



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

**RECINTO UNIVERSITARIO “RUBÉN DARÍO”
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD LUIS FELIPE MONCADA
DEPARTAMENTO BIOANÁLISIS CLÍNICO**

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
BIOANÁLISIS CLÍNICO**

**FRECUENCIA DE LA DEFICIENCIA DE GLUCOSA 6 FOSFATO
DESHIDROGENASA A TRAVÉS DE LA EVALUACIÓN DEL MÉTODO
SASS Y CARUSO EN DONANTES VOLUNTARIOS QUE FUERON
CAPTADOS POR EL BANCO DE SANGRE DE NICARAGUA EN EL
PRIMER SEMESTRE DEL 2018.**

AUTORES:

-  Br. María José García Sánchez
-  Br. Lissmorena Guadalupe Valle

TUTOR CIENTÍFICO:

-  Lic. Beatriz Moreno Montenegro

ASESOR METODOLÓGICO:

-  MsC. Rossny Peña Almanza

MANAGUA, MARZO, 2020.

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| DEDICATORIA | i |
| AGRADECIMIENTOS | ii |
| RESUMEN | iii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 JUSTIFICACIÓN | 3 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 4 |
| III. ANTECEDENTES | 5 |
| IV. OBJETIVOS | 10 |
| Objetivo general | 10 |
| Objetivos específicos | 10 |
| V. MARCO TEÓRICO | 11 |
| 5.1 Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa (G6PD) | 11 |
| 5.1.1 Estructura de la G6PD | 13 |
| 5.1.2 Función de la G6PD | 15 |
| 5.2 Deficiencia de G6PD | 17 |
| 5.2.1 Genética de la deficiencia de G6PD | 18 |
| 5.2.2 Clasificación de la deficiencia de la G6PD | 22 |
| 5.2.3 Epidemiología | 25 |
| 5.2.4 Manifestaciones clínicas de la deficiencia de G6PD | 26 |
| 5.2.5 Diagnóstico de la deficiencia de G6PD | 31 |
| 5.2.5.1 Análisis de los glóbulos rojos. | 32 |
| 5.2.5.2 Análisis genético | 33 |
| 5.2.5.3 Técnicas para la detección de la deficiencia de G6PD | 34 |
| 5.2.5.3.1 Método de Sass y Caruso. | 34 |
| 5.2.5.3.2 Reducción de la metahemoglobina Breweret. | 35 |
| 5.2.5.3.3 Técnica de Cianuro-Ascorbato de Jacob y Jandl | 35 |
| 5.2.5.3.4 Prueba directa de “Beutler Mancha Fluorescente. | 35 |
| 5.2.6 Tratamiento y prevención para deficiencia de G6PD | 35 |
| VI. PREGUNTAS DIRECTRICES | 38 |

| | |
|---|-----------|
| VII. DISEÑO METODOLÓGICO | 39 |
| VIII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 46 |
| IX. CONCLUSIONES..... | 65 |
| X. RECOMENDACIONES | 66 |
| XI. BIBLIOGRAFÍA..... | 67 |
| XII. ANEXOS | 70 |

DEDICATORIA

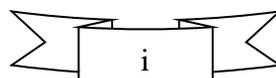
A Dios por ser nuestro creador y permitirnos llegar hasta este punto en nuestras vidas, ya que Él es el que nos permite estar aquí hoy y seguir adelante cada día.

A nuestros padres por todo su apoyo, comprensión y aliento para seguir adelante en nuestra formación profesional, sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible.

Al personal docente por dedicarnos tiempo y apoyo para nuestra formación profesional.

María José García Sánchez

Lissmorena Guadalupe Valle



AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser el motor para lograr cada uno de nuestros objetivos, a nuestros padres y personas allegadas por estar siempre presente en nuestros logros.

Agradecemos infinitamente al Instituto Politécnico de la Salud “Dr. Luis Felipe Moncada” UNAN-Managua, al personal docente participe de nuestra formación profesional, ya que sin ellos no hubiera sido posible llegar hasta este punto de nuestras vidas.

A todas aquellas personas que de una u otra forma nos ayudaron para la realización de esta monografía y nos brindaron ayuda con información y conocimientos para la elaboración de este documento.

Al personal del Banco de Sangre Nacional involucrado en la recolección de datos y muestras necesarias para el estudio.

A nuestra tutora Lic. Beatriz Moreno y asesor MsC. Rossny Peña por apoyarnos en la elaboración y culminación del estudio.

De manera muy especial a PhD. Allan Pernudi Abau por ser el impulsador de esta investigación.

María José García Sánchez

Lissmorena Guadalupe Valle

RESUMEN

El presente estudio titulado **“Frecuencia de la deficiencia de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa a través de la evaluación del método Sass y Caruso en donantes voluntarios que fueron captados por el Banco de Sangre de Nicaragua en el primer semestre del 2018”**, es un estudio analítico, cuasi-experimental de corte transversal, tiene como objetivo determinar la frecuencia de deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en donantes voluntarios captados por el Banco de Sangre Nacional.

Este estudio se desarrolló bajo el método deductivo, empleando como técnica el análisis documental y la ficha de recolección de datos como instrumento; está comprendido por tres acápites, donde se explican las principales características demográficas de los individuos en estudio, las cuales engloban edad, sexo y procedencia de los partícipes del estudio. También se aborda la aplicación del método Sass y Caruso en la detección de la deficiencia de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, donde se enfatiza el modo en que se debe aplicar la técnica y la capacidad que tiene esta para detectar individuos deficientes de la enzima; y por último se abarca la incidencia de la prueba en la deficiencia de G6PD en donantes, el cual se refiere a la cantidad de positivos y negativos encontrados en este estudio.

Al evaluar el método Sass y Caruso, se obtuvo que el reactivo era viable por ocho meses y debe ser utilizado con muestras que tengan menos de 24 horas de extracción. De un total de 1000 donantes se obtuvo un 11% afectado con esta patología, de los cuales el 57.2% corresponde al sexo masculino, la edad más afectada fue entre los 18 y 28 años y la región más destacada fue la de Managua. Los datos encontrados fueron representativos de la población y se asemejan a los datos obtenidos en otros países.

La deficiencia de G6PD es el defecto enzimático más común a nivel mundial, ocurre cuando una persona posee niveles bajos de la enzima, lo que predispone a que el eritrocito de estos individuos experimente hemólisis oxidativa, ya sea aguda o crónica, es, casi siempre, un padecimiento asintomático, que manejado correctamente, poco limita la calidad y expectativa de vida el paciente, aunque la ausencia completa de G6PD es incompatible con la vida. Dado que en Nicaragua no existe ninguna prueba que determine esta deficiencia no hay datos reflejados sobre la afectación en el país, por ello este estudio contribuye a la obtención de información sobre la deficiencia en Nicaragua.

I. INTRODUCCIÓN

La vía de las pentosas fosforadas es regulada en parte por la enzima Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD), esta enzima posee un estructura activa en forma de dímero y tetramero según las condiciones del medio en el que se encuentre, tiene relación directa con la protección del eritrocito contra el daño oxidativo; por medio de la G6PD se genera el poder reductor contra agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, la función de esta vía es mantener el glutatión en forma reducida, el cual es un compuesto que actúa como sustancia detoxificante, para lograr este propósito, el ciclo genera la forma reducida de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) esto como producto de la acción enzimática de G6PD. Debido a las diversas y vitales funciones del NADPH, la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa extiende el promedio de vida de las células. (Sáenz, 2014).

La deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o disminución de su actividad, considerablemente reduce la edad media de los glóbulos rojos, puesto que esta enzima es clave en la regulación de los agentes oxidantes y su deficiencia hereditaria va a predisponer al eritrocito a hemólisis oxidativa; debido a las múltiples variantes que posee la enzima con base en las determinaciones bioquímicas, se producen mutaciones puntuales que pueden estar asociados con desordenes clínicos, como son anemia hemolítica crónica, cuadros episódicos o ambos. Puesto que es un desorden enzimático muy común presenta una amplia distribución geográfica, se originó en África, pero actualmente se encuentra distribuida en todo el mundo; se han realizado estudios en casi toda Latinoamérica, donde se ha determinado la frecuencia y la variabilidad de la deficiencia enzimática, en países como Costa Rica, Argentina, Chile, Cuba, Brasil entre otros de Latinoamérica se emplean métodos de diagnóstico con enfoque cualitativos, cuantitativos y moleculares para la identificación de deficientes y a la vez variantes genéticas causantes de este trastorno.

En el país no se emplea ningún tipo de diagnóstico enfocado en la deficiencia de G6PD; dado que esta posee un alto índice de casos positivos no se excluye la posibilidad de que existan individuos que expresen esta variación genética para la deficiencia de dicha enzima, por tal razón se presenta el tema **“Frecuencia de la deficiencia de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa a través de la evolución del método Sass y Caruso en donantes voluntarios que fueron captados por el Banco de Sangre de Nicaragua en el primer**

semestre del 2018”, siendo este el primer análisis sobre esta anomalía, y servirá de base para su diagnóstico y control, actualmente los individuos que cruzan con un cuadro clínico sospechoso de dicha enfermedad quedan con un diagnóstico inconcluso dado que no existe una prueba de ningún ente para la determinación de la misma, por lo que este estudio contribuye en gran medida a la sociedad, ya que al detectar casos positivos para la deficiencia, se puede evitar que estos individuos sufran de crisis hemolíticas inducidas por agentes externos, así mismo al saber su estado, el individuo deficiente conocerá el riesgo de heredar la enfermedad a su progenie y se podrá disminuir la frecuencia de dicho trastorno.

1.1 JUSTIFICACIÓN

La glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la encargada de reducir los radicales libres, cuando esta función no es llevada a cabo dichos radicales que debieron haber sido eliminados se alojan en la membrana de los glóbulos rojos volviendo esta inestable y llevándolos a una muerte prematura o hemólisis. La deficiencia de G6PD es un trastorno enzimático que afecta los glóbulos rojos, es hereditario y ligado al sexo, se da cuando la persona tiene niveles bajos o ausencia total de la enzima, debido a un problema genético en el cromosoma X. La deficiencia de G6PD es el defecto enzimático más común a nivel mundial, se han determinado más de 400 variantes de dicha enzima en base a las determinaciones bioquímicas. La mayoría de estas mutantes se asocian con desordenes clínicos, otras con anemia hemolítica crónica; otras con cuadros episódicos o ambos (Sáenz, 2014), por tal razón se considera que el estudio titulado **“Frecuencia de la deficiencia de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa a través de la evaluación del método Sass y Caruso en donantes voluntarios que fueron captados por el Banco de Sangre de Nicaragua en el primer semestre del 2018”** es relevante, ya que aunque se conoce sobre la existencia de este trastorno hereditario, en el país no existe una prueba que detecte la enfermedad, por lo que no se cuenta con una base de datos donde se contemplen las afectaciones de la población nicaragüense.

Esta temática es de gran interés porque permite que los casos que presentan la deficiencia, pero no demuestran ningún episodio hemolítico, a menos que sean expuestos a agentes externos, sean diagnosticados antes de que presenten una crisis hemolítica irreversible. Detectar el trastorno en los donantes del banco de sangre es un hallazgo importante, dado que a pesar de que el donante deficiente aparente estar normal, la vida de sus glóbulos rojos está limitada siendo un dato beneficioso para el banco de sangre, tomándolo en cuenta al momento de almacenar y distribuir los elementos donados por el individuo, además el estudio contribuye a mejorar el abordaje clínico de los casos positivos para la deficiencia, y es una herramienta de conocimiento que brinda información sobre el estado de la patología a nivel nacional, igualmente permitirá a la población estudiantil la apertura de una nueva línea de investigación, siendo esta la base de la misma, ayudando a la universidad al reconocimiento científico por implementar investigaciones con nuevas temáticas de gran importancia para la sociedad, principalmente el área de la salud.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La glucosa 6 fosfato deshidrogenasa es una enzima presente en todos los seres vivos, cataliza la primera reacción en la vía de la pentosa fosfato, la ruta metabólica que proporciona NADPH a la célula y pentosas para la síntesis de ácidos nucleicos. (Sáenz, 2014)

La deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa es el desorden enzimático más común a nivel mundial, por lo que se han establecido diferentes métodos de diagnóstico para su detección, estableciendo a la vez patrones de comportamiento, clasificación de la misma de acuerdo a sus manifestaciones clínicas, clasificación genética y geográfica. En países del tercer mundo dicha patología se encuentra totalmente controlada desde el punto de vista de captación de todos los individuos positivos.

En Nicaragua se conoce acerca de esta enfermedad, pero ninguna institución de salud del país realiza una prueba que detecte la actividad enzimática o cuantificación de la enzima G6PD, por lo que no se ha diagnosticado ningún caso positivo para la deficiencia, siendo una situación muy preocupante, pues el individuo que presenta este trastorno puede presentar reacciones muy peligrosas que incluso pueden conducir a la muerte si no es controlada a tiempo en el momento de una crisis hemolítica.

Con el propósito profundizar en este tema a nivel nacional y contribuir a la detección de personas deficientes y a su vez aportar una base para el diagnóstico de esta, se planteó la siguiente interrogante: **¿Cuál es frecuencia de la deficiencia de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa a través de la evaluación del método Sass y Caruso en donantes voluntarios que fueron captados por el Banco de Sangre de Nicaragua en el primer semestre del 2018?**

Este estudio aporta información amplia del estado actual de la deficiencia, siendo útil para la sociedad y al área de salud pública al implementar un nuevo método de diagnóstico, que hará posible realizar una detección temprana de la enfermedad.

III. ANTECEDENTES

La frecuencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en Nicaragua es actualmente un dato desconocido, debido a que no está establecido ningún método diagnóstico en el país. Para la realización de esta monografía fue necesario hacer una amplia búsqueda de fuentes que sustenten el estudio, buscando información tanto a nivel nacional como internacional, sin embargo no se encontró ningún documento investigativo realizado en el país, no hay documentos relacionados al tema que indiquen algún tipo de dato, el único documento encontrado fue una recopilación de información establecida, a nivel internacional si se realizan diversas investigaciones relacionadas con el tema, por tal razón de acuerdo a la relevancia del contenido y al enfoque de esta investigación se seleccionaron los siguientes:

Un trabajo titulado “**Deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa**” realizado por Torrez y Contreras (2010), señalan que la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa es una enzima presente en los glóbulos rojos, cuya deficiencia ocasiona un cuadro de anemia de tipo hemolítica. Esta enzima cumple funciones protectoras en los glóbulos rojos, estos son los encargados de transportar el oxígeno hacia todo el organismo, cuando una persona con deficiencia ingiere oxidantes como aspirinas, sulfonamidas, antimaláricos, análogos de la vitamina K, alimentos como habas, tóxicos como naftalina e incluso en cuadros de tipo infeccioso y febriles, los glóbulos rojos sufren alteraciones en su forma para finalmente destruirse al circular por el organismo; la consecuencia final es un cuadro de anemia hemolítica, es decir, una anemia por destrucción de los glóbulos rojos circulantes en el torrente sanguíneo. Esta deficiencia es la más común a nivel mundial caracterizada por una disminución de la actividad enzimática de la glucosa 6- fosofato deshidrogenasa; se puede presentar en cualquier célula y su carencia absoluta es incompatible con la vida; es una enfermedad de tipo hereditaria que se transmite siguiendo un patrón de tipo recesivo ligado al cromosoma X por lo que predomina en los hombres, especialmente en los de raza negra.

Otro trabajo encontrado fue “**Anemia hemolítica por deficiencia de G6PD y estrés oxidativo**”, elaborado por Acosta et.al (2003), en el cual se considera la relación existente entre el papel que desempeña la Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y el estrés oxidativo, además, exponer los posibles mecanismos que ocasionan la hemólisis. Además señalan que la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa es una de las enzimas críticas para el funcionamiento y la supervivencia de los glóbulos rojos. Al analizar la función de esta enzima en el eritrocito,

se comprende su estrecha vinculación con los procesos relacionados con el estrés oxidativo en los individuos que son portadores de formas enzimáticas con actividad disminuida. Los pacientes portadores de esta deficiencia enzimática son susceptibles a la acción de los agentes oxidantes, esto hace que la mayoría de los casos presenten una anemia hemolítica de intensidad variable desencadenada por la ingestión de ciertas drogas, habas, limas o en el transcurso de procesos infecciosos severos. Otra forma de presentación es la ictericia neonatal.

De igual manera se encontró el trabajo titulado **“Deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa: de lo clínico a lo bioquímico”** realizado por Gómez et.al (2014), expresan que la deficiencia de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es la enzimopatía más frecuente, con una prevalencia global de 4,9%, con aproximadamente 330 a 400 millones de personas afectadas en el mundo. La G6PD tiene un importante papel en el equilibrio redox intracelular, especialmente en los eritrocitos; en condiciones de estrés oxidativo inducido, (por ejemplo, la exposición a agentes externos como fármacos, alimentos, o infecciones) los hematíes portadores de la variante enzimática y con deficiencia de la actividad enzimática, sufren daños irreversibles que condicionan su destrucción acelerada. La hemólisis explica el espectro de manifestaciones clínicas de esta enfermedad, que incluyen ictericia neonatal, episodios de hemólisis aguda inducida por agentes externos o anemia hemolítica crónica. El presente trabajo hace una reseña de los aspectos epidemiológicos y clínicos de esta enfermedad y revisa los aspectos fisiopatológicos a nivel bioquímico-molecular, con particular énfasis en la caracterización genética, estructural y funcional de las variantes asociadas a la deficiencia de G6PD.

El trabajo titulado **“Deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en niños. Caso clínico”**, realizado por Verdugo et.al (2014), destaca que la deficiencia de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es el trastorno enzimático más frecuente del glóbulo rojo (GR). Tanto la disminución como la ausencia de la enzima aumentan la vulnerabilidad del GR al estrés oxidativo provocado por algunos fármacos o la ingesta de habas. Sus manifestaciones clínicas más frecuentes son hemólisis aguda, hemólisis crónica, hiperbilirrubinemia neonatal, y una forma asintomática. Además se presenta el caso de un niño que debutó con crisis hemolítica debida a favismo, era un varón de 2 años y 7 meses con antecedente de hiperbilirrubinemia en el período neonatal sin causa evidente, sin historia familiar de anemia hemolítica, ni de consanguinidad paterna. Debutó con un cuadro de

ictericia y anemia severa que requirió transfusión de glóbulos rojos. Como antecedente anamnésico se detectó la ingesta de habas 48 horas previo al inicio de los síntomas. La determinación cualitativa de G6PD fue compatible con deficiencia de esta enzima. Se concluyó que la deficiencia de G6PD puede ser muy variable en su expresión clínica, por lo cual es necesario tenerla presente dentro del diagnóstico diferencial de las anemias hemolíticas a toda edad.

Otro estudio que se encontró fue el titulado “**Deficiencia de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) en Latinoamérica**” realizada por Moteiro et.al, (2014) expresa que la función principal de G6PD es la prevención del daño oxidativo a las células promoviendo desintoxicación de radicales libres, esta ruta metabólica implica la producción de nicotinamida adenina dinucleótida fosfato (NADPH) que participa en el ciclo del glutatión (GSH), protegiendo a la célula contra el hidrógeno, daño inducido por peróxido y asegurando un balance oxidativo dentro de las celdas; se describen 5 tipos de acuerdo con la actividad enzimática, que va desde el 1% hasta el 150% y va desde el tipo I-V respectivamente, las clases I, II y III tienen mayor riesgo de eventos hemolíticos, aunque la mayoría son asintomáticos, los que presentan crisis hemolíticas se desencadenan por vía intrínseca o extrínseca debido a factores estresantes, como por ejemplo: cetoacidosis diabéticas, drogas, patógenos o tipos de alimentos que causan síndromes tales como anemia hemolítica aguda, ictericia neonatal y anemia hemolítica congénita no esferocítica, donde las manifestaciones resultantes dependen de la cantidad de estrés oxidativo experimentado por la célula y los niveles de actividad enzimática. La mutación G6PD A-202 fue la variante más ampliamente distribuida en Latinoamérica, la prevalencia de la deficiencia tiene una buena correlación con la transmisión de la malaria. La técnica estándar de oro para detectar la deficiencia se basa en la medición de NADPH por la enzima.

También se encontró el trabajo realizado por Sáenz (2014), titulado “**Hematología analítica**”, señala que la deficiencia de G6PD va a cursar con dos cuadros diferentes de hemólisis, el primero y el más frecuente, es la hemólisis episódica o aguda y el segundo se denomina anemia hemolítica crónica no esferocítica. A lo largo de la historia se han descrito muchos agentes externos que pueden causar hemólisis aguda, entre ellos el frijol de fava, algunas infecciones y la exposición de medicamentos, los más comunes los antimaláricos. Como se mencionó, la destrucción eritrocitaria en sujetos deficientes de la enzima cursa con dos cuadros, en el caso de la hemólisis episódica o aguda se debe a exposición directa con agentes

oxidativos externos, usualmente autolimitada, el mecanismo fisiopatológico involucra la información de cuerpos de inclusión (Heinz), producto del daño oxidativo y la hemólisis crónica no esferocítica (AHCNE) es más severa y es producto del daño por agentes oxidativos que suelen producirse in vivo, aunque el proceso usualmente es extravascular, puede tener también un componente intravascular. En días subsecuentes la hemólisis es evidente y los hallazgos hematológicos en este tiempo son aquellos característicos de la anemia hemolítica aguda, con valores elevados de bilirrubina, hemoglobinemia y hemoglobinuria. Se ha estimado que entre el 30 y 50% de la masa eritrocítica es destruida, pero se limita a los glóbulos rojos viejos. La actividad enzimática en mujeres que poseen un gen de G6PD deficiente puede ser normal moderadamente reducida o marcadamente deficiente, sin embargo la magnitud absoluta puede ser menor.

