

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA**



**FRECUENCIA DE ANEMIA MEGALOBLASTICA EN
MUJERES EN ESTADO GESTACIONAL QUE
ASISTIERON AL HOSPITAL DE LA MUJER DURANTE
SEPTIEMBRE – DICIEMBRE DE 2009 MEDIANTE LA
EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE ACIDO FÓLICO Y
COBALAMINA**

ELABORADO POR:

Univ. MAGUEÑO FLORES SILVANA ALEIDA

(Tesina para obtener el Título de Licenciatura en Bioquímica)

LA PAZ - BOLIVIA
2010

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA**



**FRECUENCIA DE ANEMIA MEGALOBLASTICA EN
MUJERES EN ESTADO GESTACIONAL QUE
ASISTIERON AL HOSPITAL DE LA MUJER DURANTE
SEPTIEMBRE – DICIEMBRE DE 2009 MEDIANTE LA
EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE ACIDO FÓLICO Y
COBALAMINA**

ELABORADO POR:

Univ. MAGUEÑO FLORES SILVANA ALEIDA

ASESORES:

DRA. ZORKA CASTILLO
DRA. MONICA GUZMAN
DRA. HEIDY GARCIA

(Tesina para obtener el Título de Licenciatura en Bioquímica)

LA PAZ - BOLIVIA
2010

DEDICATORIA

Me gustaría dedicar esta tesina a:

Mis padres, por su ayuda y comprensión; en especial a mi mamá por haberme enseñado el valor del esfuerzo, tu esfuerzo se convirtió en tu triunfo y el mío, por tu apoyo en momentos difíciles, por tus consejos y motivación para seguir adelante, me has dado todo y formado como persona gracias por que quisiste que continuara adelante sin ti no lo habría hecho, gracias por tu gran amor que no pide nada.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el apoyo, por la formación y los valores que me inculcaron, a mi hermano gracias por preocuparte y preguntar por la evolución de mi tesina, eres una gran persona llegarás muy lejos.

A mis docentes, todos ellos, por fomentar en mí el deseo de saber, de conocer muchas más cosas abriéndome las puertas al mundo.

A mis Asesoras por su paciencia, consejos y sugerencias para el desarrollo de esta tesina, su conocimiento y capacidad profesional es un gran ejemplo.

A la Dra. Siles encargada del Laboratorio del Hospital de la Mujer por abrirme las puertas, gracias por su colaboración, al Dr. López por su ayuda y conocimiento.

A mis amigos, con quienes compartí horas de estudio, momentos de alegría con ustedes la palabra amistad cobra gran significado.

GRACIAS A TODOS

TABLA DE CONTENIDO

		Pág
	RESUMEN	
I.	INTRODUCCION	1
II.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III.	JUSTIFICACION	5
IV.	OBJETIVOS	7
	A. OBJETIVO GENERAL	7
	B. OBJETIVOS ESPECIFICOS	7
V.	DISEÑO TEORICO	8
	A. MODELO TEORICO	8
	B. MARCO REFERENCIAL	9
VI.	MARCO TEORICO	12
	A. ANEMIA EN EL EMBARAZO	12
	a) Cambios fisiológicos en el embarazo.....	12
	B. DEFINICION DE ANEMIA MEGALOBLASTICA	13
	C. ACIDO FOLICO	14
	a) Estructura química.....	14
	b) Función.....	16
	c) Fuentes y requerimiento diario del folato.....	17
	d) Absorción. Transporte y depósitos de folato.....	17
	e) Fisiopatología de la deficiencia de acido fólico.....	19
	f) Causas de la Deficiencia de Acido Fólico.....	21
	a) Ingesta inadecuada.....	21
	b) Mal absorción de causa intestinal.....	22
	c) Inducida por fármacos.....	22
	d) Aumento de requerimiento: embarazo.....	22
	D. VITAMINA B12 O COBALAMINA	24
	a) Estructura química.....	24
	b) Fuentes dietéticas y Requerimientos.....	26
	c) Absorción de la Vitamina B12.....	27
	d) Metabolismo.....	30
	e) Función metabólica.....	31
	f) Causas de la deficiencia de Vitamina B12.....	33
	g) Metabolismo de la Vitamina B12 en el Embarazo.....	34
	E. HEMATOPOYESIS MEGALOBLASTICA	34
	a) Alteraciones bioquímicas.....	35
	b) Alteraciones morfológicas.....	36
	F. DIAGNOSTICO DE LA ANEMIA MEGALOBLASTICA	37
	a) Datos clínicos.....	37
	b) Datos de laboratorio.....	38
	a) Sangre periférica.....	38
	b) Medula ósea.....	39
	c) Análisis de la deficiencia de Acido Fólico.....	39
	d) Análisis de la deficiencia de Vitamina B12.....	40
VII.	MARCO CONCEPTUAL	41
VIII.	DISEÑO METODOLOGICO	42
	A. POBLACION EN ESTUDIO	42
	a) Criterios de Inclusión.....	42

