



TESIS DOCTORAL:

**“ESFEROCITOSIS HEREDITARIA EN NIÑOS: ANÁLISIS DE
LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ANALÍTICAS,
TERAPÉUTICAS Y EVOLUTIVAS. EVALUACIÓN DE
NUEVAS TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS E INVESTIGACIÓN
DE FACTORES PROTROMBÓTICOS
POSTESPLENECTOMÍA”**

CARMEN PAOLA GARCÍA BLANES
Médico especialista en Pediatría y sus áreas específicas

TUTORA
ADELA CAÑETE NIETO

DIRECTORES
JUANA VALLÉS GINER
ANTONIO MOSCARDÓ MARTÍNEZ
M^aÁNGELES DASÍ CARPIO

Programa de Doctorado: 3139 Medicina
Departamento de Medicina
Facultad de Medicina i Odontología.

Mayo 2022

Gracias a todas las personas que han apoyando la tesis doctoral. Principalmente a mis directores M^a Ángeles Dasí, Juana Vallés y Antonio Moscardó de quienes he recibido un apoyo incondicional, incluso en los momentos más complicados. Adela Cañete, por todas las facilidades ofrecidas. Lourdes Córdón, Amparo Sampere, Leonor Senent y Yolanda por su especial implicación en el laboratorio. Bienvenida Argilés y Sara izquierdo compañeras especiales en el día a día. Ana Latorre y M^aTeresa Santos por su gran trabajo en el laboratorio de hemostasia. Y en especial a toda mi familia (mis padres, Joaquín, mis hijos...) por estar siempre a mi lado.

Una bella historia
os voy a contar,
un pequeño pájaro
no podía volar

De un árbol a otro
caía por las ramas,
y nunca volaba,
por más que lo intentaba

Una y otra vez,
de noche y de día,
este pajarito
con tesón insistía

Una de las veces
al suelo cayó,
se dio en la cabeza,
y se desmayó

Pero al despertar
no se avergonzó,
todo lo contrario
de nuevo lo intentó

Tanto insistió
que el milagro ocurrió
y al mover sus alas
un día voló.

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Esferocitosis Hereditaria.....	2
1.1. Concepto.....	2
1.2. Herencia.....	2
1.3. Epidemiología.....	2
1.4. Fisiopatología.....	3
1.5. Manifestaciones clínicas.....	8
1.6. Clasificación según gravedad.....	9
1.7. Diagnóstico.....	11
1.7.1. Índices de los reticulocitos.....	14
1.7.2. Resistencia globular osmótica.....	17
1.7.3. Test de unión eosina-5-maleimida.....	20
1.8. Complicaciones.....	21
1.9. Tratamiento.....	23
1.9.1. Ácido fólico.....	23
1.9.2. Transfusiones.....	24
1.9.3. Colecistectomía.....	25
1.9.4. Esplenectomía.....	26
1.10. Asociación con Enfermedad de Gilbert.....	32
1.10.1. Enfermedad de Gilbert.....	32
1.10.2. Implicaciones con Enfermedad de Gilbert.....	33
2. Inmunotrombosis y tromboinflamación. Papel de las plaquetas..	34
2.1. Plaquetas e inflamación.....	38
2.2. Compuestos inflamatorios liberados por las plaquetas.....	39

2.3. Agregados Leucocito-plaqueta y Monocito-plaqueta.....	41
2.4. Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs).....	43
OBJETIVOS.....	49
MATERIAL Y MÉTODOS.....	52
1. Diseño, ámbito y periodo.....	53
1.1. Diseño del estudio.....	53
1.2. Ámbito de realización.....	54
1.3. Periodo de estudio.....	54
2. Población de estudio.....	54
3. Obtención o extracción de la muestra.....	58
4. Variables del estudio y técnicas de laboratorio utilizadas.....	59
4.1. Características generales, clínicas, ecográficas y analíticas..	59
4.2. Técnicas de laboratorio utilizadas.....	63
4.2.1. Índices reticulocitarios.....	63
4.2.2. Test de unión de membrana eosina-5-maleimida.....	63
4.2.3. Biomarcadores inflamatorios, NETs y agregados leucocito-plaqueta y monocito- plaqueta.....	66
4.2.3.1. Biomarcadores inflamatorios y NETs.....	67
4.2.3.2. Agregados leucocito-plaqueta y monocito-plaqueta..	70
5. Métodos estadístico. Procesamiento y análisis de datos.....	71
RESULTADOS.....	73
1. Historia natural de los niños con esferocitosis hereditaria.....	74
1.1. Características generales.....	74
1.2. Características clínicas.....	78

1.3. Características ecográficas.....	79
1.4. Características analíticas.....	80
1.5. Complicaciones.....	84
1.5.1. Crisis hemolíticas.....	85
1.5.2. Crisis aplásicas.....	86
1.5.3. Crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares.....	87
1.6. Tratamiento.....	88
1.6.1. Descripción de la muestra esplenectomizada.....	93
1.7. Asociación con Enfermedad de Gilbert.....	97
1.8. Diagnóstico.....	103
1.8.1. Índices reticulocitarios.....	103
1.8.1.1. Descripción de la muestra.....	104
1.8.1.2. Resultados.....	104
1.8.2. Evaluación test EMA.....	109
2. Factores de riesgo de trombosis en niños con EH tras esplenectomía.....	111
2.1. Descripción y análisis de la muestra.....	111
2.2. Biomarcadores inflamatorios.....	123
2.3. NETs.....	127
2.4. Agregados leucocito-plaqueta y monocito-plaqueta.....	130
DISCUSIÓN.....	135
1. Historia natural de los niños con EH.....	136
1.1. Características generales.....	136
1.2. Antecedentes familiares.....	138
1.3. Ictericia neonatal.....	139

1.4. Características clínicas.....	140
1.5. Características ecográficas.....	142
1.6. Características analíticas.....	144
1.7. Complicaciones.....	146
1.8. Tratamiento.....	148
1.8.1. Transfusiones.....	149
1.8.2. Esplenectomía.....	149
1.8.3. Colectomía.....	152
2. Implicación o asociación con la Enfermedad de Gilbert.....	154
3. Implementación y análisis de pruebas analíticas con orientación diagnóstica.....	156
3.1. Índices y características de los reticulocitos.....	156
3.2. Test de unión eosina-5-maleimida.....	158
4. Factores de riesgo de trombosis en niños con EH con o sin esplenectomía.....	161
5. Limitaciones del estudio.....	176
 CONCLUSIONES.....	 178
 BIBLIOGRAFÍA.....	 182
 ANEXO (Formulario de recogida de datos).....	 220

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

AAS: Acido acetil salicílico.

ADC II: Anemia diseritropoyética congénita tipo II.

ADE: Ancho de distribución eritrocitario.

ADR : Ancho de distribución reticulocitario .

AIHA: Anemia hemolítica autoinmune.

AUC: Área bajo la curva.

CHCM: Concentración corpuscular media de hemoglobina.

CPRE: Colangiopancreatografía retrograda endoscópica.

CXCL5: C-X-C motif chemokine 5.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EDTA: Anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético.

EG: Enfermedad de Gilbert.

EH: Esferocitosis Hereditaria.

EMA: Eosina-5-Maleimida.

FRI: Fracción de reticulocitos inmaduros.

GOT: Transaminasa glutámico-oxalacética.

GPT: Transaminasa glutámico pirúvica.

H3CyT: Histona 3 citrulinada.

HCM: Hemoglobina corpuscular media.

HDL: Lipoproteína de alta densidad.

HMGB1: High-mobility group box1.

IMC: Índice de masa corporal.

L-P: Leucocito-plaqueta.

LDH: Lactato deshidrogenasa.

LDL: Lipoproteína de baja densidad.

M-P: Monocito-plaqueta.

NaCl: Cloruro sódico.

NETs: Trampas extracelulares de neutrófilos.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: Solución salina tamponada con fosfato.

PCR: Proteína c reactiva.

PDW: Ancho de distribución plaquetar.

RANTES: Regulated on activation normal T cell expressed.

RGO: Resistencia globular osmótica.

Test EMA: Test de unión de membrana eosina-5-maleimida.

TGC: Triglicéridos.

UGT1A1: Uridina difosfoglucuronato-glucuronosiltransferasa.

VCM: Volumen corpuscular medio.

VMCE: Volumen medio de células esféricas.

VMR: Volumen medio reticulocitario.

VPM: Volumen plaquetar medio.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la gravedad en la EH modificada de Eber.

Tabla 2. Recomendaciones de vacunas para niños con esplenectomía o asplenia funcional.

Tabla 3. Componentes proteicos de los NETs.

Tabla 4. Variables de las características generales, clínicas, ecográficas y analíticas.

Tabla 5. Descripción de las características generales de la muestra.

Tabla 6. Descripción y análisis estadístico de las características generales de la muestra clasificadas en función de la gravedad de EH en leve, moderada y grave.

Tabla 7. Descripción y análisis estadístico de las características clínicas clasificadas en función de la gravedad de EH en leve, moderada y grave.

Tabla 8. Descripción y análisis estadístico de las características ecográficas en función de la gravedad de EH en leve, moderada y grave.

Tabla 9. Valores medios de los parámetros de la serie roja.

Tabla 10. Valores medios de los parámetros bioquímicos.

Tabla 11. Valores medios de los parámetros de la serie roja y parámetros bioquímicos clasificados en función de la gravedad de la EH.

Tabla 12. Descripción y análisis estadístico del porcentaje de transfusión de concentrado de hematíes recibidos en función de la gravedad de la EH.

Tabla 13. Descripción y análisis estadístico de los valores medios del hemograma y parámetros bioquímicos medios pre y post esplenectomía.

Tabla 14. Descripción y análisis estadístico de las características generales en niños con EH esplenectomizados y no esplenectomizados.

Tabla 15. Descripción y análisis estadístico de las características clínicas en niños con EH esplenectomizados y no esplenectomizados.

Tabla 16. Descripción y análisis estadístico de las características ecográficas en niños con EH esplenectomizados y no esplenectomizados.

Tabla 17. Descripción y análisis estadístico del número medio de complicaciones en niños con EH esplenectomizados y no esplenectomizados.

Tabla 18. Distribución de los pacientes diagnosticados de EG en función de la gravedad de la EH.

Tabla 19. Descripción y análisis estadístico de la ictericia clínica, los cálculos biliares en ecografía, los valores analíticos de bilirrubina, las crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares y la colecistectomía clasificados por Enfermedad de Gilbert.

Tabla 20. Descripción y análisis estadístico de la ictericia, los cálculos biliares en ecografía, los valores analíticos de bilirrubina, las crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares y la colecistectomía clasificados por Enfermedad de Gilbert homocigota y heterocigota.

Tabla 21. Análisis de los valores medios de bilirrubina total, directa e indirecta en función de la EG ajustado por la gravedad EH.

Tabla 22. Análisis de los valores medios de bilirrubina total, directa e indirecta en función del subtipo EG (homocigoto) ajustado por la gravedad EH.

Tabla 23. Descripción de los índices y características eritrocitarias.

Tabla 24. Descripción de los índices y características reticulocitarias.

Tabla 25. Descripción de los Índices reticulocitarios y eritrocitarios calculados.

Tabla 26. Descripción y análisis estadístico de los índices reticulocitarios y calculados en función de la gravedad de la EH.

Tabla 27. Resultados descriptivos de los índices reticulocitarios y calculados en pacientes con EH esplenectomizados y no esplenectomizados.

Tabla 28. Evaluación del cumplimiento de los puntos de corte descritos en la literatura de los índices eritrocitarios y reticulocitarios.

Tabla 29. Descripción y análisis estadístico de los valores medios del test EMA en función de la gravedad de la EH.

Tabla 30. Descripción y análisis estadístico de los valores medios EMA en pacientes con EH esplenectomizados y no esplenectomizados.

Tabla 31. Distribución y análisis estadístico de la Edad en el grupo sano, grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 32. Distribución y análisis estadístico de la variable Sexo en el grupo sano, grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 33. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie roja en el grupo sano y grupo EH.

Tabla 34. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie roja en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 35. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie roja en el grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 36. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie blanca en el grupo sano y grupo EH.

Tabla 37. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie blanca en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 38. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie blanca en el grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 39. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie plaquetar en el grupo sano y grupo EH.

Tabla 40. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie plaquetar en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 41. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie plaquetar en el grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 42. Descripción y análisis estadístico de los biomarcadores inflamatorios (RANTES, CXCL5 y HMGB1) en el grupo sano y grupo EH.

Tabla 43. Descripción y análisis estadístico de los biomarcadores inflamatorios (RANTES, CXCL5 y HMGB1) en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 44. Descripción y análisis estadístico de los biomarcadores inflamatorios (RANTES, CXCL5 y HMGB1) en el grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 45. Descripción y análisis estadístico de los NETs (DNA y H3CyT) en el grupo sano y grupo EH.

Tabla 46. Descripción y análisis estadístico de los NETs (DNA y H3CyT) en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 47. Descripción y análisis estadístico de los NETs (DNA y H3CyT) en el grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 48. Descripción y análisis estadístico del porcentaje de agregados L-P y agregados M-P en el grupo sano y grupo EH.

Tabla 49. Descripción y análisis estadístico del porcentaje de agregados L-P y agregados M-P en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 50. Descripción y análisis estadístico del porcentaje de agregados L-P y agregados M-P en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

Tabla 51. Modelo de regresión lineal múltiple con el análisis del porcentaje medio de agregados L-P en los diferentes grupos (grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado) ajustado por número medio de plaquetas.

Tabla 52. Modelo de regresión lineal múltiple muestra el coeficiente estandarizado Beta.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición y estructura de la membrana eritrocitaria.

Figura 2. Microscopia óptica de glóbulos rojos en EH. Esferocito.

Figura 3. Fisiopatología de la esferocitosis hereditaria.

Figura 4. Comportamiento del VMCE ante solución hipo-osmolar en eritrocito y esferocito.

Figura 5. Prueba de resistencia globular osmótica. Visualización de la hemólisis en paciente sano y paciente con EH con diferentes concentraciones de NaCl.

Figura 6. Esquema de la Inmuntrombosis en los vasos sanguíneos.

Figura 7. Proceso de NETosis.

Figura 8. Tamaño muestral del primer y segundo estudio.

Figura 9. Tamaño muestral del tercer tercer estudio.

Figura 10. Pasos a seguir en la técnica de laboratorio del test EMA.

Figura 11. Pasos a seguir en la técnica de laboratorio que analiza los biomarcadores tromboinflamatorios y los marcadores de activación plaquetaria.

Figura 12. Descripción y análisis estadístico de los valores medios de CHCM y ADE en niños con EH.

Figura 13. Descripción del porcentaje de esplenectomías en los pacientes con EH.

Figura 14. Descripción del porcentaje de colecistectomías en los pacientes con EH.

Figura 15. Descripción del porcentaje de EH y EG en los pacientes de nuestra muestra, incluyendo los subtipos de EG homocigoto y heterocigoto.

Figura 16. Representación gráfica de los valores medios de EMA en el grupo leve, moderado y grave de EH. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 17. Número medio de leucocitos en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 18. Número medio de neutrófilos en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 19. Número medio de linfocitos en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 20. Número medio de monocitos en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 21. Número medio de plaquetas en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 22. Valor medio del VPM en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 23. Valor medio del PDW en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 24. Valores medios de RANTES en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 25. Valores medios de CXCL5 en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 26. Valores medios de HMGB1 en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 27. Valores medios de DNA en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 28. Valores medios de H3CyT en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

Figura 29. Porcentaje medio de agregados L-P en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. L-P: Leucocito-plaqueta.

Figura 30. Porcentaje medio de agregados M-P en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. M-P: Monocito-plaqueta.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Esferocitosis Hereditaria

1.1. Concepto

La Esferocitosis Hereditaria (EH) es una anemia hemolítica crónica que se produce por una membranopatía debida a la alteración de alguna de las proteínas de membrana del eritrocito responsable del anclaje del citoesqueleto a la membrana lipídica. Estas alteraciones confieren al hematíe una forma característica llamada forma esférica o “esferocitos”. Los esferocitos son más susceptibles de destruirse a su paso por el bazo porque tienen menor capacidad para deformarse, disminuyendo así su supervivencia (1).

1.2. Herencia

La herencia más frecuente es autosómica dominante (75%). La herencia recesiva o los casos esporádicos con mutación *de novo* son responsables del 25% restante (2).

1.3. Epidemiología

La EH es la anemia hemolítica hereditaria más frecuente en Europa y en el mundo (3). Su incidencia es mayor en el norte de Europa, población caucásica, con una incidencia de 1/2000-5000 (4-7). Pero podrían existir formas asintomáticas o muy leves que se presentan como rasgos esferocíticos que pasan desapercibidas y sólo se detectan

con técnicas diagnósticas muy sensibles, por lo que se sospecha que la prevalencia podría ser mayor (4,8,9).

1.4. Fisiopatología

El hematíe es la célula más abundante en los vasos sanguíneos, se forma en la médula ósea y tiene una vida media aproximada de 120 días. En condiciones normales el hematíe tiene forma de disco bicóncavo y no tiene núcleo. La estructura del hematíe está formada básicamente por la membrana celular, la hemoglobina y otros componentes. Su función más importante, aunque no la única, es la oxigenación de los órganos y tejidos a través de la circulación sanguínea.

La membrana del hematíe tiene, entre otras, tres funciones importantes: 1) el mantenimiento de la estructura característica del glóbulo rojo que le confiere una importante capacidad de deformarse, 2) la presencia de diversos transportadores de membrana que permiten la permeabilidad selectiva de la membrana y 3) la exposición de antígenos en su superficie que le confiere una serie de características y permite diferenciarlos de otros tipos celulares.

La composición de la membrana está formada por una doble capa lipídica (fosfolípidos y colesterol) y una estructura proteica integrada por (9) :

- Proteínas de membrana o integrales: totalmente o parcialmente sumergidas en la membrana lipídica (banda 3, glicoforinas A, B, C, D complejo Rh...).
- Proteínas estructurales: se encuentran por debajo de la bicapa lipídica en contacto con el citosol (alfa-espectrina, beta-espectrina, anquirina, proteína 4.2, proteína 4.1, proteína p55, actina, aducina, dematina, tropomiosina y tropomodulina...).

Estas proteínas se unen formando interacciones verticales o complejos verticales, entre las proteínas periféricas y las integrales, e interacciones o complejos horizontales entre las proteínas periféricas. (Figura 1) (5).

- Complejo o unión vertical anquirina: Formado por tetrámeros banda 3, complejo Rh, CD47 y glicoforina A ligando espectrina a través de anquirina y proteína 4.2.
- Complejo o unión horizontal: Formado por tetrámeros de espectrina a través de proteína 4.1 y actina se unen a dímeros banda 3, aducinas, glicoforina C, GLUT1 y estomatina.

Las uniones verticales y horizontales mantienen la estructura y la capacidad de deformarse del glóbulo rojo y regulan una adecuada elasticidad del eritrocito (10).

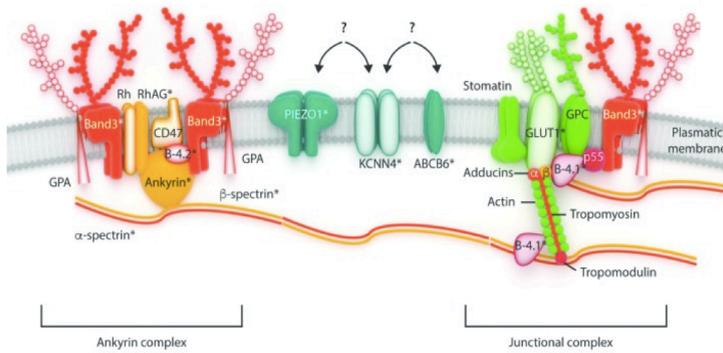


Figura 1. Composición y estructura de la membrana eritrocitaria. La membrana de los eritrocitos está compuesta por proteínas integrales incorporadas en una bicapa fosfolipídica. El entramado de proteínas del citoesqueleto está unido a la membrana y a varias proteínas transmembrana con una función transportadora. Las recientemente descritas PIEZO1, KCNN4 y ABCB6, se relacionan con la modulación de la permeabilidad de la membrana eritrocitaria. Imagen importada de Andolfo I (5).

La EH se produce por una alteración en alguna o algunas proteínas de la membrana del hematíe. Los glóbulos rojos característicos de la enfermedad se llaman esferocitos y son hematíes de forma esférica de menor diámetro que el hematíe normal que han perdido su palidez central. (Figura 2) (11).

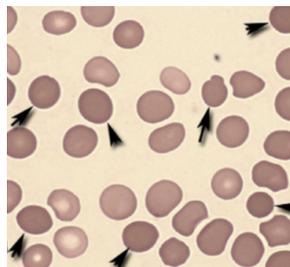


Figura 2. Microscopía óptica de glóbulos rojos en EH. Esferocitos (flechas en negro). Imagen importada de Da costa L (11).

La EH se produce por un defecto cualitativo o cuantitativo de una o varias proteínas que intervienen en las interacciones verticales, produciendo una mayor debilidad en sus uniones, produciendo una alteración de la función de la membrana del eritrocito con menor capacidad para moldearse y deformarse haciendo al eritrocito más delicado y frágil.

Las proteínas implicadas en la EH son: alfa-espectrina, beta-espectrina, anquirina 1, proteína 4.2 y banda 3. Las proteínas están codificadas por los siguientes genes: SPTA1, SPTB, ANK1, EPB42 y SLC4A1. Alguna proteína del complejo Rh también puede estar implicada.

Las alteraciones proteicas más frecuentes son anquirina 1 (50-60%) , beta-espectrina (20%), banda 3 (15-25%) y proteína 4.2 (<5%) (12,13). Las mutaciones genéticas generalmente con herencia autosómica dominante son en beta-espectrina (SPTB), anquirina 1 (ANK1) y banda 3 (SLC4A1), siendo la herencia autosómica recesiva debida a mutaciones genéticas en alfa-espectrina (SPTA1) y proteína 4.2 (EPB42) (5,6,12). Existe un 10% de mutaciones no identificadas (14).

En la EH, las interacciones verticales son débiles, perdiendo progresivamente microvesículas de la membrana, produciendo una disminución de la relación superficie/volumen del glóbulo rojo, proporcionando al hematíe la forma de esferocítica (7,13,15). Esta disminución de la relación superficie/volumen hace que los

esferocitos sean más frágiles, reduciendo su vida media al pasar por el bazo. En el bazo se aumenta la pérdida de membrana y la destrucción del hematíe por diferentes mecanismos: disminución de la glucosa, disminución de pH, aumento de las sustancias oxidantes, aumento del contacto con los macrófagos y por otros mecanismos no bien esclarecidos (figura 3) (2,7).

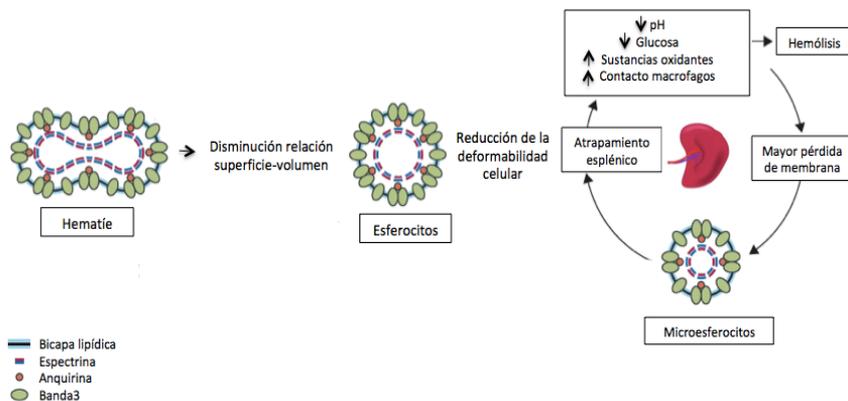


Figura 3. Fisiopatología de la EH. El hematíe tiene una pérdida de membrana con una disminución de la relación superficie-volumen formándose el esferocito. Los esferocitos a su paso por el bazo son atrapados, produciéndose la hemólisis o una mayor pérdida de membrana convirtiéndose en microesferocitos, que serán hemolizados posteriormente a su paso por el bazo de nuevo. Imagen importada y modificada de Perrota S y Gallagher PG (2,7).

1.5. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas más frecuentes son producidas por la hemólisis crónica: anemia, ictericia y esplenomegalia. Los pacientes suelen diagnosticarse en la infancia, aunque algunos casos leves-moderados se detectan en la edad adulta. Al ser una enfermedad hereditaria en muchos casos, los pacientes son derivados para su diagnóstico por los antecedentes familiares de EH.

Es una enfermedad heterogénea, probablemente debido a las múltiples mutaciones implicadas, y los pacientes pueden cursar con una hemólisis leve o moderada que la médula ósea puede compensar con una mayor eritropoyesis y así los pacientes estar asintomáticos, o cursar con una hemólisis moderada o grave que la médula ósea no sea capaz de compensar apareciendo entonces las manifestaciones clínicas. Las complicaciones agudas (crisis hemolíticas, crisis aplásicas, crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares) pueden ocurrir de forma puntual a lo largo de todo el seguimiento del paciente como procesos intercurrentes.

La ictericia o hiperbilirrubinemia neonatal que precisa fototerapia o exanguinotransfusión podría ser el debut diagnóstico de la EH. En los neonatos con un ingreso hospitalario por ictericia, se debe tener en cuenta en el diagnóstico diferencial la EH, realizando una adecuada anamnesis con antecedentes familiares y exploraciones complementarias adicionales si el paciente lo requiere. En un estudio se estima que el 1% de los neonatos con clínica de ictericia grave se

diagnosticaron de EH con una incidencia 30 veces superior a la población general (16).

Los neonatos con EH a su nacimiento tienen valores de hemoglobina que suelen ser normales, pero van disminuyendo durante los siguientes 20 días de vida valores de hemoglobina bajos que en algunas ocasiones precisan transfusión de concentrado de hematíes (17). En estos pacientes se debe mantener la vigilancia clínica y analítica, por la disminución de eritropoyesis en las primeras 8-12 semanas de vida cuando alcanza su valor de hemoglobina mínimo. La esplenomegalia es una manifestación clínica poco frecuente en los recién nacidos (18).

Las características analíticas de los pacientes con EH son una disminución de los glóbulos rojos por lo tanto un descenso de los parámetros hematológicos: hemoglobina, hematocrito y número de hematíes; sin embargo, se produce un aumento de los reticulocitos tanto en porcentaje como en valor absoluto por la eritropoyesis compensatoria. A mayor hemólisis implica una mayor disminución de hemoglobina con mayor estimulación de la médula ósea y en consecuencia aumento de reticulocitos.

1.6. Clasificación según gravedad

La clasificación modificada de Eber *et al.* para EH nos permite organizar a los pacientes en función de su gravedad según los valores de hemoglobina, reticulocitos y bilirrubina (10,19, 20) (Tabla 1). Esta clasificación de los pacientes con EH se realiza cuando el pacientes

esté estable o en situación basal para no sobreestimar la gravedad de la enfermedad.

Tabla 1. Clasificación de la gravedad en la EH modificada de Eber. (19).

	Leve	Moderada	Grave
Hb (g/dL)	11-15	8-12	6-8
Reticulocito (%)	3-5,9	>6-9,9	>10
Bil (mg/dL)	1-2	≥ 2	≥ 3

Hb: Hemoglobina, Retis: Reticulocitos.

Se clasifican en 3 grupos diferentes:

- EH leve: paciente asintomático, suele ser diagnosticado por antecedentes familiares de EH. Clínica de anemia leve o asintomático, dado que existe una eritropoyesis compensatoria adecuada, no ictericia o mínima y no se detecta esplenomegalia habitualmente.
- EH moderada: paciente con anemia entre 8-12 g/dL, con aumento de niveles de reticulocitos. Aumento de las cifras de bilirrubina con esplenomegalia palpable en la exploración física.
- EH grave: paciente sintomático con hemólisis importante. Las cifras de hemoglobina son bajas y precisan transfusiones de concentrado de hematíes ocasional o periódicamente, la eritropoyesis no consigue compensar la hemólisis a pesar del alto porcentaje de reticulocitos (>10%) .

1.7. Diagnóstico

Las pruebas analíticas y ecográficas que pueden orientar el diagnóstico en la EH son: hemograma con los parámetros eritrocitarios y reticulocitarios, parámetros bioquímicos, test de Coombs directo, la morfología de los eritrocitos en la extensión de sangre periférica y la ecografía abdominal.

Dentro de los parámetros hematológicos de los eritrocitos, la concentración corpuscular media de hemoglobina (CHCM) y el ADE son los parámetros característicos de la EH. La CHCM se define como la cantidad de hemoglobina relativa al tamaño del glóbulo rojo o hematíe. En la EH la CHCM está aumentado. El ADE informa sobre la variabilidad del tamaño de los glóbulos rojos o hematíes y en la EH suele estar aumentado. La combinación del aumento de la CHCM con el aumento del ADE es un buen predictor para el diagnóstico de EH (21). El volumen corpuscular medio (VCM) puede ser normal o estar disminuido y los reticulocitos aumentados. El resto de parámetros o índices hematimétricos se encuentran dentro de la normalidad. Los parámetros reticulocitarios los comentaremos en el apartado siguiente dado que su evaluación es uno de los objetivos de nuestro estudio.

En los parámetros bioquímicos, debido a la hemólisis crónica, se observa un aumento de bilirrubina sérica total a expensas de la bilirrubina indirecta y aumento de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). La ecografía abdominal es la prueba de imagen solicitada en los niños con EH, nos informa del tamaño del bazo y también valora

la vesícula biliar para la detección de barro o litiasis biliar. La esplenomegalia se puede detectar hasta en el 50% de los lactantes con EH en los primeros años de vida y podría llegar hasta un 75-95% en niños mayores. La ecografía se realizará de forma anual a partir de los 4-5 años y posteriormente se determinará su seguimiento ecográfico en función de la evolución del paciente (20,22).

La observación de la extensión de sangre periférica muestra esferocitos, que son hematíes más pequeños de forma esférica o redondeada e intensamente coloreados que han perdido el halo blanco central. Los esferocitos no son específicos de la EH, pueden aparecer en otras patologías como la anemia hemolítica autoinmune (AIHA), la anemia hemolítica microangiopática, el síndrome hemolítico por incompatibilidad ABO e incluso en recién nacidos sanos (18,19,23,24). En estos casos no existe una alteración intrínseca en las proteínas de membrana del eritrocito y además los parámetros o características reticulocitarias no están afectadas. El test de Coombs directo será negativo.

Las técnicas diagnósticas confirmatorias en la EH son: el test de resistencia globular osmótica (RGO) o fragilidad osmótica, el test de lisis con glicerol acidificado y el *pink* test, la citometría de flujo mediante el test de unión de membrana eosina-5-maleimida (test EMA), el estudio de deformabilidad por ectacitometría y la electroforesis de las proteínas de membrana eritrocitaria. El test de lisis con glicerol acidificado y *pink*-test, el estudio de deformabilidad por ectacitometría y la electroforesis de las proteínas de membrana

eritrocitaria no son técnicas que se realicen de forma rutinaria en muchos laboratorios, por lo que no se solicitan en la práctica clínica habitual.

La mayoría de estas pruebas valoran la capacidad de deformarse del eritrocito. El esferocito tiene una menor relación superficie/volumen lo que permite una menor entrada de agua dentro del esferocito, produciendo una hemólisis más precoz. Las pruebas que valoran dicha función son: el test de RGO, el test glicerol acidificado y el *pink* test. Sin embargo, estas pruebas no son específicas de la EH, por lo que otras patologías que cursen con esferocitos en la extensión de sangre periférica como las AIHA pueden dar un resultado positivo. Algunos pacientes con EH leve, no se detectarían con estos métodos diagnósticos dado que tienen una sensibilidad menor (25,26). Precisamos por tanto para el diagnóstico de otras pruebas con una mayor especificidad.

Existen otro tipo de pruebas más novedosas y actuales con una mayor sensibilidad y especificidad como son: la citometría de flujo mediante el test EMA, la ectacitometría de gradiente osmótico y la electroforesis de las proteínas de membrana en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico. Uno de nuestros objetivos del estudio fue la implantación por primera vez en el Hospital del test EMA centrándonos en el estudio de niños con EH, para la puesta a punto de la técnica y validación de la prueba diagnóstica.

Para un diagnóstico confirmatorio se puede realizar un estudio molecular de genes que codifica la proteína alterada de la membrana del eritrocito responsable de la EH. Esta técnica era complicada en el pasado, empleaba mucho tiempo y sólo se realizaba en laboratorios específicos, pero hoy en día se realiza mediante paneles de secuenciación masiva (NGS) de membranopatías, que agilizan y facilitan dicho trabajo.

1.7.1. Índices de los reticulocitos

Los índices y características de los reticulocitos podrían ser herramientas analíticas que permitan guiar o ayudar en el diagnóstico en los pacientes con EH.

Los cambios en la membrana se observan desde fases muy tempranas y no se alteran con la esplenectomía. El reticulocito presenta ya cambios en su morfología (27), por ello es interesante evaluar sus características o índices. En las AIHA sin embargo se ven afectados tan sólo los eritrocitos maduros, no los reticulocitos, por lo que podría ser un buen test para el diagnóstico diferencial entre EH y AIHA.

Los parámetros o índices reticulocitarios analizados son: el porcentaje o número de reticulocitos, la fracción de reticulocitos inmaduros (FRI), el volumen medio reticulocitario (VMR), el volumen medio de células esféricas (VMCE) y el ancho de distribución reticulocitario (ADR). Los pacientes con EH presentan un recuento alto del porcentaje y número de reticulocitos con una baja FRI.

El VMCE mide el volumen de los eritrocitos en condiciones o soluciones hipoosmolares (28,29). Los glóbulos rojos normales en una solución hipo-osmolar, gracias a su buena deformabilidad y a su buena relación entre superficie /volumen introducen agua en el eritrocito consiguiendo una buena expansión, aumentando así el valor de VMCE. Los esferocitos sin embargo, al tener una disminución del cociente superficie/volumen, en una solución hipo-osmolar incorporan líquido al interior celular hasta que se produce la rotura o fragmentación, disminuyendo el VMCE (figura 4). El VMCE es bajo en los pacientes con EH (30).

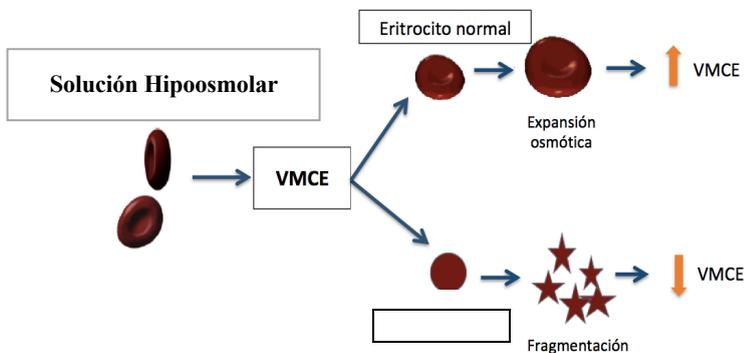


Figura 4. Comportamiento del VMCE ante solución hipo-osmolar en eritrocito y esferocito. La solución hipoosmolar expuesta al eritrocito induce su expansión y aumenta el VMCE. Sin embargo, la solución hipoosmolar expuesta al esferocito, produce su lisis o fragmentación y disminuye el VMCE.

La relación de VMCE menor que el VCM ($VMCE < VCM$) obtenida de los parámetros eritrocitarios y reticulocitarios, tiene una alta

sensibilidad (100%) y especificidad (93,3%) en los pacientes con EH y fue descrita por Chiron *et al.* (31) y posteriormente apoyada por Tao *et al.* (32).

El parámetro Delta es la diferencia entre el VCM y el VMCE (VMC-VMCE). En los pacientes con EH presenta un valor aumentado en comparación con individuos sanos. Este parámetro Delta permite identificar a los pacientes con EH (29,33–35).

El VMR en los pacientes con EH tiene valores más bajos que la población normal y podría ser útil para el diagnóstico de pacientes con EH, aunque no es la técnica que ha mostrado los mejores resultados (30,33,36). El ADR tiene valores más altos en los pacientes diagnosticados de EH.

La combinación de varios parámetros o de sus índices calculados crea nuevos algoritmos diagnósticos para la detección de pacientes con EH (24), algunos de los cuales se describen a continuación:

- Broséus *et al.* propone el criterio diagnóstico Delta (VMC-VMCE) $> 9,6$ fL, excluyendo a los pacientes con sospecha clínica de AIHA, con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90,57% para el diagnóstico de pacientes con EH (29).
- Lazarova *et al.* propone la combinación de los siguientes criterios diagnósticos con un área bajo la curva (AUC) en VMCE de 0,95, en Delta (VMC-VMCE) de 0,98 y en VMR en 0,98 (30):

$VMCE < 70,2 \text{ fL}$ o $\text{Delta (VMC-VMCE)} > 10,4 \text{ fL}$ y/o $VMR < 96,7\text{fL}$

- Arora *et al.* propone la combinación de los siguientes criterios diagnósticos (34), excluyendo a los pacientes con sospecha clínica de AIHA:

$\text{Delta (VMC-VMCE)} > 10 \text{ fL}$ y $(VMR - VMCE) < 25 \text{ fL}$.

- Nair *et al.* propone la combinación de los siguientes criterios diagnósticos para el diagnóstico de pacientes con EH con una sensibilidad del 84,2% y una especificidad de 94,7% (37):

$\text{Delta (VMC-VMCE)} > 10 \text{ fL}$ y $(VMR - VMCE) < 25\text{fL}$.

La ventaja del análisis de estos parámetros reticulocitarios es que es una técnica sencilla que se realiza empleando el contador celular Coulter al pasar la muestra del hemograma y no precisa de mayor cantidad de muestra de sangre del paciente. Es una herramienta sencilla y rápida que evaluamos como uno de los objetivos de la presente tesis para comprobar si estos parámetros reticulocitarios pueden ayudar a orientar el diagnóstico de nuestros pacientes.

1.7.2. Resistencia globular osmótica

La RGO, se basa en la valoración de la funcionalidad del hematíe ante un medio hipotónico o hipo-osmolar.

La prueba consiste en exponer a los hematíes a diferentes concentraciones de cloruro sódico (NaCl) con concentraciones cada vez más hipotónicas o concentraciones decrecientes de NaCl. La membrana del eritrocito es semipermeable, permitiendo que el agua pueda circular libremente compensando la presión osmótica del medio. Ante una solución hipotónica el eritrocito introduce agua dentro de la célula para intentar equilibrar su osmolaridad. Esta distensión y aumento de tamaño tiene un límite en el que la deformabilidad de su membrana eritrocitaria llega a su estado máximo produciéndose entonces la hemólisis del eritrocito, con la subsecuente liberación de la hemoglobina del interior del hematíe.

En los pacientes con una disminución de la relación superficie/volumen como en la EH, la lisis se producirá con concentraciones de NaCl más altas, con un medio menos hipotónico, siendo entonces positiva la prueba. Por tanto existirá una lisis anticipada respecto a su comparación con el control normal (26). Se observa visualmente en la Figura 5.

Las muestras se deben incubar al menos durante 24 horas a una temperatura de 37°C, para aumentar la fragilidad de los esferocitos produciendo una mayor hemólisis. Con la incubación de las muestras mejora notablemente la sensibilidad y la especificidad del test diagnóstico, con una sensibilidad hasta de 71,4% y una especificidad de 74,1% (38). En ocasiones el resultado de la prueba puede afectarse, con aumento de resultados negativos en pacientes con EH, por la

presencia de pocos esferocitos o por el aumento importante de reticulocitosis (25).

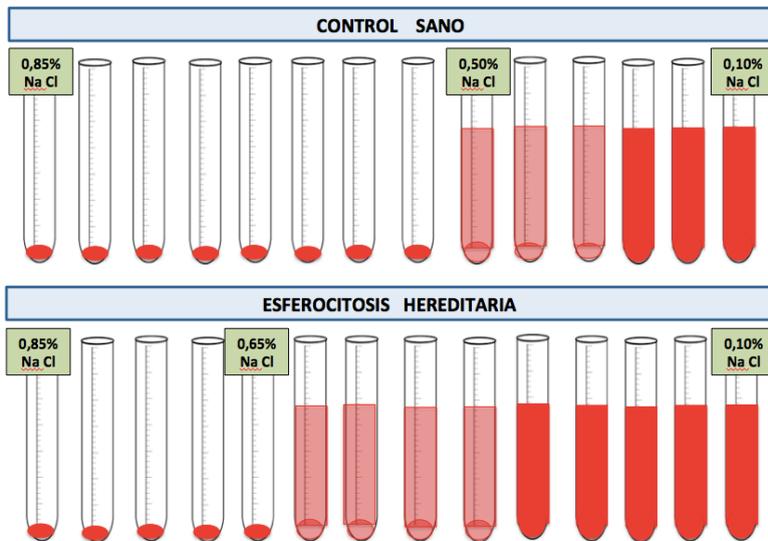


Figura 5. Prueba de resistencia globular osmótica (RGO). Visualización de la hemólisis en paciente control y paciente con EH con diferentes concentraciones de NaCl. Se observa una lisis precoz en el paciente con EH, con concentraciones de NaCl más altas en comparación con el paciente control.