Otro trabajo encontrado fue el realizado por Bello y Mohamed (2015) titulado **“Déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: revisión a propósito de un caso”**, señalan que la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) es un enzima eritrocitaria cuya función consiste en mantener la homeostasis de los eritrocitos frente a los insultos oxidativos, a través de la producción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH). Esta enzima forma parte de la ruta metabólica de las pentosas monofosfato y cataliza el paso oxidativo de la glucosa-6-fosfato hacia 6-fosfogluconato y reduce la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) a NADPH. Esta vía provee de NADPH al eritrocito, y es un cofactor básico en el metabolismo del glutatión, que participa activamente en la protección frente a estímulos oxidativos. El eritrocito tiene de forma habitual una gran cantidad de glutatión reducido que actúa como amortiguador de noxas endógenas o exógenas (infecciones, medicamentos y algunos alimentos). De esta manera no se produce el acúmulo oxidativo ni la degeneración proteica eritrocitaria, debido al paso del glutatión oxidado a reducido, para lo que se emplea NADPH, que a su vez se acopla a la actividad de la G6PDH. El eritrocito depende activamente de la producción de NADPH por esta vía para el balance del estrés oxidativo, al no disponer de mitocondrias para su obtención el déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (DG6PDH) es el defecto enzimático más frecuente de los eritrocitos. Se trata de una alteración vinculada a la protección del glóbulo rojo frente al estrés oxidativo. La mayoría de los pacientes son asintomáticos; clínicamente, se asocia con cuadros de hemólisis, desencadenada por algunos fármacos, infecciones o alimentos. En el caso de asociarse a la ingesta de habas, se denomina favismo. El tratamiento está enfocado hacia la anemización

producida, precisando en algunos casos trasfusión de hematíes. El principal cuidado de estos pacientes es el de evitar los desencadenantes conocidos de la hemólisis. El D6GPDH no se ha relacionado con una disminución de la calidad o compromiso de la vida de estos pacientes. Se presenta en este artículo una revisión del tema a propósito de un caso que debuta desde Atención Primaria.

También se encontró el trabajo titulado **“Fundamentos de Hematología”** elaborado por Boza (2016), donde comenta que la G6PD es una enzima que participa en el metabolismo del eritrocito y concretamente en la vía de las pentosas fosforadas, que se derivan de la glicólisis. Esta vía es importante para producir agentes con capacidad reductora que protegen al eritrocito del daño oxidativo, en la deficiencia la capacidad para producir estos agentes antioxidantes esta disminuida o ausente y por ello la célula sufre hemólisis producto de las sustancias oxidante internas y externas. Hay oxidación de la hemoglobina, la cual produce meta hemoglobina y sulfo hemoglobina que finalmente producen cuerpos de Heinz, el mecanismo de herencia es ligado al cromosoma X, por los que los varones son los que están usualmente más afectados. La forma más común de hemólisis en personas con esta deficiencia enzimática es el fenómeno agudo, que ocurre al ingerir un medicamento con alto poder oxidativo y se sobrepasa la capacidad detoxificadora, una vez que se identifica el agente causal de la destrucción y este se elimina, se detiene la hemólisis; algunos medicamentos que se han identificado son la quinina, quinidina, ácido nalidíxico, sulfonamidas, primaquina, el frijol llamado vicia, fava, entre muchos más. La otra forma es de tipo crónico y ocurre en sujetos con un defecto enzimático mayor de tal forma que no requieren la presencia de un agente tóxico externo, sino que los niveles de radicales libres que se produzcan constantemente en el organismo producen una hemólisis crónica permanente.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la frecuencia de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa a través de la evaluación del método Sass y Caruso en donantes voluntarios captados por el Banco de Sangre Nicaragüense durante el primer semestre del año 2018.

Objetivos específicos

1. Describir las principales características demográficas de los individuos en estudio.
2. Evaluar la funcionabilidad del método Sass y Caruso para la detección de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa.
3. Aplicar el método Sass y Caruso para la detección de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en los individuos donantes.

V. MARCO TEÓRICO

El presente protocolo de investigación está enfocado en la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, la cual es un defecto enzimático de amplia distribución geográfica, que afecta principalmente al sexo masculino, generando una serie de síntomas que pueden provocar consecuencias irremediables e incluso concluir con la muerte del que la padece si no es detectada y tratada a tiempo.

5.1 Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa (G6PD)

La glucosa 6 fosfato deshidrogenasa es una enzima catalizadora encargada de mantener bajo control los radicales libres evitando que se acumulen y causen daño oxidativo al organismo. Según la OMS (2017), “La G6PD es una enzima constitutiva fundamental de los eritrocitos que interviene frente al daño oxidativo produciendo la forma reducida Nicotinamida adenina dinucleotido fosfato. Los eritrocitos no tienen vías alternativas para la producción de NADPH dependiente de la G6PD”. (p.5)

En palabras de Moteiro et. al (2014) afirma:

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) es una enzima citoplasmática, cuya función principal es la prevención del daño oxidativo a las células mediante la promoción de desintoxicación de radicales libres. Esta vía metabólica implica la producción de nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH), que participa en el ciclo de glutatión (GSS), que protege la célula contra la hidratación, daño inducido por peróxido de hidrógeno y asegurando un oxidativo perfil de equilibrio activo dentro de la celda. (p.553)

Por otra parte Uribe (2017) señala que:

La G6PD es un complejo enzimático de localización citoplásmica y distribución sistémica, que juega un papel esencial en el metabolismo celular al dar comienzo al ciclo de las pentosas, convirtiendo la glucosa 6 fosfato proveniente de la vía Glucolítica a 6 Fosfogluconato una acción catalítica que involucra la generación Nicotin Adenin Dinucleótido Fosfato en su forma reducida (NADPH), un cofactor fundamental en diversas rutas biosintéticas, pero imprescindible en los procesos de reducción enzimática del glutatión eritrocitario, un tripeptido que actúa como un elemento amortiguador de grupos sulfidrilos, que mantienen en estado reducido las unidades aminoácidas de cisteína de la hemoglobina y otros elementos proteicos de los hematíes, aliviando el estrés oxidativo ya antes descrito. En consecuencia, las células con bajo nivel de Glutatión reducido por deficiencia de este componente muestran mayor susceptibilidad al fenómeno hemolítico. (p.9)

La G6PD es una enzima del citoplasma celular, cuya función principal es la prevención del daño oxidativo a las células al promover de eliminación de radicales libres. El eritrocito, desprovisto de núcleo y otras organelas, es incapaz de replicarse, sintetizar proteínas y

realizar fosforilación oxidativa. Necesita preservar los grupos sulfhidrilos de numerosas proteínas y prevenir el daño oxidativo, para garantizar una supervivencia aproximada de 120 días y cumplir con su función principal de transporte de oxígeno. Para tal fin emplea diferentes vías metabólicas; entre ellas, la vía de las pentosas, cuya enzima clave es la G6PD. La enzima cataliza la entrada de glucosa-6-fosfato en la vía de las pentosas, produciendo Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH). En el glóbulo rojo, este paso anaeróbico en el metabolismo de la glucosa es la única fuente de NADPH, el cual es requerido para la acción normal de la metahemoglobina-reductasa y el mantenimiento de un nivel adecuado de glutatión reducido. Los eritrocitos contienen concentraciones relativamente altas de glutatión reducido (tripéptido: g-glutamilcisteinilglicina), el cual protege de lesiones provocadas por agentes oxidantes como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH \cdot$), los cuales se producen de manera continua en los eritrocitos normales, a modo de productos accesorios de la oxidación de la hemoglobina por su carga de oxígeno. La glutatión-peroxidasa, enzima que remueve el peróxido del eritrocito transformándolo en agua, utiliza el glutatión reducido como sustrato, y dado que el NADPH es esencial para la reducción del glutatión, la eliminación de cada molécula de peróxido requiere de una molécula de NADPH. Así, al ser la G6PD esencial para que se produzca el NADPH, constituye un factor esencial en las cadenas de reacción que preservan al glóbulo rojo del peróxido de hidrógeno y los radicales libres del oxígeno durante situaciones de stress oxidativo. (Olivas & Viñas, 2018)

Por otro lado un estudio basado en la actividad de la enzima revela que esta actúa sobre la vía de las pentosas y mantiene al eritrocito protegido del daño oxidativo. Boza (2016) lo plantea de la siguiente manera:

La G6PD es una enzima que participa en el metabolismo del eritrocito y concretamente en la vía de las pentosas fosforadas, que se deriva de la glicólisis. Esta vía es importante para producir agentes con capacidad reductora que protegen al eritrocito del daño oxidativo, en la deficiencia la capacidad para producir estos agentes antioxidantes está disminuida o ausente y por ello la célula sufre de hemólisis producto de las sustancias oxidantes internas o externas, lo que se produce con oxidación de la hemoglobina. (p.89)

De igual manera en otro estudio se considera que la G6PD es una de las enzimas más importantes en la vía de las pentosas, Gómez et.al (2014) expresa:

La G6PD es la primera enzima de la vía de las pentosas-fosfato, una vía metabólica altamente conservada responsable de la producción de una variedad de moléculas fundamentales, incluyendo precursores de nucleótidos y NADPH. En la primera reacción de la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato, la G6PD cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato (G6P) a 6-fosfogluconolactona con la producción concomitante de una molécula de NADPH. Cuando

el 6-fosfogluconato se convierte en ribulosa-5-fosfato por la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD), se produce una segunda molécula de NADPH. (p. 413)

También esta enzima se conoce por ser la encargada de brindarle no solo la protección al eritrocito sino también participa en la formación de NADP el cual es indispensable para el metabolismo del glutatión, proporcionador de energía hacia las células, lo que destaca Bello y Mohamed (2015) que plantean:

Esta enzima forma parte de la ruta metabólica de las pentosas monofosfato y cataliza el paso oxidativo de la glucosa-6-fosfato hacia 6-fosfogluconato y reduce la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) a NADPH. Esta vía provee de NADPH al eritrocito, y es un cofactor básico en el metabolismo del glutatión, que participa activamente en la protección frente a estímulos oxidativos. El eritrocito tiene de forma habitual una gran cantidad de glutatión reducido que actúa como amortiguador de noxas endógenas o exógenas (infecciones, medicamentos y algunos alimentos). De esta manera no se produce el acúmulo oxidativo, ni la degeneración protéica eritrocitaria, debido al paso del glutatión oxidado ha reducido, para lo que se emplea NADPH, que a su vez se acopla a la actividad de la G6PDH. El eritrocito depende activamente de la producción de NADPH por esta vía para el balance del estrés oxidativo, al no disponer de mitocondrias para su obtención..... La G6PDH está presente en todas las células, variando su concentración según los tejidos. En los glóbulos rojos sanos, esta enzima funciona al 1-2% de su capacidad, esto provee una idea del potencial reductor que se pierde cuando existe un DG6PDH. (¶.2.8).

El ciclo de las pentosas es el principal productor de energía en forma de NADPH, siendo participe en este ciclo la G6PD, Verdugo, Calvanese, Rodríguez y Cárcamo (2014) opinan que:

La G6PD participa del ciclo de las pentosas, cuyo objetivo es producir energía como NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), para permitir reacciones de óxido-reducción en las diferentes células del organismo. El eritrocito depende exclusivamente de este mecanismo para obtener energía. Al existir la deficiencia enzimática, y en contacto con oxidantes, el hematíe no es capaz de revertir la reacción y se produce la hemólisis. En glóbulos rojos normales la enzima opera sólo en un 1% de su potencia máxima frente a un stress oxidativo, es decir, existe un gran potencial reductor. (¶.2)

5.1.1 Estructura de la G6PD

La G6PD es una enzima que se encuentra en todos los seres vivos, participa en la reacción de la vía de las pentosas fosforada, la cual es la ruta metabólica que proporciona el NADPH, se encuentra en diferentes formas estructurales.

Es una proteína citosólica que se expresa en todas las células de manera constitutiva pero cuyos niveles de expresión pueden diferir en un rango de hasta dos órdenes de magnitud en diferentes tejidos. La estructura secundaria de esta proteína se forma por un total de 15 regiones α -hélices y 15 hebras- β que se arreglan en un dominio de unión de coenzima con un plegamiento tipo Rossmann y una extensa región de interface formada por la asociación de

dominios $\beta+\alpha$ pertenecientes al extremo C-terminal de cada subunidad. En la enzima humana, cada uno de estos dominios estructurales presenta un sitio de unión a ligando, el dominio tipo Rossmann contiene el sitio activo de la enzima que une la G6PD y el NADP catalítico, mientras que un segundo sitio de unión a NADP se encuentra cerca de la región de la interface de la proteína. Este segundo sitio de unión a la coenzima se encuentra al parecer conservado sólo en organismos superiores y está implicado en la dimerización y la estabilidad de la enzima. En solución, la G6PD existe en un equilibrio dímero-tetrámero, el cual es afectado por el pH y la fuerza iónica; a pH alcalinos y alta fuerza iónica el equilibrio se desplaza hacia el dímero, mientras que en condiciones de pH ácido y baja fuerza iónica se favorece el tetrámero. (Gómez et.al, 2014)

La estructura de la enzima es muy variada, se encuentra en diferentes formas dependiendo de las condiciones en las que esté presente, La enzima, en su forma activa, es un homodímero o un homotetrámero de una cadena polipeptídica de 515 aminoácidos (59.2 KDa) y está altamente conservada en la escala evolutiva, por lo que mediante análisis de homología se han identificado algunas regiones críticas para su función. Cada monómero consiste de 2 dominios; uno pequeño, que tiene un sitio de unión a la coenzima (residuos 1-198), y otro mayor denominado $\beta+\alpha$ (residuos 199-515) que incluye el sitio de unión al sustrato. Contiene un total de 15 hélices α y 15 hojas β ; en la estructura del dímero las 2 subunidades están localizadas simétricamente a lo largo de un complejo interfásico de hojas β . El sitio activo comprende al nonapéptido 198- 206 que contiene un residuo de lisina en la posición 205 que forma parte del sitio de unión al sustrato. El sitio de unión al NADP (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato), se localiza en el extremo terminal (aminoácidos 38-47), la unión de este cofactor es importante para la estabilidad de la enzima. (García, Romo, Luque, Torres y Arámbula, 2014):

El monómero de la G6PD consta de 515 aminoácidos con un peso molecular de 59,256 daltons. La enzima activa consiste de subunidades idénticas que forman dímeros y tetrámeros, la proporción de las dos formas depende del pH, contiene un sitio de unión a nicotinamidaadenina dinucleotidofosfato (NADP), y así la agregación de los monómeros inactivos a la forma de dímeros catabólicamente activos requiere de la presencia de NADP, éste se une a la enzima, como componente estructural y como sustrato para la reacción. (Alatorre, González, López y Rojo, 2017)

5.1.2 Función de la G6PD

La importancia de la G6PD radica en la trascendencia de los procesos celulares en los que participa, a saber: Génesis de NADPH, efectuada a partir de los dos primeros pasos de la vía hexosa monofosfato. El NADPH participa en la biosíntesis reductora del colesterol y de los ácidos grasos, así como también en la síntesis del óxido nítrico (NO). Por otra parte se requiere para la actividad de la metahemoglobina reductasa y para el mantenimiento del nivel de glutatión reducido (GSH). El NADPH y GSH son los responsables del potencial redox efectivo para proteger del estrés oxidativo tanto a los grupos sulfhidrilo de la membrana celular, como a las enzimas y a la hemoglobina que compromete la supervivencia del eritrocito. Otras funciones, que muestran la trascendencia de esta enzima en la vida celular son:

1. Regulación de la actividad de la proteína KU, implicada en reparar el ADN tras el daño que causan las radiaciones. La intervención de la G6PD se efectúa a través del ciclo de las pentosas y consiste en facilitar la unión de KU -con residuos de cisteína reducidos- al ADN en proceso de reparación.
2. Desarrollo temprano del embrión. Cuando hay una deficiencia severa de G6PD en los tejidos extraembrionarios, el desarrollo de la placenta se detiene y se produce la muerte del embrión.
3. Supervivencia del feto durante la transición de la hemoglobina fetal a la forma adulta. Aquí la G6PD impide el daño oxidativo debido a la generación de especies reactivas de oxígeno a partir de la hemoglobina adulta.
4. Fagocitosis en células blancas. La deficiencia severa de esta enzima provoca una reducción de la generación de NADPH, lo que trae como resultado una disminución de la producción de H_2O_2 , y por tanto la actividad microbicida del neutrófilo está afectada, y así mismo la respuesta inflamatoria. Aunque las características clínicas de la deficiencia severa son semejantes a las de la enfermedad granulomatosa crónica (EGC), su aparición ocurre, a diferencia de esta última, hacia las etapas de vida más avanzadas. La EGC constituye un modelo fundamental para investigar la composición y la activación del sistema microbicida de las células fagocíticas, en especial de los neutrófilos. Esta entidad se debe a un defecto profundo en la explosión respiratoria que acompaña a la fagocitosis de todas las células mieloides (neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos). La explosión respiratoria genera la conversión catalítica del oxígeno molecular en el anión

superóxido que da lugar a la formación de H_2O_2 , de ácido hipocloroso y de radicales hidroxilo. Estos derivados del oxígeno juegan un importante papel en la reacción microbicida contra bacterias y hongos.

5. Modulación del factor de crecimiento endotelial vascular que regula la angiogénesis. El NADPH se utiliza como cofactor de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS). Así, el óxido nítrico requerido para la modulación del crecimiento y la migración endotelial durante el crecimiento vascular, se mantiene en un nivel adecuado.
6. La mayoría de los genes capaces de reducir el riesgo contra ciertas infecciones como la malaria se expresan en el glóbulo rojo, lo que se considera como un mecanismo genético y/o evolutivo de defensa, como en el caso de los genes que expresan la G6PD. (Bonilla et. al, 2007)

La G6PD es una enzima citoplasmática que cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona con reducción de NADP a NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducida). Esta es la única que provee de NADPH al eritrocito, la función principal de esta molécula es mantener los niveles adecuados de glutatión reducido (GSH), además es un componente estructural de la enzima catalasa. A su vez, el GSH y la catalasa participan en la detoxificación del peróxido de hidrógeno que es producido por radicales libres de superóxido cuando las células están expuestas a estrés oxidativo. Los glóbulos rojos están altamente expuestos a este estrés por dos razones: primero, los radicales oxígeno son generados continuamente dentro de los glóbulos rojos como resultado del ciclo de la hemoglobina, en el cual hay un cambio de la forma desoxigenada a la oxigenada; segundo, los glóbulos rojos están directamente expuestos a una variedad de agentes exógenos oxidantes. (García et. al, 2014)

La G6PD cataliza el paso de entrada de glucosa 6-fosfato (G6P) en la vía de las pentosas fosfato, específicamente en la de la hexosa monofosfato, reacción que produce oxidación de la glucosa 6 fosfato a 6 fosfogluconolactona, reduciendo NADP a NADPH. En el glóbulo rojo, este paso anaeróbico en el metabolismo de la glucosa es la única fuente de NADP reducido (NADPH), el cual es requerido para la acción normal de la metahemoglobina reductasa y el mantenimiento de un nivel adecuado de glutatión reducido. La glutatión peroxidasa remueve el peróxido del eritrocito; el glutatión reducido sirve como sustrato para esta enzima y debido a que NADPH es esencial para la reducción del glutatión oxidado, es

un factor esencial en las cadenas de reacción que defienden al glóbulo rojo del peróxido. Los glóbulos rojos son una fuente rica de catalasa, pero esta enzima es relativamente ineficiente en la remoción de bajos niveles de peróxido. Además, tiene la habilidad para unir fuertemente a NADPH y la forma inactiva es reactivada por NADPH. Por tanto, la actividad de la vía de las hexosas sirve para remover el peróxido no sólo a través de la acción de la glutatión peroxidasa si no también activando las catalasas. Por tanto, ambas enzimas sirven como un mecanismo de base, la una para la otra. (Alatorre et.al, 2017)

5.2 Deficiencia de G6PD

La deficiencia de G6PD es el defecto enzimático más común a nivel mundial, ocurre cuando una persona posee niveles bajos de la enzima, lo que predispone a que el eritrocito experimente hemólisis oxidativa, ya sea aguda o crónica. Según la OMS (2017), “El déficit de G6PD es un trastorno genético ligado al cromosoma X que confiere una cierta protección contra las infecciones graves por *P. falciparum*, pero también se asocia a un aumento de la vulnerabilidad a la hemólisis oxidativa”. (p.5)

Se identificó en 1956, su determinación cromosómica se conoció en 1951 y las variantes electroforéticas se demostraron en 1962, reflejando la importancia genética, clínica y bioquímica del polimorfismo del gen G6PD.2 La deficiencia de G6PD es, casi siempre, un padecimiento asintomático, que manejado correctamente, poco limita la calidad y expectativa de vida el paciente, aunque la ausencia completa de G6PD es incompatible con la vida. Muchos países han incluido a la deficiencia de G6PD en programas de tamizaje genético neonatal, dado que la formación de bilirrubina no conjugada puede producir ictericia nuclear, una de las principales causas de retardo mental y muerte en los neonatos.(Alatorre et.al, 2017)

Por otra parte Sáenz señala que “el estudio de este defecto hereditario comienza en el año 1926, cuando Cordes reporta unos casos de hemólisis agudo por exposición a una aminoquinola, luego en la guerra de Corea un porcentaje de soldados afroamericanos desarrollaron anemia hemolítica” (2014, p.133); mientras que Moteiro et.al afirma que “el gen G6PD presenta un patrón ligado al cromosoma X, aunque la mayoría de los que

presentan la deficiencia son asintomáticos, algunos experimentan anemia hemolítica”. (2014, p.553)

La deficiencia de esta enzima se considera un error latente, que no se manifiesta a menos que se produzcan determinadas alteraciones en el ambiente, generalmente la ingestión de sustancias o infecciones que hacen que se pongan de manifiesto la existencia del defecto enzimático... Las reacciones más importantes que se relacionan con la oxidación de NADPH son las que se relacionan con el glutatión. Los eritrocitos contienen concentraciones relativamente altas (2 mM) de glutatión reducido (tripéptido:g-glutamilcisteinilglicina) que sintetizan los eritrocitos maduros, el cual protege a los eritrocitos de lesiones provocadas por agentes oxidantes como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH), los cuales se producen de manera continua en los eritrocitos normales, a modo de productos accesorios de la oxidación de la hemoglobina por su carga peligrosa de oxígeno. Los fagocitos activados (por ejemplo, durante las infecciones) y los eritrocitos, en presencia de ciertos fármacos, generan grandes cantidades de oxidantes. La acumulación de estos agentes ocasiona lesiones en los lípidos y las proteínas celulares, proceso que por lo general evita el glutatión reducido (GSH), el cual convierte estequiométricamente el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua (H_2O) a través de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px), por lo tanto, la eliminación de cada molécula de H_2O_2 requiere de una molécula de NADPH, la cual es producida por la G6PD. (Acosta, Núñez y Suárez, 2003)

5.2.1 Genética de la deficiencia de G6PD

Es una deficiencia hereditaria, se da por un fallo en el cromosoma X, lo que implica una relación respecto al sexo, Sáenz (2014) refiere que:

A mediados de la década de 1950 se identificó la G6PD como la responsable de este fenómeno hemolítico y posteriormente, se descubrió el defecto como ligado al cromosoma X..... También señala que a nivel molecular posee una estructura activa en forma de dímero y de tetramero, según las condiciones del medio en que se encuentre. Los monómeros son catalíticamente inactivos y tienen un peso de 53 kDa..... El NADP está relacionado con la actividad, tanto así que el tetramero posee cuatro moléculas de este compuesto y la forma dímera dos. La importancia del NADP en la estructura se ha comprobado porque en pacientes con anemia hemolítica crónica las mutaciones en la proteína están en regiones donde se une el NADP estructural. (P.113-114).