	b) Criterios de Exclusión.....	42
B.	AMBITO DE ESTUDIO.....	42
C.	TIPO DE INVESTIGACION.....	43
D.	ANALISIS ESTADISTICO.....	43
E.	TECNICA, MATERIALES Y METODOS.....	43
	a) Materiales y reactivos.....	43
	a) Material.....	43
	b) Equipos.....	44
	c) Reactivos.....	44
	b) Método: Quimioluminiscencia.....	44
	c) Equipo.....	46
	d) Obtención de la muestra.....	46
	e) Determinación de Acido Fólico por QL.....	47
	a. Utilidad del análisis.....	47
	b. Método.....	47
	c. Fundamento del análisis.....	47
	d. Limites del método.....	48
	e. Técnica.....	48
	f. Características analíticas.....	48
	g. Ensayo.....	49
	f) Determinación de Cobalamina por QL.....	50
	a. Utilidad del análisis.....	50
	b. Método.....	50
	c. Fundamento.....	50
	d. Limites del Método.....	50
	e. Técnica.....	51
	f. Características analíticas.....	51
	g. Ensayo.....	52
	g) Determinación de Valor Hematocrito.....	53
	h) Tinción Wright y observación en placa.....	53
IX.	RESULTADOS.....	54
X.	DISCUSION.....	65
XI.	CONCLUSIONES.....	67
XII.	RECOMENDACIONES.....	68
XIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	69
	ANEXOS	

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Fig. 1: Anemia Megaloblástica. Medula Ósea. Tinción Giemsa.....</i>	13
<i>Fig. 2: Estructura de la molécula de Acido Fólico</i>	15
<i>Fig. 3: Reacciones bioquímicas del Acido Fólico y sus derivados.....</i>	16
<i>Fig. 4: Reacciones bioquímicas del Acido Fólico: Acido Glutámico.....</i>	17
<i>Fig. 5: Absorción, transporte de acido Fólico.....</i>	19
<i>Fig. 6: Estructura de la Vitamina B12 o Cobalamina.....</i>	25
<i>Fig. 7: Metabolismo de la Vitamina B12.....</i>	29
<i>Fig. 8: Reacción química para la síntesis de Metionina.....</i>	31
<i>Fig. 9: Vías metabólicas en las que participan el Acido Fólico y la Cobalamina...</i>	33
<i>Fig. 10: Síntesis de DNA y fases del Ciclo Celular.....</i>	35
<i>Fig. 11: Anemia megaloblástica, sangre periférica. Tinción Giemsa.....</i>	38
<i>Fig. 12: Fundamento de la Quimioluminiscencia.....</i>	45
<i>Fig. 13: Equipo Inmulite 1000.....</i>	46
<i>Fig. 14: Fundamento del análisis de Acido Fólico por QL.....</i>	47
<i>Fig. 15: Fundamento del análisis de Cobalamina por QL.....</i>	51

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla No. 1: Cambios en el Volumen plasmático durante el Embarazo.....</i>	13
<i>Tabla No. 2: Derivados activos del THF.....</i>	15
<i>Tabla No. 3: Causas de la deficiencia de Acido Fólico.....</i>	21
<i>Tabla No.4: Formas activas de la Cobalamina.....</i>	26
<i>Tabla No.5: Requerimiento de la Cobalamina según sexo y edad.....</i>	27
<i>Tabla No.6: Causas de la deficiencia de Vitamina B12.....</i>	34