La RGO es una técnica que requiere el empleo de mucho tiempo y trabajo. Además tanto la sensibilidad como la especificidad de la prueba no son demasiado buenas pese a la incubación de las muestra durante 24 horas. Por ello se decidió realizar el estudio con la nueva implantación del test EMA por citometría de flujo que posibilita valorar los resultados de la técnica y analizar su resultados en nuestros pacientes, lo que constituye uno de los objetivos de la presente tesis.

1.7.3. Test de unión eosina-5-maleimida

El test EMA es una técnica relativamente nueva que se utiliza para el diagnóstico de la EH.

El test se realiza mediante citometría de flujo y tiene como objetivo cuantificar la intensidad de la fluorescencia de los hematíes que son marcados con el compuesto eosina-5-maleimida (EMA). El EMA se une a la proteína banda 3 principalmente y algunas proteínas relacionadas con Rh, localizadas ambas en la membrana del hematíe (39).

Los pacientes diagnosticados de EH tienen una menor cantidad de membrana eritrocitaria y por tanto de banda 3, sea cual sea la proteína afectada, por lo que el EMA teñirá menos cantidad de proteínas con una disminución de la intensidad de fluorescencia en comparación con los controles sanos (25,40,41).

Las ventajas de la técnica son: el tiempo de realización es más corto que con otras técnicas diagnósticas como la RGO y requiere poca cantidad de sangre del paciente, lo que es muy importante para los pacientes pediátricos en concreto recién nacidos y lactantes, siendo la prueba más sensible y específica para el diagnóstico de EH, independientemente de la edad del paciente (10,39).

En algunas enfermedades como piropoiquilocitosis hereditaria, eliptocitosis y anemia diseritropoyética congénita tipo II (ADC II) la técnica puede obtener falsos positivos.

Es un test diagnóstico reciente que ofrece una alta sensibilidad y especificidad documentada en la literatura (41,46), variando la sensibilidad entre 93-96% y la especificidad entre 94-99%. Sin embargo, al tratarse de una técnica que no está ampliamente implantada, uno de los objetivos de esta tesis ha sido su puesta en marcha y validación en nuestro Hospital.

1.8. Complicaciones

Las complicaciones durante el seguimiento son las crisis hemolíticas, crisis aplásicas, crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares o crisis megaloblásticas.

Las crisis hemolíticas son las más frecuentes y se desencadenan generalmente por un estímulo externo, que en la mayoría de los casos son infecciones concomitantes, frecuentemente infecciones víricas comunes en la edad pediátrica. No hay un virus específico que desencadene la crisis hemolítica. Durante la crisis hemolítica tiene lugar una hemólisis más grave con disminución de hemoglobina y aumento de bilirrubina a expensas de bilirrubina indirecta, que no es posible compensar con la eritropoyesis medular con cifra y porcentaje de reticulocitos aumentados. Clínicamente los pacientes presentan mayor astenia, ictericia y esplenomegalia. Generalmente son leves o moderadas y se pueden manejar vía ambulatoria, pero en ocasiones cuando la anemia es importante requiere transfusión de concentrado de hematíes e ingreso hospitalario. En ocasiones puede ser el motivo del diagnóstico de la EH en las formas leves (43).

Las crisis aplásicas son menos frecuentes, suelen ser debidas a la infección del parvovirus b19 en aproximadamente un 70-80%(44,45) que infecta selectivamente a los progenitores hematopoyéticos de médula ósea, concretamente a los precursores eritroides (46). Clínicamente se manifiesta con astenia y cansancio por disminución de hemoglobina, con una parada a nivel medular o inhibición de la eritropoyesis con disminución del número o porcentaje de reticulocitos. Puede existir una leve disminución del número de leucocitos y plaquetas de manera concomitante. El tratamiento es la vigilancia clínica hasta que el sistema inmune del paciente logre vencerlo, aunque lo habitual es que precisen transfusión de concentrado de hematíes durante su ingreso.

La crisis más frecuente relacionada con la formación de cálculos biliares es la litiasis biliar sintomática o cólico biliar, que cursa con dolor abdominal intenso en el cuadrante superior derecho mantenido en el tiempo asociando en ocasiones con cortejo vegetativo con náuseas y vómitos: el tratamiento agudo fundamental es la analgesia, los antiinflamatorios no esteroideos son de elección en estos pacientes. Existen otro tipo de enfermedades relacionadas con los cálculos biliares, aunque son complicadas. Como ejemplo están la coledocolitiasis, la colecistitis, la colangitis y la pancreatitis, que son entidades poco frecuentes y requieren un tratamiento diferente (15).

El tratamiento puede ser la colecistectomía vía laparoscópica o en algunas ocasiones la colangiopancreatografía retrograda endoscópica (CPRE) cuando el cálculo se encuentra en los conductos biliares a

nivel distal. Los cálculos biliares se observan con mayor frecuencia en hemólisis crónica en sus formas graves o patología concomitante asociada como la Enfermedad de Gilbert (EG) (47).

Por último las crisis megaloblásticas pueden ser debidas a un déficit vitamínico, en concreto al déficit de ácido fólico. Aunque es rara la presentación clínica en nuestro medio dada la alimentación equilibrada y la dieta habitual que incluye alimentos con ácido fólico y por el suplemento farmacológico de ácido fólico pautado por el médico.

1.9. Tratamiento

1.9.1. Ácido fólico

Todos los niños deben llevar una dieta adecuada y equilibrada para su edad. En los pacientes diagnosticados de EH debemos comprobar que son adecuados los suplementos de ácido fólico en la dieta, de no ser así se suplementará con ácido fólico.

Algunas guías recomiendan la suplementación de ácido fólico en el grupo de EH moderada y grave (10,15) por el aumento de eritropoyesis medular en estos pacientes. La dosis recomendada de ácido fólico oscila entre 1-5 mg/día en función de los niveles plasmáticos. Para las personas con EH leve se recomienda una dieta rica en frutas y verduras. Los niveles de ácido fólico plasmático se deben solicitar en la analítica de estos pacientes para conocer si es necesario o no suplementar con tratamiento farmacológico.

1.9.2. Transfusiones

Las transfusiones de concentrado de hematíes se utilizan en los pacientes con una hemólisis moderada y grave sintomática. La transfusión suele realizarse de manera puntual, y tan sólo en los casos muy graves de manera periódica.

En la etapa neonatal la clínica de hiperbilirrubinemia puede ser severa, precisando tratamiento con fototerapia doble e incluso en ocasiones exanguinotransfusión durante las primeras semanas de vida, posteriormente pueden precisar aisladas transfusiones durante los primeros meses de vida, disminuyendo las necesidades transfusionales a partir del año de vida (18,20).

Los pacientes diagnosticados de EH, cuando presentan alguna complicación aguda como crisis hemolítica, aplásica o relacionada con la formación de cálculos biliares, podrían precisar transfusión de concentrado de hematíes de forma aislada. Lo más frecuente es en las crisis aplásicas.

Estos pacientes habitualmente no tienen sobrecarga férrica ni precisan tratamiento quelante del hierro, pero se podría emplear en algunos pacientes que además de presentar un aumento de la absorción de hierro intestinal por la anemia crónica, presenten una hemólisis grave y transfusiones periódicas con sobrecarga férrica detectada en las exploraciones analíticas (48).

1.9.3. Colecistectomía

La colecistectomía está indicada en los pacientes con litiasis biliar sintomática y complicaciones relacionadas con la formación de los cálculos biliares, valorando la recurrencia de los episodios y el tamaño de los cálculos.

En la programación de la esplenectomía de un paciente con EH, debe ser valorada la opción de realizar conjuntamente una colecistectomía sólo si el paciente lo requiere por la presencia de cálculos biliares o barro biliar con complicaciones agudas relacionadas con la formación de los cálculos biliares, pero no de manera profiláctica. La esplenectomía mejora la hiperbilirrubinemia por disminución de la hemólisis crónica y sus complicaciones. En los pacientes con EH que tienen litiasis biliar asintomática detectada por ecografía se recomienda un seguimiento ecográfico estrecho (10,49,50).

1.9.4. Esplenectomía

La esplenectomía es el tratamiento más efectivo permitiendo disminuir la hemólisis crónica y sus complicaciones(51), pero no está libre de efectos secundarios como el mayor riesgo de sepsis o infecciones por gérmenes o bacterias encapsuladas (*Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*). Aunque también presentan mayor riesgo de infecciones por *Babesia*, *Bordetella* y especies de *Capnocytophaga* (14,51).

La indicación de la esplenectomía se realiza en pacientes con hemólisis moderada-grave y/o con requerimientos transfusionales periódicos. Se debe intentar retrasar la cirugía hasta los 6 años por el riesgo de sepsis post-esplenectomía (10), que es mayor cuando menor es la edad del paciente. Tras la esplenectomía mejora la anemia y la ictericia, la cifra de reticulocitos disminuye a valores normales o un poco por encima del límite normal. El número de plaquetas aumenta tras la esplenectomía, sin un patrón de comportamiento claro estudiado en la literatura, pero con tendencia a disminuir con el paso del tiempo. La esplenectomía no corrige la forma esferocítica de los hematíes, pero impide su lisis a nivel esplénico.

La vía de abordaje quirúrgica recomendada es la esplenectomía vía laparoscópica, dada la menor tasa de complicaciones y la recuperación más rápida con estancias hospitalarias más cortas (52–54). La indicación de la esplenectomía es total, excepto en los niños menores de 6 años que es recomendable realizar una esplenectomía parcial, disminuyendo el riesgo de sepsis. En la esplenectomía parcial, el bazo no extirpado puede volver a regenerarse y crecer con el paso del tiempo, empeorando la clínica de hemólisis crónica siendo entonces indicación de esplenectomía total (20,51,55–57).

Tras la realización de la esplenectomía se produce un aumento del riesgo de sepsis o infecciones por gérmenes o bacterias encapsuladas. Este riesgo suele ser mayor durante los primeros años tras la esplenectomía. Actualmente debido a la vacunación preventiva y el

tratamiento antibiótico profiláctico con penicilina tras la esplenectomía ha disminuido el riesgo de infecciones y sepsis (58,59).

El calendario vacunal debe ser revisado y actualizado en cada paciente previo a la realización de la esplenectomía (Tabla 2) (60). La vacunación debe realizarse 15 días mínimo previo a la cirugía.

Tabla 2. Recomendaciones de vacunas para niños con esplenectomía o asplenia funcional (60).

Vacunación recomendada	
Neumococo	PCV13 PPSV23
Haemophilus influenzae tipo b	Hib
Meningococo serotipo ACWY	MenACWY
Meningococo serotipo B	MenB-FHbp
Gripe	Vacuna estacional*

*Vacunación anual

El tratamiento antibiótico profiláctico diario con penicilina o amoxicilina, se debe mantener al menos durante el primer año post-esplenectomía o hasta que el niño cumpla 5 años de edad (14). Posteriormente se evaluará a cada paciente de forma individualizada valorando las complicaciones, infecciones o sepsis ocurridas, adherencia al tratamiento y control de su enfermedad para evaluar la duración adecuada del mismo (51).

Otro de los efectos tras la esplenectomía es el aumento del riesgo trombótico (61–65). El incremento del riesgo de trombosis con el paso del tiempo en pacientes adultos con EH a los que se les realiza una

esplenectomía es conocido (66), aunque en los niños existen pocos estudios y no está bien definida su incidencia (56). De esta forma, aunque la esplenectomía es el tratamiento más efectivo de la EH, podría estar asociado con un mayor riesgo de trombosis a largo plazo, sin conocer en la actualidad cuál es el mecanismo fisiopatológico que lo produce. El estudio de estos mecanismos constituye uno de los objetivos de la presente tesis.

Se han descrito por un lado complicaciones tromboembólicas venosas: trombosis venosas profundas, embolia pulmonar, trombosis vena esplénica o portal y en otras localizaciones raras (67,68). Por otro lado se han descrito eventos arteriales e hipertensión pulmonar arterial, pero este último actualmente es un tema controvertido en la literatura (69–71).

En los niños no se realiza tromboprofilaxis de manera habitual, pero se monitoriza el número de plaquetas, por la trombocitosis reactiva tras las esplenectomía. Aunque no está claro si ésta puede aumentar el riesgo de trombosis (72), se puede establecer que si el número de plaquetas es muy elevado ($>1.000.000$) o el paciente tiene algún factor de riesgo asociado, se puede iniciar tratamiento farmacológico con un antiagregante, normalmente ácido acetil salicílico (AAS).

Se han realizado estudios para investigar cuál o cuáles son los mecanismos fisiopatológicos encargados de inducir un mayor riesgo de trombosis en pacientes con EH esplenectomizados a largo plazo, sin llegar a una conclusión evidente.

Se realizaron estudios que valoraban la implicación de alteraciones de la de coagulación (dímeros D, proteína C, proteína S, antitrombina III, anticoagulante lúpico, anticuerpo anti-cardiolipina, fibrinógeno, homocisteína) y de la inflamación (proteína C reactiva), observando niveles elevados de proteína c reactiva (PCR), Dímeros D, homocisteína y fibrinógeno (73,74) como posibles factores pro-trombóticos tras esplenectomía en pacientes con EH.

El metabolismo lipídico también es evaluado en otros estudios, evidenciando un aumento de colesterol total y LDL en los pacientes con EH esplenectomizados frente a los EH no esplenectomizados (73). Las anemias hemolíticas crónicas tienen un incremento del recambio celular debido a la disminución de la vida media de los esferocitos en el torrente circulatorio a su paso por el bazo. Este aumento del recambio celular supone una mayor utilización del colesterol como materia prima en la formación de las membranas celulares(75). Las anemias hemolíticas tienen una disminución de los valores analíticos de colesterol, pero en los pacientes con EH esplenectomizados disminuye la hemólisis produciéndose un aumento de los valores del colesterol plasmático(76–78) Este aumento de colesterol podría estar implicado en el aumento del riesgo trombótico.

La bilirrubina tiene funciones protectoras en la vasculatura sanguínea como detener el crecimiento de las células musculares y frenar la activación endotelial, implicando un efecto antiinflamatorio en el proceso aterosclerótico (79–83) Las anemias hemolíticas, entre ellas la EH, producen hiperbilirrubinemia que podría ser un factor protector

frente a las enfermedades cardiovasculares, pero en las formas graves tras la esplenectomía los valores elevados de bilirrubina disminuyen.

La viscosidad de la sangre puede estar implicada en un aumento del riesgo trombótico. El aumento de parámetros hematológicos de la serie roja (hemoglobina, hematocrito o recuento de hematíes) se ha evaluado en algunos estudios como posible factor de riesgo de complicaciones vasculares o trombóticas, aunque su relación no está bien definida (84). En los pacientes con EH esplenectomizados se observa un aumento de los parámetros de la serie roja mencionados por disminución de la hemólisis crónica (73).

El aumento de algunos tipos celulares puede estar en relación con un aumento del riesgo de trombosis. El incremento en el número de leucocitos en el torrente circulatorio podría suponer un potencial riesgo de enfermedad cardiovascular (85,86). El aumento de la cifra de plaquetas o trombocitosis reactiva tiene lugar tras la esplenectomía en pacientes con EH, y podría favorecer o contribuir en la trombosis, aunque no está asociado como claro factor de riesgo trombótico, precisando en la actualidad más estudios de investigación al respecto (74,87).

Existen determinadas patologías o enfermedades que son factores de riesgo cardiovascular bien establecidos y reconocidos. Por ejemplo: la alteración del metabolismo lipídico o dislipemia, la elevación de la tensión arterial o hipertensión, diabetes mellitus, el sobrepeso o la obesidad ligada a una dieta inadecuada con disminución de ejercicio

físico. Todo ello contribuye a lesionar progresivamente los vasos sanguíneos lo que incrementará el riesgo de trombosis. Estas enfermedades producen una elevada mortalidad (88) y además son factores modificables con las indicaciones terapéuticas del médico (89).

Estas patologías o enfermedades son mucho menos prevalentes en la población pediátrica, aumentando su incidencia conforme se incrementa la edad del paciente. Los niños son por tanto la población idónea para estudiar posibles nuevos factores de riesgo de trombosis en las mejores condiciones, evitando otros posibles factores de riesgo trombotico y cardiovascular que tienen una incidencia elevada en la edad adulta.

Se desconoce la fisiopatología concreta del proceso por el que existe un mayor riesgo de trombosis en pacientes EH esplenectomizados a largo plazo, por ello se deberían realizar más estudios en el conocimiento de este campo (61,90) Se estudia por primera vez en nuestra investigación cual podría ser el proceso fisiopatológico que aumenta el riesgo de trombosis en pacientes EH esplenectomizados escogiendo la población infantil por su baja tasa de comorbilidades y factores tromboticos (hipertensión, hiperlipidemia, obesidad, enfermedades autoinmunes, enfermedades oncológicas).

1.10. Asociación con enfermedad de Gilbert

1.10.1. Enfermedad de Gilbert

La EG es una patología hereditaria benigna que consiste en clínica de ictericia leve intercurrente producida por una menor capacidad de glucoronización hepática de la bilirrubina, produciendo un aumento de bilirrubina indirecta. Tiene una prevalencia que varía entre 4-16% de la población global (91,92), que podría estar infraestimada puesto que la clínica de estos pacientes suele pasar inadvertida.

Suele diagnosticarse en el adolescente o adulto joven, con predominio en el sexo masculino. La herencia es autosómica recesiva con penetrancia incompleta, aunque se han descrito casos de mutaciones en heterocigosis con cifras de bilirrubina aumentadas (93). La mutación es en la región promotora del gen UGT1A1, gen responsable de codificar la enzima uridina difosfoglucuronato-glucuronosiltransferasa 1A1 (UGT1A1). La mutación de la enzima UGT1A1 reduce su actividad enzimática hasta en un 30% con disminución de la conjugación de la bilirrubina en ácido glucurónico.

Se manifiesta clínicamente con ictericia leve intercurrente tras diferentes estímulos que lo desencadenan como por ejemplo: el estrés, el ayuno, la deshidratación, la fiebre o el esfuerzo físico. El aumento de bilirrubina indirecta en las exploraciones complementarias suele ser leve, con normalidad de las enzimas hepáticas y de la serie roja en el hemograma. En algunos pacientes se observa litiasis biliar asintomática o sintomática en la ecografía abdominal. Los pacientes

con EG pueden asociar otras enfermedades concomitantes que incrementen las cifras de bilirrubina como las anemias hemolíticas crónicas o algunas enfermedades hepáticas, aumentando el riesgo de litiasis biliar.

El diagnóstico de la EG es de exclusión, descartando enfermedades hepáticas o hemolíticas. También existen pruebas genéticas moleculares (94) que nos muestran la herencia de la enfermedad, pero no están disponibles en todos los centros sanitarios. La evolución clínica es favorable y no requiere ningún tratamiento.

1.10.2. Implicaciones de la asociación enfermedad de Gilbert y esferocitosis hereditaria

La asociación de EH y EG puede ser frecuente por la alta prevalencia de la EG y que esta infraestimada por la poca sintomatología clínica de la enfermedad. Esta asociación es importante porque implica el aumento de valores de bilirrubina indirecta y mayor riesgo de formación de cálculos biliares (47,95). Por ello solicitar el diagnóstico de EG en pacientes con EH que presenten una ictericia importante o hallazgos de cálculos biliares o barro biliar por ecografía abdominal con escasa hemólisis, podría orientarnos en el seguimiento y tratamiento a largo plazo (96).

La EG y la EH en un mismo paciente, produce ictericia más llamativa y cifras de bilirrubina indirecta más altas de lo habitual (97), debido por un lado a la menor capacidad de glucoronización hepática que

produce un aumento de hiperbilirrubinemia por la EG y por otro lado por la hemólisis crónica producida por la EH.

El riesgo de colelitiasis es mayor en los pacientes diagnosticado de EG que asocian otra enfermedad concomitante como EH (47), talasemia mayor (98) o anemia de células falciformes (99). También se describe la aparición de litiasis biliar a una edad más temprana en pacientes diagnosticados tanto de EH como de EG (22).

Por tanto es importante solicitar el diagnóstico genético de EG en pacientes con un aumento de bilirrubina indirecta discordante con los niveles de hemoglobina (96). Los pacientes diagnosticados de EH con la coexistencia de la EG, deben llevar un seguimiento ecográfico estrecho para evaluar la formación de litiasis o barro biliar, para conseguir un mejor control y seguimiento de las complicaciones y tratamiento terapéutico. Para un mayor conocimiento de la implicación de la EG en los pacientes con EH, se evalúa y analiza en nuestros pacientes con EH como uno de los objetivos de la presente tesis.

2. Inmunotrombosis y tromboinflamación. Papel de las plaquetas

La Inmunotrombosis es definida por Engelman y Massberg como una respuesta inmunitaria que implica la formación de un microtrombo a nivel de los vasos sanguíneos, favoreciendo el reconocimiento, atrapamiento y la destrucción de los microorganismos patógenos

(100). Es decir el sistema hemostático y la trombosis tiene un papel fisiológico en la respuesta inmunitaria.

Antes se pensaba que el sistema hemostático liderado por las plaquetas sólo se limitaba al campo de la hemostasia y el sistema inmunológico liderado por los leucocitos se limitaba al campo de la inmunidad frente a microorganismos. Hoy en día se conoce que son procesos íntimamente relacionados entre sí en los que sus principales representantes celulares (plaquetas y leucocitos) tienen influencia tanto en la coagulación como en la inmunidad.

Este mecanismo de inmunotrombosis descrito está regulado, y ante una infección se activa el sistema hemostático e inmune para la formación del coagulo y destrucción del patógeno. En la Figura 6 se muestra como las plaquetas, los neutrófilos y los monocitos activan la coagulación de la sangre y la inmunotrombosis en los vasos sanguíneos durante la respuesta inmunitaria (101). Esta interacción de las plaquetas con otras células y el endotelio vascular puede representar una conexión entre inflamación y trombosis (102).

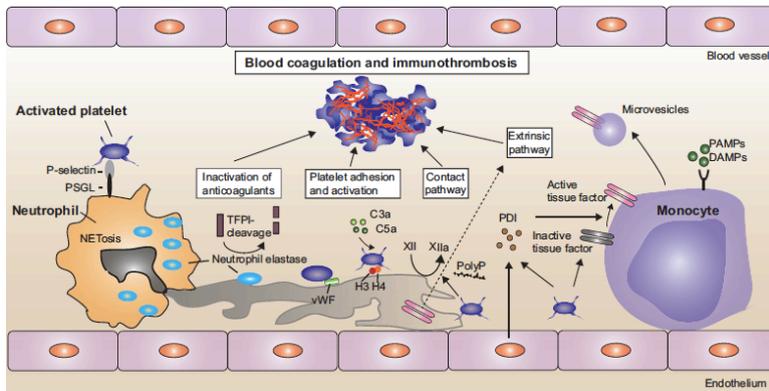


Figura 6. Esquema de la inmunotrombosis en los vasos sanguíneos. Las plaquetas activadas interactúan con las células de su entorno mediante uniones físicas mediadas por receptores específicos, pero también a través de la liberación de distintos intermediarios. De esta forma modulan la función de estas células y regulan la respuesta inmune y la inflamatoria. Imagen importada de Gaertner F. (101).

La participación de las plaquetas en la inmunotrombosis y tromboinflamación es clave. La activación plaquetar produce mayor inflamación con la secreción de citoquinas y mediadores inflamatorios que influyen en la función y activación leucocitaria, favorecen la unión de diferentes formas celulares como agregados heterotípicos (agregados leucocito-plaqueta (L-P) o monocito-plaqueta (M-P)) y regulan la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) para conseguir una adecuada respuesta inmune. Los NETs participan en la formación de trombos, dado que se encuentran presente en las lesiones vasculares con daño endotelial (103) y sus sustancias proinflamatorias secretadas producen una activación plaquetaria y formación de fibrina (104,105).

Por tanto procesos como la trombosis, la inmunidad y la inflamación son conceptos estrechamente ligados. De esta forma, y como ocurre en tantos otros procesos fisiopatológicos, nos estaríamos moviendo en un equilibrio entre una respuesta beneficiosa y una patológica, de forma semejante a lo que ocurre por ejemplo en la hemostasia. Por ejemplo, la invasión de un patógeno desencadenaría una respuesta que implicaría la formación de microagregados para favorecer su atrapamiento y eliminación por el sistema inmune, con formación de NETs y liberación de sustancias inflamatorias. Sin embargo este proceso también puede desencadenarse por un estado inflamatorio, que conduce a un estado activado de las plaquetas y el sistema hemostático en general, lo que a su vez daría lugar a la formación de NETs, que finalmente desembocarían en un proceso trombótico.

De hecho este concepto de inmunotrombosis se cree que podría ser uno de los mecanismos que podrían participar en la formación de trombos en la vasculatura de pacientes con infección COVID-19 (101,106). Pero también se han visto implicados en accidentes cerebrovasculares, infarto de miocardio y tromboembolismo venoso (101).

Pero no sólo las plaquetas y leucocitos participan en estos procesos, recientemente también se ha demostrado que los eritrocitos pueden tener un papel importante como reguladores de la inflamación. La función principal de los glóbulos rojos es el transporte e intercambio gaseoso sin embargo, actualmente conocemos que las funciones de los eritrocitos abarcan muchos más campos y que como hemos dicho

pueden jugar un papel importante en la hemostasia, la trombosis o la inflamación.

Se han descrito citoquinas asociadas a los eritrocitos que podrían estar relacionadas con la función inmune o inflamatoria (107). Los eritrocitos mediante dichas citoquinas pueden regular la función inmunitaria (108) y también pueden incrementar la funcionalidad de las plaquetas, contribuyendo a una mayor actividad procoagulante con la formación de trombos y alteración de la microvasculatura (109). No se conoce si la EH, con su alteración específica de las proteínas de membrana eritrocitaria y su hemólisis crónica, podría relacionarse en mayor o menor medida con el mecanismo de inmuntrombosis o tromboinflamación.

2.1. Plaquetas e inflamación

Las plaquetas son células discoideas sin núcleo formadas en la médula ósea a partir de la fragmentación del citoplasma de los megacariocitos. Las plaquetas viajan por los vasos sanguíneos y son destruidas por el sistema mononuclear fagocítico en el bazo e hígado. El número aproximado de plaquetas en sangre es entre 150.000-400.000 por Microlitro con una vida media de aproximadamente 7-10 días (110).

Las plaquetas contienen tres tipos de gránulos: gránulos alfa, gránulos densos y lisosomas. Estos gránulos contienen entre otras sustancias moléculas proinflamatorias. Los gránulos se liberan por exocitosis al exterior cuando se produce la activación plaquetaria. De esta forma, a

través de la liberación de su contenido granular, las plaquetas pueden participar en múltiples aspectos de la fisiopatología, desde la regulación de la hemostasia, hasta el control del proceso inflamatorio o la respuesta inmune.

2.2. Compuestos inflamatorios liberados por las plaquetas

Los gránulos alfa de las plaquetas liberados tras la activación plaquetar son los más abundantes y diversos, con una importante variedad de factores y sustancias pro-y anti-inflamatorias que podrían justificar ser responsables del papel jugado por las plaquetas en diferentes procesos biológicos (111). La activación plaquetar produce la liberación de los gránulos pero también libera otras moléculas como pueden ser los ácidos nucleicos, las micropartículas y otros compuestos que sintetiza la plaqueta como el tromboxano (TXA₂ que es sintetizada en la plaqueta por la ciclooxigenasa 1 (COX-1)). EL TXA₂ estimula la agregación de las plaquetas al trombo en formación y contrae las células del músculo liso vascular. El AAS es el fármaco que bloquea la COX-1.

Además los gránulos alfa contienen receptores que facilitan la interacción entre diferentes tipos celulares y también con el endotelio. Por ejemplo, la exposición en la membrana plaquetaria del receptor P-selectina permite que se una al endotelio y otros tipos celulares en una respuesta mediada por la P-selectina ligando (PSGL), y así favorece el reclutamiento de diferentes células (monocitos, neutrófilos y linfocitos) para generar la respuesta inflamatoria (112,113).

La unión del fibrinógeno al receptor GPIIb/IIIa activado de las plaquetas facilita la formación de agregados plaquetares (114). Al igual que se agregan las plaquetas se pueden unir a diferentes células, formando los agregados heterotípicos L-P y M-P, siendo relevantes como marcadores específicos de activación plaquetar.

Además las plaquetas modulan la respuesta funcional y la activación de los leucocitos y monocitos mediante la liberación de citoquinas inflamatorias procedentes de las plaquetas. Veamos brevemente el papel jugado por algunas de estas citoquinas, que nos han parecido especialmente interesantes para el estudio de la EH.

RANTES y CXCL5 son citoquinas con función inflamatoria liberadas por las plaquetas en diferentes situaciones tras la activación plaquetar. RANTES o también llamada CCL5 tiene características proinflamatorias y se encarga de reclutar leucocitos en el lugar de la inflamación (115) y activación de los monocitos (116). Además se ha investigado su relevancia en las infecciones, en procesos ateroscleróticos, accidentes cerebrovasculares y en enfermedades oncológicas entre otros (115–117).

CXCL5 o también llamada ENA 78 es una citoquina proinflamatoria con función de estimular la activación y quimiotaxis de los neutrófilos, mediante la transferencia de dichas moléculas a la superficie endotelial del vaso sanguíneo. Esta citoquina se ha estudiado y relacionado con otras enfermedades inflamatorias como la diabetes, la obesidad, la arterosclerosis y síndromes coronarios agudos

entre otros (118–120). Sin embargo no se ha podido establecer un claro mecanismo fisiopatológico hasta el momento.

La HMGB1 es una proteína nuclear no específica de las plaquetas y actúa como citoquina mediadora de inflamación. La activación plaquetar libera HMGB1 produciendo la activación de los neutrófilos, implicados en la función inmune mediante la formación de NETs (121). Se ha relacionado su implicación en la esclerosis sistémica y en su relación con el riesgo trombótico en ratones (122–124).

Las plaquetas como hemos dicho anteriormente participan en el sistema inmune. En un proceso séptico pueden activar a los neutrófilos mediante Toll like receptor-4 (TLR4), así estos pueden realizar su función inmune o de defensa frente al patógeno (125). Además las plaquetas pueden tener relación con las células de Kupffer hepáticas para controlar las infecciones sistémicas desencadenadas por diferentes patógenos entre ellos *Staphylococcus aureus* meticilin resistentes (126). Y también mediante la formación de NETs que explicaremos en el apartado siguiente 2.4.

2.3. Agregados Leucocito-plaqueta y Monocito-plaqueta

Los agregados heterotípicos L-P y M-P son marcadores específicos de la activación plaquetar *in vivo* (127) y se forman cuando se unen durante las reacciones inmunes, inflamatorias o trombóticas (128). El agregado L-P se produce por la unión mediante la P-selectina, que es una proteína que se expone en la superficie de la plaqueta activada, en situación basal la plaqueta almacena dicha proteína en la membrana

de los gránulos alfa. La unión se estimula por diversas sustancias inflamatorias o citoquinas y está mediada por la unión de receptores y ligandos expresados en las membranas de los distintos tipos celulares (129).

Un proceso semejante tiene lugar para la formación de agregados M-P. Los agregados M-P se inducen tras la activación plaquetar al producirse un daño en la vasculatura, un proceso inflamatorio o una infección. Se produce una activación y liberación de sustancias inflamatorias o citoquinas (130). Estos mediadores inflamatorios van a favorecer la activación de los distintos tipos celulares, lo que a su vez va a conducir a la formación de agregados heterotípicos entre plaquetas y leucocitos o monocitos, principalmente.

Los dos tipos de agregados se detectan mediante citometría de flujo y pueden servir como marcadores de activación plaquetar in vivo (131).

Estos agregados L-P y M-P pueden relacionarse con la lesión vascular implicando un mayor riesgo trombótico, incluidos los accidentes cerebrovasculares y síndromes coronarios agudos (103,132–140). Aunque también se han relacionado con diferentes patologías como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, vasculitis asociadas con anticuerpos contra citoplasma de los neutrófilos, infecciones o sepsis (141–144).

Los agregados heterotípicos L-P y M-P tienen también otra función como su implicación en la regulación de la formación de NETs.

2.4. Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)

Los neutrófilos son células con núcleo lobulado con cromatina y gránulos donde se almacenan las enzimas líticas y proteínas antimicrobianas. Habitualmente se encuentran en los vasos sanguíneos pero cuando existe algún proceso inflamatorio o infeccioso se pueden extravasar en un proceso mediado por sustancias inflamatorias o citoquinas. Su función inmune mediante los procesos de fagocitosis de los patógenos y la liberación o excreción de productos bactericidas es conocida desde hace muchos años. Actualmente se conocen otras funciones de los neutrófilos como su implicación en procesos inflamatorios de los vasos sanguíneos y su participación en la trombosis, involucrándose estas células en la tromboinflamación y la inmuntrombosis.

Los NETs se describieron en 2004 por Brinkmann *et al.* (145). En origen los NETs se implicaron en la respuesta inmunitaria frente a las infecciones o sepsis por diferentes microorganismos, actuando como una red capaz de atrapar a los patógenos, favoreciendo su eliminación (146). El microorganismo activa a los neutrófilos y se produce entonces un tipo de muerte celular conocido como NETosis con la consecuente liberación de ácido desoxirribonucleico (DNA) e histonas como la histona 3 citrulinada (H3CyT), formando una red o malla que atrapan al microorganismo y lo consiguen eliminar. A esta malla o red se le denomina trampa extracelular de neutrófilos o NETs. Por otro lado el neutrófilo tiene sustancias o proteínas antimicrobianas que

favorecen la eliminación del patógeno y se pueden visualizar tras la muerte celular del neutrófilo en los NETs (147).

Los NETs se producen por la muerte celular del neutrófilo o NETosis (148), en un proceso en el que la cromatina se descondensa mediante la citrulinización de las histonas, se destruye la membrana nuclear y por último se rompe la membrana plasmática del neutrófilo, saliendo al exterior la malla o red de DNA, histonas y proteínas pro-inflamatorias. La NETosis es un proceso diferente a la apoptosis y a la necrosis (Figura 7).

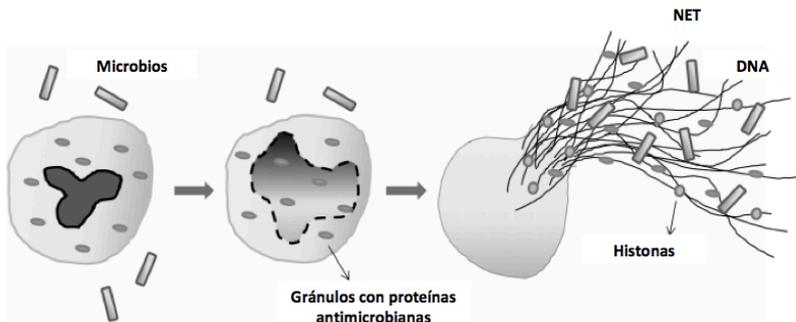


Figura 7. Proceso de NETosis. La exposición a un patógeno o microbio inicia el proceso de NETosis, se descondensa la cromatina, se rompe la membrana tanto nuclear como plasmática, expulsando una especie de red extracelular formada básicamente por DNA, decorada con histonas y diversos enzimas proteolíticos y antimicrobianos. Importada y modificada de Camicia G. (149).

Los NETs además de tener una función de respuesta inmune frente a un microorganismo (bacteria, virus...), se han relacionado con enfermedades inflamatorias o autoinmunes (artritis reumatoide, lupus

eritematoso sistémicos, enfermedades de vasculitis de pequeño vaso, preeclampsia) o enfermedades cardiovasculares (diabetes, aterosclerosis) y cáncer (150–154).

Actualmente se desconoce el proceso o la fisiopatología exacta de la implicación de los NETs en estas patologías, pero es conocido que los NETs pueden participar en la activación de la hemostasia primaria (activación plaquetar). Fuchs *et al.* describió además de la malla o red como factor de riesgo trombótico, había sustancias en ella que promovían la activación y agregación plaquetar, adherían los glóbulos rojos y proteínas que eran responsables de estabilizar el trombo como el factor von willebrand, fibronectina y fibrinógeno (105).

Los NETs además de la activación plaquetar, también participan en la activación de la hemostasia secundaria (activación de la coagulación mediante el factor tisular), implicándose ambos en la activación plaquetar y la coagulación en los procesos inflamatorios y trombóticos (100,155,156) .

Los NETs participan en la activación plaquetar y esta activación plaquetar induce a su vez la formación de NETs, en un mecanismo bidireccional. Por lo que los NETs y las plaquetas están implicados en la formación del proceso trombótico (125,157,158).

La producción de NETs puede ser por sustancias químicas, biológicas o por la activación plaquetar. Los químicos son: el oxido nítrico, quimiocina 8 (IL8), el H₂O₂, el factor activador de plaquetas, interferón alfa/gamma, C5a, el forbol miristato acetato (PMA) y el

factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), entre otros (148,159–161). Los biológicos son bacterias (*Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus Pyogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella felxneri*, *Escherichia Coli*, *Pseudomona Aeruginosa*, *Mannheimia Haemolytica*, *Mycobacterium tuberculosis*), virus (virus de leucemia felina), hongos (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) y parásitos (*Plasmodium Falciparum*, *Leishmania amazonensis*, *Eimeria Bovis*) (162–170). La activación plaquetar produce la unión de plaquetas con neutrófilos mediante P-Selectina, responsables de la formación de agregados heterotípicos entre leucocitos-plaquetas, utilizados como marcador de activación plaquetaria, lo que a su vez puede inducir la NETosis.

Las proteínas presentes en las NETs se muestran en la Tabla 3 (165).

El componente más abundante de los NETs es el DNA, mientras que las histonas son las proteínas más abundantes de los NETs. El 70% de las histonas son: H2A, H2B, H3 y H4. Las histonas están citrulinadas mediante la enzima proteína deaminasa 4 (PAD4) cuya función es la descondensación de la cromatina del neutrófilo (171). De esta forma al ser el proceso de citrulinización de la H3 un paso clave para la formación de NETs, la medida de la H3CyT es el marcador más específico de NETs.

Tabla 3. Componentes proteicos de los NETs. Tabla modificada de Urban *et al.* (165).

Localización celular	Nombre de la proteína	Nombre del gen
Gránulos	Elastasa	ELA2
	Lactotransferrina	LTF
	Azurocidina	AZU1
	Catepsina G	CTSG
	Mieloperoxidasa	MPO
	Proteasa 3	PR3
	Lisozima C	LYZ
	Defensina 1 y 3	DEFA-1 y-3
Núcleo	Histona 2A	H2A
	Histona 2B	H2B
	Histona 3	H3
	Histona 4	H4
Citoplasma	S100 Proteína de unión al calcio A8	S100A8
	S100 Proteína de unión al calcio A9	S100A9
	S100 Proteína de unión al calcio A12	S100A12
Citoesqueleto	Actina (Beta o Gamma)	ACTB, ACTG1
	Miosina-9	MYH-9
	Alfa-actinina	ACTN1, ACTN4
	Plastina-2	LCP1
	Citoqueratina-10	KRT-10
Peroxisoma	Catalasa	GATO
Enzimas glicolíticos	Alfa-enolasa	ENO1
	Transcetolasa	TKT

El DNA o RNA puede producir activar coagulación con el consiguiente riesgo trombótico (172,173). Las histonas presentes en las redes de los NETs activan la coagulación, aumentan la generación de trombina, producen una activación plaquetaria importante e

inhiben sustancias inhibitoras de la coagulación como la proteína C o la heparina (174,175).

Se han descrito numerosos artículos con ejemplos de la formación de NETs y su relación como factor de riesgo de trombosis con la cardiopatías isquémica (176–179). También los NETs podrían ser un factor de riesgo pronóstico en el seguimiento de los ictus isquémicos cerebrales (180). Los NETs en los últimos años se han visto relacionados con otras enfermedades inflamatorias y con riesgo de trombosis como la diabetes mellitus tipo 2 (181). También están presentes en la organización de trombos en pacientes con trombosis venosas profundas (182).