Se conocen más de 180 variantes genéticas distintas del déficit de G6PD. Casi todas hacen que los eritrocitos sean vulnerables a la hemólisis oxidativa, pero la gravedad de la anemia

hemolítica depende tanto de la dosis y la frecuencia de la administración de primaquina como de la variante de la enzima G6PD. Dos de las variantes más prevalentes representan los dos extremos del espectro de gravedad. La variante mediterránea, que es la más frecuente en Europa, en Asia occidental y central y en el norte de la India, se encuentra entre las más graves, y la variante africana A-, que se observa en el África subsahariana y en los afroamericanos, entre las más leves. En personas con variantes menos graves de déficit de G6PD, la hemólisis inducida por la primaquina suele manifestarse al cabo de 1 o 2 días de tratamiento, cuando están agotadas las defensas antioxidantes de todos los eritrocitos más viejos. En personas con la variante africana A-, si se mantiene el tratamiento con primaquina la hemólisis disminuye y la concentración de hemoglobina empieza a aumentar nuevamente, a medida que los reticulocitos entran en la circulación para remplazar las células hemolisadas. Estos eritrocitos jóvenes contienen cinco veces más G6PD que los más viejos, por lo que son relativamente resistentes al efecto hemolítico. No obstante, con dosis más elevadas se produce una mayor hemólisis. En cambio, en personas con la variante mediterránea, si no se detiene la primaquina, la hemólisis prosigue y puede resultar mortal. Cuanto mayor es la dosis diaria de medicamento, menor es la vida media de los eritrocitos. Como el déficit de G6PD es un trastorno ligado al cromosoma X, los hombres solo tienen un alelo del gen de la G6PD, mientras que las mujeres tienen dos. Por consiguiente, en los hombres hay dos genotipos distintos (tipo salvaje y homocigótico), mientras que en las mujeres hay tres (tipo salvaje, homocigótico y heterocigótico). Durante el desarrollo embrionario de las mujeres, uno de los dos cromosomas X de las células somáticas se inactiva de forma aparentemente aleatoria, y ese estado activo o inactivo se mantiene en la progenie de cada célula. Este fenómeno, conocido como lionización, es responsable de la variabilidad de los niveles de actividad enzimática en las mujeres heterocigóticas, que refleja la proporción de eritrocitos cuya enzima G6PD esta inactivada. Los cinco genotipos de hombres y mujeres se manifiestan en tres fenotipos: G6PD normal y G6PD deficiente, tanto en los hombres como en las mujeres, y G6PD intermedia (actividad enzimática del 30%–80% de lo normal), solo en las mujeres heterocigóticas. (OMS, 2017)

El déficit de G6PD es un desorden hereditario ligado al cromosoma X. El gen que codifica para esta enzima está localizado en un grupo de genes en el brazo distal del cromosoma X (locus q28). La deficiencia enzimática, y en contacto con oxidantes, el hematíe no es capaz

de revertir la reacción y se produce hemólisis, por lo que a este cuadro se le ha denominado hemólisis oxidativa. (Olivas & Viñas, 2018)

El gen de la G6PD que fue secuenciado en el año de 1986, se encuentra localizado en la región telomérica del brazo largo del Cromosoma X (Xq28), consiste de 12 intrones y 13 exones que codifican para una secuencia de 515 aminoácidos. La literatura mundial ha documentado 186 mutaciones hasta la fecha, donde el 85,4 % corresponden a cambios puntuales que se distribuyen en todos los exones que codifican la enzima, con una mayor frecuencia a nivel del exón 10. (Uribe, 2017)

El gen G6PD está localizado en la región telomérica del brazo largo del cromosoma X (Xq28), cerca del sitio donde se encuentran los genes para la visión a color, Hemofilia A y el Síndrome de X frágil. El gen G6PD fue clonado en 1986, está compuesto por 13 exones y 12 intrones, abarcando casi 20 kb en total; dicho gen codifica para 515 aminoácidos. Los exones tienen tamaños que varían entre 38 y 236 pares de bases; el primer exón tiene una secuencia no codificante y los intrones son pequeños, excepto el intrón 2 (11 kb). En el extremo 5' del gen existe una isla rica en CpG, la demetilación diferencial de algunos CpG se asocia con la expresión del gen en el cromosoma X activo. (Alatorre et.al, 2017)

La estructura molecular de la G6PD la codifica un gen presente en la región terminal del brazo largo del cromosoma X (Xq28), menos de 2-centi-morgan al gen del factor VIII en los hombres. La región del gen que codifica para la proteína comprende 12 segmentos, con promedio de tamaño entre 12 y 236 BP y un intrón presente en la región no traductora 5', en muchas líneas celulares, el extremo mayor 5' del ARNm de la G6PD se localiza a una distancia de 177 BP de codón de iniciación de transcripción, aunque las mutaciones se extienden a lo largo de la región codificadora del gen, existen pocas que dan origen a la forma más severa de deficiencia de la enzima, esta es la que se encuentra asociada al CNSHA (clase 1) en los 160 aminoácidos de extremo N-terminal; no obstante, no hay ninguna que cause formas moderadas de deficiencia (clase 2 y 3). Además afirman que la G6PD está constituida como estructura activa en dos tipos de forma: la de dímero y la de tetrámero, según las condiciones de medio, también se menciona que la molécula del NADP juega una función estabilizadora en la estructura cuaternaria. La interconversión del dímero o tetrámero depende de varios factores que favorecen a una o a otro de ellos (pH, Mg⁺⁺, fuerza iónica),

pero se ha demostrado que ambas formas presentan actividades específicas muy similares, in vivo, existe una mezcla de monómeros, dímeros y tetrámeros, condición regulada por los niveles de NAPD, el cual controla la formación de los complejos moleculares, así como el pH intracelular. (Torrez y Contreras, 2010)

Boza (2016) comenta que “el mecanismo de herencia está ligado al cromosoma X, por lo que los varones son usualmente lo más afectados” (p.89), por otra parte Sáenz (2014) plantea que “se han identificado 400 variantes de la enzima con base en determinaciones bioquímicas, la mayoría de esas mutantes se asocian con desordenes clínicos, otras con anemia hemolítica crónica y otras con cuadros episódicos o ambos” (p. 113)

La deficiencia de G6PD presenta una gran heterogeneidad genética; a nivel mundial se han reportado hasta la fecha alrededor de 160 mutaciones causantes de esta enfermedad; la mayoría de ellas son mutaciones puntuales que causan defectos estructurales y/o funcionales en la enzima. Algunas de estas variantes presentan frecuencias polimórficas en determinadas poblaciones. La distribución polimórfica permitió en algunas ocasiones determinar el origen evolutivo de las mutaciones en el gen de la G6PD, o bien determinar si una mutación fue de origen único o recurrente; también expresan que el gen de la G6PD se localiza en la región sub-telomérica del brazo largo del cromosoma X en el locus Xq28; por lo tanto, la deficiencia de esta enzima es una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X. La secuencia completa del gen de la G6PD presenta un tamaño de 18,5 Kb y está conformado por 12 intrones y 13 exones que codifican para un producto de 1545 pb. (Gómez et.al, 2014)

En el caso de las mujeres, debido al efecto Lyon, pueden ser heterocigotas (comportándose como mosaicos) y en ellas se han descrito casos clínicos similares en comportamiento a los del varón homocigoto. Las mujeres homocigotas no son raras en poblaciones con alta incidencia de deficiencias alélicas de G6PDH... Debido a que es uno de los trastornos enzimáticos con mayor heterogeneidad genética se han descrito más de 140 mutaciones, con más de 400 variantes bioquímicas del enzima. (Bello y Mohamed, 2015)

La deficiencia se expresa por completo en los varones, y las hembras heterocigóticas son en apariencia normales, en estas últimas la actividad enzimática media de la G6PD puede ser normal, moderadamente reducida o muy deficiente, según la distribución de la población celular. Las células deficientes en estas mujeres son tan susceptibles a lesiones oxidantes

como las células deficientes en varones; sin embargo, la magnitud total de la hemólisis es menor porque la población de células vulnerables es pequeña. (Acosta, et. al, 2003)

Existe una clara distribución de las variantes enzimáticas, a través del mundo, tanto en variantes que actúan de manera anormal como en variantes defectuosas, la enzima normal se denomina G6PD (B+) o GdB, la variante GdA+, tiene una actividad normal y se distingue de la forma B por poseer una movilidad electroforética mayor, esta posee propiedades catalíticas normales y por lo tanto no hay problema de hemólisis, su estructura difiere de la GdB por la sustitución de asparagina por asparto en la secuencia de una mutación en el nucleótido 376, que es la que le confiere su mayor movilidad. Se han descrito muchas formas anormales de la enzima, las más importantes son las variantes de las formas A+ y B+ llamadas GdA- o variante africana y GdB- o variante mediterránea. (Sáenz, 2014)

5.2.2 Clasificación de la deficiencia de la G6PD

La deficiencia de G6PD se clasifica de acuerdo al porcentaje de disminución que un individuo posee, por lo que gravedad de su sintomatología se expresa diferente en cada individuo. De acuerdo a la actividad enzimática y las manifestaciones clínicas la Organización Mundial de la Salud las ha clasificado en cinco clases que se resumen a continuación:

- ✚ Clase I: su prevalencia es poco frecuente y normalmente el nivel de deficiencia es grave, se manifiestan como anemia hemolítica no esferocítica, o anemia crónica en presencia de función eritrocítica normal.
- ✚ Clase II: más prevalente en el Mediterráneo y Asia. Aquí el nivel de deficiencia también es grave y la actividad enzimática es menor del 10% de lo normal.
- ✚ Clase III: presente en el 10% de los varones negros de Estados Unidos. Incluye variantes con nivel de deficiencia moderado y una actividad enzimática del 10 al 60% de lo normal.
- ✚ Clase IV: es una variante rara donde la deficiencia enzimática suele ser leve o ninguna, y el nivel de actividad enzimática del 60 al 150% del normal.
- ✚ Clase V: no hay deficiencia enzimática, también es rara en cuanto a prevalencia y la actividad enzimática es mayor al 150% de lo normal. (OMS, 2001)

Con respecto al grado de compromiso enzimático, como es frecuente en los errores innatos del metabolismo, a medida que se han estudiado las poblaciones afectadas por esta deficiencia, se han documentado grandes diferencias en el porcentaje residual de la actividad enzimática y la gravedad de las manifestaciones clínicas, ejemplifica este aspecto el paralelo entre la severidad encontrada por ejemplo en los asentamientos humanos de origen mediterráneo y la expresión más benigna de la enfermedad en individuos afroamericanos. Estos hallazgos han establecido una clasificación dependiente de la actividad enzimática estandarizada por la organización mundial de la salud que se relaciona a la severidad clínica y el comportamiento enzimático de las enzimas mutadas, que oscila desde las formas clásicas con valores de actividad enzimática $\leq 5\%$ de actividad residual hasta individuos con expresiones limitrofes o comparables a valores de individuos control. (Uribe, 2017)

Las variantes de la deficiencia fueron agrupadas en 5 clases basados en la actividad enzimática y manifestaciones clínicas, la mayoría de las variantes ocurren en forma esporádica, aunque la forma mediterránea y la G6PD A son más frecuentes en ciertas poblaciones. En algunas de estas variantes se produce hemólisis crónica denominada "hemólisis congénita no esferocítica", esta variante se ha descrito como clase I según la clasificación de la OMS, la hemólisis es de tipo extravascular a diferencia de la presentación hemolítica aguda, donde la hemólisis es preferentemente intravascular. (Verdugo et.al, 2014)

La expresión clínica de la deficiencia de G6FD resulta de la interacción de las propiedades moleculares de cada variante de G6PD, con factores exógenos y posiblemente factores genéticos adicionales específicos para determinadas poblaciones. La deficiencia de G6FD se divide en cinco clases según la gravedad clínica y el grado de deficiencia enzimático. La clase I se caracteriza por una anemia hemolítica no esferocítica crónica (AHNEC) sin causa precipitante y una deficiencia grave de G6FD. En la clase II se produce una hemólisis intermitente y una deficiencia grave de G6FD. La clase III se caracteriza por hemólisis después del estrés oxidativo y una deficiencia leve de G6FD. Las clases II y III representan en conjunto más del 90 % de las variantes de G6FD. Las clases IV y V no producen sintomatología clínica.

Los síndromes clínicos más relevantes de deficiencia de G6FD son:

- ✚ Anemia hemolítica aguda (AHA).
- ✚ Anemia hemolítica neonatal (AHN), en el recién nacido.

- ✚ Anemia hemolítica crónica no esferocítica (AHCNE).

La AHA es la presentación clínica más llamativa de la deficiencia de G6PD con hemólisis intravascular aguda después de la exposición a estrés oxidativo. Entre los tipos de estrés oxidativo hay que citar: la ingestión de ciertos fármacos, la ingestión de habas o procesos infecciosos severos, siendo esta última la causa más común de la hemólisis. Se caracteriza por irritabilidad, fiebre, náuseas, dolor abdominal y diarreas. Se inicia desde horas hasta varios días después de haber sufrido un estrés oxidativo y finaliza cuando se han hemolizado todos los eritrocitos deficientes de G6PD, entre las 48 h tras la exposición al oxidante. Después aparece hemoglobinuria, ictericia y anemia.

La hemólisis inducida por drogas clásicamente aparece luego de la ingestión de ciertos agentes, entre los que se señalan:

- ✚ Antipalúdicos: como primaquina, pamaquina, cloroquina y quinina.
- ✚ Sulfamidas y sulfonas: sulfanilamida, sulfapiridina, sulfacetamida, dapsone salicilazosulfapiridina, sulfametoxazol, sulfadiazina, y trimetroprima-sulfametoaxol.
- ✚ Nitrofuranos como nitrofurantoina, furazolidona y nitrofurazona.
- ✚ Analgésicos: ácido acetilsalicílico y paracetamol.
- ✚ Otras drogas como ciprofloxacino, ácido nalidixico, cloranfenicol, análogos de la vitamina K, probenecid, azul de metileno, entre otros.

La infección es probablemente la causa más común de hemólisis en los pacientes con deficiencia de G6PD. La severidad y las consecuencias clínicas de hemólisis están influenciadas por numerosos factores que incluyen la administración simultánea de drogas oxidantes, los niveles de hemoglobina previos, la función hepática y la edad.

La presentación de cuadro de hemólisis aguda luego de la ingestión de habas, es conocido como Favismo y ha sido reconocida desde la antigüedad, presentando los pacientes un cuadro clínico similar al inducido por fármacos, que se desencadena dentro de las 24 y 48 h siguientes a la ingesta de habas. Los pacientes afectados por déficit de G6PD también pueden desarrollar ictericia neonatal con kernicterus, la cual ocurre clásicamente entre los días 4 y 7 posnatales. (Oliva & Viñas, 2018)

5.2.3 Epidemiología

La deficiencia de G6PD es el defecto enzimático más común a nivel mundial, se estima que cerca de 400 millones de personas se encuentran afectadas en todo el mundo, donde la GdA- es la variante más común asociada con hemólisis episódica y se encuentra de forma predominante en la raza negra. La mediterránea es la segunda variante más común, su actividad catalítica esta marcadamente disminuida. Esta deficiencia es hereditaria y está ligada al cromosoma X por lo que los hombres se encuentran más afectados tanto heterocigotos como homocigotos, mientras que la mayoría de las mujeres solo se comportan como portadores de la enfermedad y pocas presentan la enfermedad. El origen de la deficiencia se ha asociado a su efecto protector contra el *Plasmodium falciparum*, por lo que se han desarrollado muchos estudios incluyendo la coincidencia geográfica de zonas de alta incidencia de la malaria, con alta prevalencia de la deficiencia de la enzima. La variante GdA- abarca cerca del 90% de los casos africanos, además se encuentran en el Caribe, Suramérica y Norteamérica, así como regiones de España, Portugal y el Medio Este. La GdB- se detecta en países de la región del Mediterráneo, el Medio Este y las regiones de la India. (Sáenz, 2014)

A nivel mundial, alrededor de 400 millones de personas portan por lo menos un gen deficiente de G6PD. En América Latina y el Caribe se reporta que existen alrededor de 75 mil casos con una prevalencia variable según los países, siendo Guyana Francesa, Surinam, algunas regiones de Venezuela, Colombia y Ecuador los de mayor prevalencia con cifras de superiores al 10 %. Las mutaciones en el gen de la G6PD determinan variantes con diferentes grados de actividad enzimática asociadas a una amplia gama de fenotipos bioquímicos y clínicos; y se han descubierto más de 400 variantes, las que son generalmente responsables de la diversidad en el cuadro clínico de esta enzimopatía. Las variantes genotípicas mejor conocidas son la G6PD mediterránea (G6PD B-) y la variante africana (G6PD A-). La deficiencia de G6PD A- es la mutación más habitual en africanos y afroamericanos. (Oliva y Viñas, 2018)

Por otra parte Uribe (2017) argumenta que “Se ha observado una alta incidencia en personas de raza negra y algunas poblaciones de judíos, sin embargo, su distribución es étnica, con una mayor prevalencia en zonas endémicas de malaria”. (p.11), mientras que Monteiro et.al

(2014) consideran que “la mutación G6PD A-202^a fue la variante más amplia distribuida en América latina y se identificó en 81.1% de las personas encuestadas” (p. 554).

Por otra parte Gómez (2014) también afirma que:

La deficiencia de la G6PD es la enzimopatía más común en el hombre y el quinto defecto congénito más común a nivel mundial. Tiene una distribución global con una prevalencia del 4,9% y un estimado de 330 a 400 millones de personas afectadas en el mundo. La deficiencia de G6PD se produce con mayor frecuencia en África, Asia, el Mediterráneo y el Medio Oriente. (p.556)

De las dos variantes más frecuentes, la G6PD A- (clase III de la OMS) afecta fundamentalmente a africanos y sus descendientes. Su sintomatología en general es poco grave debido a que solo un 20-30% de los eritrocitos deficientes sufren hemólisis. Se suele presentar con poca frecuencia como favismo. La forma mediterránea (G6PD mediterránea), que se considera la clase II de la OMS, afecta fundamentalmente a poblaciones de origen griego, italiano, español, árabe y judíos. Esta variante produce además hiperbilirrubinemia neonatal más grave y el favismo con mucha mayor frecuencia... Los pacientes con DG6PDH tienen mayor vulnerabilidad para la sepsis y las complicaciones relacionadas con la misma (Bello y Mohamed, 2015)

La prevalencia en México es de 0.95%, aunque en algunos países en los que prospera el Plasmodium (paludismo), como en la República Democrática del Congo, tiene prevalencia del 25%, siendo superados por los judíos kurdos con el 70%. Con mayor frecuencia en las regiones tropicales y subtropicales. Se estima que 10% de la población mundial porta un gen deficiente de G6PD. Las poblaciones con mayores proporciones de afectados van desde 5% hasta 30%, y se encuentran en África, Asia, Medio Oriente, Mediterráneo y Papuasias (Nueva Guinea). El 90% de los afectados son de sexo masculino. Los principales afectados en Estados Unidos son los varones negros, población que alcanza una prevalencia de 10%. (Alatorre et.al, 2017)

5.2.4 Manifestaciones clínicas de la deficiencia de G6PD

Al parecer la morbilidad relacionada a la deficiencia de G6PD se manifiesta solo cuando existe estrés oxidativo, por lo que se plantea que en ausencia de factores desencadenantes de crisis hemolíticas la enfermedad no se manifiesta, por lo tanto la gran mayoría de los

pacientes que cursan con deficiencia de G6PD son asintomáticas y sólo se manifiesta la enfermedad cuando éstos son expuestos a estímulos oxidativos que desencadenan la hemólisis masiva intravascular. Es por esto que muchas personas que padecen este desorden lo ignoran. Clínicamente la variante A- causa una clínica poco grave debido a que la G6PD del eritrocito pierde su función luego de 50 a 60 días de circulación y sólo 20% a 30% de los eritrocitos deficientes sufren hemólisis, mientras que la mutación mediterránea, o B-, causa una clínica muy grave porque la G6PD del eritrocito pierde su función mucho más rápidamente (5 a 10 días de circulación) y la mayoría de eritrocitos deficientes llegan a sufrir hemólisis. La expresión clínica entonces resulta de la interacción de las propiedades moleculares de cada variante de G6PD con factores exógenos y posiblemente factores genéticos adicionales específicos para determinadas poblaciones, clasificándose las manifestaciones clínicas de la siguiente manera:

✚ Ictericia neonatal: La causa de ictericia neonatal no está clara. Los infantes con ictericia neonatal no tienen antecedentes de exposición a fármacos, una de las causa es la transferencia a través de la placenta de fármacos y compuestos químicos tomados por la madre. Generalmente, la variante enzimática de G6PD encontrada en estos infantes es del tipo B- (variante deficiente con actividad enzimática muy disminuida), lo que implica una relación directa con la presencia de un estrés oxidativo, provocado por una disminución en la defensa antioxidante del eritrocito. La ictericia se presenta del primero al cuarto día de edad. La gravedad del cuadro es muy variable, puede llevar al kernicterus, que consiste en un daño cerebral y de los nervios auditivos por niveles elevados de bilirrubinemia neonatal no conjugada y puede llevar a discapacidad intelectual, parálisis cerebral, sordera y muerte. Sin embargo estas complicaciones pueden ser prevenibles.