INDICE DE GRAFICOS

	Pág.
<i>Grafico No. 1:</i> Determinación de la Concentración de Acido Fólico en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer Sep – Dic 2009.....	54
<i>Grafico No.2:</i> Determinación de la Concentración de Cobalamina en la población en estudio	55
<i>Grafico No. 3:</i> Prevalencia de deficiencia de Acido Fólico en la población en estudio según edad	57
<i>Grafica No. 4:</i> Prevalencia de deficiencia de Cobalamina en la población en estudio según edad	57
<i>Grafico No. 5:</i> Frecuencia de Anemia Megaloblástica en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer Sep – Dic 2009.....	59
<i>Grafico No. 6:</i> Frecuencia de Anemia Megaloblástica según periodo gestacional..	61
<i>Grafico No. 7:</i> Frecuencia de Anemia Megaloblástica según asistencia a control prenatal.....	62
<i>Grafico No. 8:</i> Frecuencia de Anemia Megaloblástica según empleo de suplementos vitamínicos en la población en estudio	63

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro No. 1: Prevalencia de Acido Fólico y Vitamina B12 en la población en estudio	56
Cuadro No. 2: Correlación entre la concentración de Acido Fólico y Vitamina B12 en la población en estudio	56
Cuadro No. 3: Correlación entre la concentración de Acido Fólico y la observación de macrocitos e hipersegmentación en placa.....	58
Cuadro No. 4: Estadísticos para la variable: Valor Hematocrito.....	58
Cuadro No. 5: Comparación de media para el Valor Hematocrito.....	58
Cuadro No. 6: Frecuencia de Anemia Megaloblástica en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer Sep – Dic 2009.....	59
Cuadro No. 7: Prevalencia de Anemia Megaloblástica en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer Sep – Dic 2009 según edad.....	60
Cuadro No. 8: Frecuencia de Anemia Megaloblástica según asistencia a control prenatal en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer Sep – Dic 2009.....	62
Cuadro No. 9: Frecuencia de Anemia Megaloblástica según empleo de suplementos vitamínicos en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer Sep – Dic 2009.....	63
Cuadro No. 10: Frecuencia de abortos en la población en estudio en relación a la deficiencia de Acido Fólico y Vitamina B12	64

RESUMEN

La anemia es uno de los signos más frecuentes que presenta una mujer gestante y puede deberse a un incremento en el volumen plasmático considerándose así un proceso fisiológico normal en este estado, sin embargo si está acompañada de una deficiencia nutricional por la alta demanda metabólica materna da lugar a una anemia de tipo carencial como la anemia megaloblástica (deficiencia de ácido fólico y/o cobalamina) que afecta tanto la salud de la madre como del desarrollo del feto ocasionando daños en algunos casos irreversibles en este último como la aparición de los llamados Defectos de Túbulo Neural (DTN), o en el caso de la madre problemas durante el embarazo y en el parto. Como tal Bolivia es uno de los países con una alta tasa de pobreza lo que incrementa la probabilidad de que las mujeres en gestación presenten este tipo de anemia dado que datos presentados en el país un 35.7 % de las mujeres en estado de gestación presentan algún grado de anemia sea ferropénica o megaloblástica, acompañada de una deficiencia de ácido fólico y cobalamina séricas en mujeres en edad fértil lo que incrementaría el porcentaje de pacientes que cursen este cuadro clínico durante las primeras etapas de gestación.

Para determinar la presencia de anemia megaloblástica en la población se realizó un análisis del cuadro hemático verificando de esta forma la presencia de anemia (disminución en el valor hematocrito), se observó en placa los macrocitos y neutrófilos hipersegmentados; y fue importante también la cuantificación de ácido fólico y cobalamina en suero, en este caso este análisis se realizó empleando la técnica de Quimioluminiscencia siguiendo un control tanto para la obtención de la muestra como para el tratamiento de la misma; se debe mencionar que la obtención de la muestra en la población se realizó previo Consentimiento Informado. Tomando en cuenta los criterios antes mencionados y su elevada correlación ($p=0.000$) se determinó que un 19.6 % de la población ($n=51$) presentaba anemia megaloblástica siendo las pacientes que cursaban el segundo trimestre de gestación las más afectadas con un 50% del total. Así mismo se verificó que varias de ellas no realiza ningún control prenatal desde el primer trimestre ($n=24$) acudiendo a este cuando el estado de gravidez ya está avanzado y por ende no emplea ningún tipo de suplemento vitamínico ($n=19$) lo que mejoraría y evitaría en muchos casos la aparición de anemia megaloblástica. Aplicando la prueba de ANOVA de un factor no se pudo verificar que exista una diferencia significativa entre el Ácido Fólico y la Vitamina B12 como factores determinantes para incrementar el número de abortos en las pacientes en estudio.