Como se ha indicado anteriormente, en la EH los pacientes esplenectomizados presentan un mayor riesgo de trombosis a largo plazo. Se ha observado el aumento de algún marcador hemostásico o de inflamación en estos pacientes en comparación con los EH no esplenectomizados, aunque en la actualidad el mecanismo fisiopatológico que lo produce y los factores inflamatorios y pro-trombóticos no están correctamente estudiados. Es por ello que en la presente tesis uno de los objetivos más importantes es investigar los posibles factores de riesgo que participan en la inmunotrombosis o tromboinflamación para comprobar si podrían estar relacionados con el mayor riesgo trombótico post-esplenectomía en la EH.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Describir la historia natural de una muestra de niños diagnosticados de Esferocitosis Hereditaria controlados en la Unidad de Hematología Pediátrica. Analizar los datos clínicos, analíticos y ecográficos para evaluar cuál es su implicación en la evolución del paciente.
2. Estudiar si la asociación de Esferocitosis Hereditaria con la Enfermedad de Gilbert tiene implicaciones en la evolución o seguimiento de los niños con Esferocitosis Hereditaria.
3. Analizar los índices y características de los reticulocitos en los niños con EH como prueba analítica con orientación diagnóstica.
4. Evaluar la nueva técnica diagnóstica, test eosina-5-maleimida mediante citometría de flujo para el diagnóstico de EH en niños.
5. Investigar la existencia de factores de riesgo de trombosis en niños con Esferocitosis Hereditaria tras la esplenectomía, comparándolo con un grupo de niños con Esferocitosis Hereditaria sin esplenectomía y un grupo control de niños sanos. Investigación del papel de diversos biomarcadores tromboinflamatorios como potenciales factores de riesgo trombótico.
 - 5.1. Trampas extracelulares de neutrófilos (NETs): DNA y H3CyT.

- 5.2. Citoquinas pro-inflamatorias: RANTES, CXCL5 y HMGB1.
- 5.3. Marcadores de activación plaquetaria: agregados heterotípicos leucocito-plaqueta y monocito-plaqueta.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño, ámbito y período

1.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional descriptivo y analítico.

La primera parte del estudio fue en su mayor parte retrospectivo para describir y analizar las características de la historia natural de los niños con EH y la implicación en su evolución. Por otro lado, se realizó de forma transversal una evaluación analítica puntual para la valoración de parámetros y técnicas diagnósticas de laboratorio novedosas (índices reticulocitarios y test EMA) en los niños con EH.

La segunda parte del estudio se realizó como parte de la investigación traslacional en una evaluación analítica puntual para analizar los posibles factores de riesgo de trombosis en niños con EH tras la esplenectomía. Se seleccionaron 3 grupos: niños con EH sin esplenectomía, niños con EH esplenectomizados y niños sanos o control.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica y la Comisión de Investigación del Hospital La Fe. Se proporcionó la información completa a los padres o tutores legales sobre el estudio y se obtuvo su consentimiento informado voluntario. Los niños mayores de 12 años aceptaron también su participación.

1.2. Ámbito de realización

El estudio se realizó en la Unidad de Hematología Pediátrica del Hospital Universitario La Fe de Valencia. La Unidad de Hematología Pediátrica del Hospital La Fe es un centro de referencia de Hematología infantil para los Hospitales de la Comunidad Valenciana.

1.3. Periodo de estudio

De enero 2015 a enero 2017.

2. Población de estudio.

Estudio 1: Estudio retrospectivo descriptivo y analítico de la historia natural de la EH en niños. Se incluyeron un total de 55 niños diagnosticados de EH que llevaban un seguimiento clínico en la Unidad de Hematología Pediátrica del Hospital La Fe. El diagnóstico de EH se había establecido por la sospecha clínica, los parámetros analíticos compatibles, la visualización de esferocitos en la extensión de sangre periférica y la positividad de la prueba diagnóstica RGO (Figura 8).

Cumplieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión:

- Edad comprendida entre 0 y 16 años.
- Paciente con diagnóstico de EH por RGO positiva realizada en

Hospital La Fe.

- Haber firmado el consentimiento informado por parte de los padres o tutores legales para participar en el estudio. Los niños mayores de 12 años deben aceptar también su participación.

Criterios de exclusión:

- Enfermedades neoplásicas.
- Infecciones crónicas por hepatitis o VIH.
- Enfermedades crónicas importantes que puedan modificar el curso de la EH.

Estudio 2: Evaluación de los nuevos índices y características de los reticulocitos e introducción de la nueva técnica diagnóstica test EMA. De los 55 niños diagnosticados de EH del primer estudio, se recogieron muestras de sangre de 47 niños para el análisis de los índices reticulocitarios y muestras de sangre de 46 niños para la realización del test EMA (Figura 8).

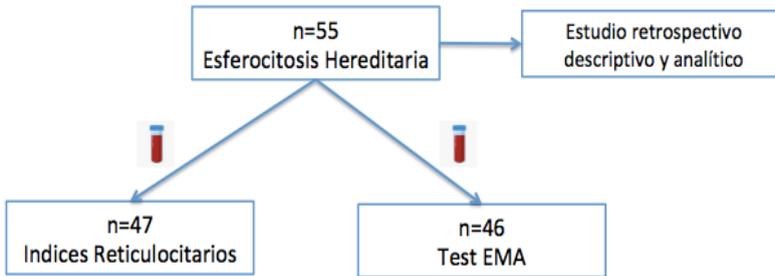


Figura 8. Tamaño muestral del primer y segundo estudio.

Todos los pacientes incluidos en el segundo estudio cumplieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión:

- Edad comprendida entre 0 y 16 años.
- Paciente con diagnóstico de EH por RGO positiva realizada en Hospital La Fe.
- Haber firmado el consentimiento informado por parte de los padres o tutores legales para participar en el estudio. Los niños mayores de 12 años deben aceptar también su participación.

Criterios de exclusión:

- Enfermedades neoplásicas.
- Infecciones crónicas por hepatitis o VIH.

- Enfermedades crónicas importantes que puedan modificar el curso de la EH.
- Pacientes transfundidos recientemente (menor o igual a 3 meses).
- Paciente con proceso inflamatorio o infeccioso intercurrente en el momento de la extracción.

Estudio 3: Investigación y evaluación de los posibles factores de riesgo trombótico en los niños con EH esplenectomizados, se seleccionaron todos los pacientes con EH esplenectomizados en seguimiento en la unidad de hematología (n=16) creando el grupo EH esplenectomizados. Se seleccionaron otros dos grupos: un grupo de pacientes EH sin esplenectomía seleccionados del grupo de niños con EH con similares edades y mismo sexo (n=16) y un grupo de niños sanos o control (n=16). Todos los grupos tenían un mismo tamaño muestral (figura 9).

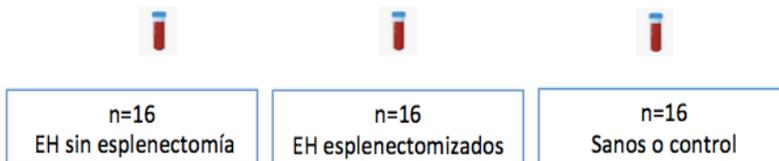


Figura 9. Tamaño muestral del tercer estudio.

El grupo control de niños sanos, se seleccionó de manera aleatorizada (días pares de cada mes) en los niños que acudían a la extracción de una analítica prequirúrgica y que cumplieron los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

Criterios inclusión:

- Niños con edad comprendida entre 0 y 16 años.
- Pendiente de realización de cirugía menor programada.
- Haber firmado el consentimiento informado por parte de los padres o tutores legales para participar en el estudio. Los niños mayores de 12 años deben aceptar también su participación.

Criterios de exclusión:

- Antecedentes personales y familiares relevantes.
- Enfermedad aguda o crónica concomitante.
- Toma de fármacos de manera puntual o crónica (incluidos fármacos que pudieran afectar a la función plaquetaria, mínimo 15 días).

3. Obtención o extracción de la muestra

Las extracciones se realizaron en el laboratorio del Hospital la Fe, en unos boxes acondicionados para los niños, donde habitualmente se

llevan a cabo las analíticas en la población infantil. Se aprovecharon las citas de los controles analíticos programados por su médico para realizar el estudio de las muestras biológicas sin generar nuevas visitas hospitalarias, ni nuevos pinchazos a los pacientes.

Se realizaron extracciones de sangre venosa periférica de la vena cubital mediante el sistema Vacutainer con el paciente en ayunas. Para los estudios 1 y 2 se utilizó el tubo con anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) donde se realiza el hemograma, para posteriormente la realización del test EMA y los índices reticulocitarios. Para el tercer estudio se recogieron dos tubos de citrato de sodio y un tubo de EDTA para la realización del estudio de marcadores inflamatorios, NETs y marcadores de activación plaquetaria.

4. Variables del estudio y Técnicas de laboratorio utilizadas

Todas las variables se registraron en un formulario (ANEXO 1) y posteriormente se introdujeron en una base de datos Access.

4.1. Características generales, clínicas, ecográficas y analíticas

Se recogieron las características de los niños con EH de forma retrospectiva registradas en la historia clínica y se completaron mediante entrevista a los padres o familiares que acompañan al paciente a las consultas externas hospitalarias. En la Tabla 4 se enumeran las variables recogidas de las características generales de la

muestra, características clínicas, características ecográficas y características analíticas.

Tabla 4: Variables de las características generales, clínicas, ecográficas y analíticas.

Características generales	<ul style="list-style-type: none"> - Sexo. Edad al diagnóstico (Fecha nacimiento y diagnóstico) - Motivo de consulta (Clínica, A. Familiares, Analítica). - Ictericia neonatal (Ictericia sin FT, Ictericia con FT, ET). - Enfermedad de Gilbert (Heterocigoto o Homocigoto). - Antecedentes personales patológicos. - Antecedentes familiares EH y EG.
Características clínicas	<ul style="list-style-type: none"> - Antropometría (Peso y talla). Fecha de antropometría. - Esplenomegalia, ictericia, palidez, soplo sistólico y hepatomegalia.
Características ecográficas	<ul style="list-style-type: none"> - Ecografía abdominal. - Esplenomegalia, barro biliar, litiasis biliar, bazo accesorio y hepatomegalia.
Características analíticas	<ul style="list-style-type: none"> - Hemograma: hemoglobina, recuento de hematíes, hematocrito, VCM, HCM, CHCM, ADE, reticulocitos T, reticulocitos %, leucocitos y plaquetas. - Extensión de sangre periférica (visualización de esferocitos). - Bioquímica: Glucemia, PCR, LDH, bilirrubina total, bilirrubina directa e indirecta, enzimas hepáticas (GOT y GPT), función renal (urea y creatinina), metabolismo del hierro (ferritina, índice saturación de transferrina, hierro y catofife) y perfil lipídico (Col T, LDL, HDL, TGC). - Resistencia globular osmótica (RGO).

A: antecedentes, FT: fototerapia, ET: exanguinotransfusión, VCM: volumen corpuscular medio, HCM: Hemoglobina corpuscular media, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, ADE: Ancho de distribución eritrocitario, T: totales. PCR: proteína c reactiva., LDH: lactato deshidrogenasa, GOT: transaminasa glutámico-oxalacética, GPT: transaminasa glutámico pirúvica. Catofife: capacidad de fijación del hierro total, LDL: Lipoproteína de baja densidad, HDL: Lipoproteína de alta densidad, TGC: Triglicéridos.

En los antecedentes personales se recogió el diagnóstico de EG. Este estudio genético de la EG se solicitó en aquellos pacientes con EH en los que se evidenció incremento de ictericia o hiperbilirrubinemia no justificable con la hemólisis crónica, o litiasis biliar visualizada en ecografía abdominal y crisis relacionadas con la formación de los cálculos biliares. El estudio genético muestra la mutación en la región promotora del gen UGT1A1 en su forma homocigota o heterocigota, responsable de codificar la enzima UGT1A1.

Las medidas antropométricas (peso y talla) se recogieron en cada paciente. El índice de masa corporal (IMC) se calculó a partir del peso y la talla recogida siguiendo la siguiente fórmula: $\text{Peso (Kilogramos)} / \text{Talla (metro}^2\text{)}$. Se calcularon los percentiles y los Z-Score del IMC según la organización mundial de la salud (OMS), para poder realizar comparaciones entre niños con diferentes edades y sexos. Para poder clasificar el IMC se establecen los siguientes puntos de corte en función del percentil: sobrepeso $p > 85$ $p < 98$, obesidad $p \geq 98$, normalidad $p \geq 3$ $p \leq 85$ y subnutrición $p < 3$.

Las características analíticas se recogieron en estado basal, sin complicaciones agudas. En los pacientes esplenectomizados se registraron dos analíticas: una previa a la esplenectomía y otra en su seguimiento más lejano tras la esplenectomía. La prueba diagnóstica realizada en todos los pacientes fue la RGO. Se utilizó la escala modificada de Eber (19) para la clasificación de la gravedad de nuestros pacientes.

También de forma retrospectiva se recogieron todas las complicaciones clínicas en los pacientes: crisis aplásicas, crisis megaloblásticas, crisis hemolíticas y las crisis relacionadas con la formación de los cálculos biliares. En cada una de ellas se registró la fecha, los valores analíticos (hemoglobina, porcentaje de reticulocitos, bilirrubina total, bilirrubina directa, bilirrubina indirecta, LDH y PCR), la etiología o el desencadenante (virus, cirugía, déficit de ácido fólico) y el tratamiento recibido (ácido fólico, transfusión de concentrado de hematíes, CPRE, esplenectomía y/o colecistectomía).

Se registraron las transfusiones recibidas en cada paciente, si la terapia fue ocasional o periódica, la fecha de la transfusión y los valores analíticos (hemoglobina mínima y porcentaje de reticulocitos). Se incluyó si el paciente había precisado una cirugía: el tipo de cirugía (esplenectomía y/o colecistectomía), la vía de abordaje de la esplenectomía (abierta o laparoscópica) y el tipo de esplenectomía (parcial o total).

Se investigaron las complicaciones del paciente tras la esplenectomía: el número de infecciones graves o sepsis por bacterias encapsuladas (neumococo, meningococo y haemophilus influenzae), el número de ingresos hospitalarios por infecciones y la adherencia al tratamiento antibiótico profiláctico, así como el estado vacunal adecuado del paciente (vacuna frente a distintos serotipos de neumococo y meningococo, haemophilus influenzae tipo b y la vacuna antigripal anual).

4.2. Técnicas de laboratorio utilizadas

4.2.1. Índices reticulocitarios

Se analizaron de forma prospectiva en la primera parte del estudio los índices reticulocitarios: el número y porcentaje de reticulocitos, el VMR, la FRI, el VMCE y el ADR. Se utilizó para su análisis el contador hematológico DxH800 (Beckman Coulter, San Diego, CA, USA).

El hemograma se llevó a cabo con el mismo analizador y se recogieron los índices eritrocitarios: la hemoglobina, el hematocrito, el VCM, la hemoglobina corpuscular media (HCM), la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y el ADE.

4.2.2. Test de unión de membrana eosina-5-maleimida

La prueba por citometría de flujo (fijación del colorante) cuantifica la intensidad de la fluorescencia de los hematíes marcados con EMA (40,41).

Las muestras de sangre recogidas en tubos de EDTA pueden analizarse dentro de las primeras 24 horas desde su extracción conservadas entre 2-8°C.

El compuesto EMA, (Sigma-Aldrich), es sensible a la luz por lo que debe mantenerse en la oscuridad y conservarse a 4°C. La solución de trabajo de EMA se prepara disolviendo 1 mg en 1 mL de solución

salina tamponada con fosfato (PBS). Se mezcla bien y almacena en alícuotas de 200 μL a -40°C . Tras descongelar el EMA, se diluyen 200 μL de la solución de trabajo de EMA con PBS para obtener una solución a una concentración de 0,5 mg/mL.

Se selecciona un tubo control con sangre de un individuo normal y el tubo o tubos de las muestras problema. El test se realiza por duplicado en cada una de las muestras control o de los pacientes.

Los pasos a seguir se muestran en la figura 10:

Paso 1: pipetear 30 μL de sangre total en cada uno de los tubos, añadir 2 mL de PBS y realizar un primer lavado centrifugando a 1600 rpm (480g) durante 4 minutos.

Paso 2: retirar el sobrenadante y tomar 5 μL del concentrado de hematíes para introducirlos en el siguiente tubo. Añadir 25 μL de la solución EMA. Agitar en el vórtex unos segundos, incubar en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente, volviendo a repetir el proceso agitando y dejando incubar en las mismas condiciones.

Paso 3: realizar 3 lavados consecutivos por centrifugación a 2000 rpm (750g) durante 5 minutos de los hematíes marcados con EMA, añadiendo a los tubos 500 μL de PBS. Tras cada lavado retirar el sobrenadante previo a la adición del PBS.

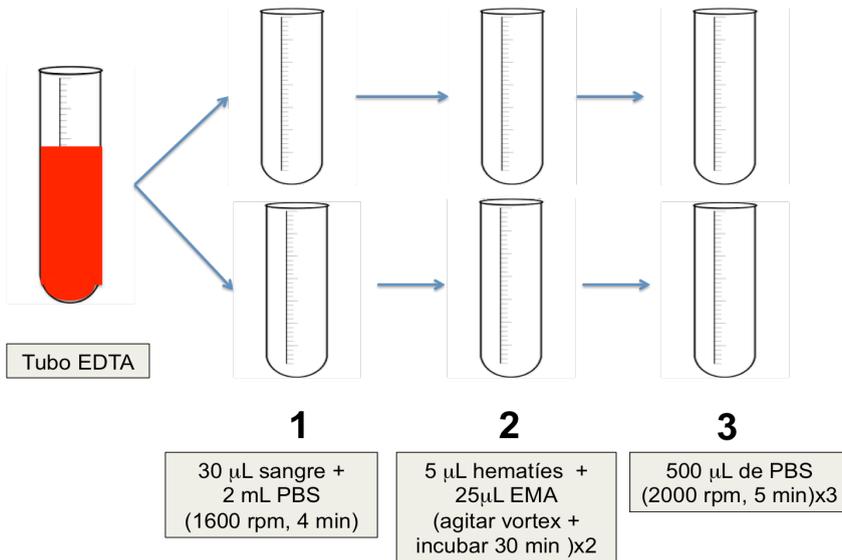


Figura 10. Pasos a seguir en la técnica de laboratorio del test EMA.

Del último tubo se transfieren 100 μ L de las células resuspendidas a un tubo de citometría de 12x75 mm y se añade 1 mL de PBS. Las suspensiones celulares deben mantenerse en la oscuridad hasta que se utilicen.

Posteriormente, las muestras se miden en el citómetro de flujo (Navios, Beckman Coulter, San Diego, CA, USA). De cada uno de los tubos se deben adquirir un mínimo de 15.000 células en la región de los hematíes seleccionados por los parámetros de tamaño y complejidad, ambos en escala logarítmica. A partir de los hematíes seleccionados se mide la media de intensidad de fluorescencia de EMA, cuyas longitudes de onda de excitación y emisión son 488 nm y 545 nm, respectivamente. Los resultados se expresan como el cociente entre el valor medio de la intensidad de fluorescencia de la muestra

problema y el valor medio de la intensidad de fluorescencia de la muestra control.

Cada laboratorio establece el intervalo de referencia y los valores de corte para su instrumento. Consideraremos un resultado positivo un cociente menor de 0,8 y un resultado negativo un cociente igual o mayor de 0,8 (40,41,183). El resultado positivo nos indica diagnóstico de EH.

4.2.3. Biomarcadores inflamatorios, NETs y agregados leucocito-plaqueta y monocito-plaqueta

En la segunda parte del estudio se registraron en todos los pacientes en cada uno de los grupos (sanos, EH sin esplenectomía y EH esplenectomizados) la fecha de la extracción, el sexo y los valores del hemograma que había sido realizado el mismo día de la extracción sanguínea.

También se registran las variables de la serie roja (hemoglobina, hematocrito, el VCM, la HCM, la CHCM, el ADE y reticulocitos), serie blanca (leucocitos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos) y serie plaquetar (las plaquetas, el volumen plaquetar medio (VPM) y el ancho de distribución plaquetar (PDW)).

Se recogieron los resultados obtenidos tras su análisis de los biomarcadores inflamatorios (RANTES, CXCL5 y HMGB1), los NETs (DNA y H3CyT) y los marcadores de activación plaquetar

(agregados L-P y M-P). Para ello se realizaron las siguientes técnicas diagnósticas:

4.2.3.1. Biomarcadores tromboinflamatorios y NETs

No hay un método específico y universal para el análisis de los NETs, pero realizamos las mediciones de algunos marcadores o componentes de los NETs como: el DNA y la H3CyT. La H3CyT es el marcador más específico de NETs, ya que necesita la citrulinización de la histona-3 para la descondensación del DNA, que es el paso previo a su liberación en forma de NETs (180,184).

Los pasos de la técnica de laboratorio para el análisis de los biomarcadores tromboinflamatorios (RANTES, CXCL5 y HMGB1) y NETs (DNA y H3CyT) se muestra en la figura 11. El procesamiento de la muestra se realizó en las primeras 2 horas tras su extracción. Previamente del tubo de citrato se separa un volumen para los agregados L-P y M-P.

En el primer paso, los tubos del paciente se centrifugan a 3000 rpm durante 10 minutos a 21°C. Del tubo de EDTA se recoge el sobrenadante, siendo muy cuidadoso para no remover los eritrocitos ni los leucocitos (interfase blanca), y se divide en 2-3 alícuotas de al menos 100 µL en tubos marcados como EDTA.

De los tubos de citrato se recogen los sobrenadantes, siendo muy cuidadoso para no remover los elementos celulares, se juntan en un

nuevo tubo, se mezcla suavemente. Se vuelve a centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura 21°C. Se recogen las alícuotas del plasma sobrenadante que sean posibles, dejando siempre al menos 0,5 cms en el fondo del tubo, se introducen en tubos rotulados como CIT y en tubos marcados como EDTA.

De cada paciente se obtuvo tras el procesamiento de la muestra: 2-3 alícuotas de EDTA y 3-4 alícuotas de CIT. Estas muestras se guardaron en el congelador a -80°C clasificadas hasta su posterior análisis mediante ELISA.

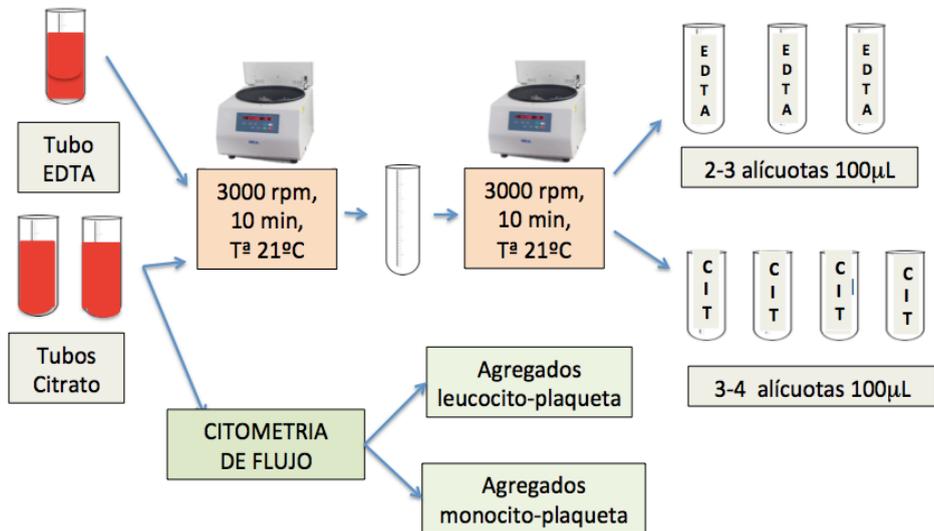


Figura 11. Pasos a seguir en la técnica de laboratorio que analiza los biomarcadores tromboinflamatorios y los marcadores de activación plaquetaria.

Para la determinación del DNA en forma libre (cfDNA) , el plasma citratado se diluyó 1:10 con tapón fosfato salino (PBS (in mmol/L: NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 10, KH₂PO₄, pH7,4)) y se mezcló (1:1) con 1 mM SytoxGreen (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en PBS. La fluorescencia se determinó en un lector de placas de fluorescencia (Gemini XPS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Una curva de calibración se generó empleando DNA de concentración conocida, DNA (Invitrogen) en PBS. La determinación de la H3CyT se realizó como se ha descrito previamente (176,180). Para realizar la medida se emplearon las placas de Elisa recubiertas de estreptavidina (componente 9, Cell Death Detection ELISA^{PLUS}), y se incubó el plasma junto a un anticuerpo monoclonal de ratón contra histonas unido a biotina (componente 1) durante 2 horas. Tras lavar los pocillos intensivamente, se incubaron toda la noche a 4°C con un segundo anticuerpo de conejo contra H3CyT en posición 3 (ab81797; Abcam Inc.,MA,USA). Tras lavar de nuevo, la detección se realizó con un anticuerpo contra ratón unido a peroxidasa (GE Biosciences, Barcelona, Spain). Finalmente se reveló con ABTS según las instrucciones del fabricante y se leyó en un lector de placas (MRX, ThermoLabsystems) a 405 nm usando como longitud de referencia la medida a 490 nm. Los valores se normalizaron con respecto a una mezcla de distintas muestras que se incluyó en todas las placas. Los valores se expresaron como valores individuales de absorbancia (U.A.)

4.2.3.2. Agregados leucocito-plaqueta y agregados monocito-plaqueta

El análisis de la presencia de agregados L-P y M-P mediante citometría de flujo se realizó en las primeras 2 horas tras su extracción.

Se selecciona del tubo de citrato sódico la sangre del paciente para la realización del análisis de los marcadores de activación plaquetar por citometría de flujo (figura 11).

La sangre procedente del tubo de citrato de diluyó 1:1 con una solución tampón (HBSS) con 50 μ L y 50 μ L de sangre.

Se incubó con concentraciones saturantes de CD61-PE como marcador plaquetario , y con CD45-FITC como marcador panleucocitario ó CD14-FITC como marcador de monocitos. Para ello se añadieron los anticuerpos correspondientes: en un primer tubo 10 μ L CD14 + 10 μ L CD45 y en un segundo tubo 10 μ L CD61 + 10 μ L CD45, se agitaron para que se consiguiera una mezcla homogénea y posteriormente se mantuvieron en oscuridad durante 15 minutos.

Se fijó la muestra con Thrombofix (BD) (15 min a 37°C) y se diluyó posteriormente con HBSS. Para ello se añadió 500 μ L de OptiLyse y se mezcló correctamente, para conseguir la lisis de los glóbulos rojos. Se mantuvo durante 15 minutos a temperatura ambiente y por último se introdujo 2 ml de HBSS. Las muestras se mantuvieron en frío (4°C) hasta su utilización .

Las muestras se introdujeron en el citómetro de flujo para obtener el porcentaje de agregados L-P y M-P. Tras determinar la zona correspondiente a leucocitos o monocitos, se determinó el porcentaje de células en estas regiones positivas para plaquetas, lo que proporcionó una medida del porcentaje de uniones heterotípicas. Se contaron en cada caso al menos 1000 leucocitos o monocitos.

Los agregados L-P se expresan como porcentaje de leucocitos (CD45+) que llevan alguna plaqueta asociada (CD61+). Los agregados M-P se expresan como porcentaje de monocitos (CD45-CD14+) que llevan alguna plaqueta asociada (CD61+).

Se utilizaron anticuerpos de Beckman Coulter, Beckton Dickinson o Immunostep.

5. Método estadístico. Procesamiento y análisis de datos.

El análisis estadístico se realizó con el sistema informático STATA 12.

Se realizó un análisis descriptivo univariante de todas las variables. Las variables cuantitativas o continuas se expresaron en medidas de tendencia central (media o mediana) y dispersión (desviación estándar o rango intercuartílico). Las variables cualitativas se expresaron con frecuencia absoluta (número) y relativa (porcentaje).

El estudio analítico de las variables cualitativas permite comparar proporciones. Se utilizó el test paramétrico X^2 cuadrado cuando las

frecuencias o valores esperados en la tabla de contingencia fueron mayores de 5. El test exacto de Fisher se utilizó como test no paramétrico cuando esta condición no se cumplía.

Se evaluó la normalidad de las variables mediante test Shapiro Wilk, previo a la elección del test estadístico. En el análisis de las variables cuantitativas continuas para muestras con dos categorías con distribución normal se utilizó el test de la T de Student y si no seguían una distribución normal el test no paramétrico U Mann-Whitney. Para el análisis de las variables cuantitativas para muestras con 3 categorías con distribución normal se utilizó el test ANOVA y como test no paramétrico Kruskal Wallis .

La asociación entre dos variables cuantitativas se evaluó con el coeficiente de correlación lineal de Pearson, en las variables que siguieron una distribución normal. Para las no paramétricas se utilizó el coeficiente de correlación de Rho Spearman.

Se utilizó el análisis multivariante mediante regresión lineal múltiple, para eliminar el sesgo de confusión o interacción, con las variables descritas en la bibliografía como clínicamente importantes y en las que se observaron diferencias estadísticamente significativas.

La significación estadística se estableció como $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Historia natural de los niños con esferocitosis hereditaria. Descripción y análisis de la muestra

1.1. Características generales

Se incluyeron un total de 55 niños diagnosticados de EH con una edad mediana de 2 años al diagnóstico (24,3 meses, IQR 1,1-36,7), con similar proporción en ambos sexos (Tabla 5). Los motivos de remisión del paciente a la consulta de Hematología Pediátrica se muestran en la Tabla 5.

La historia familiar de EH se detectó en 42 pacientes, y en 13 pacientes se consideró el primer caso de la familia (Tabla 5). En la mayoría de los pacientes con antecedentes familiares fueron antecedentes de primer y segundo grado (57%). El número total de familiares diagnosticados de EH asciende a 126, lo que corresponde a una media de 3 familiares afectos por cada niño con EH y antecedentes familiares. Se diagnosticaron un mayor porcentaje de antecedentes familiares en rama materna (madre, tía o tío, abuelo o abuela materna) (56%), frente a familiares en rama paterna (padre, tía o tío, abuelo o abuela paterna) (44%). Fueron diagnosticados 2 parejas, 1 trío y 1 cuarteto de hermanos. Del total de pacientes con historia familiar positiva se identificó 19 niños con al menos un familiar con EH que había precisado esplenectomía.

Durante la etapa perinatal 36 niños fueron diagnosticados de ictericia (Tabla 5). En aproximadamente un 72% de los niños con ictericia neonatal precisaron ingreso hospitalario y tratamiento con fototerapia o exanguinotransfusión en una Unidad Neonatal.

Se detectó antecedentes personales patológicos en 20 niños. Los antecedentes más frecuentemente diagnosticados fueron antecedentes cardiológicos (comunicación interauricular pequeña, comunicación interventricular pequeña ...) y respiratorios (bronquitis obstructivas, crisis asmáticas...), seguidos de nefrológicos (infecciones urinarias, reflujo vesicoureteral leve), y otorrinolaringológicos (otitis y amigdalitis de repetición). Los menos frecuentes fueron antecedentes neurológicos (retraso del desarrollo leve y trastorno de déficit de atención e hiperactividad) y antecedentes hematológicos benignos (anemia ferropénica) (Tabla 5).

Tabla 5. Descripción de las características generales de la muestra.

Características generales	n (%)
<u>Sexo</u>	
- Hombre	29 (52,7 %)
- Mujer	26 (47,3%)
<u>Motivo consulta:</u>	
1. Clínica	43(78,2%)
- Palidez	22 (40%)
- Ictericia	18 (32,7%)
- Esplenomegalia	3 (5,5%)
2. A. familiares	10 (18,2%)
3. Alteración analítica	2 (3,6%)
<u>Historia Familiar</u>	
- Sí	42 (76,4%)
- No	13 (23,6%)
<u>Ictericia Neonatal</u>	
- Sí	36 (65,5%)
- No	19 (34,5%)
<u>Antecedentes patológicos</u>	20 (36,4%)
- Cardiológico	6 (10,9%)
- Neumológico	5 (9,1%)
- Nefrológico	3 (5,5%)
- ORL	3 (5,5%)
- Neurológico	2 (3,6%)
- Hematológico	1 (1,8%)

ORL: Otorrinolaringológicos.

Los pacientes con EH se clasificaron en función de la gravedad en grupo leve, moderado y grave según la clasificación de Eber (19). Se registraron 19 niños, 21 niños y 15 niños en cada grupo, respectivamente.

Las características generales de los pacientes con EH en función de la gravedad se muestran en la Tabla 6. Se objetivó un aumento del

porcentaje de ictericia con el incremento en la gravedad de la EH, sin ser estadísticamente significativo. No se encontraron diferencias en función del género y antecedentes familiares. En el grupo EH grave el diagnóstico se realizó a una edad más temprana y el motivo de consulta más frecuente fue por alteración clínica; ambas con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6).

Tabla 6. Descripción y análisis estadístico de las características generales de la muestra clasificadas en función de la gravedad de EH en leve, moderada y grave.

	Leve (n=19) n (%)	Moderada (n=21) n (%)	Grave (n=15) n (%)	p
Sexo				
- Hombre	11(57,9%)	10 (47, 6 %)	8 (53, 3 %)	0,808
- Mujer	8 (42,1%)	11 (52, 4 %)	7 (46, 7 %)	
Edad (meses) <i>Mediana(IQR)</i>	29,4 (12,1- 56,3)	27,3 (8,3 - 45,7)	14,4 (1,1- 25,6)	0,038
M. consulta:				
1.Clínica	12(63, 2 %)	17(80,9%)	14(93,3%)	0,028
2.A. Familiares	7 (36,8%)	3 (14,3%)	0 (0%)	
3.Alteración analítica	0(0%)	1(4,8%)	1(6,7%)	
Historia F^a				
- Sí	16 (84,2%)	15 (71,4%)	11(73,3%)	0,669
- No	3 (15,8%)	6 (28,6%)	4 (26,7%)	
Ictericia Neonatal				
- Sí	10 (52,6%)	14 (66,7%)	12 (80%)	0,247
- No	9 (47,4%)	7 (33,3%)	3 (20%)	

1.2. Características clínicas.

En la exploración clínica en situación basal, se detectó esplenomegalia en el 64% de los pacientes, ictericia en el 58% y palidez en el 49%. Clínica menos frecuente como soplo sistólico y hepatomegalia se detectó en un 38% y 7% respectivamente.

Las características clínicas de los pacientes con EH en función de la gravedad se exponen en la tabla 7. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en esplenomegalia y palidez ($p < 0,05$), con aumento marcado de ambas al aumentar su gravedad.

Tabla 7. Descripción y análisis estadístico de las características clínicas clasificadas en función de la gravedad de EH en leve, moderada y grave.

	Leve (n=19) n (%)	Moderada (n=21) n (%)	Grave (n=15) n (%)	p
Esplenomegalia				
- Sí	7 (36,8%)	14 (66,7%)	14 (93,3%)	0,003
- No	12 (63,2%)	7 (33,3%)	1 (6,7%)	
Ictericia				
- Sí	8 (42,1%)	15 (71,4%)	9 (60%)	0,169
- No	11 (57,9%)	6 (28,6%)	6 (40%)	
Palidez				
- Sí	5 (26,3%)	9 (42,9%)	13 (86,7%)	0,002
- No	14 (73,7%)	12 (57,1%)	2 (13,3%)	
Soplo sistólico				
- Sí	6 (31,6%)	8 (38,1%)	7 (46,7%)	0,667
- No	13 (68,4%)	13 (61,9%)	8 (53,3%)	
Hepatomegalia				
- Sí	0 (0%)	3 (14,3%)	1 (6,7%)	0,240
- No	19 (100%)	18 (85,7%)	14 (93,3%)	

Se valoró el IMC en las visitas de nuestros pacientes, el Z-Score del IMC medio fue de 0,19 (SD 1,01). Se detectó que el 78% de los pacientes tienen un peso adecuado para su edad y un 20% presentaron sobrepeso (13%) u obesidad (7%). En tan sólo uno de los pacientes se detectó desnutrición. No existen diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de pacientes con sobrepeso y obesidad entre los subtipos de EH leve, moderada y grave ($p= 0,305$).

1.3. Características ecográficas

53 pacientes recibieron evaluación abdominal mediante ecografía. Los dos pacientes a los que no se realizó ecografía fueron niños con edad inferior a 2 años que habían sido remitidos a la consulta por antecedentes familiares de EH sin clínica ni complicaciones.

La evaluación ecográfica detectó esplenomegalia en el 85% de los pacientes, presencia de bazo accesorio en el 6% y tan sólo hepatomegalia en 1 paciente. La litiasis biliar o barro biliar como complicación propia de la EH, se observó en un 36% y 38% de pacientes respectivamente durante su seguimiento. La edad media de aparición de cálculos biliares o barro biliar fue de 7,1 años (SD 3,5) en los niños con EH.

Las características ecográficas de los pacientes con EH en función de la gravedad se exponen en la Tabla 8. Existen diferencias estadísticamente significativas en esplenomegalia, litiasis biliar y

barro biliar, con incremento del porcentaje de las tres variables al aumentar su gravedad.

Tabla 8. Descripción y análisis estadístico de las características ecográficas en función de la gravedad de EH en leve, moderada y grave.

	Leve (n=19) n (%)	Moderada (n=19) n (%)	Grave (n=15) n (%)	p
Esplenomegalia				
- Sí	13 (68,4%)	17 (89,5%)	15 (100%)	0,032
- No	6 (31,6%)	2 (10,5%)	0 (0%)	
Barro biliar				
- Sí	0 (0%)	9 (47,4%)	11 (73,3%)	0,001
- No	19 (100%)	10 (52,6%)	4 (26,7%)	
Litiasis biliar				
- Sí	0 (0%)	9 (47,4%)	10 (66,7%)	0,001
- No	19 (100%)	10 (52,6%)	5 (33,3%)	
Bazo accesorio				
- Sí	0 (0%)	1 (5,3%)	2 (13,3%)	0,272
- No	19 (100%)	18 (94,7%)	13 (86,7%)	
Hepatomegalia				
- Sí	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,7%)	0,283
- No	19 (100%)	19 (100%)	14(93,3%)	

1.4. Características analíticas

En todos nuestros pacientes se analizó los valores del hemograma y los parámetros bioquímicos, además de una extensión de sangre periférica con estudio morfológico de los hematíes. Los parámetros de la serie roja se muestran en la Tabla 9. Los valores medios de la serie blanca y plaquetar fueron normales. Se confirmó en el examen morfológico la presencia de esferocitos en todos los niños.

Los valores medios de hemoglobina, recuento de hematíes y hematocrito fueron más bajos que los valores normales descritos en la literatura, sin embargo, los reticulocitos presentaron niveles por encima de la normalidad. Los valores medios del VCM y la HCM fueron normales (Tabla 9).

Tabla 9. Valores medios de los parámetros de la serie roja.

	Tendencia central (media)	Dispersión (SD)
Hb (g/dL)	10,61	1,58
Rec.hematíes ($\times 10^6/\text{ul}$)	3,65	0,55
Hto (%)	30,22	4,34
VCM (fL)	83,13	5,38
CHM (pg)	29,09	2,59
CHCM (g/dL)	35,31	1,06
ADE (%)	21,58	4,31
RETIS T ($10^6/\text{L}$)	0,38	0,15
RETIS (%)	10,25	4,11

Hb:Hemoglobina, Rec: recuento, Hto:Hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, HCM:Hemoglobina corpuscular media, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, ADE: Ancho de distribución eritrocitario, RETIS T: Reticulocitos Totales. RETIS : Reticulocitos. SD: Desviación estándar.

Los valores medios de la CHCM y el ADE fueron superiores al rango de normalidad establecido en la literatura en la CHCM (> 35 g/dL) y el ADE ($>14\%$), con diferencias estadísticamente significativas $p=0,0365$ y $p=0,0001$ respectivamente (Tabla 9 y Figura 12)

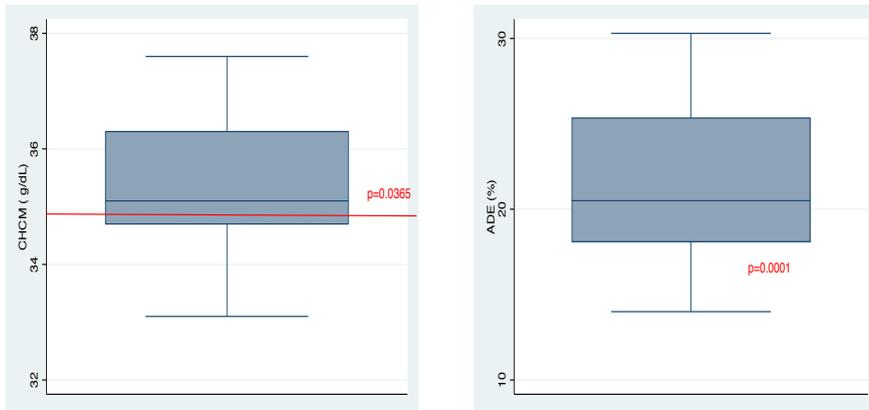


Figura 12. Descripción y análisis estadístico de los valores medios de CHCM y ADE en niños con EH.