✚ Favismo: Se denomina favismo, a la hemólisis aguda que se desarrolla en algunos individuos después del consumo de habas en este caso, el agente oxidativo es el metabolito de la L- Dopa (compuesto de las habas) la dopaquinona, el cual es un potente oxidante. Los síntomas del favismo se desarrollan a las 24 a 48 horas después de la ingestión y es muy peligroso. Los más comunes son las náuseas, vómitos, malestar y vértigo. A estos síntomas les sigue una hemólisis aguda donde, a menudo, el conteo de eritrocitos cae por debajo de $1,0 \times 10^{12}/L$. También se puede presentar ictericia y afección renal. En la mayoría de los glóbulos rojos son vistos cuerpos de Heinz. Están presentes la

hemoglobinemia y la hemoglobinuria. Los síntomas generalmente cesan luego de 2 a 6 días. En la actualidad está establecido que el favismo en el área mediterránea es debido a la ineficiente variante B- de la enzima G6PD.

- ✚ Anemia hemolítica inducida por infecciones: Es la causa más común de anemia hemolítica aguda, en ésta el anión superóxido y el H_2O_2 se generan en los macrófagos en respuesta a la infección, produciéndose por lo tanto agentes que dañan indirectamente a los glóbulos rojos. Por otra parte, el daño en la morfología de los eritrocitos provoca que estos sean blanco de los macrófagos, por lo que pueden fagocitar a los hematíes. Ambos mecanismos participan en la hemólisis del eritrocito. Además los medicamentos administrados durante la infección pueden generar más grado de oxidación. Las infecciones más relevantes son las hepatitis infecciosas, la neumonía y la fiebre tifoidea.
- ✚ Anemia hemolítica inducida por fármacos: El mecanismo exacto de destrucción de los glóbulos rojos por estos fármacos hemolíticos todavía no está esclarecido. La severidad del trastorno está relacionada con la variante genética para G6PD que presenta la persona y con el fármaco. La administración de fármacos hemolíticos en pacientes con deficiencia de G6PD es seguida, típicamente de 24 a 72 horas, con hemólisis e ictericia. La hemólisis es primordialmente intravascular y normalmente se asocia con hemoglobinuria. Los eritrocitos vistos al microscopio evidencian la aparición de cuerpos de Heinz y la hemoglobina cae abruptamente y, la orina se torna oscura.
- ✚ Anemia Hemolítica Crónica no esferocítica: Todos los pacientes con deficiencia de G6PD experimentan hemólisis crónica. Habitualmente la hemólisis ocurre sólo bajo sujeción a estrés. Estos pacientes con deficiencia de G6PD que manifiestan anemia hemolítica crónica no esferocítica suelen poseer factores agravantes adicionales a su(s) mutacione(s) en el gen G6PD, como pueden ser otras anormalidades genéticas como la anemia diseritropoyética congénita, esferocitosis hereditaria, deficiencia de piruvato-cinasa o deficiencia de 6 fosfogluconolactonasa, así como con condiciones asociadas infrecuentes como disfunción granulocítica, que contribuye a la hemólisis al incrementar la susceptibilidad del individuo a adquirir infecciones.

✚ Anemia hemolítica congénita no esferocítica (AHNEC): Los síntomas pueden aparecer inmediatamente después del nacimiento, por lo que el recién nacido se encuentra anémico y presenta ictericia. En ocasiones la concentración de hemoglobina es normal y la hemólisis está compensada, pero el estrés oxidativo producido por el déficit en la producción de NADPH por la deficiencia en la actividad de G6PD y, por consiguiente, en el mantenimiento de los niveles de glutatión reducido, puede llevar a una dramática caída en los niveles de hemoglobina. (Alatorre et.al, 2017)

Por otra parte se tiene que las manifestaciones varían en cada individuo dependiendo del tipo de deficiencia que padezca, el espectro clínico de la deficiencia de G6PD es muy amplio, abarcando desde sujetos asintomáticos hasta estados hemolíticos agudos o crónicos. La gravedad del cuadro clínico casi siempre se correlaciona con el grado de deficiencia enzimática. La mayoría de los sujetos que presentan las variantes con niveles moderados de deficiencia, se encuentran asintomáticos a través de su vida e inclusive desconocen el estado de su enfermedad. En los sujetos con las variantes deficientes graves, las manifestaciones clínicas pueden dividirse en tres grandes grupos: ictericia neonatal, hemólisis aguda y anemia hemolítica crónica no esferocítica. (Gómez et.al, 2014)

Un paciente deficiente puede expresar dos tipos de anemia hemolítica, ya sea crónica o aguda, la forma de hemólisis más común en personas con esta deficiencia enzimática es el fenómeno agudo, que ocurre cuando se ingiere algún medicamento con alto poder oxidativo y sobrepasa la capacidad dextrosificadora. La otra forma de hemólisis es de tipo crónico y ocurre en sujetos con un defecto enzimático mayor, de tal manera que no requieren la presencia de un agente tóxico externo, sino de los niveles de radicales libres que se produzcan constantemente en el organismo. (Boza, 2016)

Dada la gran heterogeneidad genética, la forma de presentación clínica también es bastante variable, la mayoría de los pacientes con este déficit suelen estar asintomáticos. Las formas clínicas sintomáticas son:

✚ Anemia hemolítica aguda (por fármacos o infecciones). Existe una larga lista de fármacos y agentes infecciosos que se han relacionado con cuadros de hemólisis aguda. En el caso de fármacos, la hemólisis no es clínicamente detectable hasta las 24-72 horas de su administración. El rasgo característico es el de orina oscura por hemoglobinuria.

La anemia se agudiza hasta los 7-8 días de la administración, momento en el que la hemoglobina inicia la recuperación. En el caso de infecciones, se ha descrito para los virus A y B de la hepatitis, citomegalovirus, neumonías, fiebre tifoidea y agente como *E. coli*, *Salmonella* y *Streptococcus* grupo B². El mecanismo exacto de hemólisis por esta causa es desconocido, aunque una explicación podrían ser las reacciones derivadas de la actividad fagocitaria en el seno de la infección.

- ✚ Favismo. Aunque la evidencia clínica no lo ha demostrado del todo, la mayoría de los autores coinciden en que la patogenia está determinada por la toxicidad que producen elementos del haba, como la vicina y la convicina, al ser hidrolizadas en el tubo digestivo y convertirse en alguno de los activos divicina e isouramilo, que son capaces de producir hemólisis de los glóbulos rojos.

- ✚ Anemia hemolítica congénita no esferocítica. Es una forma de hemólisis crónica, agrupada en el tipo I de la OMS. Son casos esporádicos. Se trata de una hemólisis típicamente extravascular, que se debe sospechar por una historia compatible (típicamente ictericia neonatal, anemia crónica regenerativa que se exacerba con estímulos oxidativos, colelitiasis, esplenomegalia), así como datos analíticos de destrucción corpuscular.

- ✚ Hiperbilirrubinemia neonatal. Es más típica y grave en pretérminos que en términos. Se suele presentar entre los días 1 y 4 de vida, como la fisiológica, y con las mismas complicaciones y tratamiento. El mecanismo de la hemólisis no se conoce totalmente. Se debe pensar en este defecto en el caso de ictericias en las primeras 24 horas, con valores altos, o en casos de historia familiar previa al nacimiento. (Bello y Mohamed, 2015).

Es bien conocido que la deficiencia de G6PD produce un fallo en el metabolismo del GSH y el resultado de esto es la hemólisis. Como un elevado número de variantes deficientes de G6PD no se asocian a hemólisis crónicas, se puede inferir que una pequeña cantidad de actividad residual es suficiente para los requerimientos del eritrocito..... En las variantes deficientes de G6PD con hemólisis crónicas asociadas es evidente que la producción de NADPH es inadecuada, aunque se desconoce con exactitud como esto ocasiona la hemólisis.

Una explicación razonable es que en estos casos los niveles de GSH son tan bajos que los grupos sulfhidrilos críticos en algunas proteínas claves no pueden ser mantenidos en su forma reducida y se producen uniones intramoleculares e intermoleculares entre estos grupos. Se ha observado la formación de agregados de las proteínas del citoesqueleto de la membrana del glóbulo rojo, en pacientes con anemia hemolítica por déficit de G6PD. Estos agregados disminuyen la deformabilidad de la célula y pueden alterar la superficie celular, haciéndolas reconocibles por los macrófagos como anormales y dando lugar a la producción de una hemólisis extravascular. (Acosta et. al, 2003)

La presentación clínica, íntimamente ligada al daño estructural y en consecuencia funcional, causada por la mutación, muestra un amplio espectro cuya especificidad lo hace con frecuencia indistinguible de otras enzimopatía eritrocitarias, entre las manifestaciones fenotípicas relacionadas a la severidad del episodio hemolítico y la capacidad de compensación celular se encuentran la anemia no esferocítica aguda o crónica, ictericia por una hiperbilirrubinemia de predominancia indirecta (puede progresar a Kernicterus y muerte) y esplenomegalia, entre otros. (Uribe, 2017)

5.2.5 Diagnóstico de la deficiencia de G6PD

La deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se detecta por diferentes métodos basados en distintos procedimientos, los cuales dependiendo de la sensibilidad y especificidad que poseen permiten hacer un diagnóstico certero de la enfermedad.

Según la OMS (2017):

Son pocas las pruebas de G6PD cualitativas para el lugar de atención que están comercializadas. En la mayoría, el umbral para detectar la actividad enzimática de la G6PD es del 30%, de modo que una actividad > 30% se considera como «G6PD normal», y una actividad < 30% como «G6PD deficitaria». Esto es importante para la administración diaria de primaquina, puesto que en las personas con una actividad de G6PD en los eritrocitos < 30% de la normal es de prever la aparición de anemia hemolítica aguda (p.8)

En palabras de Torrez y Contreras (2010) “El diagnóstico se sospecha por lo general cuando los pacientes de cierto grupos étnicos desarrollan anemia, ictericia y síntomas de hemólisis después de los efectos de cualquiera de las causas anteriormente mencionadas, sobre todo cuando existe una historia familia positiva”. (p.49)

Los hallazgos hematológicos y clínicos con los cuales se sospecha de deficiencia de G6PD se deberá confirmar mediante dosificación de la actividad enzimática de G6PD en eritrocitos, objetivándose carencia de la enzima. Dicha dosificación no debe realizarse durante crisis hemolíticas (durante periodos de presencia sangre muy rica en reticulocitos), porque los eritrocitos viejos se han hemolizado y sólo quedan eritrocitos nuevos funcionales, o también durante transfusiones de eritrocitos, por la presencia de eritrocitos exógenos funcionales; ya que estas situaciones pueden conducir a falsos negativos. En células rojas normales el rango de actividad de G6PD, medida a 30°C es de 7 a 10 UI/ gr Hemoglobina. En hombres deficientes de G6PD (o mujeres homocigotas) el nivel basal (*steady state*) de G6PD es, por definición, menos del 50% de lo normal aunque en la mayoría de las variantes es menos del 20% y en algunas prácticamente indetectable. En mujeres heterocigotas, el nivel es intermedio o extremadamente variable por lo que el diagnóstico puede ser difícil, en estos casos se recomienda el estudio de la familia completa o análisis de ADN. Los recién nacidos pueden someterse a tamización para ciertas alteraciones hematológicas, metabólicas y hormonales. La mayoría de los defectos de nacimiento identificados mediante tamización neonatal no tiene efectos visibles inmediatos en los bebés, pero, a menos que se detecten y traten tempranamente, pueden causar muerte o discapacidad física, intelectual, visual o auditiva. Las condiciones comunes que pueden considerarse para tamización en los países de medianos y bajos ingresos, incluyen hipotiroidismo congénito, enfermedad de células falciformes, deficiencia de G6PD, fenilcetonuria y galactosemia. (Alatorre et.al, 2017)

5.2.5.1 Análisis de los glóbulos rojos.

El glóbulo rojo constituye un papel fundamental en el momento de diagnóstico, dado que este está relacionado activamente con la falla de la enzima. En el período precedente al reconocimiento de la deficiencia enzimática de G6PD como mecanismo subyacente de la hemólisis inducida por primaquina, algunos ensayos cualitativos como la observación de los cuerpos de Heinz y la estabilidad del glutatión, ayudaron a entender la fisiopatología y orientar el diagnóstico de la enfermedad. El siguiente avance en el diagnóstico de la enfermedad lo constituyó el desarrollo de métodos semi-cuantitativos que permitieron determinar la actividad de G6PD siguiendo la reducción de NADP a NADPH; dentro de éstos se incluye el método de la mancha fluorescente y el método de la decoloración. Ambos métodos son sencillos, rápidos, sensibles y económicos; de tal forma que se utilizan

frecuentemente en aquellos países en donde esta enfermedad presenta una alta prevalencia como aquéllos con una alta incidencia de malaria. (Gómez, 2014)

El método diagnóstico más común es el análisis de glóbulos rojos, es decir, por medio de un extendido periférico, donde los hallazgos significativos que inducen a la presencia de la enfermedad son los cuerpos de Heinz y glóbulos rojos con bocas marginales conocidos como Bite cells, otro hallazgo morfológico lo constituye la presencia de eferocitos. También se aplica el recuento sanguíneo completo y recuento de reticulocitos y en G6PD activa los cuerpos de Heinz se pueden ver en las células rojas de la sangre en una película se sangre, además se realizan pruebas a las enzimas del hígado para excluir otras causas de ictericias y se realiza el lactato deshidrogenasa debido a su elevación en la hemólisis ya que es un marcador de gravedad hemolítica; también se hace la prueba de Coombs, la cual debe ser negativa. (Torrez y Contreras, 2010)

5.2.5.2 Análisis genético

El diagnóstico de la deficiencia de la G6PD se puede realizar por análisis cuantitativo espectrofotométrico o más comúnmente por un test rápido de fluorescencia el cual detecta la generación de NADPH desde NADP. Existe también el test basado en detectar mutaciones específicas a través de PCR usado en detección poblacional, estudios de familias o diagnóstico prenatal. En la hemólisis aguda los exámenes podrían no detectar la deficiencia debido a que los eritrocitos más viejos han sido destruidos y quedan los más inmaduros y reticulocitos los cuales pueden tener una actividad enzimática normal. Las mujeres heterocigotas debido al mosaicismo del cromosoma X pueden tener deficiencia parcial y no ser detectado por exámenes de rastreo. (Verdugo, 2014)

También se puede realizar el diagnóstico por medio de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa PCR, donde se identifican las variantes debido a sus mutaciones puntuales del gen. La determinación de la frecuencia de la deficiencia permite analizar su impacto en la salud pública y descubrir los individuos en riesgo de sufrir crisis hemolíticas ante desencadenantes de la enfermedad o en mujeres en riesgo de tener hijos afectados. (Torrez y Contreras, 2010)

5.2.5.3 Técnicas para la detección de la deficiencia de G6PD

Existen diversas técnicas que permiten detectar este padecimiento, abarcan desde las más sencillas y económicas hasta las más complejas y costosas.

Se debe sospechar la deficiencia enzimática en un paciente cuando la anemia sea subclínica o severa y requiera transfusiones, el rango de Hb es variado. La anemia es por lo general normocítica y normocrómica, pero en ocasiones puede ser macrocítica debido a la cantidad de reticulocitos (hasta 20% o más) los cuales incrementan el volumen corpuscular medio. La hiperbilirrubinemia a expensas de la indirecta se presenta sin alteraciones en enzimas hepáticas, baja concentración de haptoglobina y valores incrementados de lactato Deshidrogenasa. La deficiencia de G6PD debe ser siempre considerada en el diagnóstico diferencial de la anemia hemolítica, tener presente la deficiencia de G6PD cuando se prescriba un medicamento potencialmente hemolítico. Las discrepancias sobre el valor de corte cuantitativo en los diferentes ensayos deben ser definidos en cada población y tamizaje. Utilizar al menos 2 controles normales y 3 mediciones por muestras, controles y problemas. En caso de sospecha de la enfermedad con prueba de tamizaje negativa realizar frotis de sangre periférica y conteo de reticulocitos, realizar nuevamente la prueba y realizar otras pruebas confirmatorias. Se recomienda realizar las pruebas bioquímicas cuantitativas con eritrocitos maduros separados por centrifugación en capilares de hematocrito, lavados con solución salina, hemolizados por congelación-descongelación y diluidos 1:20 como fuente directa de enzima. Es recomendable realizar el estudio molecular en los familiares directos de un paciente en el que se haya establecido genotipo. (S.A, 2016)

5.2.5.3.1 Método de Sass y Caruso.

Está basado en la estimulación de la pentosa fostafo por parte del azul de metileno, así se produce el $\text{NADPH}+\text{H}^+$ en presencia de la enzima G6PD, cuya generación produce la reducción del colorante y torna a este incoloro, en ausencia de la enzima no hay estímulo al desvío de las pentosas, no se genera poder reductor y por lo tanto, el azul de metileno no sufre reducción y conserva su color.

5.2.5.3.2 Reducción de la metahemoglobina Breweret.

Se basa en un principio similar al descrito, donde la hemoglobina color rojo de la muestra es oxidada a la mezcla de reacción, estimula el ciclo de las pentosas y en presencia de G6PD se genera NADPH+H⁺, el cual reduce la metahemoglobina a hemoglobina. Se producirá así inicialmente una variación de color rojo a café y finalmente en presencia de G6PD, este se tornara nuevamente rojo. En ausencia de la enzima el color café permanece.

5.2.5.3.3 Técnica de Cianuro-Ascorbato de Jacob y Jandl

El ascorbato de sodio que es un agente oxidante, actúa sobre la oxihemoglobina produciendo metahemoglobina y sulfohemoglobina por efecto del H₂O₂ en tanto la actividad catalasa se ve inhibida por la presencia de NaCN. En presencia de G6PD, el desvío de la pentosa es suficiente para prevenir la acumulación de metahemoglobina y sulfohemoglobina, ya que en este ciclo se genera NADPH, este mantiene al glutatión reducido y por lo tanto se ejerce su actividad peroxidasa, en ausencia de G6PD, se acumulará metahemoglobina y sulfohemoglobina y G6PD normal aparecerá un color rojo oscuro (oxihemoglobina).

5.2.5.3.4 Prueba directa de “Beutler Mancha Fluorescente.

Es una prueba rápida y económica, ya que identifica visualmente NADPH producido por la G6PD bajo la luz ultravioleta, cuando la mancha de sangre no es fluorescente, la prueba es positiva, puede ser un falso negativo en los pacientes que están activamente hemolizando, por lo tanto debe hacerse de 2-3 semanas después de un episodio hemolítico. (Torrez y Contreras, 2010).

5.2.6 Tratamiento y prevención para deficiencia de G6PD

El manejo de la deficiencia de G6PD contiene tres puntos principales: anular las causas de estrés oxidativo, dar suplemento de ácido fólico y hierro, y no practicar esplenectomía. Según (S.A, 2016) el tratamiento a seguir es el siguiente:

- ✚ Evitar ingesta de alimentos y fármacos potencialmente oxidantes.
- ✚ Iniciar fototerapia cuando los niveles de bilirrubinas no conjugadas superen 150umol/L.
- ✚ Realizar transfusión sanguínea con niveles de bilirrubina no conjugada de 300umol/L.
- ✚ Realizar transfusión sanguínea en pacientes que cursen con niveles de Hb por debajo de 7g/dl o con Hb menor de 9g/dl y evidencia de hemólisis persistente (hemoglobinuria).
- ✚ Usar ácido fólico a dosis de 1mg/día, en anemia no severa.
- ✚ Realizar hemodiálisis en pacientes con fallo renal agudo.

Ictericia neonatal: En la mayoría de los casos la fototerapia es altamente efectiva, sin embargo, cuando los niveles de bilirrubina son arriba de 300 $\mu\text{mol/L}$ (o aún menor en bebés prematuros o quienes tienen acidosis o infección) se aplica transfusión de intercambio para prevenir daño neurológico.

Anemia hemolítica aguda y favismo: Las transfusiones son útiles cuando la hemólisis es grave. La hemodiálisis puede ser necesaria si hay falla renal aguda. Para evitar daños renales en pacientes con hemoglobinuria es imperativo asegurar un buen flujo urinario.

AHNEC: En términos generales, la AHNEC debida a deficiencia de G6PD no difiere de la que es debida a otras causas (ejemplo; deficiencia de piruvato cinasa). Si la anemia no es severa se recomienda el uso de ácido fólico. Es importante evitar la exposición a drogas potencialmente hemolíticas y se indica transfusión de intercambio cuando haya infecciones recurrentes. En pocos pacientes la anemia es tan severa que deberán ser considerados dependientes de transfusión. (Alatorre et.al, 2017)

El tratamiento solo es un método que controla las manifestaciones clínica que causa la deficiencia. La mayoría de los casos los pacientes permanecen asintomáticos a menos que sean expuestos a medicamentos o alimentos que puedan causar las crisis hemolíticas, dependiendo del defecto específico presente en el gen, el tratamiento específico de la anemia por deficiencia de G6PD será determinado por el medico basándose en lo siguiente:

- ✚ Edad, estado general de salud e historia médica
- ✚ El avance de la enfermedad
- ✚ Tolerancia a determinados medicamentos, procedimientos y terapias
- ✚ Expectativas para la trayectoria de la enfermedad

La medida más importante es la prevención de los medicamentos y alimentos que producen hemólisis. Se puede prevenir la infección inducida por los ataques, en la fase aguda de la hemólisis, las transfusiones de sangre podrían ser necesarias e incluso algunos pacientes pueden beneficiarse de la eliminación de la esplenectomía del bazo, ya que es un importante sitio de destrucción de glóbulos rojos. (Torrez y Contreras, 2010)

VI. PREGUNTAS DIRECTRICES

¿Cuáles son las principales características demográficas de los individuos en estudio?