I. INTRODUCCION

La anemia del embarazo se define como la presencia de un nivel de hemoglobina y hematocrito inferior al normal, esta alteración en los valores hematológicos dará lugar posteriormente a una incompetencia funcional de la sangre para liberar oxígeno a los tejidos (hipoxia tisular), la anemia es uno de los signos más frecuentes que se presenta en la mujer gestante a partir de la sexta semana de gestación y que se va acentuando hacia la 24ava. semana de gravidez todo debido a un incremento en el volumen plasmático materno, este cambio fisiológico puede ir acompañado con un incremento en los requerimientos nutricionales pues no solo debe cubrir sus propias necesidades sino también los del feto todo debido al rápido crecimiento celular que ocurre en su interior, y al acelerado recambio tanto de las células hematopoyéticas como de las células que dan lugar a la estructura del feto, y la formación de la placenta.

Es en este cambio fisiológico donde la futura madre emplea los depósitos de ciertos oligoelementos y/o vitaminas, entre estos se encuentran el Hierro, el Acido Fólico, la Cobalamina (Vitamina B12), Calcio; si tomamos en cuenta la existencia de reservas maternas suficientes los requerimientos nutricionales pueden ser cubiertos; pero si las reservas maternas son insuficientes y el aporte alimenticio también lo es esto da origen a la aparición de patologías que ponen en riesgo la vida de la madre y el feto, o que en su defecto daría lugar a problemas de salud posteriores; como se mencionó anteriormente la anemia aparece como una respuesta al incremento del volumen plasmático "hidremia", sin embargo esta anemia fisiológica puede transformarse en una anemia de tipo carencial siendo ferropénica o megaloblástica. Esta última como tal trae consigo alteraciones importantes dependiendo de la etapa en la que aparece la misma, si ocurre durante las primeras semanas de gravidez el más afectado es el feto pues aparecen enfermedades del tubo neural como la espina bífida, hidrocefalia, abortos tempranos espontáneos; hacia el segundo trimestre se expone la presencia de macrocitosis materna acompañada de una anemia moderada o crónica y hacia el tercer trimestre la aparición de preeclampsia o en los recién nacidos aparentemente sanos una reducción de talla/peso, retardo en el aprendizaje y otros.

Considerando datos proporcionados en el año 2004 por el Ministerio de Salud del país debemos mencionar que una de cada tres mujeres en edad fértil presenta algún grado de anemia (1) llegando a ser un 35,7% las que presentan anemia durante el curso del

embarazo según datos proporcionados por el CENETROP (2), de este porcentaje un 25% presenta anemia leve y un 25% una anemia moderada.

El tipo de anemia de mayor prevalencia en mujeres gestantes es el carencial, y nuestro país no está exento de este panorama debido a la situación económica, a un sistema de salud que en muchos casos no atiende a la población con mayor riesgo, es por este y otros puntos planteados anteriormente que se hace necesario el enfoque de este tema, la determinación de la frecuencia de anemia megaloblástica en mujeres embarazadas, siendo este tipo de anemia carencial muy poco estudiada en nuestro medio, el intervalo de gestación en el que se presenta con mayor incidencia y la relación con factores tales como el número de gestaciones, el uso de suplementos vitamínicos, la asistencia al control prenatal, para ello se empleó el método de quimioluminiscencia para la determinación de ácido fólico y cobalamina séricos, valores que fueron analizados y comparados con el cuadro hemático de cada una de las pacientes para evidenciar la presencia de anemia megaloblástica.