Los parámetros de los valores medios bioquímicos se muestran en la Tabla 10. Los valores medios de LDH y bilirrubina fueron más elevados que los valores normales, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,00001$). Los niveles de PCR y el metabolismo lipídico presentaron valores dentro de la normalidad (Tabla 10). Los valores de glucosa, enzimas hepáticas (GOT y GPT) y función renal (urea y creatinina) fueron normales.

El hierro y la capacidad de fijación del hierro total presentaron valores dentro de la normalidad. Los valores medios de ferritina y el índice de saturación de transferrina fueron superiores a los límites normales (Tabla 10). Los pacientes que han recibido alguna transfusión de concentrado de hematíes durante su vida presentaron un aumento medio de 157 ng/mL de ferritina ($p=0,001$) y un aumento de 6 % en el índice de saturación de transferrina ($p=0,04$) en comparación con los pacientes no transfundidos. Sin embargo, no se observaron diferencias

estadísticamente significativas en el hierro y en la capacidad de fijación del hierro total.

Tabla 10. Valores medios de los parámetros bioquímicos.

	Tendencia central (media)	Dispersión (SD)
Bil. Total (mg/dL)	3,7	2,8
Bil. Indirecta (mg/dL)	3,4	2,8
Bil. Directa (mg/dL)	0,49	0,25
LDH (U/L)	703	188
PCR (mg/L)	1,02	0,85
Ferritina (ng/mL)	176,4	169,2
Indice Sat. Transferrina (%)	34,9	10,2
Hierro ($\mu\text{g/dL}$)	94,8	22,3
Catofife ($\mu\text{g/dL}$)	279,5	50,9
Colesterol T (mg/dL)	113,5	34,1
LDL (mg/dL)	54,6	31,9
HDL (mg/dL)	41,7	12,3
TGC (mg/dL)	66,3	35,6

Bil: Bilirrubina. LDH: lactato deshidrogenasa. PCR: proteína c reactiva. Sat: Saturación. Catofife: capacidad de fijación del hierro total, T: total, LDL: Lipoproteína de baja densidad , HDL: Lipoproteína de alta densidad, TGC: Triglicéridos. SD: Desviación estándar.

En función de la clasificación de gravedad se obtuvieron los siguientes valores analíticos del hemograma (serie roja) y parámetros bioquímicos (marcadores de hemólisis) que se muestran en la Tabla 11.

A medida que aumentaba la gravedad se observaba una disminución de hemoglobina y hematocrito, un incremento de reticulocitos y bilirrubina con similares valores de la CHCM y porcentaje del ADE.

Tabla 11. Valores medios de los parámetros de la serie roja y parámetros bioquímicos clasificados en función de la gravedad de la EH.

	Leve (n=19) media (SD)	Moderada (n=21) media (SD)	Grave (n=15) media (SD)	p
Hb (g/dL)	11,9 (0,9)	10,4 (1,0)	9 (1,2)	0,001
Rec.hem (x10 ⁶ /ul)	4 (0,3)	3,6 (0,5)	3,2 (0,5)	0,001
Hto (%)	34,1 (2,1)	29,7 (3,3)	26 (3,4)	0,001
VCM (fL)	84,7 (4,3)	82,4 (6,6)	82,2 (4,6)	0,318
CHM (pg)	29 (2,6)	29 (2,7)	29,3 (2,5)	0,909
CHCM (g/dL)	35,1 (1,2)	35,6 (0,9)	35,2 (0,9)	0,182
ADE (%)	20 (4,8)	20,8 (3,3)	21,9 (3,5)	0,054
RETIST (10 ⁶ /L)	0,27 (0,11)	0,42 (0,14)	0,46 (0,14)	0,001
RETIS (%)	7,2 (3,4)	10,9 (3,3)	13,3 (3,4)	0,001
Bil.Total (mg/dL)	1,8 (0,8)	3,9 (1,6)	5,3 (3,6)	0,001
Bil.I. (mg/dL)	1,5 (0,8)	3,7 (1,7)	4,9 (3,5)	0,001
Bil.Directa (mg/dL)	0,31 (0,12)	0,6 (0,32)	0,54 (0,16)	0,001
LDH (U/L)	665 (153)	702 (180)	766 (244)	0,352
PCR (mg/L)	0,84 (0,6)	0,85 (0,8)	1,7 (1,1)	0,066

Hb: Hemoglobina, Rec: recuento, Hto:Hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, HCM:Hemoglobina corpuscular media, CHCM:Concentración de hemoglobina corpuscular media, ADE: Ancho de distribución eritrocitario, RETIS T: Reticulocitos Totales. Bil: Bilirrubina. LDH: lactato deshidrogenasa. PCR: proteína c reactiva. SD: Desviación estándar.

1.5. Complicaciones

El 84% de nuestros pacientes sufrió una complicación durante su seguimiento, con una mediana de 2 complicaciones por niño durante el seguimiento medio de 7,7 años (SD 4,7). Dentro de las complicaciones más frecuentes encontramos las crisis hemolíticas presentes en un 71% de los pacientes, seguidas de las complicaciones de la formación de cálculos biliares (litiasis biliar, coledocolitiasis, colangitis...) en un 29% y por último las crisis aplásicas en un 27%.

1.5.1. Crisis hemolíticas

Las crisis hemolíticas han sido las más frecuentes en nuestros pacientes, en 39 niños se ha identificado al menos una crisis hemolítica durante su seguimiento. La edad media de presentación de la primera crisis hemolítica fue a los 2,1 años (SD 3,2). En la mayoría de los pacientes la etiología fue infecciosa (74,3%), de predominio vírico (69%), sin identificar el causante concreto en la mayoría de los casos.

En la primera crisis hemolítica, el valor medio de hemoglobina mínima fue de 6,2 g/dL (SD 1,4), el porcentaje de reticulocitos medio fue de 12,5% (SD 5,2), la bilirrubina total media máxima 7,9 mg/dL (SD 6,3) de predominio indirecta y la LDH media de 1301 U/L (SD 513). La exploración clínica junto a la ecografía abdominal detectó esplenomegalia en un 62% de los pacientes. El tratamiento con transfusión de concentrado de hematíes se realizó en más de la mitad de los niños, un total de 24.

En las siguientes crisis hemolíticas en comparación con la primera hubo un aumento de los valores medios de hemoglobina de 6,2 g/dl hasta 7,3 g/dl, un descenso del porcentaje medio de reticulocitos de 12,5% a 7,4% y un descenso de bilirrubina total media de 7,9 mg/dL a 2,8 mg/dL, a expensas de bilirrubina indirecta. Tan sólo hubo diferencias estadísticamente significativas en el descenso de reticulocitos ($p=0,0263$). Los pacientes precisaron menor número de transfusiones en las posteriores crisis hemolíticas, tan sólo 11 , 4 , 3 y

1 pacientes respectivamente, siendo menor el número de niños que presentaban una segunda (n=15) , tercera (n=7) , cuarta (n=4) y quinta (n=2) crisis hemolítica .

Un total de 57 crisis hemolíticas se registraron, se calcula una media de 1,5 crisis hemolíticas por niño durante el seguimiento.

El 50% de los niños con EH leve presentaron alguna crisis hemolítica durante su seguimiento, el 81% de los niños con EH moderada y el 87% de los niños con EH grave. Al comparar según la gravedad de la EH, se analizó un mayor riesgo de presentar una crisis hemolítica en el grupo EH moderado con una OR 4,3 (IC95% 1,2-17,7), aún más elevado en el grupo EH grave con una OR de 6,5 (IC95% 1,2-35,5) comparando con el grupo leve y fueron estadísticamente significativos respectivamente ($p=0,047$ y $p= 0,036$). Por lo que al incrementarse la gravedad de la EH se produce un mayor riesgo de presentar una crisis hemolítica.

1.5.2. Crisis aplásicas

Un total de 15 crisis aplásicas hubo en diferentes niños, con una edad de presentación media de 5,5 años (SD 2,1). En el 73% de ellas se identificó como etiología el Parvovirus B19 en la serología vírica en sangre periférica. El valor medio de hemoglobina fue de 5,9 g/dL (SD 1,3), el porcentaje medio de reticulocitos fue de 0,9% (SD 0,5), la bilirrubina total media 2,3 mg/dL (SD 1,4) y LDH 970 U/L (SD 309). El tratamiento precisó transfusión de concentrado de hematíes en 14

pacientes (93,3%). En ningún caso durante el seguimiento hubo una segunda crisis aplásica.

En el grupo de EH leve hubo 5 crisis aplásicas, en el grupo moderado 4 crisis aplásicas, y en el grupo grave 6 crisis aplásicas, sin observar diferencias estadísticamente significativas ($p=0,185$). Las crisis aplásicas no tienen relación con la gravedad de la EH en nuestros pacientes.

1.5.3. Crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares.

En 16 pacientes hubo una crisis relacionada con la formación de cálculos biliares (litiasis biliar sintomática, coledocolitiasis, colecistitis, colangitis o pancreatitis). La edad media fue de 6,9 años (SD 2,9). El valor medio de hemoglobina en las crisis fue de 9,2 g/dL (SD 1,7), el porcentaje medio de reticulocitos fue de 12,2% (SD 2,4), la bilirrubina total media 16,3 mg/dL (SD 12,5), a expensas del aumento de bilirrubina directa a 9,2 mg/dL (SD 10,5), y LDH en 914 U/L (SD 370). El desencadenante se confirmó en el 25% de los pacientes y fue relacionado con infecciones víricas, sin confirmar un virus específico. Precisaron transfusión de concentrado de hematíes 2 pacientes. Se realizó colecistectomía en 3 casos y cirugía mediante CPRE en otros 3 casos.

De los 16 pacientes que presentaron crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares: 8 niños pertenecían al grupo EH moderado y 8 niños al grupo EH grave. Los niños con EH leve no realizaron ninguna crisis durante todo su seguimiento. El porcentaje

de crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares es mayor en el grupo EH grave (53,3%) frente al grupo EH moderado (38,1%) con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,001$). Al aumentar la gravedad de la EH se produce mayor riesgo de presentar una crisis relacionada con la formación de cálculos biliares.

El número medio de crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares es de 2,1 (SD 1,6) por paciente.

1.6. Tratamiento

La transfusión de concentrado de hematíes se realizó en más de la mitad de los pacientes durante su seguimiento (61,8%). Sólo 5 pacientes precisaron transfusiones periódicas. Los 5 pacientes pertenecían al grupo EH grave. La edad media de la primera transfusión de concentrado de hematíes fue a los 2,1 años (SD 2,9). La hemoglobina media fue de 6,1 g/dL (SD 1,4) y el porcentaje de reticulocitos medio fue de 10,8% (SD 4,4).

Los 34 niños que precisaron transfusión de concentrado de hematíes se clasificaron en función de su gravedad: 6 niños con EH leve, 16 niños con EH moderada y 12 niños con EH grave, con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 12). A mayor gravedad de la EH se incrementa el riesgo de precisar transfusión de concentrado de hematíes.

Tabla 12. Descripción y análisis estadístico del porcentaje de transfusión de concentrado de hemáties recibidos en función de la gravedad de la EH.

	Leve (n=19) n (%)	Moderada (n=21) n (%)	Grave (n=15) n (%)	p
Transfusión				
- Sí	6 (31,6%)	16 (76,2%)	12 (80%)	0,006
- No	13 (68,4%)	5 (23,8%)	3 (20%)	

Se realizaron un total de 17 esplenectomías y 11 colecistectomías. (Figura 13 y 14). De los 17 niños esplenectomizados, 9 de ellos asociaron colecistectomía. En 2 niños se realizó tan sólo colecistectomía sin asociar esplenectomía, por complicación aguda relacionada con la formación de cálculos biliares. La edad mediana de la esplenectomía fue a los 8,8 años (IQR 7,1-8,9) y la edad media de la colecistectomía fue a los 7,8 años (SD 2,6).

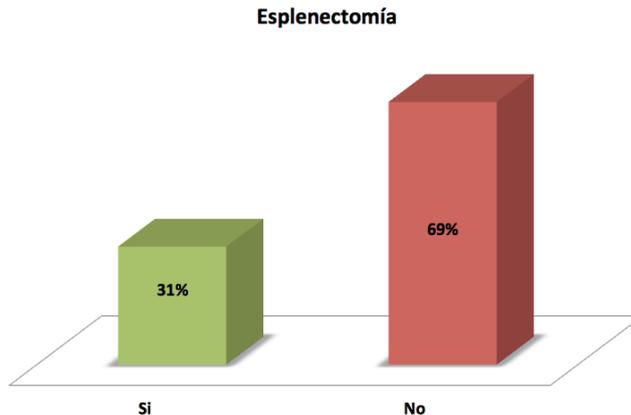


Figura 13: Descripción del porcentaje de esplenectomías en los pacientes con EH.

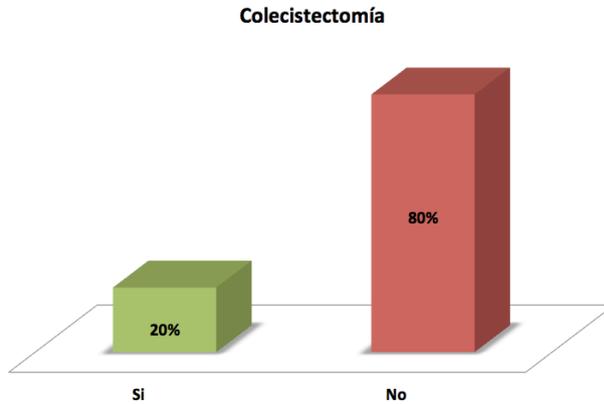


Figura 14: Descripción del porcentaje de colecistectomías en los pacientes con EH.

En todos los pacientes se realizó una esplenectomía total, excepto en 2 niños a los que se les realizó una esplenectomía parcial. La esplenectomía parcial se realizó a una edad media de 6,5 años (SD 3,2) y la esplenectomía total con 8,8 años (SD 3,5). La evolución en uno de los pacientes esplenectomizados parcialmente fue desfavorable y precisó una esplenectomía total a los 13 meses de la parcial, el otro paciente presentó una adecuada evolución. En 16 pacientes el abordaje quirúrgico se realizó mediante cirugía laparoscópica.

Los pacientes esplenectomizados recibieron una adecuada vacunación contra los gérmenes encapsulados y recibieron tratamiento antibiótico profiláctico. El 94% tuvieron una adherencia al tratamiento buena. Las complicaciones infecciosas tras la realización de la esplenectomía fueron escasas, tan sólo alguna infección localizada propia de la edad (infección respiratoria de vías aéreas superiores, otitis media, faringoamigdalitis, gastroenteritis...) que se manejaron de manera ambulatoria. No hubo ingresos hospitalarios por infecciones, ni sepsis.

Los valores analíticos del hemograma y parámetros bioquímicos pre y postesplenectomía se exponen en la Tabla 13. Los valores medios de hemoglobina, recuento hematíes y hematocrito aumentaron significativamente tras la esplenectomía y los valores medios de los reticulocitos disminuyeron significativamente. El número medio de leucocitos y el número medio de plaquetas fue más elevado tras la esplenectomía, con diferencias estadísticamente significativas. Tras la esplenectomía se observó en el hemograma una disminución significativa de los valores medios de la CHCM y del porcentaje del ADE (Tabla 13).

El estudio bioquímico mostró valores similares de glucosa, enzimas hepáticas (GOT y GPT), función renal (Urea y creatinina) y PCR, previo a la esplenectomía como postesplenectomía. Los valores medios de LDH y bilirrubina en todas sus formas disminuyeron significativamente tras la esplenectomía. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el análisis del metabolismo férrico y el metabolismo lipídico pre y postesplenectomía (Tabla 13).

Tabla 13. Descripción y análisis estadístico de los valores medios del hemograma y parámetros bioquímicos medios pre y post esplenectomía.

	Pre-esplenectomía media (SD)	Post-esplenectomía media (SD)	p
Hb (g/dL)	9,4 (1,5)	13,9 (1,3)	0,001
Rec.hem(x10 ⁶ /ul)	3,5 (1,2)	4,8 (0,5)	0,001
Hto (%)	27,2(4,5)	39,6 (4,1)	0,001
VCM (fL)	83,7(5,8)	84,1(3,5)	0,591
HCM (pg)	29,1 (2,1)	29,2 (1,4)	0,271
CHCM (g/dL)	35,4(1,1)	34,5 (1,0)	0,006
ADE (%)	23,7 (4,1)	15,4 (3,0)	0,001
RETIS T (10 ⁶ /L)	0,45 (0,13)	0,13(0,06)	0,001
RETIS (%)	12,9 (3,7)	2,7 (1,5)	0,001
Leucocitos	8796 (2392)	11215 (2546)	0,011
Plaquetas	239.394 (95.952)	588.332 (97.877)	0,001
Bil. Total(mg/dL)	4,6 (2,3)	1,2 (0,7)	0,001
Bil. I. (mg/dL)	4,4 (2,3)	1,1 (1,2)	0,001
Bil. Directa (mg/dL)	0,60 (0,3)	0,24 (0,2)	0,001
LDH (U/L)	767,6 (237,4)	493(92,6)	0,001
Ferritina (ng/mL)	260,4 (233,4)	368,4 (384,3)	0,099
I. Sat.Transf(%)	40,5 (10,4)	37,2 (13,6)	0,285
Hierro (µg/dL)	101,9 (22,6)	101,4 (38,9)	0,871
Catofife (µg/dL)	262,3 (52,4)	308,3 (47,7)	0,080
Colesterol T (mg/dL)	101,2 (29,3)	131,9 (49,7)	0,054
LDL (mg/dL)	56,3 (31,3)	61,4 (37,9)	0,686
HDL (mg/dL)	42 (12,3)	36,5 (7,3)	0,095
TGC (mg/dL)	70,9 (33,5)	67,9 (24,9)	0,537

Hb: Hemoglobina, Rec: Recuento , Hto:Hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, HCM: Hemoglobina corpuscular media, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, ADE: Ancho de distribución eritrocitario, RETIS T: Reticulocitos Totales. RETIS : Reticulocitos. Bil: Bilirrubina, LDH: lactato deshidrogenasa. Sat: Saturación. Catofife: capacidad de fijación del hierro. SD: Desviación estándar. total, T: total, LDL: Lipoproteína de baja densidad , HDL: Lipoproteína de alta densidad, TGC: Triglicéridos. SD: Desviación estándar.

Los valores mínimos del porcentaje medio de reticulocitos se obtuvieron a los 3,2 meses tras la esplenectomía, con cifras de 1,9% (SD 1,2). El valor máximo del número medio de plaquetas se observó a los 3 meses de la esplenectomía con una cifra media de 872.308 plaquetas (SD 283.234). A los 2,2 años tras la esplenectomía presentó

una disminución estadísticamente significativa del número de plaquetas medio a 552.539 (SD 119.808). En 3 pacientes se logró comprobar valores normales del número de plaquetas, tras un seguimiento medio de los pacientes tras la esplenectomía de 3,4 años (SD 2,3). Los otros pacientes mantuvieron plaquetas por encima de 400.000 con media de 585.181 (SD 96.362), en un tiempo medio de seguimiento de 3,6 años (SD 2,3).

En 2 casos precisaron tratamiento con AAS por el ascenso del número de plaquetas superior a 1.000.000. En ningún paciente durante su seguimiento se ha producido proceso de trombosis.

El porcentaje de niños con EH que precisó esplenectomía es mayor en el grupo grave (93%) en comparación con el grupo moderado (14%) y el grupo leve en el que no hubo ningún caso, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0001$).

1.6.1. Descripción de la muestra esplenectomizada

Las características generales de los pacientes esplenectomizados se muestran en la Tabla 14, no hubo diferencias estadísticamente significativas en comparación con los pacientes no esplenectomizados.

Tabla 14. Descripción y análisis estadístico de las características generales en niños con EH esplenectomizados y no esplenectomizados.

Características generales	Esplenectomía		p
	No (n=38) n (%)	Sí (n=17) n (%)	
Sexo			
- Hombre	20 (52,6%)	9 (52,9%)	0,983
- Mujer	18 (47,4%)	8 (47,1%)	
Edad (años) <i>Media (DS)</i>	2,3 (SD 3,1)	1,5 (SD 1,7)	0,369
<u>Motivo consulta:</u>			
1. Clínica	28 (73,7%)	15(88,2%)	0,267
2. A. Familiares	9 (23,7%)	1(5,9%)	
3. Alteración analítica	1 (2,6%)	1(5,9%)	
<u>Historia Familiar</u>			
- Sí	30 (78,9%)	12 (70,6%)	0,511
- No	8 (21,1%)	5 (29,4%)	
<u>Ictericia Neonatal</u>			
- Sí	22 (57,9%)	14 (82,4%)	0,078
- No	16 (42,1%)	3 (17,6%)	

La exploración clínica en los pacientes que serán esplenectomizados se muestra en la tabla 15, detectó esplenomegalia y palidez cutáneo-mucosa en un porcentaje mayor en comparación con el porcentaje de no esplenectomizados, con diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 15. Descripción y análisis estadístico de las características clínicas en niños con EH esplenectomizados y no esplenectomizados.

Características clínicas	Esplenectomía		p
	No (n=38) n (%)	Sí (n=17) n (%)	
Esplenomegalia			
- Sí	20 (52,6%)	15 (88,2%)	0,011
- No	18 (47,4%)	2 (11,8%)	
Ictericia			
- Sí	20 (47,4%)	12 (70,6%)	0,212
- No	18 (52,6%)	5 (29,4%)	
Palidez			
- Sí	14 (36,8%)	13 (76,5%)	0,007
- No	24 (63,2%)	4 (23,5%)	
Soplo sistólico			
- Sí	14 (36,8%)	7 (41,2%)	0,760
- No	24 (63,2%)	10 (58,8%)	
Hepatomegalia			
- Sí	3 (7,9%)	1 (5,9%)	1,0
- No	35 (92,1%)	16 (94,1%)	

La evaluación ecográfica de los pacientes esplenectomizados se muestra en la Tabla 16. El porcentaje de esplenomegalia, litiasis biliar y barro biliar fue mayor en el grupo que será esplenectomizado frente al que no, con diferencias estadísticamente significativas .

El porcentaje de niños que sufren complicaciones fue mayor en los pacientes que serán esplenectomizado en comparación con los pacientes sin esplenectomía. El porcentaje de crisis hemolíticas fue de 82% en EH esplenectomizados frente a 66% en EH sin esplenectomía, de crisis aplásicas fue de 41% frente a 18%, ambos sin diferencias estadísticamente significativas. El porcentaje de crisis relacionadas con la producción de cálculos biliares fue de 58,8% en EH

esplenectomizados frente a 15,8% en los no esplenectomizados, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,003$).

Tabla 16. Descripción y análisis estadístico de las características ecográficas en niños con EH esplenectomizados y no esplenectomizados.

Características ecográficas	Esplenectomía		p
	No (n=38) n (%)	Sí (n=17) n (%)	
Esplenomegalia			
- Sí	28 (77,8%)	17 (100%)	0,044
- No	8 (22,2%)	0 (0%)	
Litiasis biliar			
- Sí	7 (19,4%)	12 (70,6%)	0,001
- No	29 (80,6%)	5 (29,4%)	
Barro biliar			
- Sí	7 (19,4%)	13 (76,5%)	0,001
- No	29 (80,6%)	4 (23,5%)	
Bazo accesorio			
- Sí	1(2,8%)	2 (11,8%)	0,238
- No	35 (97,2%)	15 (88,2%)	
Hepatomegalia			
- Sí	0 (0%)	1 (5,9%)	0,321
- No	36 (100%)	16 (94,1%)	

El número medio de complicaciones (tanto de crisis hemolíticas y crisis relacionadas con la formación de los cálculos biliares) en el grupo EH que será esplenectomizado es mayor que en el grupo sin esplenectomía. Sin embargo, el número de crisis aplásicas no mostró diferencias entre los grupos (Tabla 17).

Tabla 17. Descripción y análisis estadístico del número medio de complicaciones en niños con EH esplenectomizados y no esplenectomizados.

Nº de complicaciones	Esplenectomía		p
	No (n=38) media (SD)	Sí (n=17) media (SD)	
Nº crisis hemolíticas	1,47 (SD 1,7)	7,12 (SD 10,3)	0,002
Nºcrisis aplásicas	0,18 (SD 0,4)	0,44 (SD 0,5)	0,062
Nºcrisis formación de los cálculos biliares	0,34 (SD 0,9)	1,20 (SD 1,7)	0,023

SD: Desviación estándar.

1.7. Asociación con Enfermedad de Gilbert

Se estudió evaluar si el diagnóstico de EG en los niños con EH tiene relevancia clínica, analítica y evolutiva en el seguimiento de su enfermedad.

La EG se detectó en 20 pacientes de nuestra muestra. 11 pacientes en su forma heterocigota y 9 en su forma homocigota (figura 15).

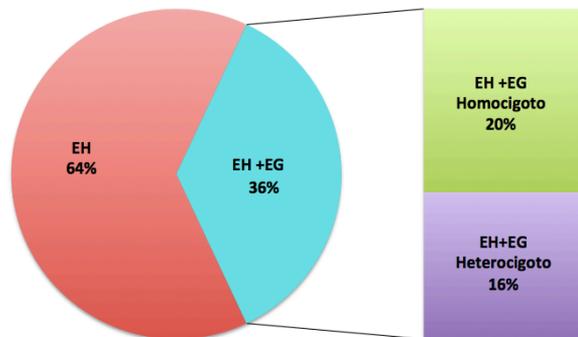


Figura 15. Descripción del porcentaje de EH y EG en los pacientes de nuestra muestra, incluyendo los subtipos de EG homocigoto y heterocigoto.

La clasificación de los pacientes con EG en función de la gravedad clínica de la EH se expone en la Tabla 18.

Tabla 18. Distribución de los pacientes diagnosticados de EG en función de la gravedad de la EH.

	Leve (n=19) n (%)	Moderada (n=21) n (%)	Grave (n=15) n (%)
<u>EG</u>			
- Sí	4 (21,1%)	10 (47,6%)	6 (40%)
- No	15 (78,9%)	11 (52,4%)	9 (60%)
<u>Subtipo EG</u>			
- Heterocigoto	4 (100%)	3 (30%)	4 (66,7%)
- Homocigoto	0 (0%)	7 (70%)	2 (33,3%)

Los pacientes con EG y EH tuvieron un porcentaje significativamente mayor de ictericia clínica, de cálculos biliares y de crisis relacionadas con la formación de los cálculos biliares, frente a los niños diagnosticados sólo de EH. La EG fue diagnosticada en más de la mitad (62,5%) de los pacientes que presentaron crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares. En los pacientes con EH y EG, se calculó un riesgo 5,6 veces mayor de tener cálculos biliares en la ecografía ($p=0,006$). Las cifras de bilirrubina directa y bilirrubina indirecta fueron significativamente mayores en los pacientes que asocian EG (Tabla 19).

No hubo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de colecistectomía y esplenectomía en pacientes con EH y EG en comparación con los pacientes con sólo EH (Tabla 19). La edad media de la colecistectomía fue menor en los pacientes con EH+EG

(6,6 años, SD 2,8) frente a los pacientes con sólo EH (7,8 años ,SD 2,6). De los dos niños con colecistectomía aislada, sólo uno se diagnosticó de EG.

Tabla 19. Descripción y análisis estadístico de la ictericia, los cálculos biliares en ecografía, los valores analíticos de bilirrubina, las crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares y la colecistectomía clasificados por Enfermedad de Gilbert.

	Enfermedad de Gilbert		p
	Sí (n=20) n(%)	No (n=35) n(%)	
<u>Ictericia</u>			
- Sí	16 (80%)	16 (45,7%)	0,013
- No	4 (20%)	19 (54,3%)	
<u>Cálculos biliares (eco)</u>			
- Sí	12(60,0%)	7 (20%)	0,004
- No	8 (40,0%)	28 (80%)	
Bilirrubina T (mg/dL) <i>Media (DS)</i>	5,5 (SD 2,9)	2,6 (SD 2,1)	0,002
Bilirrubina I (mg/dL) <i>Media (DS)</i>	5,1 (SD 2,9)	2,3 (SD 2,1)	0,003
<u>Crisis relacionadas con formación cálculos biliares</u>			
- Sí	10 (50%)	6 (17,1%)	0,010
- No	10 (50%)	29 (82,9%)	
<u>Colecistectomía</u>			
- Sí	7 (35%)	4 (11,4%)	0,076
- No	13 (65%)	31 (88,6%)	
<u>Esplenectomía</u>			
- Sí	8 (40%)	9 (26%)	0,270
- No	12 (60%)	26 (74%)	

SD: Desviación estándar.

Al realizar el estudio según los subtipos de EG se observó que los pacientes con EG homocigotos presentaron un porcentaje mayor de litiasis en la ecografía renal en comparación con los heterocigotos con

diferencias estadísticamente significativas (Tabla 20). La edad media de aparición de cálculos biliares o barro biliar fue de 7,1 años (SD 3,5) en los niños con EH. En los niños diagnosticados de EG fue de 6,8 años (SD 2,46), y en niños con EG homocigoto fue de 6,6 años (SD 2,7), sin observar diferencias estadísticamente significativas.

Los valores analíticos de bilirrubina total e indirecta fueron más elevados en el grupo homocigoto frente al heterocigoto con diferencias estadísticamente significativas. Se observó un porcentaje significativamente mayor de crisis relacionadas con los cálculos biliares en el subgrupo homocigoto. No hubo otras diferencias estadísticamente significativas en el resto de variables. (Tabla 20).

Tabla 20. Descripción y análisis estadístico de la ictericia, los cálculos biliares en ecografía, los valores analíticos de bilirrubina, las crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares y la colecistectomía clasificados por Enfermedad de Gilbert homocigota o heterocigota.

	Enfermedad de Gilbert n(%)		p
	Heterocigota (n=11)	Homocigota (n=9)	
<u>Ictericia</u>			
- Sí	8 (72,3%)	8 (88,9%)	0,591
- No	3 (27,3%)	1 (11,1%)	
<u>Cálculos biliares en ecografía</u>			
- Sí	4 (36,4%)	8 (88,9%)	0,028
- No	7 (63,6%)	1 (11,1%)	
Bilirrubina T (mg/dL) <i>Media (DS)</i>	3,7 (SD 1,4)	7,6 (SD 3,0)	0,0001
Bilirrubina I (mg/dL) <i>Media (DS)</i>	3,3 (SD 1,4)	7,2 (SD 2,9)	0,0001
<u>Crisis relacionadas con formación cálculos biliares</u>			
- Sí	3 (27,3%)	7 (77,8%)	0,025
- No	8 (72,7%)	2 (22,2%)	
<u>Colecistectomía</u>			
- Sí	3 (27,3%)	4 (44,4%)	0,642
- No	8 (72,7%)	5 (55,6%)	
<u>Esplenectomía</u>			
- Sí	4 (36,4%)	4 (44,4%)	0,714
- No	7 (63,6%)	5 (55,6%)	

SD: Desviación estándar.

Resumiendo, el porcentaje de ictericia clínica, cálculos biliares en ecografía, el porcentaje de complicaciones relacionadas con los cálculos biliares y los valores medios de bilirrubina (total e indirecta) fueron las variables con diferencias estadísticamente significativas en función de presentar o no EG. Al comparar los subtipos de EG (homocigoto y heterocigoto) se objetivaron resultados similares,

excepto la ictericia clínica que no muestra diferencias estadísticamente significativas.

Se analizó el riesgo de la EG y los subtipos de EG en las variables clínicas, analítica, ecográficas y evolutivas de nuestros pacientes. Su cálculo mostró que el diagnóstico de EG aumentaba el riesgo 4,8 veces de presentar crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares ($p=0,013$), llegando aproximadamente a duplicar el riesgo ($OR= 9,3$) si pertenecía al grupo homocigoto ($p=0,033$). Al ajustar el modelo por la gravedad de la EH del paciente, el diagnóstico de EG objetivó un aumento del riesgo 4,4 veces superior de presentar crisis relacionada con los cálculos biliares ($p=0,04$).

El análisis de regresión lineal múltiple mostró la relación entre la bilirrubina total, directa e indirecta y la EG, con independencia de la gravedad del paciente. Los resultados mostraron un aumento estadísticamente significativo de los valores medios de bilirrubina total, directa e indirecta en los pacientes diagnosticados de EG, ajustado por la gravedad de la EH (Tabla 21). Estos valores medios de bilirrubina aún fueron mayores cuando se asoció con el subtipo de EG (homocigoto), ajustado por la gravedad de la EH (Tabla 22).

Tabla 21. Análisis de los valores medios de bilirrubina total, directa e indirecta en función de la EG ajustado por la gravedad EH.

		Coefficiente B	p
EG	Bil.Total (mg/dL)	2,22	0,001
	Bil.Indirecta (mg/dL)	2,09	0,003
	Bil.Directa (mg/dL)	0,13	0,032

Tabla 22. Análisis de los valores medios de bilirrubina total, directa e indirecta en función del subtipo EG (homocigoto) ajustado por la gravedad EH.

		Coefficiente B	p
EG Homocigota	Bil.Total (mg/dL)	2,90	0,029
	Bil.Indirecta (mg/dL)	2,94	0,028
	Bil.Directa (mg/dL)	0,35	0,011

1.8. Diagnóstico

1.8.1. Índices reticulocitarios

Se estudiaron los índices reticulocitarios en 47 niños con EH, de los 55 niños diagnosticados y en seguimiento en el Hospital La Fe. En 8 de los casos no se pudo realizar el estudio, dado que 4 pacientes fueron dados de alta por edad en el momento en el que se incorpora la técnica y otros 4 pacientes dejan de acudir a las consultas (2 pacientes comunican un cambio de residencia y 2 pacientes no se conoce su destino).

1.8.1.1. Descripción de la muestra

Se analizaron los índices reticulocitarios de 47 pacientes, con una edad media de 9 años (SD 4,5) en el momento en que se realizó el estudio. La distribución por sexo fue similar (masculino 51%, femenino 49%). Se clasificaron los pacientes en función de su gravedad en leve (34%), moderado (32%) y grave (34%). La esplenectomía se realizó en 14 niños, todos ellos pertenecientes al grupo grave de EH.

1.8.1.2. Resultados

Los valores medios de hemoglobina, hematocrito, el VCM y la HCM estuvieron dentro del rango de normalidad. Sin embargo, los valores medios de la CHCM en 35,6 g/dL y del ADE en 18,2% de nuestra serie superaron los valores anormales establecidos de la CHCM (> 35 g/dL) y del ADE (>16%), con diferencias estadísticamente significativas $p=0,0006$ y $p=0,0005$, respectivamente (Tabla 23).

Tabla 23. Descripción de los índices y características eritrocitarias.

	Tendencia central (media)	Dispersión (SD)
Hb (g/dL)	12,4	2,2
Hematocrito (%)	34,8	6,2
VCM (fL)	84,0	6,2
HCM (pg)	29,9	2,3
CHCM (g/dL)	35,6	1,1
ADE (%)	18,2	4,1

VCM: volumen corpuscular medio, HCM : Hemoglobina corpuscular media, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, ADE: Ancho de distribución eritrocitario. SD: Desviación estándar.

Los índices y características de los reticulocitos se exponen en la Tabla 24. Se observó un aumento del número y porcentaje de reticulocitos con respecto a los valores de normalidad en niños, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0001$).

Tabla 24. Descripción de los índices y características reticulocitarias

	Tendencia central (media)	Dispersión (SD)
Retis(%)	8,1	5,0
Retis ($10^6/\mu\text{L}$)	0,32	0,19
VMR (fL)	77,9	8,3
FRI (Ratio)	0,44	0,15
VMCE (fL)	60,9	6,1
ADR (%)	31,8	3,0

VMR: volumen medio reticulocitario, FRI : Fracción de reticulocitos inmaduros, VMCE: Volumen medio de células esféricas, ADR: Ancho de distribución reticulocitario. SD: Desviación estándar.

Los resultados de los valores calculados a partir de los índices y parámetros reticulocitarios y eritrocitarios analizados se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Descripción de los Índices reticulocitarios y eritrocitarios calculados.

	Tendencia central (media)	Dispersión (SD)
Delta =VCM-VMCE (fL)	23,1	5,0
VMR-VMCE (fL)	16,9	5,2

VCM: volumen corpuscular medio, VMCE: Volumen medio de células esféricas, VMR: volumen medio reticulocitario. SD: Desviación estándar.

Los valores analizados en función de la gravedad de EH se muestran en la Tabla 26. Se evidenciaron diferencias entre los grupos, algunas con significación estadística, aunque no fueron relevantes en los puntos de corte para su diagnóstico.

Tabla 26. Descripción y análisis estadístico de los índices reticulocitarios y calculados en función de la gravedad de la EH.

	Leve (n=16) media (SD)	Moderada (n=15) media (SD)	Grave (n=16) media (SD)	p
VMR(fL)	81,8 (9,1)	76,8 (5,3)	74,9 (8,7)	0,051
FRI (Ratio)	0,50 (0,05)	0,55 (0,05)	0,29 (0,15)	0,001
VMCE(fL)	61,8 (6,2)	58,8 (4,9)	62,1 (6,7)	0,257
ADR (%)	30,1 (1,9)	32,1 (2,1)	33,4 (3,6)	0,003
Delta (fL)	21,7 (5,3)	24,2 (5,1)	23,3 (4,6)	0,270
VMR-VMCE(fL)	19,9 (4,5)	18 (4,3)	12,9 (4,3)	0,001

SD: Desviación estándar.

Los valores analizados en función de si el paciente había sido o no esplenectomizado se muestran en la Tabla 27. Se evidenciaron diferencias entre los grupos, algunas con significación estadística, pero en ningún caso fueron relevantes en los puntos de corte para su diagnóstico.

Tabla 27. Resultados descriptivos de los índices reticulocitarios y calculados en pacientes con EH esplenectomizados y no esplenectomizados.

	Esplenectomía		p
	No (n=33) media (SD)	Sí (n=14) media (SD)	
VMR (fL)	79,8 (7,8)	73,4 (7,9)	0,014
FRI (Ratio)	0,53 (0,06)	0,24 (0,07)	0,001
VMCE (fL)	61,1 (6,2)	60,7 (5,9)	0,070
ADR (%)	31,1 (2,2)	33,7 (3,7)	0,004
Delta (fL)	22,6 (5,6)	24,1 (3,1)	0,384
VMR-VMCE (fL)	18,7 (4,6)	12,7 (4,1)	0,001

SD: Desviación estándar.

Los puntos de corte descritos en la literatura seleccionados por ser una herramienta útil para el diagnóstico de los pacientes con EH fueron evaluados en el estudio. Los resultados de nuestros pacientes se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Evaluación del cumplimiento de los puntos de corte descritos en la literatura de los índices eritrocitarios y reticulocitarios.

	Cumplen	Cita
Delta >9,6 fL *	n=47 (100%)	Broséus <i>et al.</i> (2010)
VMCE <70,2 fL o Delta>10,4 fL y/o VMR<96,7fL	n=47 (100%)	Lazarova <i>et al.</i> (2014)
Delta>10 fL y (VMR-VMCE) <25 fL *	n=44 (93,6%)	Arora <i>et al.</i> (2018)
Delta>10 fL y (VMR – VMCE) <25fL	n=44 (93,6%)	Nair <i>et al.</i> (2015)
VMCE<VCM	n=47 (100%)	Chiron <i>et al.</i> (1999) Tao <i>et al.</i> (2015)

Delta : Diferencia entre volumen corpuscular medio y volumen medio de células esféricas, VMCE: Volumen medio de células esféricas, VMR: volumen medio reticulocitario, VCM: volumen corpuscular medio. * Excluyendo AIHA.

Los tres pacientes que no cumplieron los criterios de Nair *et al.* y Arora *et al.* fueron:

- 1º = Delta 21,7 y (VMR – VMCE) 26
- 2º = Delta 16,1 y (VMR – VMCE) 28
- 3º = Delta 9,7 y (VMR – VMCE) 9,7

El primer caso fue una paciente de 11 años con EH leve. El segundo y tercer caso fueron ambas lactantes (<12 meses), con EH leve y grave, respectivamente. En el tercer caso la paciente había sido transfundida hacía 4 meses. En ninguno de los tres pacientes se había realizado esplenectomía.