¿Cómo se evalúa la funcionabilidad del método Sass y Caruso para la detección de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa?

¿De qué manera se aplica el método Sass y Caruso para la detección de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en los individuos donante?

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

Toda investigación se basa en un diseño metodológico, el cual describe de manera precisa y detallada como se llevó a cabo la investigación, establece los pasos a seguir para generar la información requerida. Hernández, et. al (2006) expresan que “El diseño constituirá el plan o la estrategia que se desarrolla para obtener la información que se requiere en una investigación, este incluye procedimientos y actividades tendientes a encontrar la respuesta”. (p. 158).

7.1 Tipo de investigación.

De acuerdo al tema establecido y a los objetivos formulados la investigación es **analítica**, ya que posee las pautas para el desarrollo investigativo, pues se pretende determinar un número de afectados de cierta población, estableciendo la frecuencia de deficientes de G6PD, este tipo de investigación nos permite una visión dinámica del proceso el cual es entendido como la descomposición de un fenómeno en sus elementos constitutivos.

. Barrantes (2008), explica que:

Este análisis se va a considerar como proceso con cierto grado de sistematización, que está implícito en las actuaciones del investigador. En este sentido, resulta difícil hablar de una estrategia o procedimiento general de análisis de datos, pero pueden señalarse tres tareas fundamentales: reducción de datos, disposición y transformación de datos y obtención y verificación de datos. (p. 169)

7.2 Tipo de estudio.

El tipo de estudio es **cuasi-experimental** ya que la investigación se realizó en base a los donantes voluntarios que fueron captados en el primer semestre del 2018, donde los participantes del estudio son de carácter intencionado, debido a que fueron seleccionados y proporcionados por el Banco de Sangre, para Segura (2003):

Los diseños cuasi-experimentales son una derivación de los estudios experimentales, en los cuales la asignación de los pacientes no es aleatoria aunque el factor de exposición es manipulado por el investigador, es particularmente útil para estudiar problemas en los cuales no se puede tener control absoluto de las situaciones, pero se pretende tener el mayor control posible, aun cuando se estén usando grupos ya formados, es decir, se utiliza cuando no es posible realizar la selección aleatoria de los sujetos participantes en dichos estudios. Por ello, una característica de los cuasi-experimentos es el incluir "grupos intactos", es decir, grupos ya constituidos (¶. 3)

El estudio es de corte **transversal**, ya que se efectuó en un lapso establecido, el cual comprendió seis meses, Barrantes (2008) expresa que estos “estudios también son denominados sincrónicos y estudian aspectos de desarrollo de los sujetos en un momento dado”. (P. 64)

Además es de carácter **prospectivo** dado que no se conoce de la existencia de casos positivos para la deficiencia de G6PD, puesto que no se emplea ningún método diagnóstico en el país; permitiendo de esta manera determinar la presencia de deficientes en Nicaragua a través de la prueba establecida en este estudio, en palabras de Osman (s.f) “se describe el período de recogida de los datos de exposición con respecto a la fecha actual”. (p6)

7.3 Método.

La presente investigación se desarrolló bajo el método **deductivo**, este método se seleccionó debido a que las conclusiones son una consecuencia necesaria de las premisas: cuando las premisas resultan verdaderas y el razonamiento deductivo tiene validez, no hay forma de que la conclusión no sea verdadera. Méndez (2009), menciona que:

El conocimiento deductivo permite que las verdaderas particulares contenidas en las verdaderas universales se vuelvan explícitas. Esto es, que a partir de situaciones generales se lleguen a identificar explicaciones particulares contenidas explícitamente en la situación general. Así, de la teoría general a cerca de un fenómeno o situación, se aplican hechos o situaciones particulares. (p. 240)

7.4 Técnicas e instrumentos.

Para efectuar el desarrollo del protocolo es ineludible indagar y obtener información para satisfacer el propósito del estudio, por tal razón, es esencial utilizar técnicas e instrumentos que contribuyen a identificar, detallar, analizar y explicar la evaluación de la prueba de escrutinio de la deficiencia de G6PD. Las técnicas de investigación que se emplearon fueron la ficha de recolección de datos y el análisis documental, ya que permitirán obtener la información requerida para el desarrollo de la investigación.

El **análisis documental** se realizó con el fin de reunir información que respalde la investigación mediante la búsqueda de varios documentos relacionados al tema en cuestión. Barrantes (2008) plantea que “El análisis documental es una técnica para estudiar la comunicación objetiva, sistemática y cuantitativa. Con este análisis puede hacerse inferencias

válidas y confiables de datos dentro de un contexto. Los procesos de comunicación están inmersos dentro de diversos contextos”. (p. 199)

La **ficha de recolección de datos** se utilizó para reunir los resultados obtenidos de los exámenes de cada paciente y sus datos personales, a partir del informe recolectado por el Banco de Sangre de Nicaragua, por lo que será aplicada a los donantes voluntarios que asistieron a esta misma institución (Ver anexo N°1), Mérida (2003) explica que “las fichas son los instrumentos que permiten el registro e identificación de las fuentes de información, así como el acopio de datos o evidencias” (¶.5).

7.5 El universo o la población.

En esta investigación el universo o población está comprendido por los donantes voluntarios captados por el Banco de Sangre de Nicaragua, que asistieron en el período del primer semestre del 2018, en palabras de Hernández et. al (2006) “La población es el conjunto de todos los pasos que concuerdan con una serie de especificaciones”. (p. 238)

7.6 Muestra

La muestra está comprendida por 1000 donantes voluntarios facilitados por el Banco de Sangre de Nicaragua; se conoce de la fórmula estadística de selección de muestra, sin embargo no se utilizó en la presente investigación dado que la muestra fue intencionada y facilitada estrictamente por la institución antes mencionada, para Fernández y Díaz (2001), “La muestra es el conjunto menor de individuos, subconjunto de la población accesible y limitado sobre el que realizamos las mediciones o el experimento con la idea de obtener conclusiones generalizables a la población”. (¶. 6)

7.7 Criterios de inclusión

- ✚ Individuos nacidos en Nicaragua.
- ✚ Individuos donantes captados por el banco de sangre.
- ✚ Individuo que donó en el primer semestre del 2018.
- ✚ Muestra con un máximo de 24 horas después de extracción.
- ✚ Individuo que firmó el consentimiento informado proporcionado por el banco de sangre.

7.8 Criterios de exclusión

- ✚ Individuos nacidos en otro país que no sea Nicaragua.
- ✚ No ser donante voluntario.
- ✚ Individuos que donaron fuera del período estipulado.
- ✚ Muestras con más de 24 horas después de la extracción.
- ✚ Muestras hemolizadas.
- ✚ No haber firmado el consentimiento informado proporcionado por el banco de sangre.

7.9 Ética

Dado que no se tuvo relación directa con los partícipes del estudio, no se cuenta con un consentimiento informado del paciente, debido a que la información obtenida es a partir del formulario proporcionado por el Banco de Sangre, donde los donantes aceptan que sus muestras sean utilizadas para la realización de pruebas clínicas, que tengan repercusiones en la donación. (Ver anexo N°5)

7.10 Procedimiento de referencia

Se utilizó como referencia para la estandarización de la técnica el método de Sass y Caruso descrito por Sáenz (2014) en el libro titulado Hematología Clínica, la cual se trata de una reacción coloreada rápida y simple para uso de rutina para la investigación de escrutinio de la deficiencia de Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. (Ver Anexo N°8)

7.11 Muestras y condiciones de almacenamiento

Para el procedimiento se utilizó muestras de sangre total con anticoagulante EDTA y fueron almacenadas a 4°C por un máximo de 24 horas.

Como control positivo se utilizó un falso positivo obtenido a partir de una muestra patrón manipulada.

El control negativo fue obtenido a partir de una muestra de un individuo sano son ningún signo o síntoma de la anomalía en estudio.

7.12 Método Sass y Caruso

El azul de metileno estimula el ciclo de las pentosas para que produzca NADPH + H por acción de la G6PD. El azul de metileno se reduce (pasa a incoloro) en presencia del hidrógeno lo que permite detectar pacientes con deficiencia de G6PD, ya que en ausencia de la enzima no hay estímulo al desvío de las pentosas, no se genera poder reductor y por lo tanto, el azul de metileno no sufre reducción y conserva su color.

Procedimiento técnico

1. En un tubo de ensayo de 12x75 mm se colocan 0.4 ml de eritrocitos empacados; es recomendable realizar un lavado con solución salina.
2. Se agrega 1.25 ml de la solución de trabajo de azul de metileno y se mezcla bien, se deja a temperatura ambiente por 30 minutos.
3. Después de los 30 minutos de la incubación se agita bien nuevamente y se centrifuga a 2000 RPM durante 5 minutos.
4. Realizar lectura de los resultados

Interpretación

Positivo: presencia sobrenadante azul

Negativo: presencia de sobrenadante incoloro

7.13 MATRIZ DE INVESTIGACIÓN

| Tema | Problema | Objetivos | Preguntas directrices/Hipótesis | Esquema de marco teórico | Instrumentos | Fuente de información |
|--|--|--|---|---|--|---|
| <p>Frecuencia de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenas a través de la evaluación del método Sass y Caruso en donantes voluntarios que fueron captados por el banco de sangre de Nicaragua en el primer semestre del 2018</p> | <p>¿Cuál es la frecuencia de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa a través de la evaluación del método Sass y Caruso en donantes voluntarios que fueron captados por el banco de sangre de Nicaragua en el primer semestre del 2018?</p> | <p>1-Describir las principales características demográficas de los individuos en estudio. 2-Evaluar la funcionabilidad del método Sass y Caruso para la detección de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. 3-Aplicar el método Sass y Caruso para la detección de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en los individuos donantes.</p> | <p>¿Cuáles son las principales características demográficas de los individuos en estudio? ¿Cómo se evalúa la funcionabilidad del método Sass y Caruso para la detección de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa? ¿Cómo se detecta la deficiencia de G6PD por medio de la prueba de tamizaje en los individuos donantes?</p> | <ul style="list-style-type: none"> • Enzima Glucosa 6 fosfato deshidrogenas • Generalidades de la deficiencia de G6PD. • Manifestaciones clínicas. • Métodos de Diagnóstico | <p>Análisis documental Ficha de recolección de datos</p> | <p>Libros Artículos Hojas de registro de donantes</p> |

7.14 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

| Variables | Sub-variables | Definición conceptual | Definición operacional | Indicadores | Criterio |
|------------------------------|---------------|--|---|------------------------|--|
| Demografía | Sexo | Condición orgánica que distingue a los hombres de las mujeres | Características que permitirán realizar el diagnóstico de la patología | Femenino | Si No |
| | Edad | Tiempo que ha vivido un individuo desde su nacimiento | | Rangos de edad | |
| | Procedencia | Lugar de donde procede alguien | | Municipios | |
| Método de Diagnóstico | Saz y Caruso | Técnica basada en la estimulación de la pentosa fostafo por medio del azul del metileno, con producción de NADPH | Técnica basada en el cambio de color del azul metileno en presencia de la enzima G6PD | Positivos Negativos | Sobrenadante azul Sobrenadante incoloro |

VIII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La presente investigación consta con una base de datos que respalda los resultados obtenidos, en este punto se presentan los porcentajes de cada carácter a resaltarse en dicha investigación y el proceso de evaluación de la funcionabilidad del reactivo. Se analizaron 1,000 muestras de individuos donantes de carácter intencional, sin preferencia de sexo y edad, sin embargo se seleccionaron las muestras más frescas.

8.1 Principales características demográficas de los individuos participantes del estudio.

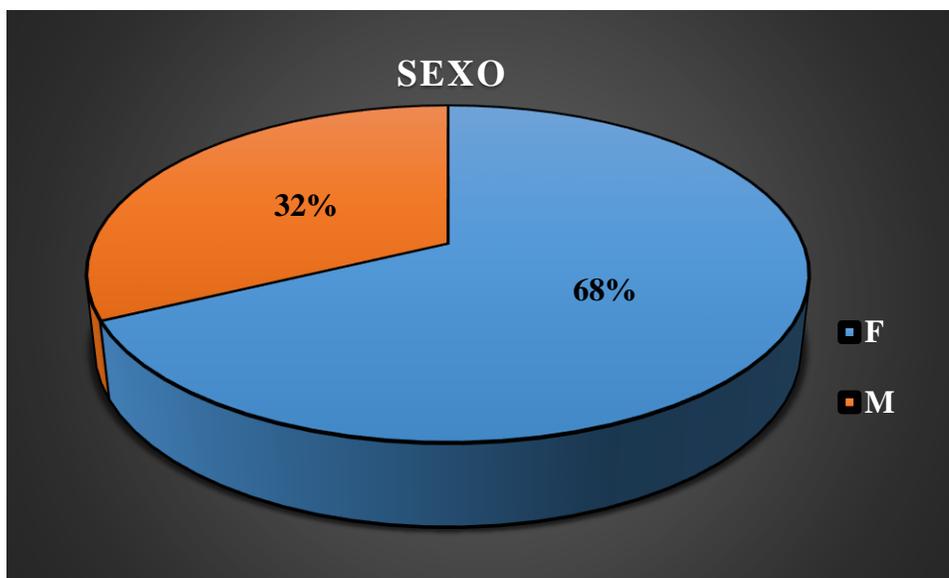
Se contemplan las características demográficas (sexo, edad y procedencia) de los individuos que conforman el estudio, el cual es de 1000 donantes voluntarios, se explica cada uno a través de los resultados obtenidos por cada parámetro antes mencionado, resaltando los datos que tuvieron mayor predominio.

Se procesaron un total de 1,000 muestras de donantes voluntarios captados por el banco de sangre de Nicaragua, los cuales fueron elegidos de forma intencionada por parte de los miembros de la institución antes mencionada la que nos facilitó las muestras para el estudio, por lo que se presentan características de acuerdo a la asistencia y captación de dicha institución, sin embargo se seleccionaron los caracteres que se cree son de mayor impacto para con la investigación, el único aspecto de preferencia que tuvo el estudio fue con las muestras, buscando las que tuvieran una hora de extracción menor de 24hrs por razones de viabilidad de la enzima en cuestión, para así lograr tener un resultado más confiable.

8.1.1 Sexo

Del total de 1,000 muestras procesadas el 67.8% resultó ser del sexo femenino y el 32.2% del sexo masculino; en números reales fueron 678 mujeres y 322 hombres. (Ver gráfico N°1) Lo que quiere decir que las mujeres donan con mucha más frecuencia que los hombres. La diferencia entre sexos es bastante notoria, esto en parte lo podemos atribuir a que en la población en general de país hay más mujeres que hombres y que por naturaleza las mujeres asisten más a la donación voluntaria por instinto humanista.

Gráfico N° 1: Principales características demográficas de los individuos partícipes del estudio. Distribución por sexo de los donantes.



Fuente: Tabla 2. Elaborado por autoras monográficas

8.1.2 Edad

De las 1,000 muestras procesadas comprendían las edades entre 16 y 60 años, esto regido por el formato de aceptación de donantes voluntarios del Banco Nacional de Sangre, donde uno de sus criterios de inclusión es que el donante este entre este rango de edad. Se encontró que los jóvenes son potencialmente más activos a la donación, dado que más del 50% está entre las edades de 18 y 30 años, la edad con más frecuencia es la de 19 años con un 11.9% del total de donantes, esto equivalente a 119 individuos de ambos sexo, en segundo lugar está la edad de 18 y 20 con un 10.8%, que corresponde a un total de 108 donantes para cada uno, la edad mínima de 16 años tuvo un porcentaje de 0.5% equivalente a 5 individuos, la edad de 17 tuvo un 4.2% es decir, 42 individuos, la edad de 21 tiene un 8.2%, equivalentes a 82 personas, la edad de 22 años un 6.5% igual a 65 donantes, 23 años con llego al 6.1% o sea 61 donantes, 24 años obtuvo 4.5% es decir 45 donantes, la edad de 25 años tiene un 3.1% correspondiente a 31 personas, la edad de 26 años tiene un 2.9% es decir 29 personas, las edades de 27, 28 y 29 años tienen porcentajes similares, obtuvieron porcentajes de 2.2, 2.3, y 2.8% respectivamente, siendo en números reales 22, 23 y 28 individuos cada uno, la edad

de 30 años fue otra que tuvo un índice de incidencia alto, con un 7% equivalente a 70 donantes, 31 y 32 años tienen porcentajes de 0.9% y 0.8% para cada uno, es decir 8 y 9 individuos., la edad de 33 obtuvo un 0.5% o sea 5 personas, las edades de 34 y 35 años tienen 0.9% cada uno, 9 donantes por cada edad. Las edades de 36 37 años, tienen porcentajes de 1 y 1.1% cada respectivamente, es decir 10 y 11 donantes. Las edades con menor frecuencia son las que se encuentran en el rango de 38 a 60 años, donde todas las edades tienen incidencia baja, las edades de 38, 42, 45, 51 y 53 tienen un porcentaje igual, todas las edades tienen un porcentaje de 0.4% cada uno, es decir, 4 donantes para cada edad. Las edades de 46 y 50 tienen valores iguales, de 0.5%, es decir 5 individuos por edad. De igual manera las edades de 39, 40, 44 y 54 años tienen el mismo rango de incidencia, de 0.6% por edad, o sea 6 donantes respectivamente. Las edades de 48, 55 y 58 tienen un porcentaje de 0.7%, lo equivalente a 7 donantes por cada edad. La edad de 41, 56 y 59 obtuvieron 0.2% lo que es igual a 2 donantes por edad. Las edades de 43, 52 y 60 tienen una incidencia de 0.3% es decir 3 donantes por edad. Y por último la edad de 47 que abarco un 0.8% del total muestreado y esto equivale a 8 donantes demostrándose que ha mayor edad es menor la incidencia de donaciones. Además se observa que la edad de 16 por ser la del límite inferior también cuenta con una baja incidencia, esto puede deberse a las limitaciones de peso, permiso de los padres o tutores en caso de no tener cedula, y falta de información. Un dato a destacar es que no hubo ningún donante con la edad de 57 años en el muestreo. (Ver gráfico 2)

Grafico N° 2: Principales características demográficas de los individuos partícipes del estudio. Distribución en porcentaje de las edades de los donantes.



Fuente: Tabla 2. Elaborado por autoras monográficas

8.1.3 Procedencia

En el banco de sangre se procesan muestras de casi todo el país, para este estudio sin embargo se seleccionaron mayormente muestras de Managua, o tomadas en Managua, debido a que las muestras procesadas debían estar lo más frescas posibles para poder ser procesadas sin interferencia en los resultados, dado que al tener más tiempo transcurrido desde su extracción tienen mayor probabilidad de provocar un falso positivo. A pesar de este limitante se procesaron muestras de diferentes departamentos, gracias a la migración de los pueblos a la ciudad y a casos especiales de ciertos departamentos procesados en la cede de Managua. Debido a esta preferencia de muestras, el 49.7% del total de los muestreados es originario de la ciudad de Managua correspondiente a 497 individuos exactamente, seguido de las Ciudades de León y Chinandega puesto que no cuentan con una cede y el total de sus donantes es procesado en la cede de Managua, estas abarcan un 10.9% y 8.4% respectivamente, es decir, 109 de León y 84 de Chinandega. Las demás ciudades que lograron entrar en el estudio son Costa Caribe 7.5%, Chontales 3.5%, Estelí 3.4%, Matagalpa 3.3%, Carazo 3.1%, Granada 2.9%, Rivas 2.3%, Rio San Juan 1.9%, Masaya 1.5%, Nueva Segovia

1.2% y Boaco 0.4%, esto en orden descendente de acuerdo al grado de incidencia, con números reales de 75, 35, 34, 33, 31, 29, 23, 19, 15, 12 y 4 individuos respectivamente.

Grafico N°3: Principales características demográficas de los individuos partícipes del estudio. Procedencia en porcentaje de los donantes.



Fuente: Tabla 2. Elaborado por autoras monográficas

8.2 Evaluación de la funcionabilidad del método Sass y Caruso para la detección de la deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa en individuos donantes.

En este capítulo se presenta de manera detallada el proceso de preparación de los reactivos y múltiples ensayos realizados para su control y verificación de uso del método de Sass y Caruso.

8.2.1 Preparación del reactivo, método de Sass y Caruso

Se trata de una reacción coloreada, rápida y simple para el uso de rutina en la investigación de G6PD basada en la reducción del azul de metileno por activación del ciclo de las pentosas.