El presente trabajo no solo brinda datos estadísticos sino también pretende demostrar que la anemia megaloblástica es una patología frecuente, considerando estudios recientes se ha visto que la deficiencia y la aparición de la anemia megaloblástica está relacionada con problemas maternos antes no pensados como la toxemia del embarazo e incluso la ruptura de la placenta debida a un incremento de la homocisteína en la madre, entonces estos estudios deberían ponernos a pensar que este cuadro clínico es la fuente de diversos problemas de salud en la madre y el feto, y que debería ser atendido y estudiado incorporando la cuantificación de Ácido Fólico y Cobalamina como exámenes de base en mujeres gestantes que son atendidas por el sistema de salud de nuestro país.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las anemias nutricionales se constituyen un importante problema de nutrición que afecta a gran parte de la población, especialmente de países en desarrollo como el nuestro; este problema de salud es mucho mas grave si el grupo afectado se trata de mujeres en edad fértil o mujeres en gestación pues trae consigo graves consecuencias tales como una morbi-mortalidad materno-infantil elevada, bajo peso al nacer en el niño, problemas durante y posteriormente al parto. Bolivia se encuentra entre los países que presentan una alta prevalencia de anemia siendo que una de tres mujeres en edad fértil presenta algún grado de anemia (1); en Cochabamba en un estudio realizado por la UMSS se encontró que la prevalencia de anemia en mujeres embarazadas corresponde a un 45% y 33% en el área rural y urbana respectivamente, así mismo en este estudio no se encontró datos que nos permitan diferenciar entre una anemia de tipo ferropénica o a una anemia de tipo megaloblástica; en otro estudio realizado en la ciudad de La Paz se encontró que la prevalencia de anemia alcanza a un 26.5% de la población de mujeres embarazadas entre 16 – 48 años de edad. (1) Y es que la anemia en el embarazo es un problema serio en Latinoamérica, en un mapa de una compilación de información entre los años 1995 – 2005 se aprecia una alta prevalencia en países como Perú, Guyana, Haití. En si es un problema de salud publica y que decir de países como Colombia, Chile, Ecuador, Venezuela, Brasil, Argentina donde se presenta un grado de anemia moderada; llegando a un 20 y 40% en estos países en vías de desarrollo y a un 23 % en países desarrollados; así por ejemplo en Ecuador el 40 % de las gestantes presentan anemia, en Colombia el 33% de adolescentes embarazadas presenta anemia siendo esta una de las causas importantes de mortalidad materna que llega al 11% de los casos. (Anemia Working Group)

Si bien la anemia ferropénica es considerada el principal tipo de anemia que se presenta en la mujer gestante y que ha dado lugar a diferentes y variados estudios, no podemos dejar de lado a otro tipo de anemia carencial como la anemia megaloblástica, que en caso de presentarse durante el curso del embarazo pone es riesgo la vida del feto con la aparición de malformación congénita, y en varios casos problemas de aprendizaje, una disminución en la relación talla/peso del niño problemas que son identificados y que en muchos no solían ser relacionados a este cuadro clínico. Todas estas alteraciones se presentan y parten del hecho de que las vitaminas acido fólico y cobalamina intervienen en la síntesis de ácidos nucleicos (síntesis del DNA) y por

ende si existe una alteración a este nivel la división celular queda interrumpida y en muchos casos como ocurre con la células hematopoyéticas da lugar a la presencia de anormalidades morfológicas como es la presencia de macrocitos, neutrófilos hipersegmentados y la aparición de cuerpos de Howell-Jolly.

En la mayoría de los casos si la mujer presenta algún grado de deficiencia de estos factores ácido fólico y vitamina B12 antes del embarazo desarrollaría la anemia megaloblástica ya durante el primer mes de gestación lo que origina los llamados defectos del tubo neural (DTN) con la aparición de la espina bífida, la hidrocefalea, o interrupción del embarazo sin causa aparente es mas los abortos hacia la 2 y 3ª semana de gestación son frecuentes siendo este tipo de abortos de aparición muy temprana, así mismo si la anemia megaloblástica aparece hacia el segundo y tercer trimestre de gestación por una aporte nutricional deficiente que agota las reservas materna esto da origen a problemas principalmente en la madre con la aparición de una anemia crónica, la ruptura de la placenta, la toxemia de embarazo o la preeclampsia, pero porque es la madre la que sufre estas alteraciones, se ha verificado que el metabolismo tanto del ácido fólico como de la cobalamina favorecen al feto a costa de la madre pues muy pocas veces se ha encontrado la presencia de una deficiencia de ácido fólico y cobalamina séricos en el feto.