1.8.2. Evaluación test EMA

La técnica diagnóstica test EMA se realizó en 46 niños de los 55 niños diagnosticados y reclutados en nuestro estudio. En 8 de los casos no se pudo realizar el estudio, dado que 4 pacientes fueron dados de alta por edad en el momento en el que se incorpora la técnica y otros 4 pacientes dejan de acudir a las consultas (2 pacientes comunican un cambio de residencia y 2 pacientes no se conoce su destino).

En todos los niños con EH se obtuvo un resultado del test EMA positivo (n=46). Dado que todos los pacientes diagnosticados de EH dieron un resultado positivo para la RGO, se podría afirmar que las pruebas diagnósticas RGO y EMA presentaron una concordancia del 100% en nuestra serie.

Los valores obtenidos del test EMA dieron un valor medio de 0,7 (SD 0,07). Al evaluarlo en función de la gravedad de la EH se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, con disminución de los valores medios de EMA conforme se incrementaba la gravedad. (Tabla 29).

Tabla 29. Descripción y análisis estadístico de los valores medios del test EMA en función de la gravedad de la EH.

	Leve (n=18) media (SD)	Moderada (n=16) media (SD)	Grave (n=12) media (SD)	p
Test EMA	0,73 (SD 0,07)	0,71 (SD 0,06)	0,67 (SD 0,05)	0,019

SD: Desviación estándar.

Comparando cada uno de los grupos se observó que el valor medio del test EMA fue significativamente menor en el grupo grave en comparación con el grupo leve ($p= 0,0198$) y el grupo moderado ($p=0,0178$).

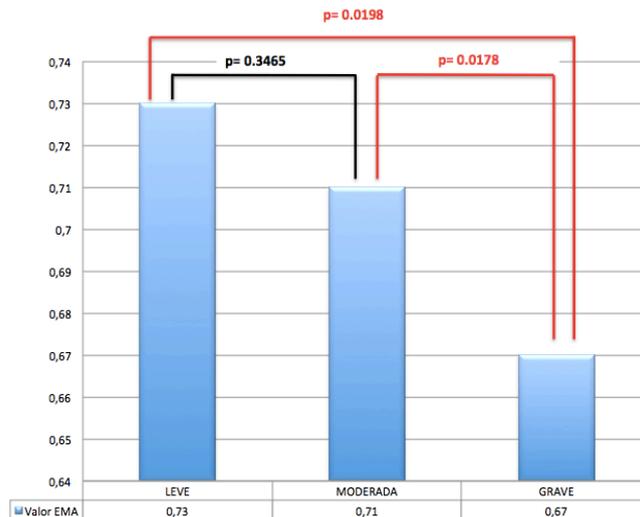


Figura 16. Representación gráfica de los valores medios de EMA en el grupo leve, moderado y grave de EH. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.

El test EMA se realizó en 14 niños esplenectomizados y 32 no esplenectomizados, ambos grupos con EH. Se analizó la posible influencia de la esplenectomía sobre los valores medios de EMA, observándose una disminución significativa en el grupo esplenectomizado frente a los pacientes no esplenectomizados (Tabla 30).

Tabla 30. Descripción y análisis estadístico de los valores medios EMA en pacientes con EH esplenectomizados y no esplenectomizados.

	Esplenectomía		p
	No (n=32) media (SD)	Sí (n=14) media (SD)	
Test EMA	0,72 (SD 0,06)	0,67 (SD 0,05)	0,027

SD: Desviación estándar.

2. Factores de riesgo de trombosis en niños con EH tras esplenectomía

2.1. Descripción y análisis de la muestra

Se recogieron muestras de sangre de un total de 48 niños. El grupo sano, el grupo EH y el grupo EH esplenectomizado, con un tamaño muestral de 16 niños en cada grupo.

La edad media de los pacientes fue de 11,2 años (SD 3,6) con predominio del sexo femenino (54,2%). Los grupos fueron comparables por edad y sexo, puesto que no había diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Tabla 31 y 32). En los

pacientes esplenectomizados, había pasado una media de 3 años (SD 2,3) desde la cirugía.

Tabla 31. Distribución y análisis estadístico de la Edad en el grupo sano, grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

	SANO	EH	EH + Esplenecto	p
EDAD (años)	11,1 (SD 3,4)	10,8 (SD 3,3)	11,7 (SD 4,2)	0,566

Esplenecto: Esplenectomizados. SD: Desviación estándar.

Tabla 32. Distribución y análisis estadístico de la variable Sexo en el grupo sano, grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

	SANO	EH	EH + Esplenecto	p
SEXO				
- Hombre	9 (56,2%)	8 (50%)	9 (56,2%)	0,167
- Mujer	7 (43,8%)	8 (50%)	7(43,8%)	

Esplenecto: Esplenectomizados.

En el hemograma realizado a todos los pacientes, se analizaron valores de la serie roja, blanca y plaquetar. El análisis bivalente de los parámetros de la serie roja entre: el grupo sano frente a grupo con EH, el grupo sano frente a grupo EH con esplenectomía y el grupo EH frente a grupo EH con esplenectomía se muestran en la Tabla 33, 34 y 35 respectivamente.

La serie roja mostró una hemoglobina y hematocrito más bajo en el grupo EH en comparación con el grupo sano, sin embargo, los

parámetros de HCM, la CHCM, ADE y reticulocitos fueron más elevados en el grupo EH frente al grupo sano, ambas con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 33).

La hemoglobina, HCM, la CHCM y reticulocitos fueron más elevados en el grupo EH con esplenectomía en comparación con el grupo sano, con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 34).

Al comparar los grupos de EH frente a grupo EH con esplenectomía, la serie roja presentó una hemoglobina y hematocrito más elevado en el grupo EH con esplenectomía, sin embargo, los parámetros analíticos de la CHCM, el ADE y reticulocitos fueron más bajos, ambos con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 35).

Tabla 33. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie roja en el grupo sano y grupo EH.

	SANO	EH	P
Hb (g/dL)	13,6 (SD 1,1)	11,5 (SD 1,5)	0,0001
Hto (%)	41,1 (SD 2,8)	31,7 (SD 3,9)	0,00001
VCM (fL)	83,6 (SD 5,3)	84,7 (SD 6,4)	0,5807
HCM (pg)	27,5 (SD 2,1)	30,6 (SD 2,3)	0,0005
CHCM (g/dL)	32,9 (SD 1,3)	36,1 (SD 0,8)	0,00001
ADE (%)	17,6 (SD 9,9)	21,9 (SD 10,9)	0,0029
RETIS (%)	0,89 (SD 0,2)	11,5 (SD 3,3)	0,00001

Hb: Hemoglobina, Hto:Hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, HCM : Hemoglobina corpuscular media, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, ADE: Ancho de distribución eritrocitario, RETIS: Reticulocitos. SD: Desviación estándar.

Tabla 34. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie roja en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

	SANO	EH + Esplenecto	P
Hb (g/dL)	13,6 (SD 1,1)	14,7 (SD 1,7)	0,0364
Hto (%)	41,1 (SD 2,8)	41,9 (SD 4,7)	0,1416
VCM (fL)	83,6 (SD 5,3)	85,1 (SD 5,1)	0,4328
HCM (pg)	27,5 (SD 2,1)	29,7 (SD 1,5)	0,0018
CHCM (g/dL)	32,9 (SD 1,3)	34,9 (SD 1,1)	0,00001
ADE (%)	17,6 (SD 9,9)	16,1 (SD 6,1)	0,1626
RETIS (%)	0,89 (SD 0,2)	3,5 (SD 3,7)	0,0087

Hb: Hemoglobina, Hto:Hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, HCM : Hemoglobina corpuscular media, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, ADE: Ancho de distribución eritrocitario, RETIS: Reticulocitos. Esplenecto: Esplenectomizados. SD: Desviación estándar.

Tabla 35. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie roja en el grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

	EH	EH + Esplenecto	P
Hb (g/dL)	11,5 (SD 1,5)	14,7 (SD 1,7)	0,00001
Hto (%)	31,7 (SD 3,9)	41,9 (SD 4,7)	0,00001
VCM (fL)	84,7 (SD 6,4)	85,1 (SD 5,1)	0,8838
HCM (pg)	30,6 (SD 2,3)	29,7 (SD 1,5)	0,2135
CHCM (g/dL)	36,1 (SD 0,8)	34,9 (SD 1,1)	0,0019
ADE (%)	21,9 (SD 10,9)	16,1 (SD 6,1)	0,0005
RETIS (%)	11,5 (SD 3,3)	3,5 (SD 3,7)	0,0001

Hb: Hemoglobina, Hto:Hematocrito, VCM: volumen corpuscular medio, HCM : Hemoglobina corpuscular media, CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media, ADE: Ancho de distribución eritrocitario, RETIS: Reticulocitos. Esplenecto: Esplenectomizados. SD: Desviación estándar.

La hemoglobina y hematocrito medio en cada uno de los grupos mostró cifras compatibles con anemia en el grupo de EH. Los reticulocitos y la CHCM superaron los valores normales establecidos en la literatura en los grupos de EH y EH con esplenectomía. Se objetivó un incremento del porcentaje ADE en el grupo de EH frente al grupo control y al grupo EH esplenectomizado.

El análisis estadístico bivalente de los parámetros de la serie blanca entre: el grupo sano frente a grupo con EH, el grupo sano frente a grupo EH con esplenectomía y el grupo EH frente a grupo EH con esplenectomía se muestran en la Tabla 36, 37 y 38 respectivamente.

El número medio de leucocitos fue más elevado significativamente en el grupo EH en comparación con el grupo sano, a expensas del alto número de neutrófilos. En el número medio de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos no se observaron diferencias entre los grupos. (Tabla 36).

Tabla 36. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie blanca en el grupo sano y grupo EH.

	SANO	EH	P
Leucocitos	6940 (SD 1241,9)	9669 (SD 2903,9)	0,0008
Neutrófilos	2903 (SD 749,2)	5956 (SD 2677,6)	0,0001
Linfocitos	2932 (SD 856,7)	2588 (SD 623,8)	0,3960
Monocitos	577 (SD 137,2)	738 (SD 334,4)	0,0856
Eosinófilos	476 (SD 371,1)	338 (SD 280,2)	0,3945
Basófilos	90 (SD 165,3)	138 (SD 215,6)	0,7598

Al comparar el grupo EH con esplenectomía frente al grupo sano se observó una cifra media de leucocitos más elevada en el grupo EH con esplenectomía, con diferencias estadísticamente significativas. El número medio de neutrófilos, monocitos y basófilos también fueron más elevados significativamente en el grupo de EH esplenectomizados. En la cifra media de linfocitos y eosinófilos no se observaron diferencias entre los grupos. (Tabla 37).

Tabla 37. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie blanca en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

	SANO	EH + Esplenecto	P
Leucocitos	6940 (SD 1241,9)	11170 (SD 3372,9)	0,0001
Neutrófilos	2903 (SD 749,2)	5813 (SD 2392,8)	0,0001
Linfocitos	2932 (SD 856,7)	3388 (SD 741,5)	0,1006
Monocitos	577 (SD 137,2)	1171 (SD 334,5)	0,00001
Eosinófilos	476 (SD 371,1)	640 (SD 538,1)	0,2816
Basófilos	90 (SD 165,3)	146 (SD 77,6)	0,0002

Esplenecto: Esplenectomizados. SD: Desviación estándar.

En la Tabla 38 se muestran los valores medios de la serie blanca en el grupo EH y grupo EH con esplenectomía con su análisis estadístico comparativo. El número medio de linfocitos, monocitos y eosinófilos fueron más elevados significativamente en el grupo de EH esplenectomizados. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los otros grupos celulares.

Tabla 38. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie blanca en el grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

	EH	EH + Esplenecto	P
Leucocitos	9669 (SD 2903,9)	11170 (SD 3372,9)	0,1222
Neutrófilos	5956 (SD 2677,6)	5813 (SD 2392,8)	0,8744
Linfocitos	2588 (SD 623,8)	3388 (SD 741,5)	0,0091
Monocitos	738 (SD 334,4)	1171 (SD 334,5)	0,0010
Eosinófilos	338 (SD 280,2)	640 (SD 538,1)	0,0286
Basófilos	138 (SD 215,6)	146 (SD 77,6)	0,0744

Esplenecto: Esplenectomizados. SD: Desviación estándar.

La cifra de leucocitos, monocitos y eosinófilos superaron los límites de la normalidad según la literatura científica en el grupo de EH esplenectomizados. Aunque se objetivaron diferencias significativas entre el resto de los grupos en los valores medios de neutrófilos, linfocitos y basófilos; todos los valores estuvieron dentro de los límites normales.

Los resultados más destacados de la serie blanca se muestran gráficamente en las figuras 17-20.

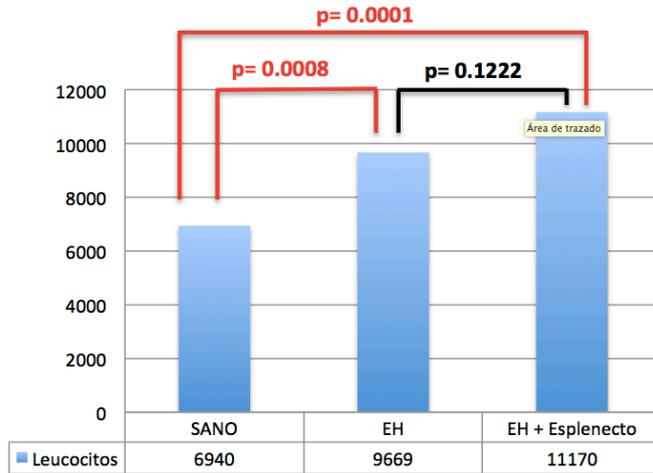


Figura 17. Número medio de leucocitos en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

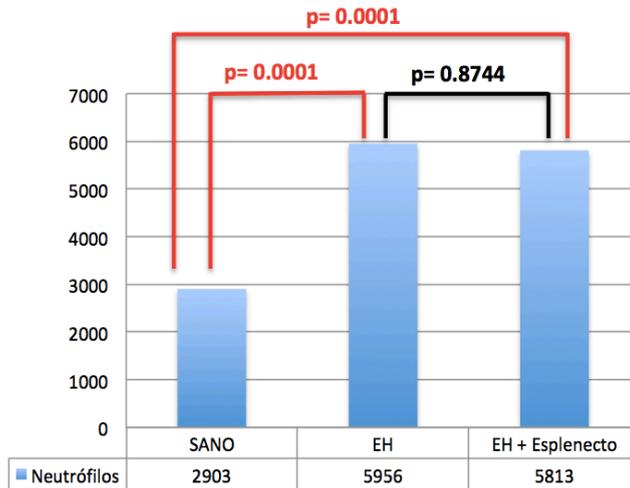


Figura 18. Número medio de neutrófilos en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

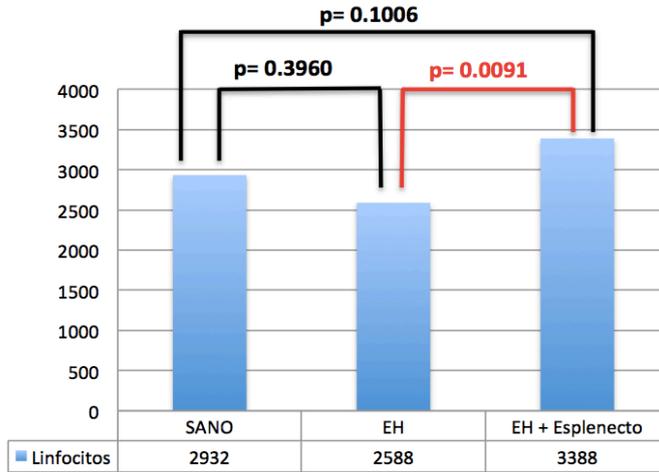


Figura 19. Número medio de linfocitos en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

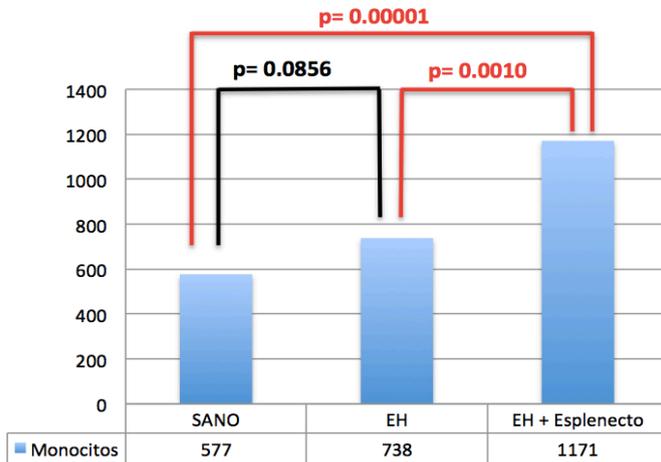


Figura 20. Número medio de monocitos en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

El análisis estadístico de los parámetros de la serie plaquetar entre: el grupo sano frente a grupo con EH, el grupo sano frente a grupo EH con esplenectomía y el grupo EH frente a grupo EH con esplenectomía se muestran en la Tabla 35, 36 y 37 respectivamente.

El número medio de plaquetas fue similar en el grupo sano frente al grupo con EH. El valor medio del VPM disminuyó en el grupo con EH sin embargo el PDW se incrementó en dicho grupo frente al grupo sano, ambos con diferencias estadísticamente significativas en el grupo con EH (Tabla 39).

Tabla 39. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie plaquetar en el grupo sano y grupo EH.

	SANO	EH	P
Plaquetas	291.563 (SD 66.023)	305.625 (SD 83.089)	0,6000
VPM (fL)	10,3 (SD 1,3)	8,2 (SD 1,2)	0,00001
PDW	12,9 (SD 2,6)	16,9 (SD 0,6)	0,00001

VPM: volumen plaquetar medio, PDW: Ancho de distribución plaquetar. SD: Desviación estándar.

El número medio de plaquetas fue mayor en el grupo EH con esplenectomía en comparación con el grupo control y grupo con EH, con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 40 y 41).

El valor medio del VPM fue más bajo en el grupo de EH con esplenectomía frente al grupo sano, sin embargo, el PDW fue más elevado, ambos con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 40).

Tabla 40. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie plaquetar en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

	SANO	EH + Esplenecto	P
Plaquetas	291.563 (SD 66.023)	512.875 (SD 110.737)	0,00001
VPM(fL)	10,3 (SD 1,3)	9,1 (SD 1,1)	0,0057
PDW	12,9 (SD 2,6)	15,3 (SD 1,8)	0,0050

VPM: volumen plaquetar medio, PDW: Ancho de distribución plaquetar.
Esplenecto: Esplenectomizados.

El valor medio del VPM fue más elevado en el grupo de EH con esplenectomía frente al grupo EH, sin embargo, el PDW fue más bajo, ambos con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 41).

Tabla 41. Descripción y análisis estadístico de los parámetros de la serie plaquetar en el grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

	EH	EH + Esplenecto	P
Plaquetas	305.625 (SD 83.089)	512.875 (SD 110.737)	0,00001
VPM (fL)	8,2 (SD 1,2)	9,1 (SD 1,1)	0,0344
PDW	16,9 (SD 0,6)	15,3 (SD 1,8)	0,0001

VPM: volumen plaquetar medio, PDW: Ancho de distribución plaquetar.
Esplenecto: Esplenectomizados. SD: Desviación estándar.

Los resultados de la serie blanca se muestran gráficamente en las figuras 21-23.

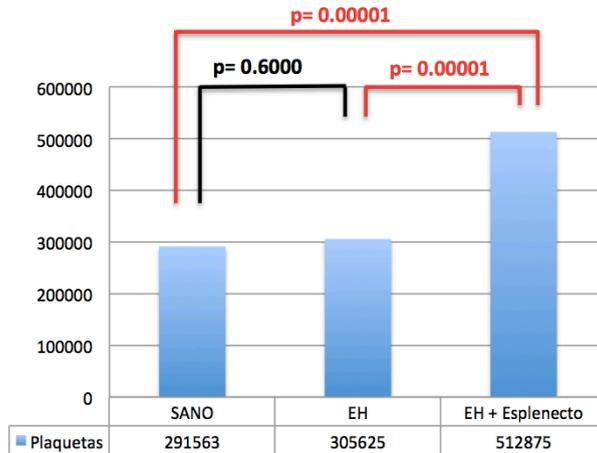


Figura 21. Número medio de plaquetas en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

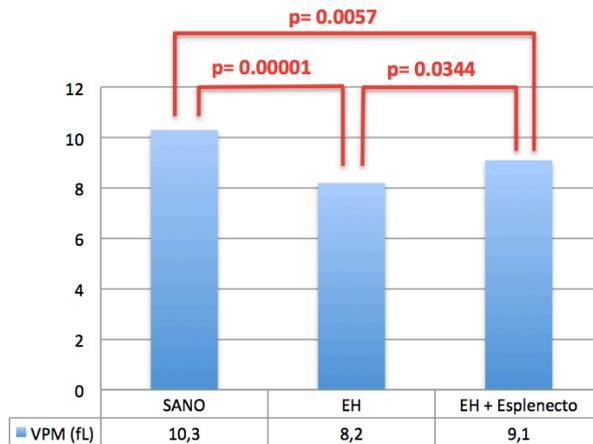


Figura 22. Valor medio del VPM en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

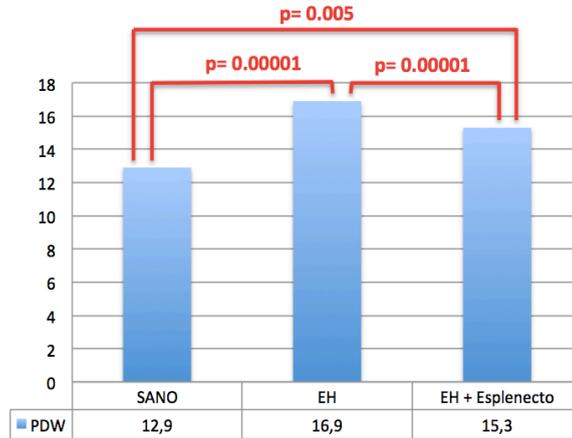


Figura 23. Valor medio del PDW en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

2.2. Biomarcadores inflamatorios

El análisis estadístico de los biomarcadores inflamatorios RANTES, CXCL5 y HMGB1 entre: el grupo sano frente a grupo con EH, el grupo sano frente a grupo EH con esplenectomía y el grupo EH frente a grupo EH con esplenectomía se muestran en la Tabla 42, 43 y 44 respectivamente.

Al comparar los biomarcadores inflamatorios (RANTES, CXCL5 y HMGB1) entre los niños del grupo sano y los niños con EH se observó un elevado valor medio no significativo de RANTES y HMGB1 en el grupo EH. El valor medio de CXCL5 tenía valores medios similares en ambos grupos (Tabla 42).

Tabla 42. Descripción y análisis estadístico de los biomarcadores inflamatorios (RANTES, CXCL5 y HMGB1) en el grupo sano y grupo EH.

	SANO	EH	P
RANTES (pg/ml)	242,1 (SD 146,2)	286,9 (SD 96,1)	0,0545
CXCL5 (pg/ml)	83,7 (SD 100,5)	82,5 (SD 94,8)	0,939
HMGB1 (ng/ml)	1,42 (SD 1,54)	1,76 (SD 1,25)	0,200

SD: Desviación estándar.

Los valores medios de los marcadores inflamatorios RANTES, CXCL5 y HMGB1 en el grupo EH esplenectomizados fueron más elevados frente al grupo sano, con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 43).

Tabla 43. Descripción y análisis estadístico de los biomarcadores inflamatorios (RANTES, CXCL5 y HMGB1) en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

	SANO	EH + Esplenecto	P
RANTES (pg/ml)	242,1 (SD 146,2)	411,9 (SD 154,5)	0,0222
CXCL5 (pg/ml)	83,7 (SD 100,5)	191,2 (SD 189,2)	0,0283
HMGB1 (ng/ml)	1,42 (SD 1,54)	2,37 (SD 0,88)	0,0009

Esplenecto: Esplenectomizados. SD: Desviación estándar.

Los valores medios inflamatorios de RANTES, CXCL5 y HMGB1 fueron más elevados en el grupo EH esplenectomizados frente al grupo EH, con diferencias estadísticamente significativas en CXCL5 y HMGB1 (Tabla 44).

Tabla 44. Descripción y análisis estadístico de los biomarcadores inflamatorios (RANTES, CXCL5 y HMGB1) en el grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

	EH	EH + Esplenecto	P
RANTES (pg/ml)	286,9 (SD 96,1)	411,9 (SD 154,5)	0,061
CXCL5 (pg/ml)	82,5 (SD 94,8)	191,2 (SD 189,2)	0,0437
HMGB1 (ng/ml)	1,76 (SD 1,25)	2,37 (SD 0,88)	0,0418

Esplenecto: Esplenectomizados. SD: Desviación estándar.

Los resultados del análisis de los biomarcadores inflamatorios se muestran gráficamente en las figuras 24, 25 y 26. Los valores medios de RANTES, CXCL5 y HMGB1 fueron más elevados en el grupo EH esplenectomizado, en comparación con los otros dos grupos.

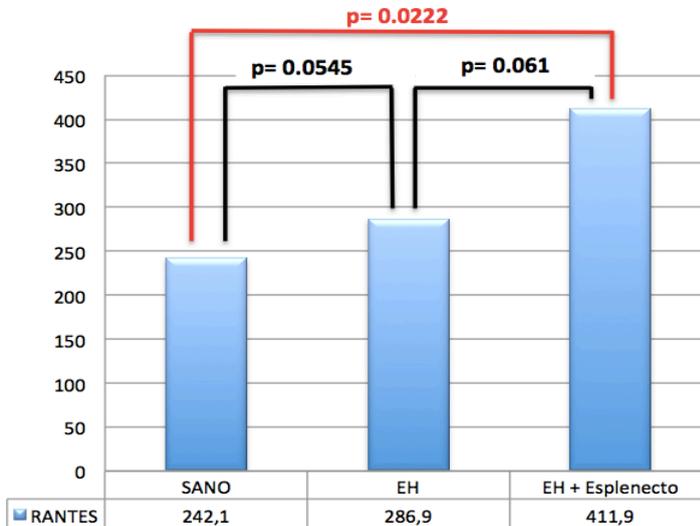


Figura 24. Valores medios de RANTES en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

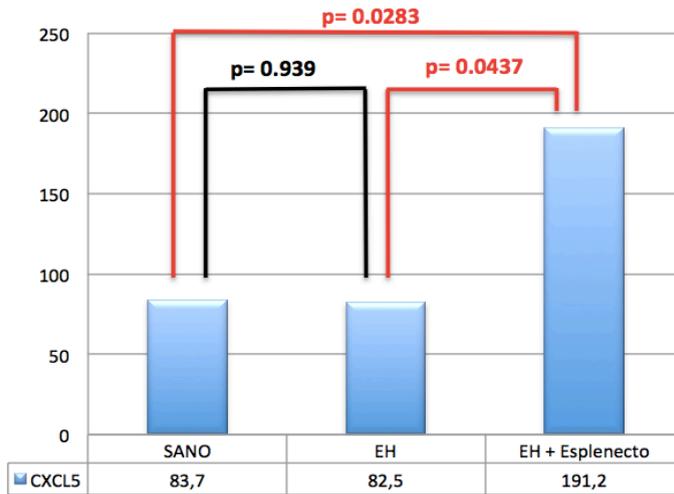


Figura 25. Valores medios de CXCL5 en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

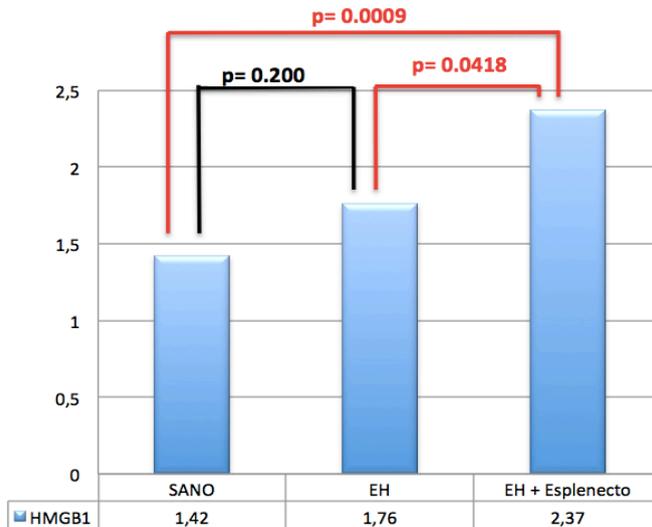


Figura 26. Valores medios de HMGB1 en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

2.3. NETs

El análisis estadístico de los marcadores de NETs, DNA y H3CyT entre: el grupo sano frente a grupo con EH, el grupo sano frente a grupo EH con esplenectomía y el grupo EH frente a grupo EH con esplenectomía se muestran en la Tabla 45, 46 y 47 respectivamente.

El valor medio de DNA en el grupo EH fue elevado en comparación con el grupo sano, con diferencias estadísticamente significativas. Los valores de H3CyT en el grupo EH y el grupo sano fueron muy similares (Tabla 45).

Tabla 45. Descripción y análisis estadístico de los NETs (DNA y H3CyT) en el grupo sano y grupo EH.

	SANO	EH	P
DNA (ng/ml)	425,9 (SD 119,7)	806,3 (SD 345,1)	0,0012
H3CyT(U.A.)	0,164 (SD 0,049)	0,168 (SD 0,049)	0,8652

U.A.: Unidades arbitrarias. SD: Desviación estándar.

El grupo EH esplenectomizado obtuvo valores más elevados de DNA y H3CyT en comparación con el grupo sano, con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 46).

Tabla 46. Descripción y análisis estadístico de los NETs (DNA y H3CyT) en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

	SANO	EH+Esplenecto	P
DNA (ng/ml)	425,9 (SD 119,7)	655,9 (SD 329,3)	0,0004
H3CyT(U.A.)	0,164 (SD 0,049)	0,207 (SD 0,077)	0,0457

U.A.: Unidades arbitrarias. Esplenecto: Esplenectomizados. SD: Desviación estándar.

Al comparar los NETs en el grupo EH frente al grupo EH esplenectomizado, se obtuvo valores medios elevados de DNA en el grupo EH y valores medios elevados de H3CyT en el grupo EH esplenectomizado, sin significación estadística (Tabla 47).

Tabla 47. Descripción y análisis estadístico de los NETs (DNA y H3CyT) en el grupo EH y grupo EH con esplenectomía.

	EH	EH + Esplenecto	P
DNA (ng/ml)	806,3 (SD 345,1)	655,9 (SD 329,3)	0,2427
H3CyT(U.A.)	0,168 (SD 0,049)	0,207 (SD 0,077)	0,0993

U.A.: Unidades arbitrarias. Esplenecto: Esplenectomizados. SD:Desviación estándar.

Los resultados del análisis de los NETs (DNA y H3CyT) se muestra gráficamente en las figuras 27 y 28. Los valores medios H3CyT fueron los más elevados en el grupo EH esplenectomizado, en comparación con los otros dos grupos. El grupo EH presentó los valores medios más elevados de DNA, en comparación con los otros dos grupos.

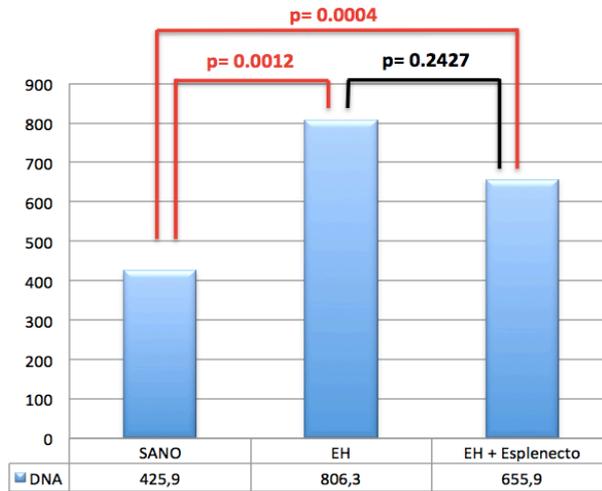


Figura 27. Valores medios de DNA en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

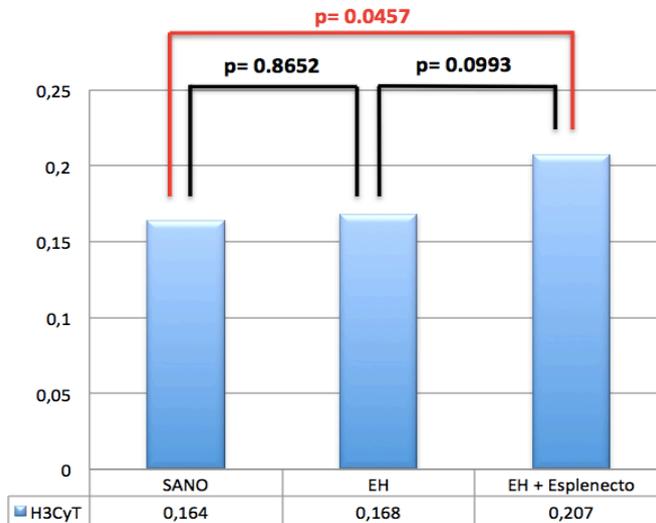


Figura 28. Valores medios de H3CyT en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

2.4. Agregados leucocito-plaqueta y monocito-plaqueta.

El análisis estadístico de los agregados L-P y M-P entre: el grupo sano frente a grupo con EH, el grupo sano frente a grupo EH con esplenectomía y el grupo EH frente a grupo EH con esplenectomía se muestran en la Tabla 48, 49 y 50 respectivamente

Al comparar los agregados L-P y M-P entre el grupo sano y el grupo EH se observó un porcentaje medio más elevado tanto en los agregados L-P como los agregados M-P en el grupo EH, con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 48).

Tabla 48. Descripción y análisis estadístico del porcentaje de agregados L-P y agregados M-P en el grupo sano y grupo EH.

	SANO	EH	P
Agregados L-P (%)	7,9 (SD 4,3)	14,6 (SD 5,9)	0,0010
Agregados M-P (%)	23,7 (SD 18,6)	50,4 (SD 23,3)	0,0015

SD: Desviación estándar.

El porcentaje medio de los agregados L-P y M-P fueron significativamente más elevados en el grupo EH esplenectomizados frente al grupo sano (Tabla 49).

Tabla 49. Descripción y análisis estadístico del porcentaje de agregados L-P y agregados M-P en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

	SANO	EH +Esplenecto	P
Agregados L-P (%)	7,9 (SD 4,3)	21,9 (SD 9,2)	0,00001
Agregados M-P (%)	23,7 (SD 18,6)	55,4 (SD 13,4)	0,0001

Esplenecto: Esplenectomizados. SD: Desviación estándar.

La Tabla 50 muestra la comparación de los agregados L-P y M-P en el grupo EH frente al grupo EH esplenectomizado. Se observó un porcentaje medio más elevado de agregados L-P en el grupo EH esplenectomizado, con diferencias estadísticamente significativas. El porcentaje medio de agregados M-P fue similar en ambos grupos (Tabla 50).

Tabla 50. Descripción y análisis estadístico del porcentaje de agregados L-P y M-P en el grupo sano y grupo EH con esplenectomía.

	EH	EH +Esplenecto	P
Agregados L-P (%)	14,6 (SD 5,9)	21,9 (SD 9,2)	0,0108
Agregados M-P (%)	50,4 (SD 23,3)	55,4 (SD 13,4)	0,4642

Esplenecto: Esplenectomizados. SD: Desviación estándar.

Los resultados del análisis de los agregados L-P y los agregados M-P se muestra gráficamente en las figuras 33 y 34.

El porcentaje medio de agregados L-P se duplicó en el grupo EH, y triplicó en el grupo EH esplenectomizados, en comparación con el grupo control. El incremento fue lineal y estadísticamente significativo ($p=0,00001$) (Figura 29).

El porcentaje medio de agregados M-P se duplicó en el grupo EH frente al grupo sano. El grupo EH y grupo EH esplenectomizado tuvo porcentajes medios similares de agregados M-P (Figura 30).

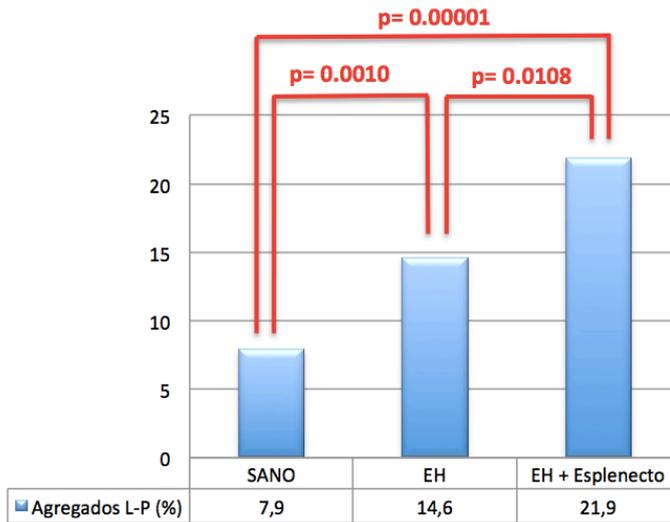


Figura 29. Porcentaje medio de agregados L-P en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos. Esplenecto: Esplenectomizados.

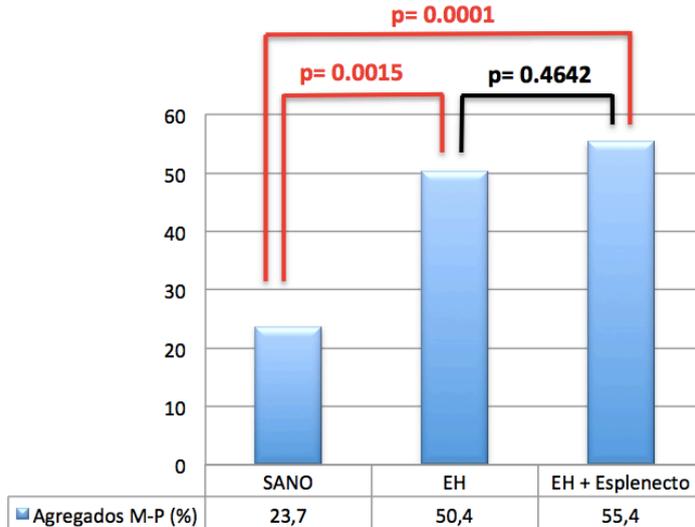


Figura 30. Porcentaje medio de agregados M-P en el grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado. Análisis estadístico comparativo entre cada uno de los grupos.. Esplenecto: Esplenectomizados.

La regresión lineal múltiple incluyó el número de plaquetas como posible factor de confusión dado que los grupos presentaron un desajuste significativo en el número de plaquetas.

El ajuste del modelo con el número medio de plaquetas en los diferentes grupos mostró el aumento del porcentaje de agregados L-P en un 6,23% (IC 95% 1,68- 10,78) en el grupo EH frente al grupo control y el aumento del porcentaje de agregados L-P en un 7,9% (IC 95% 1,31- 14,48) en el grupo EH esplenectomizado frente al grupo control (Tabla 51).

La regresión lineal múltiple ajustó que por cada 100.000 plaquetas aumentaba el porcentaje medio de agregados L-P en 2,76% con independencia del grupo al que pertenezcan: grupo sano, grupo EH o grupo EH esplenectomizados (Tabla 52).

Tabla 51. Modelo de regresión lineal múltiple con el análisis del porcentaje medio de agregados L-P en los diferentes grupos (grupo sano, grupo EH y grupo EH esplenectomizado) ajustado por número medio de plaquetas.

Variable		Coefficiente B	95% IC	p
Grupo	EH	6,23	1,68- 10,78	0,008
	EH+ Esplenecto	7,90	1,31- 14,48	0,020
Plaquetas		0,0000276	0,000006-0,0000492	0,013
Constante		-0,10	-7,17-6,96	0,976

Esplenecto: Esplenectomizados.

El coeficiente R² o coeficiente de determinación del modelo de regresión lineal múltiple calculado fue de 0,51. Un 51% de la

variación total del modelo fue explicada por el modelo de regresión lineal múltiple que incluyeron las dos variables analizadas: el grupo y el número de plaquetas.