Reactivos:

| Reactivos | Cantidad |
|--|--|
| NaHPO ₄ 0.066M | 9,46 g/l para 500ml de agua destilada |
| K ₂ HPO ₄ 0.066M | 9,08 g/d para 500ml de agua destilada |
| Glucosa anhidra | 1 gramo para 500ml del tampón de fosfato |
| NaCl | 4,25 gramos para 500ml del tampón de fosfato |
| Azul de metileno (0.3%) | 0,3 gramos para 100ml de agua destilada |

Procedimiento:

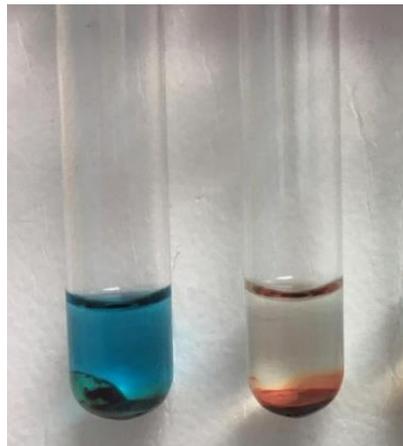
1. A 500 ml de solución de NaHPO₄ agregar solución de K₂HPO₄ hasta obtener un pH de 7.4, formando un tampón de fosfatos.
2. A la solución anterior agregar glucosa y NaCl en polvo, formando una solución salina-glucosa-tampón de fosfato.
3. Para crear la solución de trabajo final agregar a la solución anterior 1,5 ml de azul de metileno previamente diluido (0.3 gramos azul de metileno en 100 ml de agua destilada).
4. Es estable por varios meses refrigerado a 4°C

8.2.2 Funcionabilidad del reactivo

Para comprobar que el reactivo funciona correctamente se debe someter a una prueba con controles, positivos y negativos. Ya que se pretende descubrir la presencia o ausencia de una enzima eritrocitaria es necesario usar paquete globular, por lo tanto las muestras que se requieren deben ser tomadas con anticoagulante EDTA. Dado que no se cuenta con un individuo positivo para la deficiencia que se pueda usar como control positivo, se procedió al uso de un falso positivo y un negativo real como controles. El control positivo se construyó con muestra de un individuo cualquiera, disminuyendo la concentración de glóbulos rojos,

con una dilución de 1/8 con un volumen final de 400ul, en este punto por ser una menor concentración de muestra y por ende menos concentración de enzima presente en dicha muestra se logra obtener un resultado positivo, que funciona como un control positivo. Para el control negativo se usó paquete globular de un individuo cualquiera verdaderamente negativo el cual nunca ha presentado ningún tipo de anemia hemolítica o registros de manifestaciones clínicas asociados a esta deficiencia, en caso de este control solo es funcional durante 24hrs, después de pasado dicho tiempo deja de dar resultados certeros que puedan evaluar la funcionabilidad de la solución de trabajo preparada.

Figura 1: Control positivo/ control negativo. El control positivo se identifica por medio del color azul que presenta el sobrenadante y el control negativo posee un sobrenadante incoloro.



Fuente: tomada por autoras monográficas

Para la comprobación del funcionamiento de la solución de trabajo se prepararon controles positivos y negativos cada vez y fueron utilizados únicamente en ese momento, ninguno fue guardado para su uso posterior. En el caso del reactivo se comprobó su estabilidad y buen funcionamiento durante un período de ocho meses, límite en el cual el reactivo pierde su viabilidad y comienza a dar resultados falsos positivos.

8.2.3 Ensayos de prueba respecto a la muestra

Ensayo 1: Volumen de la muestra

Para conocer el volumen límite de detección de la prueba, se montaron 5 tubos con volúmenes diferentes de muestra y la misma cantidad de solución de trabajo en todas, la

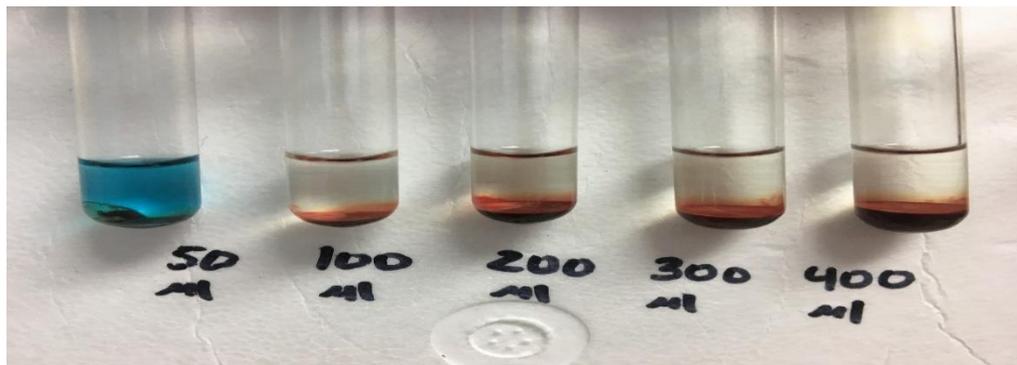
muestra usada es además recién tomada y de un verdadero negativo. El primer tubo contiene 50ul, el segundo 100ul, 200ul el tercero, 300ul el cuarto y el quinto 400ul, más 1.25ml del reactivo en todos los tubos, lo que nos permitió observar y conocer que los dos primeros volúmenes no son útiles para este método de diagnóstico, el tercer volumen es considerado el límite de muestra para uso, siendo el cuarto y quinto volumen de muestra idónea para mejores resultados.

Ensayo 2: Viabilidad de la muestra

En este punto se buscó conocer el límite de tiempo de la muestra, con el objetivo de saber si era posible usar muestras conservadas de varios días sin obtener interferencias en resultado, para saber este dato se procesaron diferentes volúmenes de muestra con diferente tiempos de obtención de la muestra. Todas las muestras usadas fueron de un individuo cualquiera verdaderamente negativo, ya que es más fácil obtener un resultado falso positivo que un falso negativo.

Ensayo 2.1: 0hrs, muestra recién tomada y centrifugada. Aquí se muestra 5 tubos con diferentes volúmenes de muestra y mismo volumen de reactivo (1.25ml), sabiendo que el tubo que contiene 50 ul de muestra debe ser positivo y el tubo que contiene 400 ul de muestra es negativo, este dato es conocido gracias al ensayo 1, en el cual se usó muestra recién tomada.

Figura 2: Ensayo 2.1 a las 0 horas

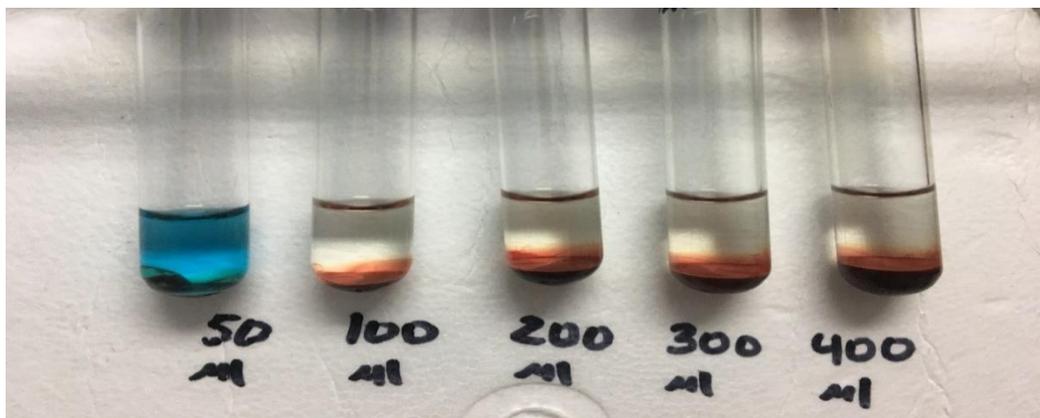


Fuente: tomada por autoras monográficas

Ensayo 2.2: 6hrs después de tomada la muestra.

Se montaron nuevamente los 5 tubos con los mismos volúmenes de muestra y reactivo que el caso anterior, con la diferencia de que en este caso la muestra lleva conservada en refrigeración 6hrs después de su toma. Aquí se nota el mismo comportamiento que el caso anterior, donde solo el primer tubo presenta positividad.

Figura 3: Ensayo 2.2 a las 6 horas.

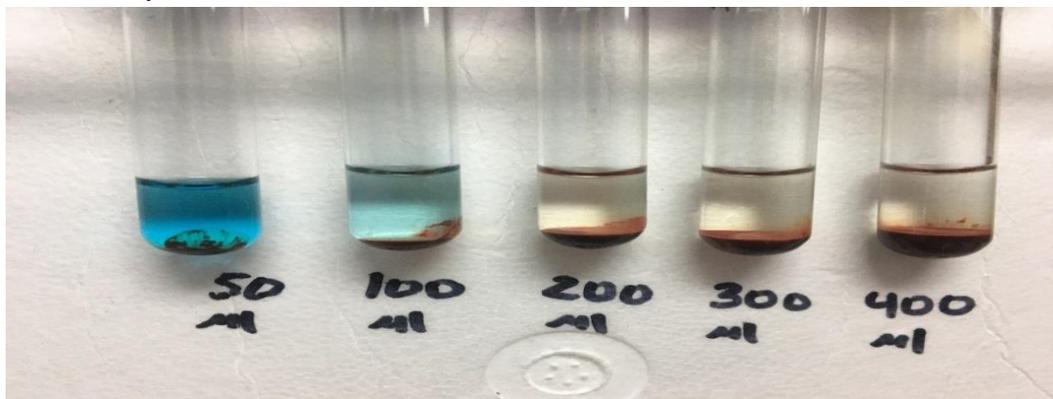


Fuente: tomada por autoras monográficas

Ensayo 2.3: 12hrs después de tomada la muestra

Se repite el caso anterior, misma cantidad de tubos, mismo volumen de muestra y mismo volumen de reactivo, sin embargo en este caso la muestra tiene 12hrs de conservación después de tomada. Notándose un ligero cambio en el tubo que contiene 100 ul de muestra, donde ya se nota un ligero color azul, indicativo de positividad.

Figura 4: Ensayo 2.3 a las 12 horas.

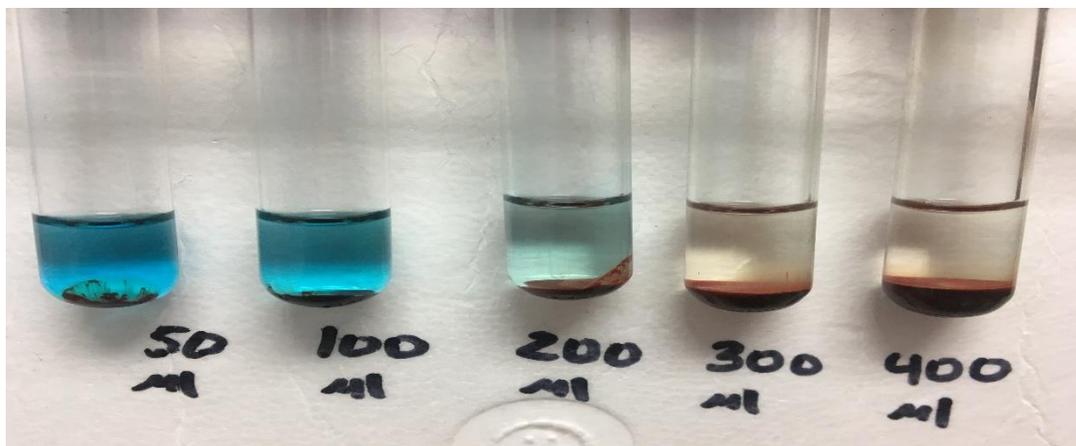


Fuente: tomada por autoras monográficas

Ensayo 2.4: 18hrs después de tomada la muestra.

Igual que los casos anteriores se montan los mismos 5 tubos, con muestra y reactivo, en este caso la muestra ya lleva 18hrs guardada en refrigeración, ya se nota positividad en el tubo número 1 y 2, los tubos restantes siguen teniendo el mismo comportamiento negativo

Figura 5: Ensayo 2.4 a las 18 horas.

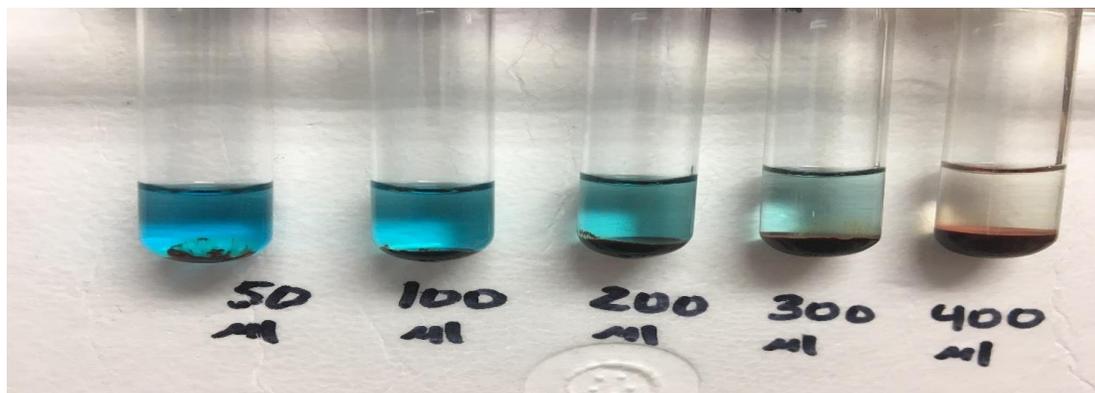


Fuente: tomada por autoras monográficas

Ensayo 2.5: 24hrs después de tomada la muestra

La muestra usada en este paso ya lleva almacenada 24hrs después de su extracción, como en los ensayos anteriores nuevamente se montan los 5 tubos con muestra y reactivo correspondiente. En este caso los tubos 1, 2 y 3 presentan positividad, aunque en comparación el tubo tres tiene un color azul bastante débil.

Figura 6: Ensayo 2.5 a las 24 horas.

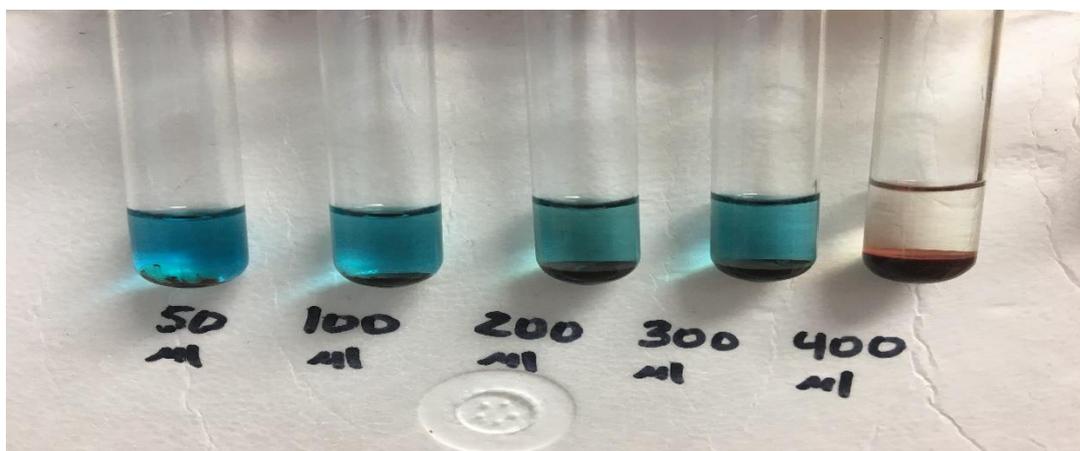


Fuente: tomada por autoras monográficas

Ensayo 2.6: 30hrs después de tomada la muestras

Nuevamente el mismo procedimiento de los 5 tubos, con su muestra y reactivo correspondiente, en este caso la muestra ya lleva 30 horas guardada, en este caso se nota ya positividad en los tubos 1, 2 y 3, en el caso del tubo 4 ya se nota un leve color azul indicativo de positividad, siendo el ultimo tubo el que se observa negativo.

Figura 7: Ensayo 2.6 a las 30 horas.

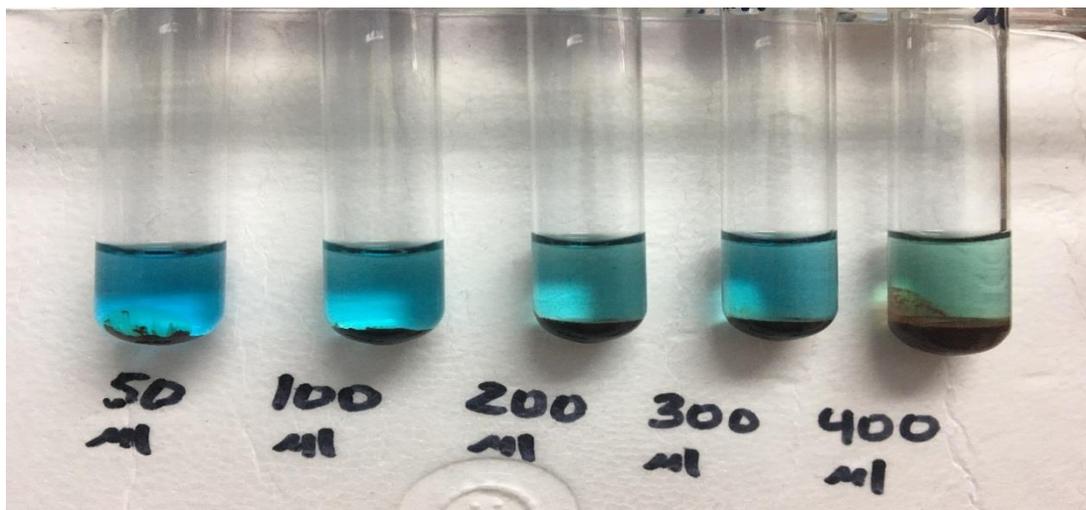


Fuente: tomada por autoras monográficas

Ensayo 2.7: 36hrs después de tomada la muestra

Igual que en los ensayos anteriores se montaron los 5 tubos con su muestra y la solución de trabajo. La muestra usada lleva 36hrs en refrigeración, en este momento ya todos los tubos presentan positividad indicada por el color azul, el tubo 5 a pesar de demostrar una ligera tonalidad azul, ya presenta indicios de positividad.

Figura 8: Ensayo 2.7 a las 36 horas.



Fuente: tomada por autoras monográficas

Como se puede notar la positividad es gradual (Ver en anexo N°2), lo que nos indica que las muestras usadas en este estudio y/o con este reactivo deben ser muestras lo más frescas posibles, estableciendo como límite máximo 24 horas después de haber sido tomada dicha muestra.

8.3 Detección de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en los individuos donantes.

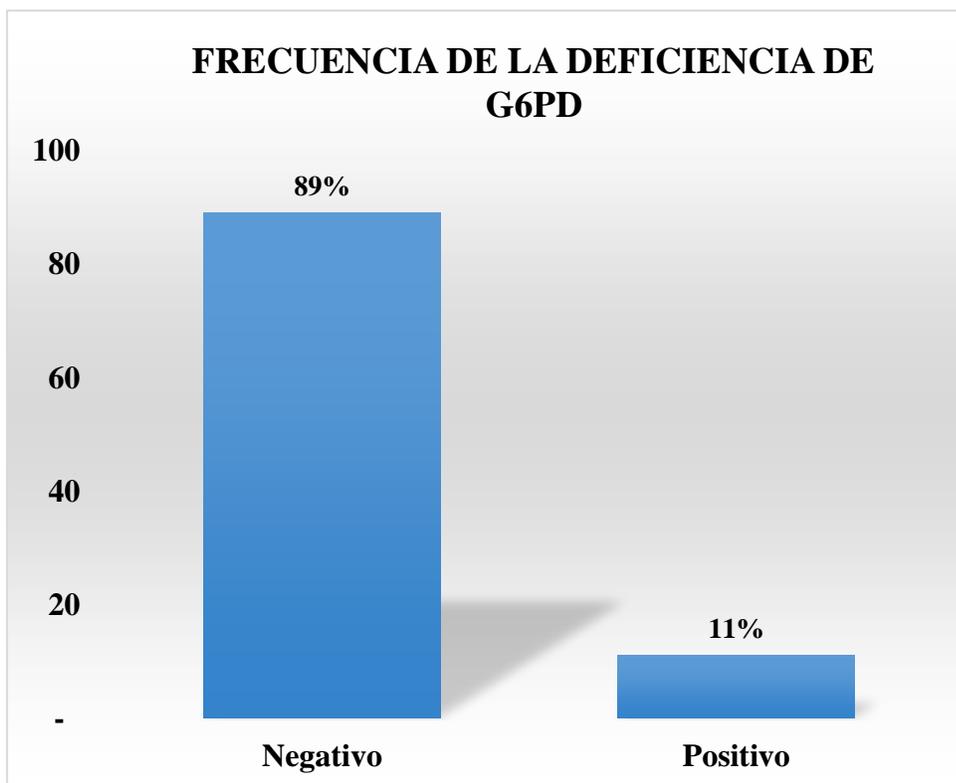
8.3.1. Positivos

Se procesaron 1,000 muestras de individuos donantes voluntarios, de estos el 11% resultó ser positivo para la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, (Ver gráfico N°4), a pesar de ser el desorden enzimático más común del mundo, se encontró una incidencia baja en comparación con resultados obtenidos en Costa Rica, donde existe una incidencia del 17.8% en la población de la ciudad de Limón. Una incidencia baja puede deberse a que la deficiencia se presenta con más frecuencia en gente de la raza negra y principalmente en hombres, dos características esenciales que no fueron criterios de inclusión en este muestro ya que se pretende conocer la frecuencia en la población en general, otra justificación de la incidencia baja es que se muestreo población relativamente sana, para ser donante de sangre

uno de los requisitos es poseer una buena salud, ninguno de los individuos que formaron parte del estudio refirieron haber tenido un episodio hemolítico en su vida, esto no quiere decir que el individuo no sea realmente deficiente, la OMS clasifica la deficiencia en 5 niveles, el nivel 3 posee una disminución enzimática considerable, pero que en condiciones normales no presenta ninguna alteración patológica, a menos que este se encuentre en un estado de estrés oxidativo y la poca concentración de enzima en su sistema no pueda controlar la demanda, este tipo de deficiencia es la que se esperaba encontrar en este tipo de individuos, para confirmar esto es necesario hacer una cuantificación enzimática por método de espectrofotometría; sin embargo los resultados obtenidos en este estudio son altos en comparación a los resultados en EE.UU, donde la mayoría de estudios realizados señalan que alrededor del 10% de la población masculina y negra padece dicha deficiencia, a pesar de este dato preferimos tomar como base los resultados obtenidos de nuestro país vecino Costa Rica puesto que debido a que la cercanía entre ambos países propicia que ambas poblaciones compartan características étnicas similares.

A pesar de que estos deficientes clínicamente no sean relevantes, es un dato que para el banco de sangre es de mucha utilidad, ya que es importante resaltar que la vida media de los glóbulos rojos de estos individuos es más baja de lo normal, esto gracias a que además de que la enzima protege el eritrocito del daño oxidativo, también por medio de su actividad metabólica produce energía que le da vida a la célula carente de núcleo, los glóbulos rojos de un individuo deficiente tienen una vida media de alrededor de 14 días. Por otro lado es necesario tomar en cuenta que este muestreo es el primero en realizarse en el país con el fin de encontrar deficientes de G6PD, por lo que la frecuencia de esta es un dato a ciegas, no se sabe a ciencia cierta el estado correcto de la cantidad de deficientes. Este estudio no es más que una idea de dicha información, la cual está siendo similar a resultados de otros países.

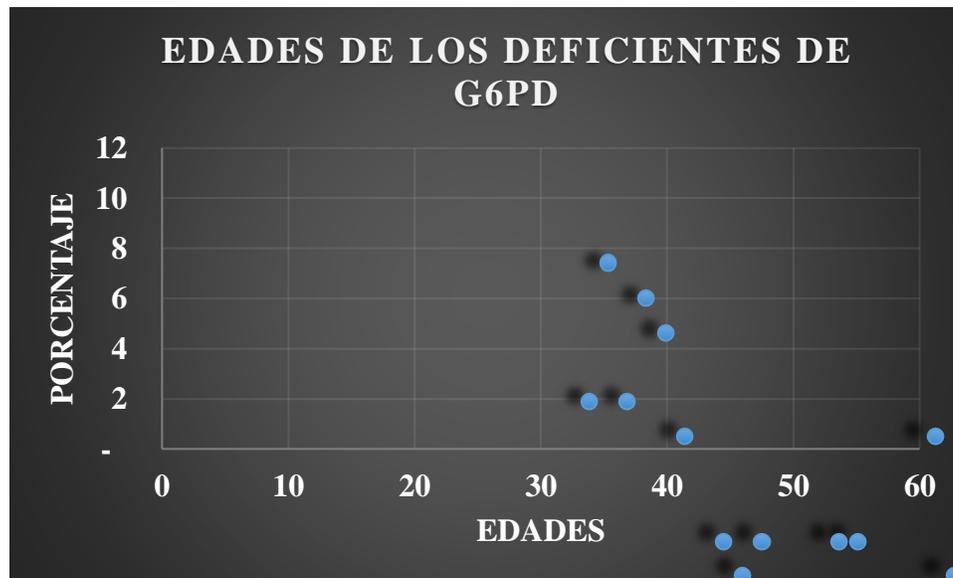
Gráfico N°4: Frecuencia de la deficiencia de G6PD en donantes voluntarios.



Fuente: Fuente: Tabla 2. Elaborado por autoras monográficas

Se muestra el porcentaje de positivos y negativos obtenidos, donde el 11% representa los positivos, el que corresponde a 110 casos positivos para la deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y el 89% son negativos, lo que es decir que 890 fueron detectados como negativos por medio del método Sass y Causo.

Gráfico N°5: Frecuencia de la deficiencia de G6PD en donantes voluntarios. Edades afectadas.



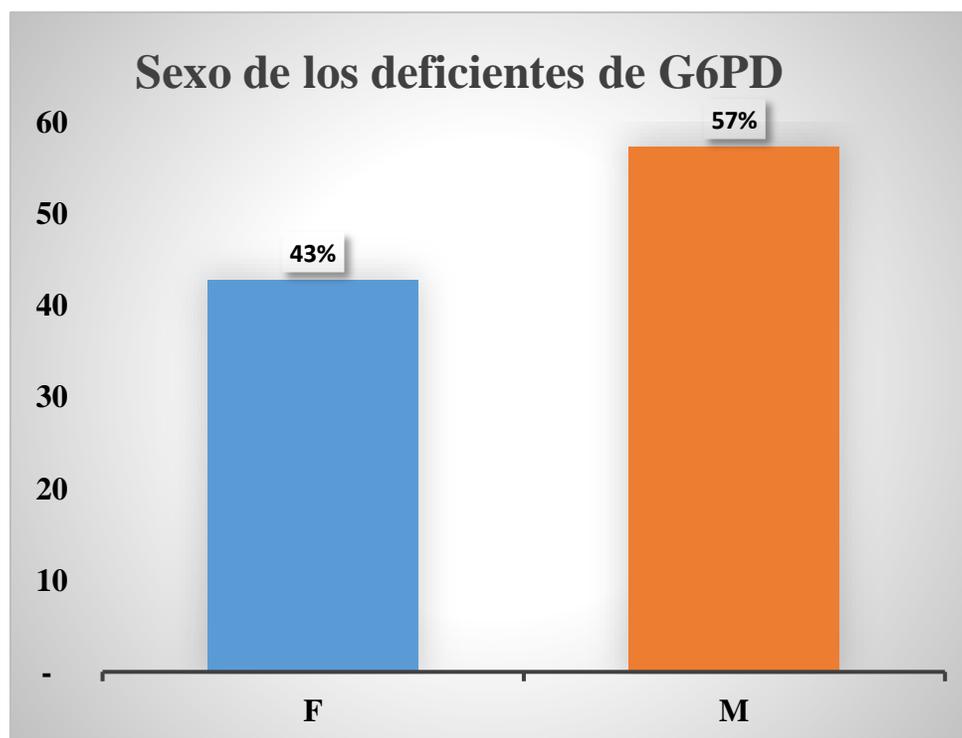
Fuente: Tabla 2. Elaborado por autoras monográficas

Del 100% de los positivos, es decir, 110 individuos, se obtuvieron los siguientes datos en base al estudio, los positivos se ubican entre los rangos de edades 17 a 56 años, donde la edad más frecuente es la de 19 años con un 11%, correspondiente a 12 individuos del total de 110 donantes deficientes, seguido de la edad de 21 años donde se encontraron 11 individuos deficientes lo que equivale al 10% del total de deficientes; en tercer lugar está la edad de 22 años, con un 9% de incidencia del total de positivos, lo que equivale a 10 individuos. La edad de 18 tiene un 7% es decir, 8 individuos, igual que la edad de 20 años. La edad de 36 posee un 6% equivalente a 7 individuos deficientes. Las edades de 25, 27, 31 y 32 años tienen una incidencia igual, del 4% lo que en números reales equivale a 4 individuos positivos por edad. Las edades de 26, 37 y 41 obtuvieron el 3% de los positivos por cada edad, es decir 3 individuos positivos por cada una de las edades. La edad de 17, 35, 38, 39 y 47 años alcanzaron el 2% de los positivos por edad, es decir 2 individuos positivos por cada una de las edades mencionadas de los positivos. Mientras que las edades de 24, 29, 30, 33, 34, 44, 45, 49, 52, 53, 54 y 56 llegaron al 1% cada una, lo que equivale a un individuo positivo de cada una de las edades; las edades que no se mencionaron y están entre el rango de 16 a 60 es porque no hubo ningún positivo en esa edad. Mientras los donantes presentaban edades más avanzadas se encontró una menor frecuencia de casos positivos para la deficiencia, esto

puede ser atribuido a que las personas de mayor edad no donan con tanta frecuencia como los jóvenes.

La edad de los individuos que resultaron ser positivos es proporcional a la edad que más donó sangre, es decir, la gran mayoría de donantes fueron individuos jóvenes por lo tanto la edad con mayor cantidad de deficientes está en ese mismo rango, lo cual podría explicar porque ninguno ha tenido un cuadro hemolítico, son personas jóvenes que a lo largo de su corta vida no han experimentado ciertos escenarios que pueden provocar la hemólisis. Aproximadamente el 55% de los positivos están en este rango de edades, lo que nos da una idea de cómo es la deficiencia en el país, mientras más gente joven padezca la deficiencia hay muchas más probabilidades de que a futuro la frecuencia aumente en nuestra población.

Gráfico N°6: Frecuencia de la deficiencia de G6PD en donantes voluntarios. Sexo en porcentaje de los deficientes afectados.



Fuente: Tabla 2. Elaborado por autoras monográficas

Se presentaron un total de 110 casos positivos, para la deficiencia de G6PD, lo que equivale al 100%, de este el 57% corresponde al sexo masculino y el 43% es femenino, equivalente a 63 y 47 individuos respectivamente.

La deficiencia de G6PD se caracteriza por ser ligada al sexo, afecta principalmente a hombres, dado que su causa es debida a un defecto en el cromosoma X, con este dato se esperaba encontrar una alta incidencia de deficientes del sexo masculino y bastante significativo en comparación con el sexo femenino, a pesar de eso, los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la diferencia entre ambos géneros no era tan amplia y notoria, obteniendo porcentajes bastantes similares, el sexo masculino obtuvo la mayor cantidad de afectados (Ver gráfico N° 6), a pesar de que el sexo masculino sigue estando a la cabeza, se esperaba encontrar una baja incidencia en el caso de los positivos femeninos, por debajo del 20% como se demuestra en estudios parecidos realizados en otros países. Sin embargo, hay una explicación lógica para esto, en este caso no se seleccionaron cantidades exactamente iguales para ambos sexos.

Aquí fueron muestras al azar sin distinción de sexo y dada la situación actual del país, donde por razones de predisposición genética hay más población femenina y el hecho de que durante la guerra la población masculina disminuyó en gran cantidad y hasta la fecha no se ha podido recuperar, la población nicaragüense en general cuenta con más mujeres que hombres, por lo que el muestreo fue encabezado por las mujeres, teniendo así resultados positivo mayores de los que se esperaban para este género.

De haber tenido poblaciones iguales en cuanto al sexo se hubiese podido demostrar que los resultados del país son iguales a los descritos por diferentes literaturas, esto lo podemos comprobar a través de cálculos matemáticos que permiten predecir resultados a futuro.

8.3.4 Procedencias.

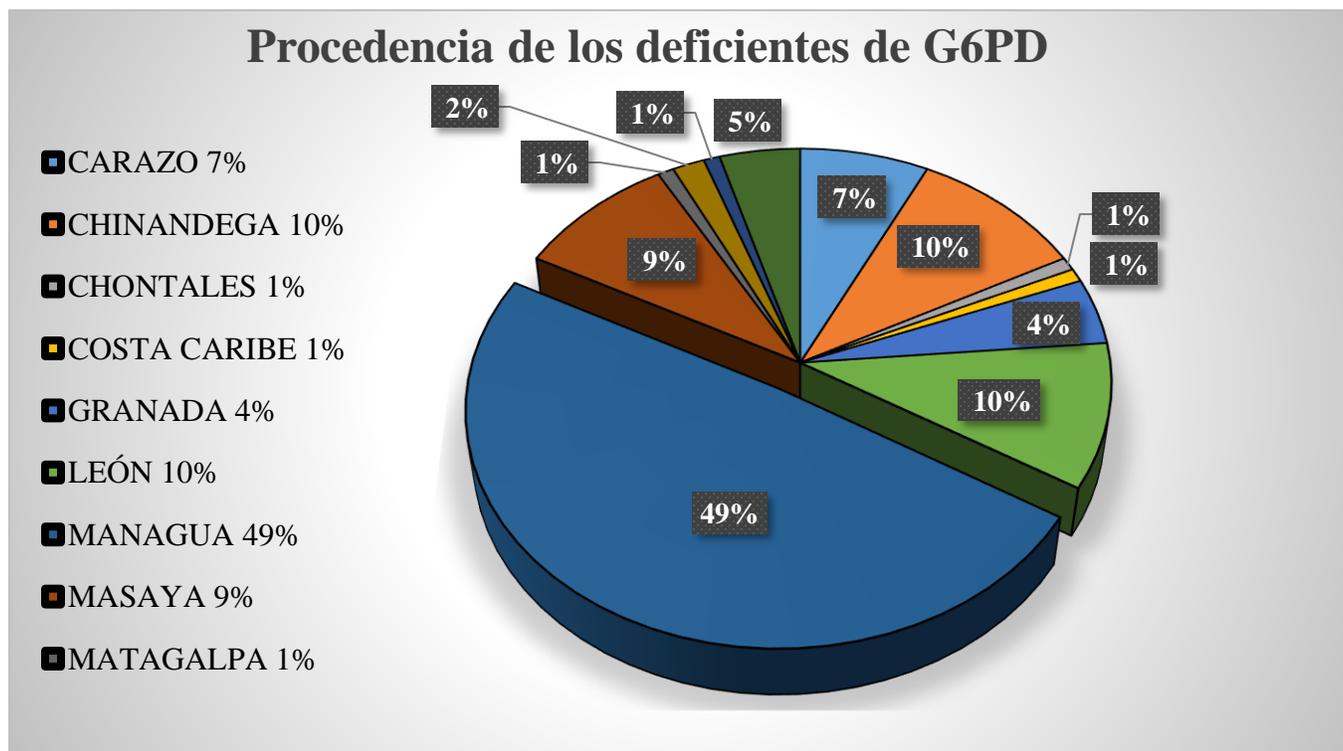
La mayor parte de individuos positivos son originarios de la ciudad antes mencionada, un dato curioso es que el primer individuo positivo resulto ser un joven de sexo masculino y originario de la ciudad de Managua. Sin embargo se encontraron positivos relativos de los demás departamentos, es decir, que los resultados obtenidos no favorecen ninguna zona en específico, aunque por genética se conoce que la raza negra es la más afectada y se sabe bien

que en el país la raza negra comúnmente habita en la zona de la región caribe, no obstante este estudio no se enfocaba en eso, sino en conocer un aproximado de deficientes en la población en general, sin distinguir entre raza, género y edad.

Los datos obtenidos de procedencia de los positivos, van de la mano con la cantidad de individuos muestreados en esas procedencias. Los resultados son relativos, lo que probablemente indique una frecuencia a nivel nacional en un rango similar sin distinción de lugar y edad, exceptuando la raza negra, donde se espera encontrar una incidencia mayor.

Sin embargo es importante señalar que actualmente se sabe bien que la raza negra ha tenido un desplazamiento amplio a diferentes partes del país, principalmente a la Ciudad de Mangua, lo que no excluye que individuos originarios de dicha ciudad o cualquiera de las demás ciudades sean de la raza negra.

Grafico N°7: Frecuencia de la deficiencia de G6PD en donantes voluntarios. Procedencia en porciento de los individuos deficientes.



Fuente: Tabla 2. Elaborado por autoras monográficas

La procedencia más afectada fue la del municipio de Managua con el 49 % de casos positivos para la deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, lo que equivale a 54 individuos, los municipios de Chinandega y León fueron los que tuvieron mayor incidencia de casos positivos después de Managua, ambos con un 10%, es decir 11 individuos deficientes por cada región; la ciudad de Masaya obtuvo una incidencia de 9% lo que equivale a 10 individuos positivos de este lugar; Carazo obtuvo 8 individuos positivos, es decir el 7% del total, Granada y Rivas tienen valores iguales, un 5% de incidencia, es decir 5 individuos por cada ciudad. Nueva Segovia llegó al 2%, en números reales es igual a dos individuos; Las ciudades de Chontales, Costa Caribe, Matagalpa y Río San Juan obtuvieron la incidencia menor, de 1% es decir, un individuo por cada Ciudad.

IX. CONCLUSIONES

La deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa es un desorden enzimático muy común, que afecta gran parte de la población, con este estudio se demuestra que en Nicaragua si existen pacientes con esta patología, ya que los resultados obtenidos mediante la prueba implementada permite confirmar esto, revelando los siguientes datos en base a la información obtenida a partir de la muestra analizada.

- ✚ En base a las características demográficas se encontró que sexo con mayor frecuencia en la donación es el sexo femenino con un 68% quedándose atrás el sexo masculino con un 32%, sin embargo de acuerdo a esta variable el sexo más afectado fue el masculino con un 57%, por otra parte la edad joven es quien dona más, llevándose más del 50% las edades entre 18 y 30 años. De igual manera la mayoría de los donantes fueron originarios de la ciudad de Managua pero esto se debe a que el estudio fue realizado en esta ciudad.
- ✚ El método Sass y Caruso es eficiente para realizar estudios o diagnóstico de deficiencia de G6PD, sin embargo cuenta con ciertas limitantes como es el uso cantidades específicas de muestra y el tiempo de obtención, demostrando que una muestra con más de 24hrs después de su extracción no es útil para la realización del método pues da un resultado falso positivo, basado en los experimentos realizados.
- ✚ Según el estudio en el país si se encuentran casos positivos para la deficiencia de G6PD, encontrando un 11% afectado de la población total, siendo este de 1,000 individuos donantes, es decir que equivale a 110 donantes que padecen dicha deficiencia.

X. RECOMENDACIONES

- ✚ A la **población** de ambos sexos y todas las edades realizarse la prueba de tamizaje para deficiencia de G6PD, debió a que se encontró una razonable cantidad de casos positivos para esta deficiencia, de esta manera podrán ser diagnosticados evitado que sufran crisis hemolíticas.

- ✚ Al **MINSA**, incluir el método Sass y Caruso como prueba de detección y diagnóstico de la deficiencia de G6PD, teniendo en cuenta la viabilidad de las muestras; además promover a la población que se realicen esta prueba para conocer el estado actual del país sobre la cantidad de deficientes existentes.

- ✚ Al **Banco de Sangre Nacional** implementar esta prueba para el uso correcto de los componentes obtenidos a partir de donantes que presentan esta deficiencia, dado que el paquete globular de estos donantes tendrá una vida promedio de 14 días.

- ✚ Al **Departamento de Bioanálisis Clínico** promover investigaciones científicas dentro del análisis de la deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, motivando de esta manera a sus estudiantes, a realizar estudios sobre esta temática, para consolidar una línea de investigación.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Libros

Alatorre, M., González, J., López I., & Rojo W. (2017). *Deficiencia de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa*. México: Universidad de Guadalajara.

Barrantes, R. (2008). *Investigación un camino al conocimiento: Enfoque cuantitativo y cualitativo*. Costa Rica: Universidad estatal a Distancia de Sam José

Boza, S. (2016). *Fundamentos de hematología*. Costa Rica: UCR.

Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2006). *Metodología de la investigación*. México: Mexicana. 4ta Ed.

Méndez, C. (2009). *Metodología: Diseño y desarrollo del proceso de investigación con enfoque en ciencias empresariales*. México: Limuso. 4ta Ed.

Monteiro, M., Val, F., Siqueria, M., Franca, P., Sampaio, S., Melo, C., et al. (2014). *G6PD deficiencia en Latinoamérica*. Brasil: Fundación de medicina tropical.

Olivas, D. & Viñas, A. (2018). *Déficit de Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa*. Revista de medicina general integral. Cuba.

S.A. (2016). *Deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa: tamizaje, diagnóstico y tratamiento 1er, 2º y 3er nivel de atención*. México: Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud: CENETEC.

Sáenz, G. (2014). *Hematología analítica*. Costa Rica: EDNASSS. 6ta Ed.

Torrez, C. & Contreras, W. (2010). *Eritropatías: Deficiencia de Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa*. Seminario de graduación para optar al título de Bioanálisis Clínico por la UNAN – Managua. Nicaragua.

Uribe, A. (2017). *Deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa: Memorias de 22 años de tamizaje de alto riesgo*. Centro de Investigaciones en Bioquímica (CIBI) de la Universidad de los Andes, Colombia.