El coeficiente Beta o coeficiente de regresión estandarizado, comparó entre sí las variables que carecen de unidades de medida similares. El coeficiente Beta en nuestro modelo de regresión lineal múltiple indicó que el grupo EH esplenectomizados (0,43) y el número de plaquetas (0,42) tuvieron una mayor contribución que haber pertenecido al grupo EH (0,38) (Tabla 52).

Tabla 52. Modelo de regresión lineal múltiple muestra el coeficiente estandarizado Beta.

Variable		Coefficiente B (95% IC)	Coefficiente Beta
Grupo	EH	6,23 (1,68- 10,78)	0,38
	EH+ Esplenecto	7,90 (1,31- 14,48)	0,43
Plaquetas		0,0000276 (0,000006-0,0000492)	0,42

Esplenecto: Esplenectomizados.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Historia natural de los niños con EH

La EH es una enfermedad que afecta tanto a niños en todos los rangos de edad como a adultos, aunque se suele manifestar clínicamente por primera vez en la infancia. La EH ha sido y es objeto de estudio en muchos de sus ámbitos: etiología, fisiopatología, complicaciones, diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Con todos los estudios se han podido elaborar guías al respecto (9,10,15,18,20,51) que se van modificando y actualizando con los nuevos descubrimientos y trabajos.

1.1. Características generales

La casuística estudiada es bastante numerosa teniendo en cuenta que no abundan en la bibliografía consultada series de pacientes exclusivamente pediátricos, ni cuya valoración comprenda todos los aspectos referidos en el presente trabajo.

Es un grupo homogéneo en cuanto a la distribución por sexos, con una edad mediana al diagnóstico temprana (2 años) en comparación con otras publicaciones (185,186). Esto podría ser debido al porcentaje de EH graves de nuestra serie, ya que el motivo de consulta más frecuente en nuestros pacientes (78%) fue por la clínica que presentaba el niño (palidez, ictericia o esplenomegalia) que había sido detectada bien por los familiares, por el pediatra de atención primaria

o el de urgencias hospitalarias. En nuestro estudio se observó que al aumentar la gravedad de la EH por un lado los pacientes incrementaban las manifestaciones clínicas y por otro lado se diagnosticaban los pacientes en edades más tempranas, siendo la edad más precoz con 14,4 meses (IQR 1,1-25,6) en las formas graves (Tabla 6). En algunos trabajos realizados en población pediátrica describen al igual que en el nuestro, una edad más precoz al aumentar la gravedad de los pacientes con EH. En el de Konca *et al.* detectan una edad mediana de diagnóstico de 5,6 años, siendo en el grupo grave de 6,6 meses (186,187).

La evaluación de la gravedad se determinó en condiciones basales, sin complicación intercurrente (9,10,19,20,188). Al analizar la gravedad de la EH en nuestro estudio se observó un aumento del porcentaje de las formas graves que fueron el 27% de los casos, siendo EH moderadas el 38% y EH leves el 35%. Los porcentajes descritos en la literatura en función de la gravedad de la EH son: formas EH moderada en torno al 50-60%, EH leve en torno al 20-30% y un porcentaje menor en las formas severas, en torno a un 10% (186,189). La diferencia porcentual de la gravedad de EH en la literatura y nuestra serie, podría ser explicada porque las investigaciones están realizadas en población adulta o mezclan población tanto pediátrica como adulta, y en la nuestra tan sólo se incluyeron niños (190). Al comparar los porcentajes en investigaciones realizados en niños se objetiva la persistencia de un porcentaje más elevado en nuestro estudio de formas EH graves (27%): Oliveira *et al.* (20%), Konca *et*

al. (8%) y Güngör *et al.* (24%) y también un porcentaje disminuido de las formas de EH moderadas (38%) en nuestro trabajo en comparación con otros: Oliveira *et al.* (54%), Konca *et al.* (61%) y Güngör *et al.* (50%) (185–187).

La edad más precoz observada en nuestros pacientes y el porcentaje superior de las formas de EH graves, podría estar justificado porque actualmente el servicio de hematología pediátrica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es un centro de referencia de la Comunidad Valenciana, por ello podríamos recibir y atender un porcentaje mayor de pacientes graves que precisaran un manejo o tratamiento más complejo.

1.2. Antecedentes familiares

La EH es la anemia hemolítica crónica hereditaria más frecuente en el mundo (3), con descendencia familiar en la mayoría de los pacientes. En nuestro estudio el 76% de los pacientes tenían antecedentes de una historia familiar de EH, que es un porcentaje similar al descrito hasta el momento en la literatura (2,187,191) (Tabla 5). Sin embargo en un 24% no había antecedentes familiares de EH, aunque podrían ser familiares con clínica leve que pasa desapercibida y/o asintomáticos. Este porcentaje es similar al descrito en otros trabajos en niños (186) y sugiere posiblemente una herencia por mutación autosómica recesiva o *de novo* (2).

De nuestros niños con historia familiar positiva, es llamativo que la mitad de ellos tenían al menos un familiar al que le habían realizado

una esplenectomía como tratamiento. La esplenectomía es el tratamiento de las formas de EH graves y ocasionalmente en las moderadas, por lo que se podría inferir que la mitad de nuestros niños con EH con antecedentes familiares deberían pertenecer al grupo grave. Pero al analizar los antecedentes familiares según la gravedad de la EH, no se objetivó un mayor porcentaje de formas de EH graves. Esta situación podría ser debida a que antaño se indicaban un mayor porcentaje de esplenectomías como tratamiento, y en la actualidad se tiende a ser más restrictivo con la indicación por el mayor riesgo de infecciones y trombosis postesplenectomía.

1.3. Ictericia Neonatal

Durante la época neonatal, algunos niños presentan ictericia que puede ser debida a múltiples etiologías, su asociación con la anemia es frecuente y junto a ella suelen ser la primeras manifestaciones de EH en neonatos (192,193). La esplenomegalia es una manifestación clínica poco frecuente en los recién nacidos (18). En nuestra serie se evidenció ictericia neonatal en más de la mitad de los niños diagnosticados de EH (65%), con porcentajes similares descritos en la literatura (192,194–198).

En 2006 Saada *et al.* detectaron una prevalencia de diagnóstico de EH del 1% en los pacientes con ictericia neonatal que precisaron tratamiento, lo que corresponde a una incidencia 30 veces superior a la población neonatal general (16). Por tanto es importante que dentro del diagnóstico diferencial de la ictericia neonatal (más aún cuando

precisa ingreso hospitalario), se consideren las anemias hemolíticas. La EH es uno de los diagnósticos diferenciales más frecuentes en la etapa neonatal (18). El 72% de los neonatos con ictericia precisaron ingreso en la unidad de neonatología para tratamiento con fototerapia y/o exanguinotransfusión.

La EH esta infradiagnosticada en los neonatos con ictericia e hiperbilirrubinemia, pero en todos nuestros pacientes con debut neonatal se llegó al diagnóstico de EH (199). Por otro lado se podría pensar que el debut de ictericia neonatal en los niños podría estar relacionado con una mayor gravedad de la EH, pero es independiente de la misma como se demuestra en nuestro estudio y en otras series (17,200,201). La ictericia neonatal no sugiere una peor evolución del paciente.

1.4. Características clínicas

La tríada clínica clásica descrita en la EH es: ictericia, esplenomegalia y anemia (3,11). Los niños con EH analizados en nuestro estudio presentaron con mayor frecuencia dichos síntomas: en primer lugar la esplenomegalia (64%), seguido de ictericia (58%) y anemia (49%) siendo menos frecuente la hepatomegalia y el soplo sistólico.

La esplenomegalia se puede detectar más frecuentemente en la infancia, adolescencia y adultos jóvenes (75-95%) que en la etapa del lactante (50%) (10), por tanto estudios que engloben población adulta tendrán un mayor porcentaje de esplenomegalia clínica. Existen variaciones en la clínica, con diferentes porcentajes de anemia,

ictericia y esplenomegalia en investigaciones realizadas en niños (185–187). En algún estudio de carácter retrospectivo se encuentra la esplenomegalia como signo clínico más frecuente, al igual que en el nuestro (185) pero no suele ser la clínica más habitual en niños.

Los síntomas clínicos de la tríada clásica podrían incrementar su porcentaje al aumentar la gravedad de la EH. Pero en nuestros pacientes se observó que a mayor gravedad de la EH se objetivó un aumento significativo del porcentaje de detección de palidez y esplenomegalia (Tabla 7). La ictericia no aumentó su porcentaje significativamente al aumentar la gravedad de la EH, debido posiblemente a la coexistencia de otras patologías relacionadas con el aumento de bilirrubina sanguínea sin relación con la hemólisis, como la EG que comentaremos en profundidad más adelante.

En las visitas a la consulta de hematología pediátrica se realizaba la somatometría de los pacientes para comprobar un adecuado desarrollo ponderoestatural. En nuestra muestra se objetivó un alto porcentaje (98%) de niños sin desnutrición, por lo que la EH con hemólisis crónica mantenida no indica una alteración en su estado nutricional.

La obesidad en los niños es cada vez más frecuente. El estudio ALADINO realizado en 2019 observó una alta prevalencia de obesidad y sobrepeso en la población pediátrica española con un importante porcentaje de exceso de peso (40,6%): 23,3% de sobrepeso y 17,3% de obesidad (202). La obesidad favorece la aparición de factores de riesgo protrombótico como la hipertensión arterial, la

diabetes mellitus, la hipercolesterolemia y la alteración del metabolismo lipídico. En nuestro estudio, sin embargo, tan sólo el 20% de los niños presentaron obesidad o sobrepeso, lo que supone la mitad de la prevalencia de exceso de peso detectada en los estudios a nivel estatal. Esto sugiere que los niños con EH detectados en nuestra unidad en su mayoría no presentan obesidad como factor de riesgo pro-trombótico. En ningún caso en los antecedentes personales descritos había diagnóstico de hipertensión arterial, diabetes mellitus, hipercolesterolemia y dislipemia. El porcentaje de obesidad y desnutrición en nuestros pacientes no dependía de la gravedad de la EH, lo que podría indicar que la evolución de los pacientes no influye en el estado nutricional de los niños.

1.5. Características ecográficas

La ecografía es una técnica que complementa la exploración física para la detección de esplenomegalia. El empleo de esta técnica nos permitió observar un mayor porcentaje de pacientes con esplenomegalia (85%) en comparación con el porcentaje detectado clínicamente (64%). En Güngör *et al.* se observa un porcentaje en la detección de esplenomegalia por exploración física de 70,8% y la detectada por ecografía de 73,8% (187). En nuestro estudio es más amplia la diferencia observada pudiendo ser debida a la menor edad de diagnóstico de nuestros pacientes, a la mejoría en la sensibilidad de los ecógrafos en los últimos años o a la demora en su realización de la técnica.

Una mayor gravedad de la EH produce un incremento del porcentaje de detección ecográfica de esplenomegalia. Todos los niños con subtipo grave fueron diagnosticados de esplenomegalia con ecografía.

La ecografía permite una mayor detección de casos de esplenomegalia, pero en el caso de la hepatomegalia permitió reducir el porcentaje de detección, permitiendo detectar tan sólo un caso de hepatomegalia, de los cuatro descritos por clínica. Esta variación se podría explicar por un lado porque la hepatomegalia leve en los lactantes puede ser fisiológica y en nuestro estudio hay una prevalencia alta de niños pequeños, a la demora en la realización de la ecografía abdominal solicitada en la consulta o a alguna infección vírica habitual en la infancia autolimitada con inflamación leve hepática que no se identificara posteriormente en la ecografía.

En los pacientes con ictericia, se evidencia un aumento de bilirrubina en sangre, pudiendo observar como hallazgos ecográficos en ocasiones cálculos biliares o barro biliar, siendo la ecografía la mejor técnica para la detección de los cálculos biliares (22). La litiasis biliar se detectó en nuestro estudio en el 36% de los niños, siendo el porcentaje descrito en la literatura entre el 5-50%, este porcentaje se elevará a mayor edad del paciente (197). El barro biliar se halló en un porcentaje levemente superior (38%) debido posiblemente a que el barro biliar suele ser el paso previo a la formación de los cálculos biliares. Aunque la ictericia no se correlacionó con la gravedad de la EH, el porcentaje de detección de barro biliar y la litiasis biliar se elevó al aumentar la gravedad de la EH, con porcentajes en las formas

graves de 73% y 66% respectivamente (Tabla 8). La detección de litiasis biliar o barro biliar ecográficamente puede sugerir una peor evolución de los niños con EH, por el aumento del porcentaje detectado en las formas graves.

La ecografía abdominal se realiza en el seguimiento de los pacientes con EH, como ya se recomienda en algunas guías y estudios, indicando la realización de controles ecográficos anuales en la infancia, pudiéndose iniciar en torno a los 4-5 años (20,22). En nuestro estudio se realizó la ecografía abdominal en todos los niños, excepto en dos de ellos que presentaban una edad inferior a 2 años y fueron clasificados de EH leve.

1.6. Características analíticas

La hemólisis crónica producida en la EH, objetiva una menor vida media de los esferocitos en su circulación sanguínea, por lo que las cifras medias de hemoglobina, hematocrito y recuento de hematíes disminuyen, aumentando los valores de bilirrubina total a expensas de la indirecta. Al producirse la hemólisis la médula recibe un estímulo para aumentar el número de eritrocitos (esferocitos), con un incremento mayor de sus precursores, los reticulocitos.

El esferocito tiene una forma diferente al eritrocito normal y se puede detectar en el frotis de sangre periférica, pero en un porcentaje pequeño de pacientes, en ocasiones no se objetivan esferocitos (10,197). En nuestro estudio los esferocitos se detectaron en todos los niños. Al poseer el esferocito una forma diferente también se puede

encontrar en el hemograma características e índices en la serie roja que nos pueden orientar al diagnóstico. En un estudio realizado en niños diagnosticados de EH no esplenectomizados con una CHCM > 35 mg/dl conseguía una sensibilidad del 70% y especificidad del 86% con un AUC de 0,86 y el ADE > 14% obtenía una sensibilidad del 85% y especificidad del 97% con un AUC de 0,92; siendo la combinación de las dos pruebas una buena orientación o predicción para el diagnóstico de EH (21). En nuestro caso se detectó una media de la CHCM en 35,3 mg/dL y un porcentaje medio del ADE en 21,6% pudiendo confirmar que son valores que nos pueden orientar en el diagnóstico de la EH (21) (Tabla 9).

Los valores de hemoglobina, hematocrito y recuento de hematíes así como los reticulocitos tanto en valores absolutos como en porcentaje, y la bilirrubina en todas sus formas permiten orientar acerca de la severidad de la EH. Sin embargo en este sentido no encontramos diferencias significativas en valores de la CHCM y porcentaje del ADE. Por tanto estos últimos valores nos ayudan en el diagnóstico de todas las formas de la EH (incluidas las formas leves) y no son parámetros fiables para determinar la gravedad de la EH (Tabla 11).

Dentro de los parámetros bioquímicos, se estudiaron los valores analíticos del metabolismo lipídico y estaban dentro de la normalidad, no hubo en ningún caso de hipercolesterolemia, ni de hipertrigliceridemia.

También se estudió el metabolismo férrico, con aumento de los valores de ferritina (176,4 ng/mL) y el índice de saturación de transferrina (34,9%) por encima de valores establecidos como normales. El aumento de la ferritina se puede originar por dos procesos en la EH: por un lado por la mayor absorción del hierro originada por una situación de anemia crónica hemolítica que produce mayor eritropoyesis y por otro lado por los requerimientos trasfusionales periódicos o puntuales. La ferritina sérica es muy sensible, teniendo presente que puede aumentar en situaciones de inflamación o infección, no tan sólo por sobrecarga férrica.

1.7. Complicaciones

En el seguimiento de nuestros pacientes se objetivaron frecuentes complicaciones (84%), quizá porque en nuestro estudio tan sólo analizamos niños y ellos tienen una mayor tendencia a presentar infecciones víricas (193,203) que son las que habitualmente desencadenan las crisis hemolíticas, que en nuestra serie también fueron las más frecuentes (71%). Asimismo podría ser debido también por el alto porcentaje de niños con EH grave. La primera complicación suele ser una crisis hemolítica y se presentó a la edad media de 2,1 años, algo más precoz de lo descrito en la literatura, requiriendo tratamiento transfusional con una hemoglobina media de 6,1 mg/dL (SD 1,5) (7).

Después de la primera crisis hemolítica, que en muchos casos puede ser el motivo del diagnóstico, las siguientes crisis presentan valores

analíticos más atenuados y por lo tanto disminuyen los requerimientos transfusionales. Podría sugerir que posiblemente el paciente ya conoce mejor su enfermedad, con lo que ante la aparición de algún síntoma acudiría más precozmente a solicitar asistencia sanitaria.

Las complicaciones relacionadas con la formación de los cálculos biliares (litiasis biliar sintomática es lo más frecuente, pero también se producen en ocasiones formas más complicadas como coledocolitiasis, colecistitis, colangitis o pancreatitis) se diagnosticaron en un 29% de los pacientes. Este porcentaje es inferior al descrito en la literatura (197) y podría ser explicado por un lado porque no incluimos en las complicaciones a los niños con litiasis biliar asintomática detectada por ecografía y por otro lado porque nuestra muestra tiene una edad temprana de diagnóstico, siendo que la litiasis suele aparecer con más frecuencia en la infancia tardía y etapa adulta.

La gravedad de la EH influye en el riesgo de presentar una crisis hemolítica pero también de presentar una complicación relacionada con la formación de los cálculos biliares. Se produce un mayor porcentaje de complicaciones relacionadas con los cálculos biliares y crisis hemolíticas cuando aumenta la gravedad de la EH (204). En nuestro estudio el riesgo de producir una crisis hemolítica aumentó en el grupo moderado (OR 4,3, $p=0,047$), siendo aún más elevado en el grupo grave (OR 6,5, $p=0,036$) en comparación con el grupo leve. El porcentaje de las crisis relacionadas con la formación de los cálculos biliares fue significativamente más elevado en el grupo grave (53,3%)

seguido del moderado (38,1%), en el grupo leve no se produjo ninguna crisis.

Las crisis aplásicas sin embargo son independientes de la gravedad de la EH y son las menos frecuentes, pero en nuestro trabajo el porcentaje diagnóstico fue elevado (27%) en comparación con otros (185–187). Además son crisis más impredecibles y graves (205), por la detección o parada a nivel medular y suponen una frecuencia alta de necesidad de transfusión. En nuestro estudio todos los pacientes excepto uno precisaron transfusión durante su ingreso. El agente etiológico más frecuente es el Parvovirus B19, que fue el detectado en el 73% de nuestros pacientes (45). En ningún caso hubo una segunda crisis aplásica, posiblemente porque el parvovirus produce inmunidad de por vida.

No hubo complicaciones como crisis megaloblásticas porque todos los pacientes recibieron tratamiento con ácido fólico siguiendo las indicaciones de las guías clínicas (206). Aunque en la literatura si que hay descritos casos, posiblemente por no tener acceso en su mayoría a asistencia sanitaria y una adecuada alimentación (186).

1.8. Tratamiento

Todos los pacientes deben llevar una dieta equilibrada para su edad, rica en frutas y verduras. Como hemos mencionado en el apartado anterior, todos nuestros pacientes recibieron tratamiento con ácido fólico para evitar la anemia megaloblástica, siguiendo las indicaciones de las guías clínicas (10,15,196,218).

1.8.1. Transfusiones

El 61,8% de los pacientes de nuestro estudio necesitaron transfusiones de concentrado de hematíes en alguna ocasión y 5 niños precisaron transfusiones periódicas por la clínica anémica. A mayor gravedad de la EH existe un incremento significativo del porcentaje de transfusiones, siendo en el grupo grave del 80%, en el moderado del 76,2% y en el grupo leve del 31,6%.

Como los requerimientos transfusionales aumentan los valores de ferritina, en nuestro estudio se analizaron a los pacientes que habían sido trasfundidos frente a los que no, objetivando que los niños transfundidos tenían un incremento de ferritina media de 157 ng/mL en comparación con los no transfundidos (80 ng/mL), con diferencias estadísticamente significativas. Ningún paciente mostró sobrecarga férrica, ni niveles de ferritina que pudieran sugerirlo y por tanto en ningún caso se inicio tratamiento quelante.

1.8.2. Esplenectomía

La esplenectomía se realiza en las formas EH graves y en algunas formas de EH moderadas. Es un tratamiento efectivo, disminuye la hemólisis crónica y sus complicaciones (51). En nuestra serie el porcentaje de esplenectomías fue del 31%, elevado en comparación con otras series (186,187), aunque en algún estudio aislado presenta un porcentaje similar al nuestro (185). Este porcentaje elevado detectado podría ser explicado por una mayor gravedad de nuestros pacientes con EH.

En un estudio realizado en niños se observó una edad mediana de esplenectomía en 8 años (IQR 5-12) (207), edad mediana similar a la observada en nuestro estudio (8,8 años, IQR 7,1-8,9). Las guías clínicas de EH aconsejan retrasar la cirugía hasta los 6 años por el riesgo de sepsis postesplenectomía, que es mayor cuando menor es la edad del paciente (10). No obstante a pesar del elevado porcentaje de formas EH graves y de esplenectomías de nuestra muestra, no observamos un adelanto en la edad mediana de la esplenectomía.

Tanto la esplenectomía total vs la esplenectomía parcial pueden ser indicaciones terapéuticas, pero los resultados analíticos son mejores tras la esplenectomía total (208). La esplenectomía parcial se reserva para pacientes más pequeños, generalmente menores a 6 años, por disminuir el riesgo de sepsis. En la esplenectomía parcial el bazo no extirpado puede volver a regenerarse y crecer con el paso del tiempo, empeorando la clínica y la analítica siendo entonces indicación de esplenectomía total. En nuestro estudio tan sólo en dos pacientes se realizó esplenectomía parcial, uno de ellos precisó realizar una esplenectomía total a los 13 meses de la esplenectomía parcial por presentar una mala evolución clínica y analítica con aumento de la hemólisis crónica; y en el otro caso la evolución fue adecuada. Aún así muchos estudios demuestran que la esplenectomía parcial puede ser una buena opción de tratamiento en niños (51,55–57,185,209–212).

El abordaje de la esplenectomía puede ser por dos vías, laparoscópica o abierta, siendo el abordaje por vía laparoscópica la que tiene

mayores ventajas, con menor porcentaje de complicaciones y una estancia hospitalaria más corta (52–54,213–215). En nuestro estudio, tan sólo una vía de abordaje fue abierta y no hubo complicaciones durante su seguimiento postquirúrgico.

Tras la esplenectomía se pueden producir complicaciones infecciosas con mayor riesgo de infecciones graves o sepsis por bacterias encapsuladas (Neumococo, *Haemophilus influenzae* tipo b, Meningococo serotipo ACWY y B) (10), siendo mayor este riesgo durante los primeros años tras la esplenectomía. Hoy en día los pacientes reciben una cobertura vacunal frente a las bacterias encapsuladas que debe ser revisada y actualizada en cada paciente previo a la realización de la esplenectomía, al menos 15 días antes de la misma. Además precisan una profilaxis antibiótica diaria con penicilina o amoxicilina oral que se debe mantener, asegurando la adherencia terapéutica de los pacientes. La cobertura vacunal correcta y la profilaxis antibiótica han disminuido el riesgo de infecciones y sepsis en la actualidad (58,59). Todos nuestros pacientes llevaron la profilaxis antibiótica y cumplieron la cobertura vacunal específica, en ningún caso hubo infecciones graves o que requirieran ingreso hospitalario, al igual que en otros estudios (59). La adherencia al tratamiento antibiótico prescrito fue buena (94%). En algunos trabajos la sepsis tras la esplenectomía se detectaba en pacientes con antecedente de inmunodeficiencia (216), en el nuestro no hubo antecedentes de inmunodeficiencia.

Las posibles complicaciones protrombóticas postesplenectomía se abordarán, en un apartado especial, al ser uno de los objetivos principales de la tesis doctoral.

Tras la esplenectomía, al disminuir la hemólisis crónica, mejora la sintomatología clínica y los valores analíticos (208,217), con aumento de la hemoglobina (despareciendo la anemia), disminución de los reticulocitos y bilirrubina (193). Sin embargo la CHCM y el ADE disminuyen sus valores tras la esplenectomía, sin llegar a valores de normalidad. El ADE disminuye al reducir la reticulocitosis, pero en nuestros pacientes no llegó a valores normales dado que partíamos de valores pre-esplenectomía bastante elevados. En el caso de la CHCM se ha descrito en algún estudio la existencia de un posible origen genético (218). También el número de leucocitos y plaquetas persistió elevado tras la esplenectomía en un seguimiento medio de 3,6 años, posteriormente comentaremos su implicación dentro de la investigación de factores de riesgo trombótico. En nuestro estudio se instauró tratamiento con AAS en 2 pacientes por el número elevado de plaquetas, superior a 1.000.000. En ningún paciente durante su seguimiento se diagnosticó de trombosis.

1.8.3. Colecistectomía

En 11 de nuestros pacientes se realizó una colecistectomía (20%), 9 niños asociaban esplenectomía. Existen estudios en niños que expresan diferentes porcentajes de colecistectomía que va de un 1,5% hasta un 18,5% (186,187). La edad media de la colecistectomía fue a

los 7,8 años (SD 2,6), siendo descrita en algunas publicaciones una edad de realización de colecistectomía más tardía (186). La colecistectomía se realizó en 3 niños durante el episodio agudo de crisis relacionadas con la formación de los cálculos biliares, con buena evolución clínica en los 3 pacientes.

La colecistectomía está indicada en los pacientes con litiasis biliar sintomática o complicaciones relacionadas con la formación de los cálculos biliares, valorando la recurrencia de los episodios y tamaño de los cálculos. En el caso de diagnosticar litiasis asintomáticas tan sólo se recomienda el seguimiento ecográfico estrecho (10,53,54).

Tanto un 20% de colecistectomías como un 16% de esplenectomía y colecistectomía, fueron porcentajes altos. Podría ser debido a la mayor gravedad de nuestros pacientes y su asociación con la EG que comentaremos en el siguiente apartado. En 2004 las guías The British Committee for Standards in Haematology (BCSH), plantearon la opción de realizar las dos intervenciones en un mismo tiempo en función de la situación clínica del paciente (15). Pero en los últimos años, no se ha visto beneficio en la realización colecistectomía profiláctica en aquellos pacientes en los que se va a realizar una esplenectomía (14,219,220).

2. Implicación o asociación con la Enfermedad de Gilbert.

La EH asociada con la EG puede tener implicaciones en la evolución clínica y terapéutica de los pacientes. Se detectó una prevalencia elevada de EG en nuestro estudio de 36% en los niños con EH, 11 en su forma homocigota y 9 en la heterocigota como se muestra en la Figura 15. En la población general la prevalencia de EG varía entre un 4-16% (221–223). Sin embargo Costa *et al.* 2002 (95) estudiaron 44 niños con hemólisis crónica congénita (en su mayoría diagnosticados de EH) evidenciando en la mitad de sus pacientes diagnóstico de EG (10 homocigotos y 12 heterocigotos). Una de las limitaciones de nuestro estudio, que podría variar el porcentaje de detección de EG, es que tan sólo se realizó estudio genético de EG a los pacientes con valores de bilirrubina elevados no explicados por la hemólisis crónica y no a todos los pacientes.

Nuestra muestra de niños diagnosticados de EG y EH se distribuyeron sin detectar grandes diferencias en los grupos de gravedad EH, tal y como demuestran otros trabajos (95). La EG no sugiere una mayor detección en formas graves de EH.

La EG asociada con la EH produce mayor ictericia clínica y aumento de bilirrubina (47). La ictericia clínica se incrementó hasta un 80% en los pacientes con EH y EG en nuestro estudio, en comparación con los niños con solo EH (45%). También se evidenciaron valores más elevados de bilirrubina sanguínea (5,5 mg/dL) en los niños con EH y EG en comparación con los niños con EH (2,6 mg/dL), con valores

aún más altos en los EH y EG homocigotos debido a la disminución de la conjugación hepática. Los resultados que se obtuvieron tras ajustar por gravedad de la EH, mostraron una elevación de bilirrubina 2,2 mg/dL, siendo aún mayor en el grupo homocigoto en 2,9 mg/dL.

La asociación de EH y EG produce un aumento de detección de cálculos biliares (47) con un riesgo 4-5 veces mayor de presentar litiasis biliar que en la población general (97). El estudio ecográfico de litiasis biliar de nuestros pacientes, detectó un mayor porcentaje en los casos que asociaban EH y EG (60 %), frente al grupo EH (20%), siendo aún mayor el porcentaje en el subgrupo homocigoto (Tabla 19 y 20). Se calculó en nuestros sujetos con EH y EG un riesgo 5,6 veces mayor de tener cálculos biliares en la ecografía. La edad de presentación de los cálculos biliares en EH y EG tanto homocigoto como heterocigoto en comparación con los pacientes de la muestra sin EG es muy similar y no se observaron diferencias estadísticamente significativas como se describe en Miraglia *et al.* (47).

Al presentar mayor detección de litiasis biliar en dichos pacientes podrían aumentar las complicaciones relacionadas con la formación de litiasis biliar. En nuestro estudio se objetivó mayor porcentaje (50%) de crisis relacionadas con la formación de los cálculos biliares en el grupo EG y EH en comparación con el grupo con EH (17,1%), siendo el porcentaje más elevado en el subtipo homocigoto. En otros trabajos o bien no se analizan las complicaciones, o sólo se valora la presencia de litiasis asintomática detectada por ecografía. En algún estudio aislado se describen complicaciones relacionadas con la

formación de los cálculos biliares como pancreatitis siendo su porcentaje muy inferior al nuestro (95). La EG y EH objetivó un riesgo 4,8 veces mayor de producir crisis relacionadas con la formación cálculos biliares.

El aumento de riesgo de detección de litiasis biliar y de crisis relacionadas con la formación de cálculos biliares, podría aumentar el porcentaje de colecistectomías. En nuestro estudio se objetivó un mayor porcentaje de colecistectomías en niños con EH y EG pero sin significación estadística. Además la edad de la colecistectomía fue más precoz en los niños con EH y EG (6,6 , SD 2,8) en comparación con los niños con EH (7,8 años, SD 2,6). Se precisarían estudios futuros con un mayor tamaño muestral para comprobar los resultados obtenidos.

3. Implementación y análisis de pruebas analíticas con orientación diagnóstica

3.1. Índices y características de los reticulocitos

Los índices o características de los reticulocitos pueden mostrar al igual que en los eritrocitos variaciones en los niños con EH, dado que los cambios en la membrana se objetivan en etapas muy precoces. Hay pocos estudios realizados sobre las características de los reticulocitos y su utilización en la orientación diagnóstica de la EH. Por tanto no hay un consenso ni un protocolo exacto que nos permita establecer cuál es la mejor característica o índice, o incluso conocer el

punto o valor de corte exacto que permita la orientación diagnóstica de EH.

El criterio diagnóstico Delta (VMC-VMCE) $> 9,6$ fL, la combinación de criterios diagnósticos que propone Lazarova *et al.* (VMCE $< 70,2$ fL o Delta (VMC-VMCE) $> 10,4$ fL y/o VMR $< 96,7$ fL) así como el descrito por Chiron *et al.* y Tao *et al.* VMCE $<$ VCM se cumplieron en todos nuestros niños con EH (29–32,36), por lo que se obtuvo una buena rentabilidad diagnóstica (Tabla 28). Estos parámetros fueron independientes de la gravedad de la EH y del tratamiento con esplenectomía. Por lo tanto esto sugiere que los índices de los reticulocitos son una buena herramienta para la orientación del diagnóstico de EH en la infancia.

Otros puntos de corte establecidos en la literatura para otros parámetros no se cumplieron en todos nuestros pacientes del estudio. En el 93,6% de los casos se cumplieron los criterios de Arora *et al.* y Nair *et al.*: Delta (VMC-VMCE) >10 fL y (VMR – VMCE) <25 fL. En tan sólo 3 casos no se llegó al diagnóstico de EH con esos criterios (34,37) .

Algunos de estos criterios diagnósticos basados en los índices de los reticulocitos son utilizados en algunas guías para orientar el diagnóstico de EH. En concreto VMCE $<$ VCM (224), por su elevada sensibilidad y especificidad, en nuestro estudio en todos se cumplió.

Estos índices no han sido evaluados hasta el momento en función de la gravedad de la EH, pero sí el posible efecto de la esplenectomía en

algunos índices reticulocitarios (27). En nuestro estudio se analizó tanto en función de la gravedad de EH como por la esplenectomía. La FRI, al igual que la VMR y VMR-VMCE, experimentó una disminución de los valores conforme aumentaba la gravedad de EH, al igual que se observó una disminución en los niños esplenectomizados. Sin embargo, el ADR aumentó con la gravedad de la enfermedad y en los niños esplenectomizados. Debemos tener en cuenta y tratar con cautela estos datos ya que el grupo grave tenía muchos pacientes que habían sido esplenectomizados (14 niños).

Algunas limitaciones en el uso de los índices reticulocitarios son: por un lado, el valor VMR se detecta en analizadores de muchas empresas (Beckman-Coulter, Siemens y Horiba ABX), pero no existe una unificación o estandarización para evaluar valores de referencia entre ellos. Por otro lado, tan sólo podemos utilizar el contador de Beckman Coulter para la detección del valor de VMCE (225,226).

Se ha reportado que tanto niveles elevados de glucemia en la diabetes mellitus y la alteración del metabolismo lipídico (hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia) pueden alterar la deformabilidad de los glóbulos rojos, pero estos valores aumentados no tienen repercusión en los índices reticulocitarios en el diagnóstico de EH (227). Esto no se pudo comprobar en nuestro estudio, dado que en la serie no hubo ningún caso de dislipemia y/o diabetes.

3.2. Test de unión eosina-5-maleimida

El test EMA como prueba diagnóstica de EH tiene una sensibilidad y especificidad muy elevadas (25,38). Por ello buscamos implantar y validar la nueva técnica diagnóstica en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe estudiando los casos de los niños con EH. El resultado del test EMA realizado en las muestras de nuestros pacientes permitió obtener una concordancia del 100% con la técnica diagnóstica de la ROG, técnica utilizada en el pasado para el diagnóstico de los niños con EH en nuestro centro.

El estudio se ha realizado en una muestra homogénea de niños con EH. No incluimos a ningún paciente que pudiera darnos falsos positivos, como los pacientes con sospecha de ADC II, AIHA, ni eliptocitosis hereditarias. En ninguno de los niños de la serie se obtuvo un resultado EMA negativo, aunque está descrito en la literatura que algunas EH leves pueden dar falsos negativos al no ser el test EMA una técnica diagnóstica con una sensibilidad y especificidad del 100% (38,40,42,198).

Una de las ventajas del test diagnóstico EMA es que necesita poca cantidad de muestra de sangre, lo que es beneficioso para los niños más pequeños, en especial para los neonatos. De hecho, está documentado el uso de muestra de sangre capilar con buen resultado al respecto (228,229). En nuestro estudio no se realizó ninguna toma de muestra capilar, todas las muestras fueron de sangre venosa.

En la literatura se encontraron diferentes protocolos respecto a la incubación o no de la muestra para aumentar la sensibilidad y

especificidad. En el presente estudio, la muestra no se incubó durante 24 horas porque se objetivaron buenos resultados, similares a los descritos por otros autores (230). Otra limitación es que no se utilizaron como controles sanos niños de la misma edad por falta de disponibilidad, aunque en neonatos sí se deben comparar con muestras de controles de edades similares (231).

Una de las ventajas es que en pacientes a los que se les ha realizado una transfusión el diagnóstico EMA sigue siendo positivo, por tanto es un buen test para pacientes transfundidos (232). En nuestra serie tan sólo un paciente había sido transfundido hacía 4 meses y el resultado con el test EMA fue positivo.

El test EMA no se ha estudiado según la gravedad de la EH, pero sí en pacientes esplenectomizados, observando que no sufre modificaciones tras la esplenectomía (233). En el presente estudio se incluyeron 14 pacientes esplenectomizados, todos ellos con el test EMA positivo. Se analizó el valor medio del test EMA en los pacientes esplenectomizados frente a los no esplenectomizados siendo su valor menor en el grupo esplenectomizado (Tabla 30). También se analizaron los valores medios del test EMA que disminuyeron al aumentar la gravedad del niño con EH como se muestra en la Figura 16. Estos valores de EMA inferiores obtenidos en las formas graves de EH y en los esplenectomizados, podrían deberse a que estos pacientes tienen menos superficie de membrana eritrocitaria, captando así menos contraste y obteniendo un resultado más bajo; pero en la actualidad no está clara su fisiopatología.

Estos resultados no ofrecen ninguna modificación en el diagnóstico de EH porque se trata de identificar si el resultado de la prueba es positivo o negativo, para confirmar o descartar el diagnóstico de EH. Pero sugiere, que los pacientes con una menor gravedad, (formas leves de EH o EH no esplenectomizados) tienen valores medios de EMA más elevados aproximándose al punto de corte y podrían tener mayor probabilidad de obtener un resultado negativo. Sería un falso negativo, detectado en forma leve de EH por lo que tendría una menor importancia clínica. Se precisan estudios con mayor tamaño muestral para confirmar dichos resultados.

4. Factores de riesgo de trombosis en niños con EH con o sin esplenectomía

Finalmente realizamos una evaluación de marcadores de riesgo protrombótico en los niños con EH con o sin esplenectomía, al tratarse de uno de los temas más debatidos en la actualidad y con menos estudios realizados hasta el momento (66,234,235). El primer estudio publicado fue el Schilling *et al.* en 1997 (234). Desde entonces se determinó que existe mayor riesgo de sufrir eventos trombóticos a largo plazo tras la realización de la esplenectomía en pacientes con EH. Muchos de estos análisis están realizados en adultos, o en adultos y niños, y son pocos los que incluyen sólo a población pediátrica. Por tanto nuestro estudio sería uno de los primeros en analizar los posibles factores de riesgo relacionados con procesos tromboinflamatorios y/o inmunotrombóticos en los niños

con EH y la posible influencia de la esplenectomía en estos pacientes con los distintos marcadores de riesgo trombótico.

Por otro lado es conocido que conforme la edad avanza y la población envejece existe mayor riesgo de tener algún factor aterotrombótico como los ya descritos desde hace años en la literatura: obesidad, hipertensión, hiperlipidemia o diabetes. Ninguno de nuestros pacientes tenía factores de riesgo conocido, pero es cierto que se detectó un porcentaje de exceso de peso en torno al 20%, cifra muy inferior a la prevalencia de obesidad infantil a nivel estatal como hemos comentado anteriormente (202).

Hoy en día no se ha esclarecido al completo el mecanismo fisiopatológico por el que se produce el incremento del riesgo trombótico en los pacientes con EH. Se sabe que la esplenectomía aumenta el riesgo trombótico y algunos estudios defienden que diversas enfermedades hematológicas crónicas también podrían aumentarlo o incluso ambas podrían colaborar, por ello uno de los objetivos fue analizar algunos mecanismos protrombóticos en una población de niños sanos o control, niños con EH y niños con EH esplenectomizados.

Diversos estudios han señalado como variables de riesgo trombótico el metabolismo lipídico en niños y adultos con EH esplenectomizados y EH no esplenectomizados, observando un incremento del colesterol total y LDL en los pacientes esplenectomizados, con diferencias significativas (73). En nuestro estudio analizamos sólo niños con EH,

objetivando un incremento del colesterol total y LDL en el grupo esplenectomizado, pero sin diferencias estadísticamente significativas y siendo valores incluidos dentro de niveles de referencia (Tabla 13). Estos valores lipídicos también se habían descrito en trabajos que observaban disminución del metabolismo lipídico (colesterol) en anemias hemolíticas (75–78,236–240), debido posiblemente a que en los pacientes con EH se observa un incremento del recambio celular o *turnover*, utilizándose la mayor parte del colesterol como materia prima de las membranas celulares (75).

En el trabajo publicado por Shelley *et al.* en 2010 (73), se observa en el grupo esplenectomizado un aumento de los parámetros hematológicos de hemoglobina, leucocitos y plaquetas con una disminución de reticulocitos y de bilirrubina, con diferencias estadísticamente significativas. En nuestro estudio se detectó un aumento significativo de hemoglobina, recuento de hematíes y hematocrito en los pacientes con EH esplenectomizados frente a los mismos pacientes antes de la esplenectomía, con diferencias estadísticamente significativas (Tabla 13). Pero también se observó un aumento significativo de los valores medios de la serie roja como hemoglobina o hematocrito de niños con EH esplenectomizados frente al grupo sano y EH sin esplenectomía, como se mostró en las tablas 33-35. El aumento de los parámetros hematológicos de la serie roja como la hemoglobina, hematocrito o recuento de hematíes se ha descrito como potencial factor de riesgo de complicaciones vasculares

(84,241), posiblemente debido al aumento de la viscosidad en la sangre (74).