Webgrafía

Acosta, T. Núñez, D. & Suárez, M. (2003). *Trabajo de revisión: Anemia hemolítica por deficiencia de G6PD y estrés oxidativo*. Scielo, vol.22 (no. 3). Recuperado 09 de noviembre del 2018 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002003000300007

Bello, P. & Mohamed, L. (2015). *Déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: revisión a propósito de un caso*. Scielo, vol.17 (no.68). Recuperado el 10 de noviembre del 2018 de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322015000500014

Bonilla, F., M.D., Sánchez, M. & Chuaire, L. (2007). *Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD): Respuesta de los hematíes y otras células humanas a la disminución en su actividad*. Colombia Médica, vol.38 (no.1). Recuperado el 10 noviembre del 2018 de <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v38n1/v38n1a08.pdf>

Fernández, P. & Díaz, P. (2001). *Estadística descriptiva de los datos*: Madrid: SA. Recuperado el 22 de enero de 2018, de <https://www.fisterra.com/mbe/investiga/10descriptiva/10descriptiva.asp>

García, N., Romo, E., Lunque, F., Torrez, M. & Arámbula, E. (2014). *Panorama de la deficiencia de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en México*. Iberoamericana de ciencias, vol.1 (no.2). Recuperado el 23 de enero 2019 de <http://www.reibci.org/publicados/2014/julio/2200119.pdf>

Gómez, S., López, G., García, I., Hernández, G., Méndez, S., Marcial, J., et al. (2014). *Deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: De lo clínico a lo bioquímico*. México: UNAM. Recuperado el 29 de octubre del 2018 de <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v48n4/v48n4a03.pdf>

Mérida, C. (2009). *Técnicas y proceso de investigación*. Guatemala: USAC. Recuperado el 11 de octubre del 2018 de <https://investigar1.files.wordpress.com/2010/05/recolecccic3b3n-de-datos-2.pdf>

OMS. (2001). *Uso clínico de la sangre*. Londres: Malta. Recuperado el 12 de enero del 2019 de https://www.who.int/bloodsafety/clinical_use/en/Manual_S.pdf?ua=1

OMS. (2017). *Pruebas de detección del déficit de G6PD para un uso seguro de la primaquina en la curación radical del paludismo por P. vivax o P. ovale malaria*. Recuperado el 2 de octubre del 2019 de <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>

Osman. (s.f). *Estudio prospectivo*. Recuperado el 11 de enero del 2020 de <https://www.osman.es/diccionario/definicion.php?id=12571>

Segura, A. (2003). *Diseños cuasiexperimentales*. Antioquia: Facultad de Salud Pública. Recuperado el 3 de diciembre del 2018 de http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/renacip/disenos_cuasiexperimentales.pdf

Verdugo, P., Calvanese, M., Rodriguez, D. & Cárcamo, C.(2014). *Deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en niños: Caso clínico*. Scielo, vol.85 (no.1). Recuperado el 23 de octubre de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062014000100010

XII. ANEXOS

ANEXO N° 1

Ficha de recolección de datos aplicada en el Banco de Sangre de Nicaragua

La presente ficha de recolección de datos está enfocada en la recopilación de información de los donantes voluntarios que fueron captados por el banco de sangre de Nicaragua en primer semestre del 2018, de los cuales se tomaron 1000 para que sean partícipes del estudio realizado titulado **“Frecuencia de la deficiencia de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa a través de la estandarización del método Sass y Caruso en donantes voluntarios que fueron captados por el Banco de Sangre de Nicaragua en el primer semestre del 2018”**

Código de donante:

Fecha:

Apellidos:

Nombre:

N° de donante:

Sexo:

Edad:

Procedencia:

Dirección actual:

Teléfono:

Hora de extracción:

ANEXO N° 2

Tabla 1: Ensayos N° viabilidad de la muestra

| Tiempo de la muestra | Volumen o concentración de la muestra | | | | |
|----------------------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 50ul | 100ul | 200ul | 300ul | 400ul |
| 0hrs | + | - | - | - | - |
| 6hrs | + | - | - | - | - |
| 12hrs | + | +/- | - | - | - |
| 18hrs | + | + | +/- | - | - |
| 24hrs | + | + | + | +/- | - |
| 30hrs | + | + | + | + | - |
| 36hrs | + | + | + | + | +/- |

Fuente: Elaborado por autoras monográficas

ANEXO N° 3

Tabla N° 2: Base de datos de los donantes participes del estudio

Base de datos de los resultados obtenidos para la investigación “**Frecuencia de la deficiencia de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa a través de la estandarización del método Sass y Caruso en donantes voluntarios que fueron captados por el Banco de Sangre de Nicaragua en el primer semestre del 2018**” a partir de los informes de los donantes del Banco de Sangre.

| N° | Código | Edad | Sexo | Procedencia | Deficiencia de G6PD |
|-----------|---------------|-------------|-------------|--------------------|----------------------------|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Fuente: elaborado por autoras monográficas

ANEXO N° 4

Formato de declaración del donante brindada al mismo por la institución del Banco de Sangre de Nicaragua



Banco De Sangre
HOJA DE REGISTRO
BDS-EHR-R-001-04

IDENTIFICACION: _____ FECHA: _____

LUGAR DE COLECTA: _____

DONANTE: _____

PRIMER APELLIDO SEGUNDO APELLIDO PRIMER NOMBRE SEGUNDO NOMBRE

FECHA DE NACIMIENTO EDAD LUGAR DE NACIMIENTO PAIS SEXO

DOMICILIO/BARRIO: _____

TELEFONO OCUPACION TELEFONO DE TRABAJO

CORREO ELECTRONICO N° DE CARNET N° DE DONANTE

PRIMERA DONACION DONACION SUBSECUENTE FECHA DE LA ULTIMA DONACION

TIPO DE DONACION HORA DE LA ULTIMA COMIDA

PESO _____ P/A _____ PULSO _____ HB _____ HTO _____ BRAZO: I _____ D _____

TIPO DE BOLSA _____ TIEMPO _____ HORA DE LA EXTRACCION _____

RESPONSABLE DE LA ENTREVISTA _____ RESPONSABLE DE LA EXTRACCION _____

INCIDENCIA EN LA EXTRACCION: _____

CAUSA DEL DIFERIMIENTO: _____

PRODUCTOS FRACCIONADOS: GRE _____ PFC _____ PQT _____ CRIO _____ ST _____ AFERESIS _____

FECHA DEL ANALISIS: _____ TIPO Y RH: _____

OBSERVACIONES: _____

Fuente: Banco de sangre de Nicaragua

| FECHA: | PREGUNTAS PARA LA SELECCIÓN DEL DONANTE | SI | NO |
|---|--|----|----|
| <p>DECLARACIÓN DEL DONANTE Y SU CONSENTIMIENTO</p> <p>Yo, voluntariamente dono mi sangre a Banco De Sangre concedo autorización para utilizar la cantidad apropiada de sangre y sus derivados, utilizada tal y como el Banco De Sangre considere apropiado. La donación de sangre es segura, útil y salva vidas, cada día se necesitan más de 250 donaciones de sangre durante todo el año. Donar sangre es seguro, se utilizan insumos estériles descartables para la seguridad del donante y del paciente. En aproximadamente una hora, los donantes completan una breve ficha médica, se les hace un examen físico básico donde se mide el pulso, presión arterial y niveles de hemoglobina; se reclinan cómodamente durante la Extracción y se les da un refrigerio antes de retirarse. Los donantes aportan aproximadamente medio litro de sangre que su cuerpo recupera rápidamente. He, tenido la oportunidad de preguntar acerca de este procedimiento y entiendo lo que es y cuáles son sus riesgos también he tenido la oportunidad de rechazar que lo hagan. Entiendo que mi sangre será examinada para análisis del VIH/SIDA, hepatitis virales y otras enfermedades infecciosas. Una muestra de mi sangre o plasma puede ser usada en pruebas clínicas, los resultados de los análisis serán revelados únicamente al donante. Si estos exámenes indican que yo no podré Donar sangre, mi nombre podrá ser incluido en una lista de donantes diferidos indefinidamente. Comprendo que se hará un esfuerzo razonable para Notificarme cualquier resultado positivo en los exámenes para detectar enfermedades infecciosas. Comprendo que toda la información es confidencial, salvo en los casos en que la ley en la materia exija su divulgación. Yo, certifico que he contestado con la verdad todas las preguntas. En consideración a la comunidad, yo eximo de toda responsabilidad a esta institución, a sus miembros y empleados de cualquier reclamo o demanda que pueda tener en contra de cualquiera de ellos, en lo que refieren a esta donación y cualquier consecuencia como resultado directo o indirecto de ella. Entiendo que durante o después de la donación de sangre, ocasionalmente, pueda sufrir una reacción inesperada como un hematoma alrededor del sitio de la entrada de la aguja, perforación de una arteria, mareos y/o pérdida temporal de mi conocimiento.</p> <p>FECHA: _____</p> <p>FIRMA DEL DONANTE: _____</p> | <ol style="list-style-type: none"> 1. Se siente bien y saludable hoy? 2. En el último mes ha tomado algún medicamento? 3. Ha donado sangre los últimos cuatro meses? 4. Ha sido rechazado para donar sangre alguna vez? 5. Ha tenido problema durante o después de la donación? 6. Ha padecido o ha estado en contacto con enfermos de SIDA, Ictericia, Hepatitis, pacientes de Diálisis o ha recibido Globulina Anti-Hepatitis? 7. Ha tenido sudoración nocturna, fiebre, pérdida de peso, pretuberancias en cuello, axilas o ingles, manchas en la boca o en la piel, tos persistente o diarrea? 8. Ha tenido exámenes positivos de sangre para Hepatitis, Sida, Chagas o Sfilis. 9. Ha padecido malaria por más de una vez? 10. Ha tomado tratamiento Anti-Malaria? 11. Ha recibido o está recibiendo tratamiento para la Pioriasis? 12. En las últimas cuatro semanas ha recibido vacunas? 13. Ha estado hospitalizado bajo cuidados médicos Prolongados, tuvo enfermedad grave, cirugía o cirugía pendiente en el último año? 14. Se ha hecho tatuajes, acupuntura o se ha pinchado accidentalmente con agujas contaminadas en los últimos 12 meses? 15. Le han realizado algún tipo de endoscopia en el último año? 16. Ha sufrido convulsiones, ataques epilépticos, desmayos, mareos frecuentes? 17. Tiene frecuente malestar en el corazón, riñones o pulmones? 18. Ha tenido alguna enfermedad de la sangre, problemas de sangrado o cáncer? 19. En el último año ha recibido sangre o trasplante de órgano? 20. Tiene gripe, tos o dolor de garganta? 21. Le han hecho algún trabajo dental durante los últimos tres días? 22. En el último año ha padecido o ha sido tratado por enfermedades venéreas ITS? 23. Ha tenido relaciones sexuales en los últimos 12 meses al menos una vez con alguien que ha pasado por pruebas de Sida o que tiene Sida? 24. Ha tenido más de tres parejas en el último año. 25. Usted o su compañera sexual usa o ha usado drogas ilegales? 26. Ha tenido relaciones sexuales con personas de grupos de riesgo; como trabajadoras del sexo, personas con múltiples parejas sexuales, hombres que tienen relaciones sexuales con otros hombres, o drogadictos? 27. Está donando sangre por la prueba de VIH / SIDA? 28. Está embarazada o ha tenido hijos en los últimos 6 meses? 29. Ha estado en la cárcel más de dos días en los últimos 12 meses? 30. Usted considera que su sangre puede ser utilizada sin ningún riesgo en cualquier paciente? | | |

Fuente: Banco de sangre de Nicaragua

ANEXO N° 5

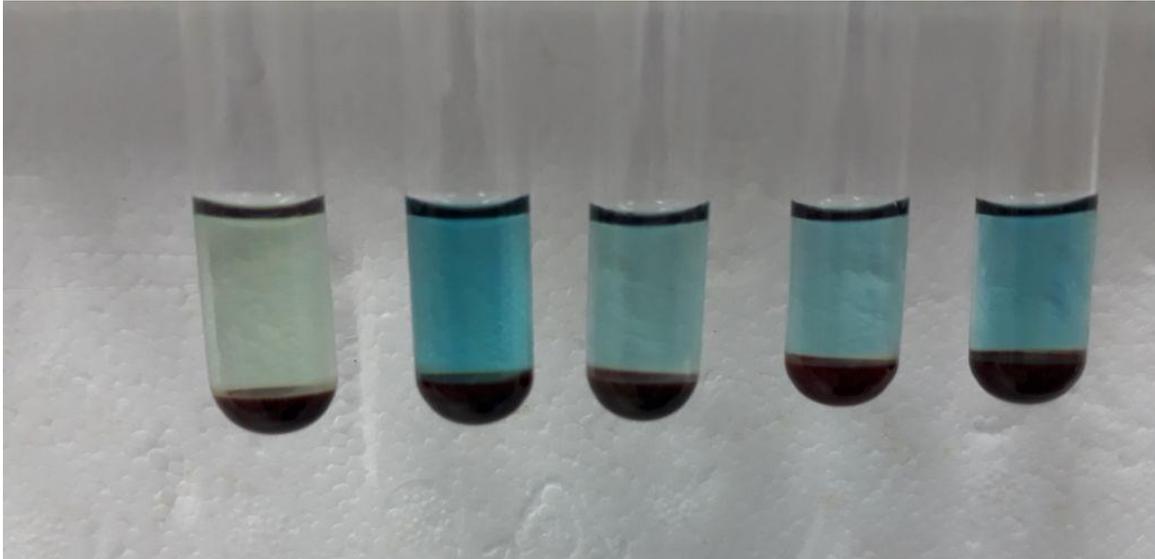
Primer caso positivo para la deficiencia de G6PD detectado a través del método Sass y Caruso en donantes voluntarios captados por el Banco de Sangre de Nicaragua



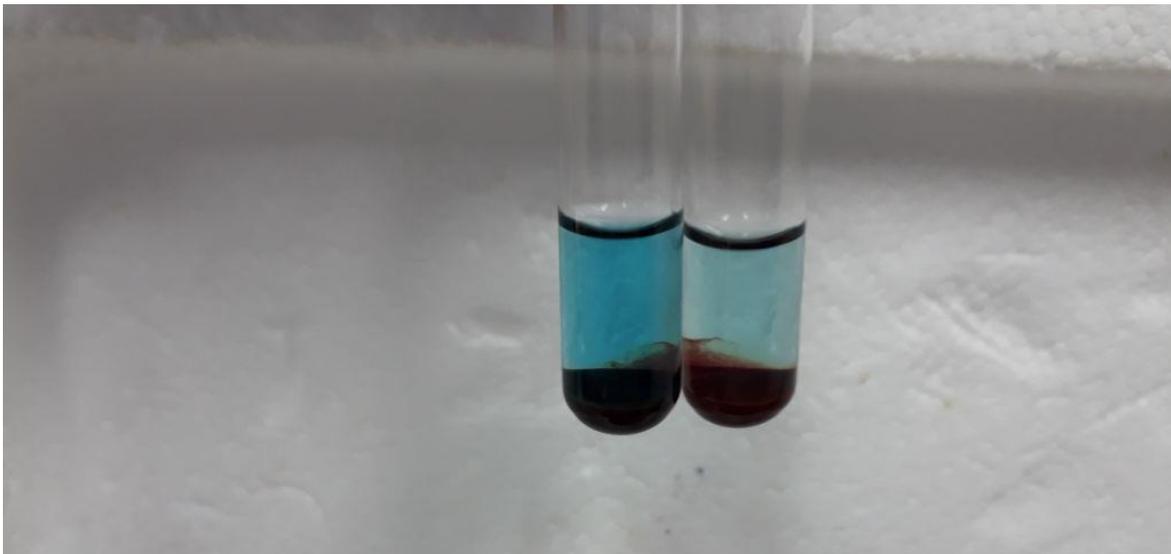
Fuente: tomada por el personal del Banco de Sangre de Nicaragua

ANEXO N° 6

Casos encontrados positivos para la deficiencia de G6PD a través del método Sass y Caruso en donantes voluntarios captados por el banco de sangre de Nicaragua



Fuente: tomada por autoras de la monografía



Fuente: tomada por autoras de la monografía

ANEXO N° 7

POE de procedimiento para la detección de deficiencia de G6PD por medio del método Sass y Caruso, aplicado a la muestra de los donantes voluntarios que fueron participes de la presente investigación.

| | | | |
|---|---|----------------------|----------------------|
|  <p>UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA UNAN - MANAGUA</p> | RECINTO UNIVERSITARIO “RUBÉN DARÍO” INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD LUIS FELIPE MONCADA DEPARTAMENTO BIOANÁLISIS CLÍNICO | | |
| PO01-01 | Procedimiento para la detección de deficiencia de G6PD por medio del método Sass y Caruso | | |
| Elaborado por: Br. María José García Sánchez Br. Lissmorena Guadalupe Valle | Revisado por: | Aprobado por: | |
| Fecha de emisión: 11/01/2020 | Fecha de vigencia: | Versión 01 | Código: Inm-1 |

- 1) **Objetivo:** realizar correctamente el procedimiento de la técnica de Sass y Caruso para la detección de la deficiencia de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.
- 2) **Alcance:** analíticas clínicas y médicos de cualquier institución de la salud.
- 3) **Muestra:** muestra de sangre total con anticoagulante EDTA.
- 4) **Responsables:** personal que labora en los laboratorios.

5) **Definiciones:**

Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa (G6PD): es una enzima citoplasmática, cuya función principal es la prevención del daño oxidativo a las células mediante la promoción de desintoxicación de radicales libres. Esta vía metabólica implica la producción de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH), que participa en el ciclo de glutatión (GSS), que protege la célula contra la hidratación, daño inducido por peróxido de hidrógeno y asegurando un oxidativo perfil de equilibrio activo dentro de la celda.

Deficiencia de G6PD: ocurre cuando una persona posee niveles bajos de la enzima, lo que predispone a que el eritrocito experimente hemólisis oxidativa, ya sea aguda o crónica.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

RECINTO UNIVERSITARIO "RUBÉN DARÍO"
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD LUIS
FELIPE MONCADA
DEPARTAMENTO BIOANÁLISIS CLÍNICO

PO01-01

Procedimiento para la detección de deficiencia de G6PD por medio del método Sass y Caruso

Elaborado por:

Br. María José García Sánchez

Br. Lissmorena Guadalupe Valle

Revisado por:

Aprobado por:

Fecha de emisión:

11/01/2020

Fecha de vigencia:

Versión 01

Código: Inm-1

6) Documentos de referencia:

Monteiro, M., Val, F., Siqueria, M., Franca, P., Sampaio, S., Melo, C., et al. (2014). *G6PD deficiencia en Latinoamérica*. Brasil: Fundación de medicina tropical.

Sáenz, G. (2014). *Hematología analítica*. Costa Rica: EDNASSS. 6ta Ed.

7) Equipos, materiales y reactivos

Materiales:

- Tubos de ensayo de 12x75 mm
- Pipeta automática
- Puntas para pipeta
- Gradilla
- Marcador

Equipos:

- Centrifuga

Reactivos:

- Reactivo de trabajo

8) Precauciones:

- Aplicar las normas de bioseguridad
- Limpiar el área de trabajo antes y después del procedimiento
- Utilizar siempre material limpio y seco
- Comprobar periódicamente el estado de los equipos y reactivos



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

RECINTO UNIVERSITARIO "RUBÉN DARÍO"
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD LUIS
FELIPE MONCADA
DEPARTAMENTO BIOANÁLISIS CLÍNICO

PO01-01

Procedimiento para la detección de deficiencia de G6PD por medio del método Sass y Caruso

Elaborado por:

Br. María José García Sánchez

Br. Lissmorena Guadalupe Valle

Revisado por:

Aprobado por:

Fecha de emisión:

11/01/2020

Fecha de vigencia:

Versión 01

Código: Inm-1

9) Fundamento del método

Está basado en la estimulación de la pentosa fostafo por parte del azul de metileno, así se produce el $\text{NADPH} + \text{H}^+$ en presencia de la enzima G6PD, cuya generación produce la reducción del colorante y torna a este incoloro, en ausencia de la enzima no hay estímulo al desvío de las pentosas, no se genera poder reductor y por lo tanto, el azul de metileno no sufre reducción y conserva su color.

10) Procedimiento para la preparación del reactivo:

- A 500ml de solución de NaHPO_4 agregar solución de K_2HPO_4 hasta obtener un pH de 7.4, formando un tampón de fosfatos.
- A la solución anterior agregar glucosa y NaCl en polvo, formando una solución salina-glucosa-tampón de fosfato.
- Para crear la solución de trabajo final agregar a la solución anterior 1,5ml de azul de metileno previamente diluido. (0.3 gramos de azul de metileno, diluido en 100 ml de agua destilada)
- Es estable por varios meses refrigerado a 4°C

11) Procedimiento de la técnica

- En un tubo de ensayo de 12x75 mm se colocan 0.4 ml de eritrocitos empacados; es recomendable realizar un lavado con solución salina.
- Se agrega 1.25 ml de la solución de trabajo de azul de metileno y se mezcla bien, se deja a temperatura ambiente por 30 minutos.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
NICARAGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

RECINTO UNIVERSITARIO "RUBÉN DARÍO"
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD LUIS
FELIPE MONCADA
DEPARTAMENTO BIOANÁLISIS CLÍNICO

PO01-01

Procedimiento para la detección de deficiencia de G6PD por medio del método Sass y Caruso

Elaborado por:

Br. María José García Sánchez

Br. Lissmorena Guadalupe Valle

Revisado por:

Aprobado por:

Fecha de emisión:

11/01/2020

Fecha de vigencia:

Versión 01

Código: Inm-1

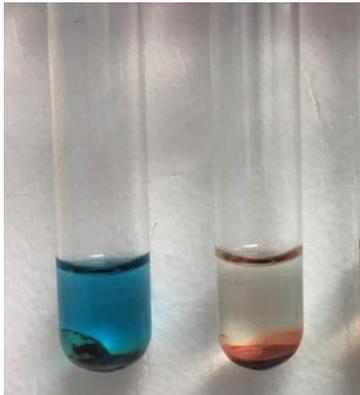
- Después de los 30 minutos de la incubación se agita bien nuevamente y se centrifuga a 2000 RPM durante 5 minutos.
- Realizar lectura de los resultados a simple vista según el color de sobrenadante obtenido.

12) Interpretación de la lectura

Positivo: presencia sobrenadante azul

Negativo: presencia de sobrenadante incoloro

13) Anexos



Control positivo y negativo (de izquierda a derecha respectivamente)

Fuente: tomada por autoras del POE.

ANEXO N° 8

Cronograma de actividades

| N° | Actividad | Lugar y fecha | Responsable | Observaciones |
|----|--|-------------------------------|--|---|
| 1 | Entrega de tema, línea de investigación y bosquejo | 13-12-18 UNAN- Managua | María José García Sánchez Lissmorena Guadalupe Valle | Organizar mejor el bosquejo |
| 2 | Elaboración de los Objetivos y antecedentes | 20-12-18 UNAN- Managua | María José García Sánchez Lissmorena Guadalupe Valle | Contextualizar Normativa APA Revisión de verbos |
| 3 | Elaboración y revisión de Justificaciones y planteamiento del problema | 10-01-19 UNAN- Managua | María José García Sánchez Lissmorena Guadalupe Valle | Ampliar y reestructurar |
| 4 | Elaboración y revisión de Introducción y Marco teórico. | 17-01-19 UNAN- Managua | María José García Sánchez Lissmorena Guadalupe Valle | Reestructurar Reorganizar Norma APA |
| 5 | Entrega de todo el avance y las correcciones. | 22-01-19 UNAN- Managua | María José García Sánchez Lissmorena Guadalupe Valle | Normas APA |
| 6 | Entrega de borrador final | 07-03-19 UNAN- Managua | María José García Sánchez Lissmorena Guadalupe Valle | Corrección de objetivos, diseño |
| 7 | Entrega y defensa del trabajo final | 07-03-19 UNAN- Managua | María José García Sánchez Lissmorena Guadalupe Valle | |
| 8 | Reunión con asesor metodológico | 25/09/19 UNAN – Managua | María José García Sánchez | Reestructurar un objetivo específico y |

| | | | | |
|----|---|----------|--|--|
| | | | Lissmorena Guadalupe Valle | ampliar el general Normas APPA Argumentar diseño metodológico |
| 9 | Consulta de más documentos y anexar más información | 02-10-19 | María José García Sánchez Lissmorena Guadalupe Valle | |
| 10 | Anexar más información al marco teórico | 30-10-19 | María José García Sánchez Lissmorena Guadalupe Valle | |
| 11 | Entrega de borrador al asesor metodológico y tutor | 08-01-20 | María José García Sánchez Lissmorena Guadalupe Valle | Correcciones de diseño metodológico y análisis y discusión |
| 12 | Entrega de las correcciones | 13-01-20 | María José García Sánchez Lissmorena Guadalupe Valle | |
| 13 | Entrega del primer borrador oficial | 16-01-20 | María José García Sánchez Lissmorena Guadalupe Valle | Revisar detalles de ortografía y concordancia de tema |

Fuente: Elaborado por autoras de la monografía.