El aumento de los glóbulos blancos o leucocitos también se describe en la literatura como un potencial factor de riesgo de enfermedad cardiovascular (85,86,242–245), aunque la mayoría de estos estudios están realizados en adultos.

En cambio, el número elevado de plaquetas, situación que se observó tras la esplenectomía en nuestros pacientes y se mantiene durante el tiempo, no se ha asociado como claro factor de riesgo trombótico, aunque podría contribuir a serlo y por tanto se necesita más investigación al respecto (87,246,247). En el estudio de Anirban *et al.* se observó una persistencia de trombocitosis en el 73% de los pacientes (74), en el nuestro el 82% de los niños se mantenían con trombocitosis >400.000 en un tiempo medio de seguimiento de 3,6 años. Sin embargo, son pocos los trabajos que relacionen un elevado número de plaquetas con un incremento del riesgo trombótico.

Por otro lado, dentro de los parámetros bioquímicos estudiados, la bilirrubina tiene la capacidad de detener el crecimiento de las células musculares en la vasos y frenar la activación a nivel endotelial (creando una disminución del espesor de los vasos sanguíneos consiguiendo reducir las enfermedades coronarias y vasculares) con un efecto antiinflamatorio en el proceso aterosclerótico (79–83,248–250). En nuestro estudio se observó una disminución de la bilirrubina en todas sus formas y con diferencias significativas tras la

esplenectomía (Tabla 13). Por tanto los valores elevados de bilirrubina en pacientes con enfermedades hemolíticas crónicas como la EH o enfermedades con menor capacidad de glucoronización hepática como la EG, podrían ser factor protector o que atenuara el riesgo trombótico (251). En el caso de la EH, al realizar la esplenectomía se observó una disminución de los valores de bilirrubina, perdiendo así su función protectora.

Otros valores analíticos analizados hasta el momento y relacionados con posibles factores de riesgo trombótico fueron la homocisteína, el fibrinógeno, Dímero D y proteína C reactiva (73,74). En nuestro estudio en general, no se evaluaron factores relacionados con la hemostasia, pero si se objetivó un aumento de proteína C reactiva en los pacientes con EH grave en comparación con el grupo EH moderado y leve, sin diferencias significativas.

El mecanismo fisiopatológico que relaciona la esplenectomía con complicaciones vasculares no esta correctamente definido. Pero se observa un aumento del riesgo trombótico a largo plazo tras la esplenectomía incluso en pacientes esplenectomizados por causa traumática, algún estudio evalúa pacientes incluso con 10 años de seguimiento (62). Boyle *et al.* 2013, describe un mayor riesgo trombótico tras la esplenectomía en pacientes diagnosticados de otras enfermedades como anemias hemolíticas en comparación con los pacientes sanos esplenectomizados por causa traumática (63). Riesgo que fue ya descrito en pacientes esplenectomizados por AIHA (64). Sin embargo, Claire *et al.* evalúa el riesgo trombótico en los pacientes

que han precisado esplenectomía por diversas patologías en comparación con el paciente que la precisó por causa traumática, y no observa mayor riesgo de trombosis tras la esplenectomía en pacientes esplenectomizados por causa traumática que por otras enfermedades hematológicas como la EH (65). En nuestro caso no disponemos de un grupo control de niños esplenectomizados por otras causas como las traumáticas, dado que el reclutamiento de niños sería bajo, debido a la tendencia actual del tratamiento conservador tras un traumatismo esplénico en los niños.

Por tanto la esplenectomía es un factor de riesgo trombótico, pero habría que realizar más estudios con mayor tamaño muestral para conocer y establecer si las enfermedades hematológicas como la EH podrían aumentar el riesgo trombótico simplemente por la anemia hemolítica crónica basal, cuyo riesgo se incrementaría en el caso de precisar esplenectomía. Este mecanismo fisiopatológico no está completamente establecido ni analizado en la actualidad (61,90).

Como se ha descrito en la introducción, recientemente se han desarrollado los conceptos de inmunotrombosis y tromboinflamación (100,102,252). La hipótesis que subyace en estos conceptos es que tanto la hemostasia como la inflamación o la respuesta inmune no constituyen procesos independientes, sino que se encuentran estrechamente ligados. De esta forma, la hemostasia forma parte de la respuesta inmune, por ejemplo, favoreciendo el atrapamiento de patógenos mediante la formación de redes de fibrina (105), o por el

reconocimiento de agentes infecciosos por las plaquetas, que a su vez los presentarán al sistema inmune para su eliminación (101,126).

Un proceso similar se da en la producción de trampas extracelulares de neutrófilos o NETs. Los NETs son una parte de la respuesta inmune, en la cual los neutrófilos (y posiblemente otros tipos celulares) reconocen a un patógeno y sufren un proceso conocido como NETosis en el cual juega un papel crucial la citrulinización de histonas. En este proceso se descondensa la cromatina y se produce la ruptura de la membrana tanto nuclear como plasmática, expulsando una especie de red extracelular formada básicamente por DNA, decorado por histonas y diversos enzimas proteolíticos como la elastasa (147–149,165,171). Sin embargo, sabemos ahora que este proceso puede estar desencadenado por un reconocimiento directo del patógeno por parte del neutrófilo, y que también puede estar originado por plaquetas que reconocen al patógeno, y van ahora a unirse al neutrófilo a través principalmente del receptor TLR4 (125), lo que va a inducir la activación del neutrófilo y la formación de NETs.

Pero además, este proceso funciona de forma bidireccional, lo que añade otro grado de complejidad, ya que tanto el DNA como las histonas presentes en los NETs poseen una potente actividad procoagulante y activadora de las plaquetas. De esta forma, aunque la formación de NETs es una pieza clave de la respuesta inmune, también puede acabar desencadenando un proceso trombótico. Más aún, no sólo los agentes patógenos son capaces de estimular la formación de NETs, sino que diversos procesos fisiopatológicos con

un componente inflamatorio como la diabetes, la aterosclerosis, la obesidad, etc, también pueden conducir a un incremento en la formación de NETs, lo que a su vez conduce a un incremento de un riesgo trombótico (103,104). De hecho se han encontrado marcadores de NETs tanto en síndrome coronario agudo como en ictus, lo que pone de manifiesto su posible implicación en estos procesos (176–181,183).

Por otro lado, tenemos el proceso tromboinflamatorio, el cual también es un diálogo en dos direcciones. Por una parte, es bien sabido que las plaquetas contienen múltiples sustancias pro y antiinflamatorias, las cuales pueden liberar al medio tras su activación (111). Pero más recientemente también hemos empezado a conocer cómo procesos inflamatorios, incluso lo que se conoce como procesos inflamatorios de bajo grado pero mantenidos en el tiempo (diabetes, obesidad) pueden inducir activación plaquetaria y estar de esta forma relacionados con un incremento del riesgo trombótico.

En resumen, respuestas del organismo que hasta recientemente estudiábamos como mecanismos claramente diferenciados, es cada vez más evidente que son distintas caras de mecanismos estrechamente interconectados. Por tanto, nos hemos planteado en este trabajo estudiar diversos marcadores de inmunotrombosis y tromboinflamación como biomarcadores inflamatorios, NETs y los agregados L-P o M-P, de los cuales se había descrito su asociación con trombosis en pacientes adultos diagnosticados de otras enfermedades como el cáncer, la diabetes, la trombosis, etc (128,252–

254) pero que nunca antes se habían utilizado para valorar el riesgo trombótico tras la esplenectomía en pacientes con EH, y mucho menos en una muestra de niños.

De los marcadores NETs descritos en la literatura, se analizó la H3CyT y el DNA, siendo H3CyT el marcador más específico disponible en la actualidad.

En nuestro estudio se observó un aumento de DNA en los niños con EH esplenectomizados frente a los controles sanos, pero este incremento fue aún mayor en niños con EH sin esplenectomía como muestra la figura 27. El aumento de DNA en EH sin esplenectomía podría ser debido a que la esplenectomía en la EH tiene como resultado una menor hemólisis intravascular. Por tanto la EH eleva las cifras de DNA, siendo el incremento superior con una mayor hemólisis intravascular. Actualmente no se conoce si el DNA puede ser causa o consecuencia de trombosis, inflamación o lisis celular (255).

Sin embargo, en el análisis de H3CyT, que es el marcador más específico de formación de NETs, se objetivó un aumento significativo en el grupo de niños con EH esplenectomizado en comparación con el grupo sano o control y con el grupo con EH sin esplenectomía (Figura 28). Este aumento de H3CyT que encontramos en nuestros pacientes con EH esplenectomizados, podría suponer para ellos un estado tromboinflamatorio aumentado y contribuir al riesgo trombótico.

Ambos marcadores DNA y H3CyT son descritos como específicos de NETs, y tienen una amplia implicación en la trombosis y también en la sepsis (256). Dado que los NETs tienen un papel en la formación de trombos y en nuestros pacientes se observó un incremento significativo de H3CyT, se podría en un futuro, y tras confirmar estos resultados en otras investigaciones, valorar realizar un tratamiento terapéutico dirigido frente a estas dianas terapéuticas que son los NETs para prevenir la trombosis a largo plazo en estos pacientes (257). Cabría añadir el objetivo de mantener un estilo de vida saludable con hábitos dietéticos y de ejercicio físico, que permitan disminuir otros factores de riesgo trombótico comentados anteriormente como la hipertensión arterial, el colesterol o la diabetes mellitus, entre otros.

Existen muchos biomarcadores inflamatorios liberados por plaquetas, aunque ninguno de ellos puede considerarse un estándar de activación plaquetaria, ya que también pueden provenir de otras fuentes. Sin embargo, aunque no sean una prueba indiscutible de activación plaquetaria, sí que se han empleado en diversos estudios como marcadores de activación plaquetaria. Además, se ha demostrado eliminando selectivamente estas sustancias en las plaquetas, que juegan un importante papel en el proceso trombótico. En nuestro estudio fueron analizados: CXCL5, HMGB1 y RANTES.

El CXCL5 presentó una elevación importante y estadísticamente significativa en los niños con EH esplenectomizados, evidenciando valores similares en el grupo control y grupo EH (Figura 25). De igual

forma se objetivó un incremento significativo de HMGB1 y RANTES en el grupo de niños con EH esplenectomizados en comparación con los niños con EH y el grupo sano, llegando prácticamente a duplicar su valor. Sin embargo, en los niños con EH sin esplenectomía HMGB1 y RANTES sí que mostraron una tendencia a estar incrementados, sin ser estadísticamente significativo como muestra la Figura 24 y 26.

Las plaquetas almacenan en sus gránulos CXCL5 que tras la activación plaquetaria se liberan, y pueden actuar sobre el endotelio, favoreciendo la activación y adhesión de los neutrófilos. Por otro lado las plaquetas activadas generan HMGB1 en la superficie, induciendo a los neutrófilos a la NETosis (121). En la esclerosis sistémica se objetiva el papel de los neutrófilos y el HMGB1 derivado de las plaquetas en la enfermedad o inflamación vascular propia de la patología (122). También se ha descrito la implicación de HMGB1 en la trombosis venosa profunda y su implicación en la formación de NETs en modelos murinos (123,124). RANTES es una citoquina que es producida también por las plaquetas y se libera a partir de los gránulos alfa de las mismas. Parte de sus efectos están mediados por la P-selectina y favorece la adhesión leucocitaria, además de regular los monocitos y macrófagos en las lesiones arterioscleróticas del endotelio. Por ello están involucradas en la formación de la enfermedad vascular aterosclerótica (116,117).

Todos estos marcadores inflamatorios estudiados y analizados mostraron un aumento significativo en el grupo EH esplenectomizado.

Se podría por tanto sugerir que existe mayor inflamación endovascular crónica y por ello ser un factor de riesgo involucrado en el desarrollo de un evento trombótico a largo plazo, mediante un estado tromboinflamatorio crónico. En el grupo EH sin esplenectomizar aumentan los valores de HMGB1 y RANTES, esto podría sugerir una relación entre la hemólisis crónica con las citoquinas asociadas con los eritrocitos y el aumento de la función plaquetar producida por los glóbulos rojos (107–109) como explicaremos posteriormente.

Durante muchos años se ha considerado que la única función de los eritrocitos era el transporte e intercambio gaseoso. Sin embargo son cada vez más abundantes los datos en la literatura que apuntan a un papel importante de los eritrocitos en otros procesos fisiopatológicos como la hemostasia, la inflamación o la respuesta inmune.

Sabemos que los eritrocitos son capaces de regular la función plaquetaria a través de un diálogo bidireccional entre ambos tipos celulares, que incluye la liberación de diversos compuestos por ambas células (107). Esta “conversación” va a conducir a un incremento de las respuestas plaquetarias incluyendo el aumento de la liberación de gránulos tanto densos como alfa, la síntesis de compuestos (TXA2 entre otros), la activación de IIbIIIa o el aumento de la capacidad activadora de las plaquetas del liberado celular.

De igual forma, compuestos liberados por las plaquetas son capaces de inducir distintas respuestas en los eritrocitos como incremento del

calcio citosólico o de la actividad procoagulante. De esta forma, los eritrocitos podrían estar participando en el proceso inflamatorio a través de la regulación y liberación de mediadores inflamatorios por las plaquetas (109). Más recientemente, se ha descrito que además los eritrocitos tienen la capacidad de unir en su membrana múltiples sustancias pro- y antiinflamatorias, y liberarlas en algunas circunstancias. Así, los eritrocitos podrían actuar como “tamponadores” de la inflamación, controlando la concentración de citocinas en plasma.

Sin embargo, desconocemos si las enfermedades hematológicas con alteración de los glóbulos rojos podrían suponer una variación en estas respuestas eritrocitarias (108). Sería por tanto interesante estudiar si los niños con EH tienen una mayor o menor relación con la función inmune e inflamatoria y la activación plaquetar; pudiendo la hemólisis crónica producir más citoquinas implicadas en su desarrollo, como en el caso del aumento del DNA en los niños con EH, y como la esplenectomía afecta estos procesos.

La comunicación entre tipos celulares en los procesos tromboinflamatorios e inmunotrombóticos puede realizarse por mediadores inflamatorios, como hemos visto anteriormente, pero también a través de uniones físicas entre distintos tipos celulares mediadas por diversos receptores expuestos en su membrana. Entre estas uniones, las producidas entre plaquetas y leucocitos o monocitos han demostrado ser un buen marcador de activación plaquetaria. Por primera vez mostramos resultados de las determinaciones de los

agregados L-P y M-P en niños sanos, niños con EH y niños con EH esplenectomizados. Ya se describió la importancia de la movilización o reclutamiento de los leucocitos por las plaquetas activadas en un estado basal inflamatorio, formando los agregados L-P con su posible implicación en la lesión vascular (103). Estos agregados circulantes se pueden considerar un marcador de estado protrombótico y factores de riesgo cardiovascular y cerebrovascular (132,133), en su mayoría en estudios realizados en adultos.

En el artículo de Christina *et al.* 2013, se estudian por primera vez los agregados M-P en niños sanos (258). En nuestro estudio se realizaron comparaciones entre los tres grupos, grupo sano o control, grupo EH y grupo con EH con esplenectomía de los niveles de agregados L-P y M-P.

En nuestro estudio los agregados L-P aumentaron el doble en los niños con EH sin esplenectomía comparado con los niños sanos como se muestra en la Figura 29, esto podría sugerir que la misma anemia crónica hemolítica supone un estado inflamatorio activado con el aumento de los agregados L-P. En los pacientes con EH esplenectomizados, el incremento fue mayor, aumentando hasta tres veces más que en situación basal o comparado con el grupo sano, sugiriendo que el estado tromboinflamatorio es mayor en niños con EH y esplenectomía.

Al realizar el estudio tuvimos en cuenta el número de plaquetas y lo ajustamos por el mismo, puesto que hubo diferencias significativas en

el número de plaquetas entre los grupos, con aumento en el grupo EH esplenectomizado. En nuestro estudio, por cada 100.000 plaquetas aumentó el porcentaje de agregados L-P un 2,76%. Sin embargo, incluso después de ajustar por el número de plaquetas se siguió observando un aumento de los agregados estadísticamente significativo en el grupo EH sin esplenectomía, siendo aún mayor en el grupo EH esplenectomizado lo que sugiere que, al menos en parte, este es un proceso independiente del observado incremento del número de plaquetas.

Los agregados M-P son uno de los marcadores más sensibles de activación plaquetaria, y están relacionados con un mayor riesgo trombótico en adultos (134,135). El porcentaje de agregados M-P en nuestro estudio objetivó un aumento considerable en el grupo con EH sin esplenectomía, con un leve incremento del porcentaje de agregados M-P en el grupo con EH esplenectomizado ambos con diferencias significativas en comparación con el grupo de niños sanos o control (Figura 30).

Esto podría deberse a que la anemia hemolítica crónica fuera la responsable en mayor medida del aumento de los agregados M-P. Los agregados L-P y M-P elevaron sus valores en nuestro estudio en el grupo con EH, siendo los agregados M-P los que aumentaron en un porcentaje mayor. Este incremento de agregados L-P y M-P podría estar en relación el aumento de la función plaquetar producida por los glóbulos rojos o la liberación de las citoquinas eritrocitarias (107–109). En la EH estos eritrocitos, al tener una alteración de la proteína

de membrana y una vida media menor por la hemólisis crónica, podrían ser los responsables de la elevación de estos agregados L-P y M-P en el grupo de EH sin esplenectomía, aunque esto debería ser objeto de futuras investigaciones.

Los resultados de este estudio muestran que la interacción incrementada de las plaquetas con los leucocitos en los niños EH esplenectomizados se acompaña de un aumento de marcadores inflamatorios liberados por las plaquetas (CXCL5, HMGB1 y RANTES) y la formación de NETS. Todo ello sugiere la presencia de un posible estado trombo-inflamatorio en los pacientes con EH principalmente tras la esplenectomía.

5. Limitaciones del estudio

La principal limitación del estudio es el tamaño muestral, siendo acotado por la recogida de todos los pacientes que estaban en seguimiento en las consultas externas de hematología pediátrica. Los estudios publicados en niños hasta la fecha son escasos, retrospectivos y con un tamaño muestral pequeño. Se deberían realizar más estudios prospectivos en niños que permitan la realización de estudios analíticos para poder seguir avanzando en el conocimiento de la EH.

Otra de las limitaciones de nuestro estudio es no disponer de un grupo de niños sanos con esplenectomía, dado que en la actualidad tanto en adultos como en niños se intenta realizar un tratamiento conservador, evitándola en lo posible. En el apartado de investigación de factores

protrombóticos, precisaríamos un mayor tamaño muestral, porque el obtenido era limitado al tener un número fijo de niños esplenectomizados. Se podría proponer la realización de estudios multicéntricos que permitieran ampliar la muestra para confirmar estos resultados.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El elevado porcentaje de EH graves en nuestra serie, implica una edad de diagnóstico temprana, una peor evolución clínica con incremento de las complicaciones, las transfusiones y porcentaje de esplenectomías, en relación a las escasas series exclusivamente pediátricas publicadas.
2. En relación con la triada clínica clásica, la mayor gravedad comentada se relaciona con un porcentaje significativamente más elevado de casos con esplenomegalia y palidez, pero no con la ictericia que es independiente (incluida la etapa neonatal) de la severidad de la EH. El porcentaje de detección ecográfica de barro biliar y la litiasis biliar se incrementó al aumentar la gravedad de la EH en nuestro estudio.
3. La combinación de la $CHCM > 35$ y el $ADE > 14$ es orientativa al diagnóstico de EH incluso en las formas leves .
4. La asociación EH y EG es frecuente en nuestra serie y debe sospecharse en aquellos niños con valores de bilirrubina elevados no explicados por la hemólisis crónica. Los pacientes con EG y EH tienen un porcentaje significativamente mayor de ictericia, bilirrubina, cálculos biliares y de crisis relacionadas con los mismos frente a los niños diagnosticados sólo de EH y son

colecistectomizados a menor edad. En estos pacientes el seguimiento ecográfico debe ser más estrecho.

5. Los índices o características de los reticulocitos son una herramienta útil para la orientación del diagnóstico de EH, realizada mediante una técnica sencilla y sin requerir mayor muestra sanguínea. Los puntos de corte que se cumplen en todos nuestros pacientes, podrían ser los más adecuados:
 - Delta (VMC-VMCE) > 9.6 fL
 - VMCE < 70.2 fL o Delta (VMC-VMCE) > 10.4 fL y/o VMR < 96.7 fL
 - VMCE < VCM

6. El test EMA permite diagnosticar a todos nuestros pacientes con EH, logrando una concordancia del 100% con la RGO. Es una técnica sencilla, requiere poca muestra de sangre y se puede realizar en pacientes trasfundidos. Por tanto es una buena técnica diagnóstica de EH en la infancia, aunque requiere más estudios prospectivos para valorar su sensibilidad y especificidad.

7. El incremento observado de H3CyT, marcador específico de NETs, en los niños con EH esplenectomizados apoya la posible existencia de un proceso inmuno-trombótico. El aumento de DNA es más llamativo en los niños con EH sin esplenectomía pudiéndose atribuir dicho incremento a la hemólisis intravascular.

8. El incremento de los biomarcadores inflamatorios analizados (CXCL5, HMGB1 y RANTES) en los niños con EH esplenectomizados indica la presencia de un estado inflamatorio que de mantenerse crónicamente podría facilitar el desarrollo de procesos atero-trombóticos.
9. La formación de agregados heterotípicos leucocito-plaqueta y monocito-plaqueta en pacientes EH, pero principalmente en EH esplenectomizados sugiere la presencia de una activación plaquetaria necesaria para que se formen estos agregados.
10. Este es el primer estudio que evalúa la inmunotrombosis y tromboinflamación en niños con EH. Algunos de los biomarcadores tromboinflamatorios estudiados podrían ser factores de riesgo trombótico en la EH tras la esplenectomía.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Tole S, Dhir P, Pugi J, Drury LJ, Butchart S, Fantauzzi M, et al. Genotype-phenotype correlation in children with hereditary spherocytosis. *Br J Haematol.* 2020;191(3):486–96.
2. Gallagher PG. Red cell membrane disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005 Jan 1;2005(1):13–8.
3. Gallagher PG. Abnormalities of the Erythrocyte Membrane. *Pediatr Clin North Am.* 2013 Dec;60(6):1349–62.
4. Eber SW, Pekrun A, Neufeldt A, Schröter W. Prevalence of increased osmotic fragility of erythrocytes in German blood donors: Screening using a modified glycerol lysis test. *Ann Hematol.* 1992 Feb;64(2):88–92.
5. Andolfo I, Russo R, Gambale A, Iolascon A. New insights on hereditary erythrocyte membrane defects. *Haematologica.* 2016 Nov;101(11):1284–94.
6. Mohandas N, Gallagher PG. Red cell membrane: past, present, and future. *Blood.* 2008 Nov 15;112(10):3939–48.
7. Perrotta S, Gallagher PG, Mohandas N. Hereditary spherocytosis. *Lancet.* 2008 Oct;372(9647):1411–26.
8. Godal HC, Heistø H. High Prevalence of Increased Osmotic Fragility of Red Blood Cells among Norwegian Blood Donors. *Scand J Haematol.* 2009 Apr 24;27(1):30–4.
9. Historia PI, Review H. Esferocitosis hereditaria. Revisión. Parte I. Historia, demografía, etiopatogenia y diagnóstico. *Arch Argent Pediatr.* 2015;113(1):69–80.

10. Bolton-Maggs PHB, Langer JC, Iolascon A, Tittensor P, King M-J, General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis - 2011 update. *Br J Haematol.* 2012 Jan;156(1):37–49.
11. Da Costa L, Galimand J, Fenneteau O, Mohandas N. Hereditary spherocytosis, elliptocytosis, and other red cell membrane disorders. *Blood Rev.* 2013;27(4):167–78.
12. Eber S, Lux SE. Hereditary Spherocytosis - Defects in Proteins That Connect the Membrane Skeleton to the Lipid Bilayer. *Semin Hematol.* 2004;41(2):118–41.
13. An X, Mohandas N. Disorders of red cell membrane. *Br J Haematol.* 2008 May 13;141(3):367–75.
14. Martín-consuegra AS, Sebastián E, Salinas A. Guía Esferocitosis Hereditaria Diagnóstico y manejo en población pediátrica. 2022;(4):1–10.
15. Bolton-Maggs PHB, Stevens RF, Dodd NJ, Lamont G, Tittensor P, King M-J, et al. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. *Br J Haematol.* 2004 Aug;126(4):455–74.
16. Saada V, Cynober T, Brossard Y, Schischmanoff PO, Sender A, Cohen H, et al. Incidence of hereditary spherocytosis in a population of jaundiced neonates. *Pediatr Hematol Oncol.* 2006 Jan 9;23(5):387–97.
17. Delhommeau F, Cynober T, Schischmanoff PO, Rohrlich P, Delaunay J, Mohandas N, et al. Natural history of hereditary

- spherocytosis during the first year of life. *Blood*. 2000 Jan 15;95(2):393–7.
18. Christensen RD, Yaish HM, Gallagher PG. A pediatrician's practical guide to diagnosing and treating hereditary spherocytosis in neonates. *Pediatrics*. 2015 Jun 1;135(6):1107–14.
 19. Eber SW, Armbrust R, Schröter W. Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: Relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility, and autohemolysis. *J Pediatr*. 1990 Sep;117(3):409–16.
 20. Donato H, Crisp R, Rapetti MC, Eliana G, Attie M. Esferocitosis hereditaria. Revision. Parte II. Manifestaciones clinicas, evolucion, complicaciones y tratamiento. *Arch Argent Pediatr*. 2015;1(2):168–76.
 21. Michaels LA, Cohen AR, Zhao H, Raphael RI, Manno CS. Screening for hereditary spherocytosis by use of automated erythrocyte indexes. *J Pediatr*. 1997 Jun;130(6):957–60.
 22. Tamary H, Aviner S, Freud E, Miskin H, Krasnov T, Schwarz M, et al. High Incidence of Early Cholelithiasis Detected by Ultrasonography in Children and Young Adults With Hereditary Spherocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2003 Dec;25(12):952–4.
 23. Liao L, Xu Y, Wei H, Qiu Y, Chen W, Huang J, et al. Blood cell parameters for screening and diagnosis of hereditary spherocytosis. *J Clin Lab Anal*. 2019;33(4):22844.
 24. Ciepiela O. Old and new insights into the diagnosis of

- hereditary spherocytosis. *Ann Transl Med.* 2018 Sep;6(17):339.
25. Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, Marcello AP, Porretti L, Cortelezzi A, et al. Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: A comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. *Haematologica.* 2012 Apr 1;97(4):516–23.
 26. Arora RD, Dass J, Maydeo S, Arya V, Radhakrishnan N, Sachdeva A, et al. Flow cytometric osmotic fragility test and eosin-5'-maleimide dye-binding tests are better than conventional osmotic fragility tests for the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Int J Lab Hematol.* 2018 Jun;40(3):335–42.
 27. Da Costa L, Mohandas N, Sorette M, Grange MJ, Tchernia G, Cynober T. Temporal differences in membrane loss lead to distinct reticulocyte features in hereditary spherocytosis and in immune hemolytic anemia. *Blood.* 2001 Nov 15;98(10):2894–9.
 28. King M-J, Garçon L, Hoyer JD, Iolascon A, Picard V, Stewart G, et al. ICSH guidelines for the laboratory diagnosis of nonimmune hereditary red cell membrane disorders. *Int J Lab Hematol.* 2015 Jun;37(3):304–25.
 29. Broséus J, Visomblain B, Guy J, Maynadié M, Girodon F. Evaluation of mean sphered corpuscular volume for predicting hereditary spherocytosis. *Int J Lab Hematol.* 2010 Oct;32(5):519–23.
 30. Lazarova E, Pradier O, Cotton F, Gulbis B. Automated

- reticulocyte parameters for hereditary spherocytosis screening. *Ann Hematol.* 2014 Nov 10;93(11):1809–18.
31. Chiron M, Cynober T, Mielot F, Tchernia G, Croisille L. The GEN.S: a fortuitous finding of a routine screening test for hereditary spherocytosis. *Hematol Cell Ther.* 1999 Jun;41(3):113–6.
 32. Tao Y, Deng Z, Liao L, Qiu Y, Chen W, Lin F. Comparison and evaluation of three screening tests of hereditary spherocytosis in Chinese patients. *Ann Hematol.* 2015 May 12;94(5):747–51.
 33. Ciepiela O, Adamowicz-Salach A, Radgowska A, Żbikowska K, Kotuła I. Usefulness of Reticulocyte Parameters for Diagnosis of Hereditary Spherocytosis in Children. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2017 Jun 24;33(2):239–47.
 34. Arora RD, Dass J, Maydeo S, Arya V, Kotwal J, Bhargava M. Utility of mean spheroid cell volume and mean reticulocyte volume for the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Hematology.* 2018 Aug 9;23(7):413–6.
 35. Liao L, Deng Z-F, Qiu Y-L, Chen P, Chen W-Q, Lin F-Q. Values of mean cell volume and mean spheroid cell volume can differentiate hereditary spherocytosis and thalassemia. *Hematology.* 2014 Oct 20;19(7):393–6.
 36. Xu Y, Yang W, Liao L, Deng Z, Qiu Y, Chen W, et al. Mean reticulocyte volume: a specific parameter to screen for hereditary spherocytosis. *Eur J Haematol.* 2016 Feb;96(2):170–4.

37. Nair SC, Arora N, Jain S, Inbakumar D, Mammen J, Sitaram U. Mean reticulocyte volume enhances the utility of red cell mean spheroid cell volume in differentiating peripheral blood spherocytes of hereditary spherocytosis from other causes. *Indian J Pathol Microbiol.* 2015;58(3):307–9.
38. Kar R, Mishra P, Pati HP. Evaluation of eosin-5-maleimide flow cytometric test in diagnosis of hereditary spherocytosis. *Int J Lab Hematol.* 2010 Feb;32(1 Pt 2):8–16.
39. Glenthøj A, Sharfo A, Brieghel C, Nardo-Marino A, Birgens H, Petersen JB. Improving the EMA Binding Test by Using Commercially Available Fluorescent Beads. *Front Physiol.* 2020;11:569289.
40. King MJ, Behrens J, Rogers C, Flynn C, Greenwood D, Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *Br J Haematol.* 2000 Dec;111(3):924–33.
41. King M-J, Telfer P, MacKinnon H, Langabeer L, McMahon C, Darbyshire P, et al. Using the eosin-5-maleimide binding test in the differential diagnosis of hereditary spherocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008 Jul;74(4):244–50.
42. Stoya G, Gruhn B, Vogelsang H, Baumann E, Linss W. Flow cytometry as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis. *Acta Haematol.* 2006;116(3):186–91.
43. Tateno Y, Suzuki R, Kitamura Y. Previously undiagnosed hereditary spherocytosis in a patient with jaundice and

- pyelonephritis: a case report. *J Med Case Rep.* 2016 Dec 1;10(1):337.
44. Cilla N, Domitien L, Arrada N, Chiffre D, Mahe P, Vincent L, et al. Transient aplastic crisis triggered by parvovirus B19 in a family with hereditary spherocytosis. *IDCases.* 2020;21:e00802.
45. Brown KE. Haematological consequences of parvovirus B19 infection. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2000 Jun;13(2):245–59.
46. Blümel J, Burger R, Drosten C, Gröner A, Gürtler L, Heiden M, et al. Parvovirus B19 - Revised. *Transfus Med Hemother.* 2010;37(6):339–50.
47. Miraglia Del Giudice E, Perrotta S, Nobili B, Specchia C, D’Urzo G, Lolascon A, et al. Coinheritance of Gilbert syndrome increases the risk for developing gallstones in patients with hereditary spherocytosis. *Blood.* 1999 Oct 1;94(7):2259–62.
48. Fibach E, Rachmilewitz EA. Iron overload in hematological disorders. *Presse Med.* 2017 Dec;46(12 Pt 2):e296–305.
49. Guitton C, Garçon L, Cynober T, Gauthier F, Tchernia G, Delaunay J, et al. [Hereditary spherocytosis: guidelines for the diagnosis and management in children]. *Arch Pediatr.* 2008 Sep;15(9):1464–73.
50. Schizas D, Katsaros I, Karatza E, Kykalos S, Spartalis E, Tsourouflis G, et al. Concomitant Laparoscopic Splenectomy and Cholecystectomy: A Systematic Review of the Literature. *J*

- Laparoendosc Adv Surg Tech A. 2020 Jul;30(7):730–6.
51. Rothman JA, Stevens JL, Gray FL, Kalfa TA. How I approach hereditary hemolytic anemia and splenectomy. *Pediatr Blood Cancer*. 2020;67(11):e28337.
 52. Rescorla FJ, Breitfeld PP, West KW, Williams D, Engum SA, Grosfeld JL. A case controlled comparison of open and laparoscopic splenectomy in children. *Surgery*. 1998 Oct;124(4):670–5; discussion 675-6.
 53. Wood JH, Partrick DA, Hays T, Sauaia A, Karrer FM, Ziegler MM. Contemporary pediatric splenectomy: continuing controversies. *Pediatr Surg Int*. 2011 Nov 28;27(11):1165–71.
 54. Curran TJ, Foley MI, Swanstrom LL, Campbell TJ. Laparoscopy improves outcomes for pediatric splenectomy. *J Pediatr Surg*. 1998 Oct;33(10):1498–500.
 55. Guizzetti L. Total versus partial splenectomy in pediatric hereditary spherocytosis: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr Blood Cancer*. 2016;63(10):1713–22.
 56. Yacobovich J, Barzilai-Birenboim S, Steinberg-Shemer O, Stark P, Pazgal I, Tamary H. Splenectomy in childhood for non-malignant haematologic disorders – long-term follow-up shows minimal adverse effects. *Br J Haematol*. 2020;190(6):909–15.
 57. Pugi J, Carcao M, Drury LJ, Langer JC. Results after laparoscopic partial splenectomy for children with hereditary spherocytosis: Are outcomes influenced by genetic mutation? *J Pediatr Surg*. 2018 May;53(5):973–5.

58. Konradsen HB, Henrichsen J. Pneumococcal infections in splenectomized children are preventable. *Acta Paediatr Scand.* 1991 Apr;80(4):423–7.
59. Jugenburg M, Haddock G, Freedman MH, Ford-Jones L, Ein SH. The morbidity and mortality of pediatric splenectomy: Does prophylaxis make a difference? *J Pediatr Surg.* 1999 Jul;34(7):1064–7.
60. Mellado Peña MJ, Moreno-Pérez D, Ruíz Contreras J, Hernández-Sampelayo Matos T, Navarro Gómez ML. Documento de consenso de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica y el Comité Asesor de Vacunas de la Asociación Española de Pediatría para la vacunación en inmunodeprimidos. *An Pediatr.* 2011;75(6).
61. Crary SE, Buchanan GR. Vascular complications after splenectomy for hematologic disorders. *Blood.* 2009 Oct 1;114(14):2861–8.
62. Kristinsson SY, Gridley G, Hoover RN, Check D, Landgren O. Long-term risks after splenectomy among 8,149 cancer-free American veterans: a cohort study with up to 27 years follow-up. *Haematologica.* 2014 Feb 1;99(2):392–8.
63. Boyle S, White RH, Brunson A, Wun T. Splenectomy and the incidence of venous thromboembolism and sepsis in patients with immune thrombocytopenia. *Blood.* 2013 Jun 6;121(23):4782–90.
64. Ho G, Brunson A, Keegan THM, Wun T. Splenectomy and the incidence of venous thromboembolism and sepsis in patients

- with autoimmune hemolytic anemia. *Blood Cells Mol Dis*. 2020;81:102388.
65. Dendle C, Spelman T, Sundararajan V, Chunilal S, Woolley I. An analysis of the thromboembolic outcomes of 2472 splenectomized individuals. *Blood*. 2015 Mar 5;125(10):1681–2.
66. Schilling RF, Gangnon RE, Traver MI. Delayed adverse vascular events after splenectomy in hereditary spherocytosis. *J Thromb Haemost*. 2008 Aug;6(8):1289–95.
67. Perkins LA, Jones SF, Bhargava RS. Dural Venous Thrombosis Following Splenectomy in a Patient with Hereditary Spherocytosis. *South Med J*. 2009 May;102(5):542–5.
68. Davidsen C, Larsen TH, Gerdt E, Lønnebakken MT. Giant right ventricular outflow tract thrombus in hereditary spherocytosis: a case report. *Thromb J*. 2016 Dec 26;14(1):9.
69. Verresen D, De Backer W, Van Meerbeeck J, Neetens I, Van Marck E, Vermeire P. Spherocytosis and pulmonary hypertension coincidental occurrence or causal relationship? *Eur Respir J*. 1991 May;4(5):629–31.
70. Hayag-Barin JE, Smith RE, Tucker FC. Hereditary spherocytosis, thrombocytosis, and chronic pulmonary emboli: A case report and review of the literature. *Am J Hematol*. 1998 Jan;57(1):82–4.
71. Smedema JP, Louw VJ. Pulmonary arterial hypertension after splenectomy for hereditary spherocytosis. *Cardiovasc J Afr*. 18(2):84–9.

72. Zvizdic Z, Kovacevic A, Milisic E, Jonuzi A, Vranic S. Clinical course and short-term outcome of postsplenectomy reactive thrombocytosis in children without myeloproliferative disorders: A single institutional experience from a developing country. *PLoS One*. 2020;15(8):e0237016.
73. Crary SE, Troendle S, Ahmad N, Buchanan GR. Traditional laboratory measures of cardiovascular risk in hereditary spherocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Oct;55(4):684–9.
74. Das A, Bansal D, Ahluwalia J, Das R, Rohit MK, Attri S V, et al. Risk factors for thromboembolism and pulmonary artery hypertension following splenectomy in children with hereditary spherocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2014 Jan;61(1):29–33.
75. Shalev H, Kapelushnik J, Moser A, Knobler H, Tamary H. Hypocholesterolemia in chronic anemias with increased erythropoietic activity. *Am J Hematol*. 2007 Mar;82(3):199–202.
76. Shores J, Peterson J, VanderJagt D, Glew RH. Reduced cholesterol levels in African-American adults with sickle cell disease. *J Natl Med Assoc*. 2003 Sep;95(9):813–7.
77. Hashemieh M, Javadzadeh M, Shirkavand A, Sheibani K. Lipid profile in minor thalassemic patients: a historical cohort study. *Bangladesh Med Res Counc Bull*. 2011 Apr 1;37(1):24–7.
78. Haghpanah S, Davani M, Samadi B, Ashrafi A, Karimi M. Serum lipid profiles in patients with beta-thalassemia major and intermedia in southern Iran. *J Res Med Sci*. 2010 May;15(3):150–4.

79. Vitek L. Bilirubin and atherosclerotic diseases. *Physiol Res*. 2017 Apr 5;66(Suppl 1):S11–20.
80. Novotný L, Vitek L. Inverse relationship between serum bilirubin and atherosclerosis in men: a meta-analysis of published studies. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003 May 6;228(5):568–71.
81. Akboga MK, Canpolat U, Sahinarslan A, Alsancak Y, Nurkoc S, Aras D, et al. Association of serum total bilirubin level with severity of coronary atherosclerosis is linked to systemic inflammation. *Atherosclerosis*. 2015 May;240(1):110–4.
82. Ollinger R, Bilban M, Erat A, Froio A, McDaid J, Tyagi S, et al. Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 2005 Aug 16;112(7):1030–9.
83. Lapenna D, Ciofani G, Pierdomenico SD, Giamberardino MA, Uchino S, Davì G. Association of serum bilirubin with oxidant damage of human atherosclerotic plaques and the severity of atherosclerosis. *Clin Exp Med*. 2018 Feb 25;18(1):119–24.
84. Gagnon DR, Zhang TJ, Brand FN, Kannel WB. Hematocrit and the risk of cardiovascular disease--the Framingham study: a 34-year follow-up. *Am Heart J*. 1994 Mar;127(3):674–82.
85. Brown DW, Giles WH, Croft JB. White blood cell count: an independent predictor of coronary heart disease mortality among a national cohort. *J Clin Epidemiol*. 2001 Mar;54(3):316–22.
86. Lee CD, Folsom AR, Nieto FJ, Chambless LE, Shahar E, Wolfe DA. White blood cell count and incidence of coronary

- heart disease and ischemic stroke and mortality from cardiovascular disease in African-American and White men and women: atherosclerosis risk in communities study. *Am J Epidemiol.* 2001 Oct 15;154(8):758–64.
87. Griesshammer M, Bangerter M, Sauer T, Wennauer R, Bergmann L, Heimpel H. Aetiology and clinical significance of thrombocytosis: analysis of 732 patients with an elevated platelet count. *J Intern Med.* 1999 Mar;245(3):295–300.
88. Patel SA, Winkel M, Ali MK, Narayan KMV, Mehta NK. Cardiovascular mortality associated with 5 leading risk factors: national and state preventable fractions estimated from survey data. *Ann Intern Med.* 2015 Aug 18;163(4):245–53.
89. McCarthy M. Half of US cardiovascular deaths are due to modifiable risk factors, study finds. *BMJ.* 2015 Jun 30;350:h3539.
90. Seregina EA, Poletaev A V, Bondar E V, Vuimo TA, Ataulakhanov FI, Smetanina NS. The hemostasis system in children with hereditary spherocytosis. *Thromb Res.* 2019 Apr;176:11–7.
91. Monaghan G, Ryan M, Hume R, Burchell B, Seddon R. Genetic variation in bilirubin UDP-glucuronosyltransferase gene promoter and Gilbert's syndrome. *Lancet.* 1996 Mar;347(9001):578–81.
92. Borlak J, Thum T, Landt O, Erb K, Hermann R. Molecular diagnosis of a familial nonhemolytic hyperbilirubinemia (Gilbert's syndrome) in healthy subjects. *Hepatology.* 2000

- Oct;32(4 Pt 1):792–5.
93. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, et al. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med*. 1995 Nov 2;333(18):1171–5.
 94. Fretzayas A, Moustaki M, Liapi O, Karpathios T. Eponym: Gilbert syndrome. Vol. 171, *European Journal of Pediatrics*. 2012. p. 11–5.
 95. Costa E, Pinto R, Vieira E, Polo S, Sarmiento AM, Oliveira I, et al. Influencia del síndrome de Gilbert en los valores de bilirrubina sérica y presencia de litiasis vesicular en pacientes con hemólisis crónica congénita. *An Esp Pediatr*. 2002;57(6):529–33.
 96. Kang L-L, Liu Z-L, Zhang H-D. Gilbert's syndrome coexisting with hereditary spherocytosis might not be rare: Six case reports. *World J Clin cases*. 2020 May 26;8(10):2001–8.
 97. Kumar D, Parakh A, Sharma S. Gilbert Syndrome Increasing Unconjugated Hyperbilirubinemia in a Child With Hereditary Spherocytosis. *J Pediatr Hematol / Oncol*. 2012 Jan;34(1):54–6.
 98. Origa R, Galanello R, Perseu L, Tavazzi D, Domenica Cappellini M, Terenzani L, et al. Cholelithiasis in thalassemia major. *Eur J Haematol*. 2009 Jan;82(1):22–5.
 99. Haverfield E V, McKenzie CA, Forrester T, Bouzekri N, Harding R, Serjeant G, et al. UGT1A1 variation and gallstone formation in sickle cell disease. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):968–72.

100. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jan 7;13(1):34–45.
101. Gaertner F, Massberg S. Blood coagulation in immunothrombosis-At the frontline of intravascular immunity. *Semin Immunol*. 2016;28(6):561–9.
102. Hansson GK. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2005 Apr 21;352(16):1685–95.
103. Evangelista V, Pamuklar Z, Piccoli A, Manarini S, Dell’elba G, Pecce R, et al. Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets. *Blood*. 2007 Mar 15;109(6):2461–9.
104. Horn M, Bertling A, Brodde MF, Müller A, Roth J, Van Aken H, et al. Human neutrophil alpha-defensins induce formation of fibrinogen and thrombospondin-1 amyloid-like structures and activate platelets via glycoprotein IIb/IIIa. *J Thromb Haemost*. 2012 Apr;10(4):647–61.
105. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 7;107(36):15880–5.
106. Jayarangaiah A, Kariyanna PT, Chen X, Jayarangaiah A, Kumar A. COVID-19-Associated Coagulopathy: An Exacerbated Immunothrombosis Response. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2020;26:1076029620943293.
107. Karsten E, Breen E, Herbert BR. Red blood cells are dynamic reservoirs of cytokines. *Sci Rep*. 2018;8(1):3101.

108. Karsten E, Herbert BR. The emerging role of red blood cells in cytokine signalling and modulating immune cells. *Blood Rev.* 2020;41:100644.
109. Vallés J, Teresa Santos M, Aznar J, Martínez M, Moscardó A, Piñón M, et al. Platelet-erythrocyte interactions enhance α IIb β 3 integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: Down-regulation by aspirin ex vivo. *Blood.* 2002 Jun 1;99(11):3978–84.
110. Martin JF, Kristensen SD, Mathur A, Grove EL, Choudry FA. The causal role of megakaryocyte–platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol.* 2012 Nov 18;9(11):658–70.
111. Italiano JE, Richardson JL, Patel-Hett S, Battinelli E, Zaslavsky A, Short S, et al. Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet α granules and differentially released. *Blood.* 2008 Feb 1;111(3):1227–33.
112. Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* 2009 Jul;23(4):177–89.
113. Martinod K, Deppermann C. Immunothrombosis and thromboinflammation in host defense and disease. *Platelets.* 2021 Apr 3;32(3):314–24.
114. Watson SP, Auger JM, Mccarty OJT, Pearce AC. GPVI and integrin α IIb β 3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1752–62.
115. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel D V. Selective attraction

- of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. 1990 Oct 18;347(6294):669–71.
116. von Hundelshausen P, Weber KSC, Huo Y, Proudfoot AEI, Nelson PJ, Ley K, et al. RANTES Deposition by Platelets Triggers Monocyte Arrest on Inflamed and Atherosclerotic Endothelium. *Circulation*. 2001 Apr 3;103(13):1772–7.
117. Terao S, Yilmaz G, Stokes KY, Russell J, Ishikawa M, Kawase T, et al. Blood cell-derived RANTES mediates cerebral microvascular dysfunction, inflammation, and tissue injury after focal ischemiareperfusion. *Stroke*. 2008 Sep;39(9):2560–70.
118. Chavey C, Lazennec G, Lagarrigue S, Clapé C, Iankova I, Teyssier J, et al. CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance. *Cell Metab*. 2009 Apr;9(4):339–49.
119. Wang X-Z, Liu L-W, Du X-M, Gu R-X, Sun Z-J. CXCL5 is associated with the increased risk of coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2015 Nov;26(7):612–9.
120. Beitelshees AL, Aquilante CL, Allayee H, Langaee TY, Welder GJ, Schofield RS, et al. CXCL5 polymorphisms are associated with variable blood pressure in cardiovascular disease-free adults. *Hum Genomics*. 2012 Aug 2;6(1):9.
121. Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, De Metrio M, Panciroli C, et al. Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb*

- Haemost. 2014 Dec;12(12):2074–88.
122. Maugeri N, Capobianco A, Rovere-Querini P, Ramirez GA, Tombetti E, Valle P Della, et al. Platelet microparticles sustain autophagy-associated activation of neutrophils in systemic sclerosis. *Sci Transl Med.* 2018;10(451).
 123. Stark K, Philippi V, Stockhausen S, Busse J, Antonelli A, Miller M, et al. Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice. *Blood.* 2016;128(20):2435–49.
 124. Dyer MR, Chen Q, Haldeman S, Yazdani H, Hoffman R, Loughran P, et al. Deep vein thrombosis in mice is regulated by platelet HMGB1 through release of neutrophil-extracellular traps and DNA. *Sci Rep.* 2018;8(1):2068.
 125. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007 Apr 25;13(4):463–9.
 126. Wong CHY, Jenne CN, Petri B, Chrobok NL, Kubes P. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat Immunol.* 2013 Aug 16;14(8):785–92.
 127. Nagasawa A, Matsuno K, Tamura S, Hayasaka K, Shimizu C, Moriyama T. The basis examination of leukocyte-platelet aggregates with CD45 gating as a novel platelet activation marker. *Int J Lab Hematol.* 2013 Oct;35(5):534–41.
 128. Petito E, Amison RT, Piselli E, Shah SA, Momi S, Pitchford

- SC, et al. A dichotomy in platelet activation: Evidence of different functional platelet responses to inflammatory versus haemostatic stimuli. *Thromb Res.* 2018;172:110–8.
129. Pluta K, Porębska K, Urbanowicz T, Gąsecka A, Ołasińska-Wiśniewska A, Targoński R, et al. Platelet-Leucocyte Aggregates as Novel Biomarkers in Cardiovascular Diseases. *Biology (Basel)*. 2022 Jan 30;11(2).
130. Mandel J, Casari M, Stepanyan M, Martyanov A, Deppermann C. Beyond Hemostasis: Platelet Innate Immune Interactions and Thromboinflammation. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 31;23(7).
131. Linden MD. Platelet Flow Cytometry. In: *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2013. p. 241–62.
132. Cerletti C, Tamburrelli C, Izzi B, Gianfagna F, de Gaetano G. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis. *Thromb Res.* 2012 Mar;129(3):263–6.
133. Denorme F, Rustad JL, Campbell RA. Brothers in arms: platelets and neutrophils in ischemic stroke. *Curr Opin Hematol.* 2021;28(5):301–7.
134. Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001 Sep 25;104(13):1533–7.
135. Linden MD, Furman MI, Frelinger AL, Fox ML, Barnard MR, Li Y, et al. Indices of platelet activation and the stability of

- coronary artery disease. *J Thromb Haemost.* 2007 Apr;5(4):761–5.
136. Gawaz M, Reininger A, Neumann FJ. Platelet function and platelet-leukocyte adhesion in symptomatic coronary heart disease. Effects of intravenous magnesium. *Thromb Res.* 1996 Sep 1;83(5):341–9.
137. Brambilla M, Camera M, Colnago D, Marenzi G, De Metrio M, Giesen PL, et al. Tissue factor in patients with acute coronary syndromes: expression in platelets, leukocytes, and platelet-leukocyte aggregates. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 May;28(5):947–53.
138. Zhang S-Z, Jin Y-P, Qin G-M, Wang J-H. Association of platelet-monocyte aggregates with platelet activation, systemic inflammation, and myocardial injury in patients with non-ST elevation acute coronary syndromes. *Clin Cardiol.* 2007 Jan;30(1):26–31.
139. Pfluecke C, Tarnowski D, Plichta L, Berndt K, Schumacher P, Ulbrich S, et al. Monocyte-platelet aggregates and CD11b expression as markers for thrombogenicity in atrial fibrillation. *Clin Res Cardiol.* 2016 Apr;105(4):314–22.
140. Shih L, Kaplan D, Kraiss LW, Casper TC, Pendleton RC, Peters CL, et al. Platelet-Monocyte Aggregates and C-Reactive Protein are Associated with VTE in Older Surgical Patients. *Sci Rep.* 2016;6:27478.
141. Hottz ED, Quirino-Teixeira AC, Merij LB, Pinheiro MBM, Rozini SV, Bozza FA, et al. Platelet-leukocyte interactions in

- the pathogenesis of viral infections. *Platelets*. 2022 Feb 17;33(2):200–7.
142. Marques P, Collado A, Escudero P, Rius C, González C, Servera E, et al. Cigarette Smoke Increases Endothelial CXCL16-Leukocyte CXCR6 Adhesion In Vitro and In Vivo. Potential Consequences in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front Immunol*. 2017;8:1766.
 143. Miao D, Li D-Y, Chen M, Zhao M-H. Platelets are activated in ANCA-associated vasculitis via thrombin-PARs pathway and can activate the alternative complement pathway. *Arthritis Res Ther*. 2017 Nov 15;19(1):252.
 144. Liverani E, Rico MC, Tsygankov AY, Kilpatrick LE, Kunapuli SP. P2Y12 Receptor Modulates Sepsis-Induced Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(5):961–71.
 145. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science* (80-). 2004 Mar 5;303(5663):1532–5.
 146. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe*. 2012 Sep 13;12(3):324–33.
 147. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol*. 2009 Nov;30(11):513–21.
 148. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*. 2007 Jan 15;176(2):231–41.

149. Camicia G, Pozner R, de Larrañaga G. Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis. *Shock*. 2014 Oct;42(4):286–94.
150. Corsiero E, Pratesi F, Prediletto E, Bombardieri M, Migliorini P. NETosis as Source of Autoantigens in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2016 Nov 14;7:485.
151. Jorch SK, Kubes P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med*. 2017 Mar 7;23(3):279–87.
152. Saffarzadeh M, Preissner KT. Fighting against the dark side of neutrophil extracellular traps in disease: manoeuvres for host protection. *Curr Opin Hematol*. 2013 Jan;20(1):3–9.
153. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood*. 2013 Oct 17;122(16):2784–94.
154. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemärck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009 Jun 17;15(6):623–5.
155. Martinod K, Demers M, Fuchs TA, Wong SL, Brill A, Gallant M, et al. Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 21;110(21):8674–9.
156. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*. 2014 May 1;123(18):2768–76.
157. Massberg S, Grahl L, von Bruehl M-L, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med*. 2010 Aug 1;16(8):887–96.

158. Von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012 Apr 9;209(4):819–35.
159. Patel S, Kumar S, Jyoti A, Srinag BS, Keshari RS, Saluja R, et al. Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation. *Nitric Oxide*. 2010 Apr 1;22(3):226–34.
160. Martinelli S, Urosevic M, Daryadel A, Oberholzer PA, Baumann C, Fey MF, et al. Induction of Genes Mediating Interferon-dependent Extracellular Trap Formation during Neutrophil Differentiation. *J Biol Chem*. 2004 Oct 15;279(42):44123–32.
161. Remijsen Q, Berghe T Vanden, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res*. 2011 Feb 9;21(2):290–304.
162. Wardini AB, Guimaraes-Costa AB, Nascimento MTC, Nadaes NR, Danelli MGM, Mazur C, et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. *J Gen Virol*. 2010 Jan 1;91(1):259–64.
163. Behrendt JH, Ruiz A, Zahner H, Taubert A, Hermosilla C. Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite *Eimeria bovis*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010 Jan 15;133(1):1–8.
164. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A.

- Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol.* 2006 Apr;8(4):668–76.
165. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. Levitz SM, editor. *PLoS Pathog.* 2009 Oct 30;5(10):e1000639.
166. Ramos-Kichik V, Mondragón-Flores R, Mondragón-Castelán M, Gonzalez-Pozos S, Muñiz-Hernandez S, Rojas-Espinosa O, et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2009 Jan;89(1):29–37.
167. Aulik NA, Hellenbrand KM, Klos H, Czuprynski CJ. *Mannheimia haemolytica* and Its Leukotoxin Cause Neutrophil Extracellular Trap Formation by Bovine Neutrophils. *Infect Immun.* 2010 Nov 1;78(11):4454–66.
168. Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Amanianda V, Nietzsche S, Thywißen A, et al. Production of Extracellular Traps against *Aspergillus fumigatus* In Vitro and in Infected Lung Tissue Is Dependent on Invading Neutrophils and Influenced by Hydrophobin RodA. Filler SG, editor. *PLoS Pathog.* 2010 Apr 29;6(4):e1000873.
169. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci.* 2009 Apr

- 21;106(16):6748–53.
170. Baker VS, Imade GE, Molta NB, Tawde P, Pam SD, Obadofin MO, et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. *Malar J*. 2008 Dec 29;7(1):41.
 171. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2009 Jan 26;184(2):205–13.
 172. Altincicek B, Stötzel S, Wygrecka M, Preissner KT, Vilcinskas A. Host-Derived Extracellular Nucleic Acids Enhance Innate Immune Responses, Induce Coagulation, and Prolong Survival upon Infection in Insects. *J Immunol*. 2008 Aug 15;181(4):2705–12.
 173. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, Trusheim H, Ruppert C, Markart P, et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 10;104(15):6388–93.
 174. Ammollo CT, Semeraro F, Xu J, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular histones increase plasma thrombin generation by impairing thrombomodulin-dependent protein C activation. *J Thromb Haemost*. 2011 Sep;9(9):1795–803.
 175. Carestia A, Rivadeneyra L, Romaniuk MA, Fondevila C, Negrotto S, Schattner M. Functional responses and molecular mechanisms involved in histone-mediated platelet activation. *Thromb Haemost*. 2013 Dec 1;110(11):1035–45.

176. Borissoff JJ, Joosen IA, Versteyleen MO, Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Elevated Levels of Circulating DNA and Chromatin Are Independently Associated With Severe Coronary Atherosclerosis and a Prothrombotic State. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Aug;33(8):2032–40.
177. Mangold A, Alias S, Scherz T, Hofbauer T, Jakowitsch J, Panzenböck A, et al. Coronary Neutrophil Extracellular Trap Burden and Deoxyribonuclease Activity in ST-Elevation Acute Coronary Syndrome Are Predictors of ST-Segment Resolution and Infarct Size. *Circ Res.* 2015 Mar 27;116(7):1182–92.
178. Riegger J, Byrne RA, Joner M, Chandraratne S, Gershlick AH, ten Berg JM, et al. Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium. *Eur Heart J.* 2016 May 14;37(19):1538.1-1549.
179. Langseth MS, Opstad TB, Bratseth V, Solheim S, Arnesen H, Pettersen AA, et al. Markers of neutrophil extracellular traps are associated with adverse clinical outcome in stable coronary artery disease. *Eur J Prev Cardiol.* 2018 May 23;25(7):762–9.
180. Vallés J, Lago A, Santos MT, Latorre AM, Tembl J, Salom J, et al. Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance. *Thromb Haemost.* 2017 Nov 28;117(10):1919–29.
181. Bryk AH, Prior SM, Plens K, Konieczynska M, Hohendorff J, Malecki MT, et al. Predictors of neutrophil extracellular traps

- markers in type 2 diabetes mellitus: associations with a prothrombotic state and hypofibrinolysis. *Cardiovasc Diabetol*. 2019 Dec 16;18(1):49.
182. Savchenko AS, Martinod K, Seidman MA, Wong SL, Borissoff JI, Piazza G, et al. Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. *J Thromb Haemost*. 2014 Jun;12(6):860–70.
183. Kedar PS, Colah RB, Kulkarni S, Ghosh K, Mohanty D. Experience with eosin-5'-maleimide as a diagnostic tool for red cell membrane cytoskeleton disorders. *Clin Lab Haematol*. 2003 Dec;25(6):373–6.
184. Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med*. 2015 Jul 15;21(7):815–9.
185. Oliveira MCLA, Fernandes RAF, Rodrigues CL, Ribeiro DA, Giovanardi MF, Viana MB. Clinical course of 63 children with hereditary spherocytosis: A retrospective study. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2012;34(1):9–13.
186. Konca Ç, Söker M, Taş MA, Yıldırım R. Hereditary Spherocytosis: Evaluation of 68 Children. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2015;31(1):127–32.
187. Güngör, Ali1. Eber SW, Armbrust R, Schröter W. Variable clinical severity of hereditary spherocytosis: relation to erythrocytic spectrin concentration, osmotic fragility and

- autohemolysis. JP [Internet]. 1990 S [cited 2019 D 17];117(3):409–16. A from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/239159>., Yaralı N, Fettah A, Ok-Bozkaya İ, Özbek N, Kara A, et al. Hereditary spherocytosis: Retrospective evaluation of 65 children. *Turk J Pediatr.* 2018;60(3):264–9.
188. Orkin SH, Nathan DG, Gingsburg D, Look TA, Fisher DE LS (eds). Disorders of the red cell membrane. Nathan Oski's *Hematol Infancy Child* (8th ed). 2015;(515):548.
189. Iolascon A, Miraglia del Giudice E, Perrotta S, Alloisio N, Morlé L, Delaunay J. Hereditary spherocytosis: from clinical to molecular defects. *Haematologica.* 1998 Mar;83(3):240–57.
190. Mariani M, Barcellini W, Vercellati C, Marcello AP, Fermo E, Pedotti P, et al. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. *Haematologica.* 2008;93(9):1310–7.
191. Miraglia del Giudice E, Nobili B, Francese M, D'Urso L, Iolascon A, Eber S, et al. Clinical and molecular evaluation of non-dominant hereditary spherocytosis. *Br J Haematol.* 2001 Jan;112(1):42–7.
192. Schröter W, Kashnitz E. Diagnosis of hereditary spherocytosis in newborn infants. *J Pediatr.* 1983 Sep;103(3):460–3.
193. Grace RF LS. Disorders of the red cell membrane. *Hematol Infancy Child.* 2009;
194. Transfusional SDM. y terapéuticos de la Esferocitosis

- hereditaria en nuestro país . Estudio sobre 143 casos pertenecientes a 84 familias. :9–16.
195. Burman D. Congenital spherocytosis in infancy. *Arch Dis Child.* 1958;33(170):335–41.
 196. Stamey CC, Diamond LK. Congenital hemolytic anemia in the newborn; relationship to kernicterus. *AMA J Dis Child.* 1957 Dec 1;94(6):616–22.
 197. Pinto L, Iolascon A, Miraglia del Giudice E, Materese MR et al. The Italian pediatric survey on hereditary spherocytosis. *Int J Pediatr Hematol Oncol.* 1995;2(43):47.
 198. Crisp RL, Solari L, Vota D, García E, Míguez G, Chamorro ME, et al. A prospective study to assess the predictive value for hereditary spherocytosis using five laboratory tests (cryohemolysis test, eosin-5'-maleimide flow cytometry, osmotic fragility test, autohemolysis test, and SDS-PAGE) on 50 hereditary spherocytosis families in Argentina. *Ann Hematol.* 2011 Jun 16;90(6):625–34.
 199. Christensen RD, Henry E. Hereditary spherocytosis in neonates with hyperbilirubinemia. *Pediatrics.* 2010 Jan 1;125(1):120–5.
 200. Aramburu Arriaga N, Fernández Cuesta MA, Martínez González MJ, Astigarraga Aguirre I, Fernández-Teijeiro Alvarez A, Navajas Gutiérrez A, et al. [Hereditary spherocytosis in neonates. Review of our caseload]. *An Esp Pediatr.* 2000 Jun;52(6):569–72.
 201. Iolascon A, Avvisati RA. Genotype/phenotype correlation in hereditary spherocytosis. *Haematologica.* 2008 Sep

- 1;93(9):1283–8.
202. Marta García-Solano 1, Enrique Gutiérrez-González 1, Ana M López-Sobaler 2, Miguel Ruiz-Álvarez 3, Laura María Bermejo López 4, Aranzazu Aparicio 4, María Araceli García-López 1, María José Yusta Boyo 1, Teresa Robledo de Dios 1, carmen villar villalba 1 MÁDRS 1. Estado ponderal de la población escolar de 6 a 9 años en España: resultados del Estudio ALADINO 2019. Agencia española Segur Aliment ynutricion inisterio sanidad, Serv Soc e igualdad Madrid 2019. 2019;
203. Tissières P, Kernen Y, Gervaix A, Humbert J, Suter S. Varicella zoster virus induced haemolytic crisis in a child with congenital spherocytosis. *Eur J Pediatr.* 2000 Oct;159(10):788.
204. Bates GC, Brown CH. Incidence of gallbladder disease in chronic hemolytic anemia (spherocytosis). *Gastroenterology.* 1952 May;21(1):104–9.
205. Mallouh AA, Qudah A. An epidemic of aplastic crisis caused by human parvovirus B19. *Pediatr Infect Dis J.* 1995 Jan;14(1):31–4.
206. Gallagher PG, Forget BG LS. Disorders of the erythrocyte membrane. *Nathan Orki's Hematol Infancy Child.* 1998;
207. Abdullah F, Zhang Y, Camp M, Rossberg MI, Bathurst MA, Colombani PM, et al. Splenectomy in hereditary spherocytosis: Review of 1,657 patients and application of the pediatric quality indicators. *Pediatr Blood Cancer.* 2009 Jul;52(7):834–7.
208. Englum BR, Rothman J, Leonard S, Reiter A, Thornburg C, Brindle M, et al. Hematologic outcomes after total splenectomy

- and partial splenectomy for congenital hemolytic anemia. *J Pediatr Surg*. 2016 Jan;51(1):122–7.
209. Buesing KL, Tracy ET, Kiernan C, Pastor AC, Cassidy LD, Scott JP, et al. Partial splenectomy for hereditary spherocytosis: a multi-institutional review. *J Pediatr Surg*. 2011 Jan;46(1):178–83.
210. Slater BJ, Chan FP, Davis K, Dutta S. Institutional experience with laparoscopic partial splenectomy for hereditary spherocytosis. *J Pediatr Surg*. 2010 Aug;45(8):1682–6.
211. Rosman CWK, Broens PMA, Trzpis M, Tamminga RYJ. A long-term follow-up study of subtotal splenectomy in children with hereditary spherocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2017 Oct;64(10):e26592.
212. Das A, Bansal D, Das R, Trehan A, Marwaha RK. Hereditary spherocytosis in children: profile and post-splenectomy outcome. *Indian Pediatr*. 2014 Feb 23;51(2):139–41.
213. Tanoue K, Okita K, Akahoshi T, Konishi K, Gotoh N, Tsutsumi N, et al. Laparoscopic splenectomy for hematologic diseases. *Surgery*. 2002 Jan;131(1 Suppl):S318-23.
214. Rescorla FJ, West KW, Engum SA, Grosfeld JL. Laparoscopic splenic procedures in children: experience in 231 children. *Ann Surg*. 2007 Oct;246(4):683–7; discussion 687-8.
215. Delaitre B. Splénectomie laparoscopique pour maladies hématologiques. Étude de 275 cas. Laparoscopic splenectomy for hematologic diseases. Report of 275 cases. *Ann Chir*. 2000 Jul;125(6):522–9.

216. Luoto TT, Pakarinen MP, Koivusalo A. Long-term outcomes after pediatric splenectomy. *Surgery*. 2016;159(6):1583–90.
217. Rice HE, Englum BR, Rothman J, Leonard S, Reiter A, Thornburg C, et al. Clinical outcomes of splenectomy in children: report of the splenectomy in congenital hemolytic anemia registry. *Am J Hematol*. 2015 Mar;90(3):187–92.
218. Pistis G, Okonkwo SU, Traglia M, Sala C, Shin SY, Masciullo C, et al. Genome Wide Association Analysis of a Founder Population Identified TAF3 as a Gene for MCHC in Humans. *PLoS One*. 2013;8(7):1–8.
219. Alizai NK, Richards EM, Stringer MD. Is cholecystectomy really an indication for concomitant splenectomy in mild hereditary spherocytosis? *Arch Dis Child*. 2010;95(8):596–9.
220. Ruparel RK, Bogert JN, Moir CR, Ishitani MB, Khan SP, Rodriguez V, et al. Synchronous splenectomy during cholecystectomy for hereditary spherocytosis: is it really necessary? *J Pediatr Surg*. 2014 Mar;49(3):433–5.
221. Sieg A, Arab L, Schlierf G, Stiehl A, Kommerell B. [Prevalence of Gilbert's syndrome in Germany]. *Dtsch Med Wochenschr*. 1987 Jul 31;112(31–32):1206–8.
222. Kim YH, Yeon JE, Jung GM, Kim HJ, Kim JS, Byun KS, et al. [A study of polymorphism in UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT-1A1) promoter gene in Korean patients with Gilbert's syndrome]. *Taehan Kan Hakhoe Chi*. 2002 Jun;8(2):132–8.
223. Roy-Chowdhury N, Deocharan B, Bejjanki HR, Roy-Chowdhury J, Koliopoulos C, Petmezaki S, et al. Presence of

- the genetic marker for Gilbert syndrome is associated with increased level and duration of neonatal jaundice. *Acta Paediatr.* 2002;91(1):100–1.
224. Wu Y, Liao L, Lin F. The diagnostic protocol for hereditary spherocytosis-2021 update. *J Clin Lab Anal.* 2021;35(12):1–7.
225. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts: state of the art. *Am J Clin Pathol.* 2008 Jul 1;130(1):104–16.
226. Piva E, Brugnara C, Chiandetti L, Plebani M. Automated reticulocyte counting: state of the art and clinical applications in the evaluation of erythropoiesis. *Clin Chem Lab Med.* 2010 Oct 1;48(10):1369–80.
227. Lazarova E, Gulbis B. Influence of diabetes and hypercholesterolemia on laboratory methods for hereditary spherocytosis diagnosis. *J Clin Lab Anal.* 2022;(June 2021):1–8.
228. Crisp RL, Solari L, Gammella D, Schwartzman GA, Rapetti MC, Donato H. Use of capillary blood to diagnose hereditary spherocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 2012 Dec 15;59(7):1299–301.
229. Christensen RD, Agarwal AM, Nussenzweig RH, Heikal N, Liew MA, Yaish HM. Evaluating eosin-5-maleimide binding as a diagnostic test for hereditary spherocytosis in newborn infants. *J Perinatol.* 2015 May 6;35(5):357–61.
230. Ciepiela O, Kotuła I, Górská E, Stelmaszczyk-Emmel A, Popko K, Szmydki-Baran A, et al. Delay in the measurement of eosin-5'-maleimide (EMA) binding does not affect the test

- result for the diagnosis of hereditary spherocytosis. *Clin Chem Lab Med.* 2013 Apr;51(4):817–23.
231. Ciepiela O, Nowak M, Wrońska M, Adamowicz-Salach A, Kotuła I. Eosin-5'-maleimide binding test-Do we use appropriate reference values to detect hereditary spherocytosis in neonates? *Int J Lab Hematol.* 2019;41(3):e57–60.
232. Cheli E, Roze J, Garrot T, Tagarist S, Briandet C, Girodon F. Usefulness of the EMA flow cytometric test in the diagnosis of hereditary spherocytosis post-transfusion. *Br J Haematol.* 2017 Jul;178(2):180.
233. Shah S, Vega R. Hereditary spherocytosis. *Pediatr Rev.* 2004 May;25(5):168–72.
234. Schilling RF. Spherocytosis, splenectomy, strokes, and heart attacks. *Lancet.* 1997 Dec;350(9092):1677–8.
235. Schilling RF, Gangnon RE, Traver M. Arteriosclerotic events are less frequent in persons with chronic anemia: evidence from families with hereditary spherocytosis. *Am J Hematol.* 2006 May;81(5):315–7.
236. Rifkind BM, Gale M. Hypolipidaemia in anaemia. Implications for the epidemiology of ischaemic heart-disease. *Lancet (London, England).* 1967 Sep 23;2(7517):640–2.
237. Westerman MP. Hypocholesterolaemia and anaemia. *Br J Haematol.* 1975 Sep;31(1):87–94.
238. Sasaki J, Waterman MR, Buchanan GR, Cottam GL. Plasma and erythrocyte lipids in sickle cell anaemia. *Clin Lab Haematol.* 1983 Jun 28;5(1):35–44.

239. Sugihara T, Yawata Y. Observations on plasma and red cell lipids in hereditary spherocytosis. *Clin Chim Acta*. 1984 Feb 28;137(2):227–32.
240. Asai K, Kuzuya M, Naito M, Funaki C, Kuzuya F. Effects of splenectomy on serum lipids and experimental atherosclerosis. *Angiology*. 1988 Jun 2;39(6):497–504.
241. Kannel WB, Gordon T, Wolf PA, McNamara P. Hemolobin and the Risk of Cerebral Infarction: The Framingham Study. *Stroke*. 1972 Jul;3(4):409–20.
242. Kannel WB, Anderson K, Wilson PW. White blood cell count and cardiovascular disease. Insights from the Framingham Study. *JAMA*. 1992 Mar 4;267(9):1253–6.
243. Gillum RF, Ingram DD, Makuc DM. White blood cell count, coronary heart disease, and death: the NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Am Heart J*. 1993 Mar;125(3):855–63.
244. Yarnell JW, Baker IA, Sweetnam PM, Bainton D, O'Brien JR, Whitehead PJ, et al. Fibrinogen, viscosity, and white blood cell count are major risk factors for ischemic heart disease. The Caerphilly and Speedwell collaborative heart disease studies. *Circulation*. 1991 Mar;83(3).
245. Prentice RL, Szatrowski TP, Fujikura T, Kato H, Mason MW, Hamilton HH. Leukocyte counts and coronary heart disease in a Japanese cohort. *Am J Epidemiol*. 1982 Sep;116(3):496–509.
246. Boxer MA, Braun J, Ellman L. Thromboembolic risk of postsplenectomy thrombocytosis. *Arch Surg*. 1978

- Jul;113(7):808–9.
247. Hirsh J, Dacie J V. Persistent post-splenectomy thrombocytosis and thrombo-embolism: a consequence of continuing anaemia. *Br J Haematol.* 1966 Jan;12(1):44–53.
 248. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 1987 Feb 27;235(4792):1043–6.
 249. Kawamura K, Ishikawa K, Wada Y, Kimura S, Matsumoto H, Kohro T, et al. Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Jan;25(1):155–60.
 250. Ishizaka N, Ishizaka Y, Takahashi E, Yamakado M, Hashimoto H. High Serum Bilirubin Level Is Inversely Associated With the Presence of Carotid Plaque. *Stroke.* 2001 Feb;32(2):580–3.
 251. Kundur AR, Singh I, Bulmer AC. Bilirubin, platelet activation and heart disease: a missing link to cardiovascular protection in Gilbert’s syndrome? *Atherosclerosis.* 2015 Mar;239(1):73–84.
 252. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Aug;32(8):1777–83.
 253. Mauracher L-M, Posch F, Martinod K, Grilz E, Däullary T, Hell L, et al. Citrullinated histone H3, a biomarker of neutrophil extracellular trap formation, predicts the risk of venous thromboembolism in cancer patients. *J Thromb Haemost.* 2018;16(3):508–18.
 254. Elalamy I, Chakroun T, Gerotziafas GT, Petropoulou A, Robert

- F, Karroum A, et al. Circulating platelet-leukocyte aggregates: a marker of microvascular injury in diabetic patients. *Thromb Res.* 2008;121(6):843–8.
255. Jiménez-Alcázar M, Kim N, Fuchs TA. Circulating Extracellular DNA: Cause or Consequence of Thrombosis? *Semin Thromb Hemost.* 2017 Sep;43(6):553–61.
256. Lee KH, Cavanaugh L, Leung H, Yan F, Ahmadi Z, Chong BH, et al. Quantification of NETs-associated markers by flow cytometry and serum assays in patients with thrombosis and sepsis. *Int J Lab Hematol.* 2018 Aug;40(4):392–9.
257. Laridan E, Martinod K, De Meyer SF. Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2019 Feb;45(1):86–93.
258. Yip C, Ignjatovic V, Attard C, Monagle P, Linden MD. First report of elevated monocyte-platelet aggregates in healthy children. *PLoS One.* 2013;8(6):e67416.

ANEXO: Formulario de recogida de datos.

DATOS GENERALES	
Fecha nacimiento	Fecha consulta
SEXO (1.Hombre, 2. Mujer)	
MOTIVO CONSULTA(1.Antecedentes familiares, 2.Alteración analítica casual, 3. Alteración clínica)	
ALTERACION ANALITICA (1.palidez, 2.hiperbilirrubinemia, 3.esplenomegalia)	

ANTECEDENTES	
A. PERINATALES (1.Ictericia/hiperbili sin FT, 2. Con FT, 3. ET)	
A. PERSONALES (s/n)	¿QUE A.PERSONAL?
ENFERMEDAD DE GILBERT s/n	1.Homo/2.Heterocigoto
A. FAMILIARES EH (1.1er grado, 2. 2º grado, 3. 1er y 2º grado, 4.otro, 5. NO)	Nº
Madre s/n, tío s/n, tía s/n, abuelo s/n, abuela s/n	
Padre s/n, tío s/n, tía s/n, abuelo s/n, abuela s/n	
A. FAMILIARES EG (1.1er grado, 2. 2º grado, 3. 1er y 2º grado, 4.otro, 5. NO)	Nº

EXPLORACION FISICA	Fecha
Peso	Talla
PALIDEZ (s/n)	ICTERICIA (s/n)
SOPLO SISTOLICO (s/n)	HEPATOMEGALIA(s/n)
ESPLENOMEGALIA (s/n)	¿tamaño clínico?

ANALITICA		Basal	Pos-esple	Basal	Pos-esple
Fecha					
Hb				Glucemia	
Rec. hematias				Urea/creatinina	
Hto				GPT/GOT	
VCM				Bil Total (Bil D/ Bil I)	
CHM				PCR/ LDH	
CHCM				Ferritina	
ADE				Indice Sat	
Reticulocitos T				Hierro	
Reticulocitos %				Catofife	
Leucocitos				Colesterol Total	
Plaquetas				Colesterol LDL	
Esfereocitos (s/n)				Colesterol HDL	

PRUEBAS DE IMAGEN	
Pruebas de imagen	Fecha realización
Esplenomegalia (s/n)	¿Tamaño eco?
Cálculos biliares (s/n)	Bazo accesorio (s/n)
Barro biliar (s/n)	Hepatomegalia (s/n)

DIAGNOSTICO	FECHA
Fragilidad osmótica (1=+, 2=-)	Valores
EMA (citometría de flujo)(1=+/2=-)	Valores

CARACTERISTICAS ERITROCITOS Y RETICULOCITOS	
Fecha Analítica	
Hb	Reticulocitos %
Hto	Reticulocitos T
VCM	VMR
HCM	FRI
CHCM	VMCE
CHCM	ADR (%)
ADE	

COMPLICACIONES (s/n)			Nº	
Crisis	aplásica	hemolítica	megloblástica	litiasis
Fecha				
Hb min				
Bil T máx (Directa/Indirecta)				
LDH				
Esplenomegalia (s/n)/ ¿Tamaño?				
¿Desencadenante? (1.virus,2.Qx,3. déficit folico,4. Otros)				
¿virus? (1.Parvovirus B12,2.VEB,3CMV,4.VH6,5.otro)				
Tto (1.Ac fólico, 2.TxCH, 3. Ambas, 4. Qx)				

TRATAMIENTO

AC. FOLICO (s/n)				
TRASFUSION CCHH (s/n)	1.Ocasional ,2. periódico		Nº	
	Fecha 1ª	Hb min	Retis	
ESPLENECTOMIA (s/n)	Fecha			
	Parcial/total	Abierta/laparosco		
COLECISTECTOMIA (s/n)	Fecha			

INMUNIDAD POSTQX

Ingreso hospitalario por infecciones s/n	Nº	
Infecciones graves o sepsis s/n (1.Neumococo, 2. Meningococo, 3.Haemophilus,4 otro)	Nº	
Vacunación correcta (neumococo y meningococo)		
Tratamiento antibiótico preventivo (s/n)	¿adherencia?/s/n	

ANAL PreQx	Fecha	
Hb	Gluc	
R. hemat	Urea/cr	
Hto	GPT/GOT	
VCM	Bil T (D/ I)	
CHM	PCR/ LDH	
CHCM	Ferritina	
ADE	I. Sat	
Retis T	Hierro	
Retis %	Catofife	
Leucos	Col T/TGC	
Plaquet	HDL/LDL	

PostQx Retis	Fecha	
Hb	Gluc	
R. hemat	Urea/cr	
Hto	GPT/GOT	
VCM	Bil T (D/ I)	
CHM	PCR/ LDH	
CHCM	Ferritina	
ADE	I. Sat	
Retis T	Hierro	
Retis %	Catofife	
Leucos	Col T/TGC	
Plaquet	HDL/LDL	

PosQx Plaqmax	Fecha	
Hb	Gluc	
R. hemat	Urea/cr	
Hto	GPT/GOT	
VCM	Bil T (D/ I)	
CHM	PCR/ LDH	
CHCM	Ferritina	
ADE	I. Sat	
Retis T	Hierro	
Retis %	Catofife	
Leucos	Col T/TGC	
Plaquet	HDL/LDL	

PostQx Plaq normal	Fecha	
Hb	Gluc	
R. hemat	Urea/cr	
Hto	GPT/GOT	
VCM	Bil T (D/ I)	
CHM	PCR/ LDH	
CHCM	Ferritina	
ADE	I. Sat	
Retis T	Hierro	
Retis %	Catofife	
Leucos	Col T/TGC	
Plaquet	HDL/LDL	

HOJA SELECCIÓN PACIENTES INVESTIGACION

DATOS GENERALES

FN		SEXO	
----	--	------	--

GRUPO (1. EH esplenectomizados, 2. EH no esplenectomizados y 3. Sano o control)	
---	--

RANTES	
CXCL5	
HMGB1	
DNA	
H3CyT	
Agregados L-P	
Agregados M-P	

ANALITICA	Fecha realización	
Hb		
Hto		
VCM		
CHM		
CHCM		
ADE		
Reticulocitos (%)		
Eritropoyetina		
Leucocitos		
Neutrófilos		
Linfocitos		
Monocitos		
Eosinófilos		
Basófilos		
Plaquetas		
VPM		
PDW		