Si bien el Seguro Universal Materno Infantil (SUMI) como tal proporciona suplementos vitamínicos a las mujeres en gestación varias de ellas recién comienzan su control prenatal hacia el tercer trimestre de embarazo de manera que no emplean los suplementos durante las etapas de mayor riesgo o en otros casos los suplementos proporcionados por el sistema de salud no son ingeridos por la mujeres gestantes agravando de esta manera y aumentando la probabilidad de la presencia de anemia megaloblástica entre esta población.

II. JUSTIFICACION

La anemia megaloblástica es un proceso clínico que se debe a una alteración en la síntesis del DNA, esta presenta un cuadro clínico acompañado de malestar, astenia, una eritropoyesis ineficaz todo debido a la deficiencia de Cobalamina (Vitamina B₁₂), de Acido Fólico o ambos. Los requerimientos de ambos factores varía con la edad, el género; y pueden verse incrementados en situaciones donde la demanda metabólica lo requiera como ocurre durante el embarazo; por ello a nivel mundial y en Latinoamérica se recomienda la suplementación adicional de estas vitaminas a mujeres embarazadas desde el primer trimestre de embarazo debido a que estos factores influyen en el desarrollo del feto, y previenen la aparición de enfermedades congénitas en el recién nacido ; además que favorece a la salud materna evitando de esta manera la presencia de anemia megaloblástica, preeclampsia, abortos espontáneos y por ende la mortalidad materna.

Bolivia es uno de los países latinoamericanos que presenta una elevada tasa de pobreza que alcanza a un total del 63% de la población (según el Análisis de Salud de 2004) (5) este factor que coadyuva al hecho de que muchas mujeres en estado de gestación no presten la atención necesaria a su estado (control prenatal apropiado acorde al seguro materno infantil) y así desarrollen una deficiencia nutricional a esto se suman factores sociales como embarazos no deseados, mujeres cuyos empleos no favorece al curso normal de la gestación, familias con numerosa cantidad de miembros, baja ingesta nutricional, etc. Tomando en cuenta estos factores la mujer gestante en una primera etapa desarrolla una deficiencia de elementos tales como el Acido fólico y Cobalamina; si bien la suplementación de tabletas que contienen 200 mg de Sulfato ferroso y 250 µg de Acido Fólico es recomendada en mujeres gestantes y es proporcionada en nuestro medio cuando la paciente comienza con su control prenatal; muchas de las pacientes no ingieren estos suplementos vitamínicos pues no realizan el control desde el primer trimestre de embarazo, lo que puede considerarse también como un factor predisponente para el desarrollo de la anemia megaloblástica.

Así mismo se han realizado estudios en América latina, referentes a Acido Fólico y Cobalamina, donde la prevalencia de deficiencia de acido fólico en mujeres en edad fértil alcanza un 24,7% en Costa Rica (3) , un 5 % en México en el año 1999 y en un estudio reciente realizado el año 2007 con 117 mujeres en este mismo país

demuestra que existe un 28 y 20% de deficiencia de ácido fólico sérico y Cobalamina respectivamente (4), tomando en cuenta estos estudios y los datos sobre anemia antes proporcionados podemos considerar que Bolivia no es una excepción a la deficiencia de ácido fólico y vitamina B12 en mujeres en edad fértil, siendo predisponentes a desarrollar una anemia megaloblástica durante los primeros meses de embarazo por el elevado requerimiento de estos factores por parte del feto, pues durante el embarazo los requerimientos de Ácido Fólico pueden llegar hasta unos 400 mg/dL e incluso más si el embarazo es múltiple, es más se ha asociado a la deficiencia de ácido fólico con problemas como preeclampsia y nacimiento de recién nacidos prematuros y de bajo peso, o los llamados defectos del tubo neural que puede tener lugar en dos niveles: en cerebro (dando lugar a una anencefalia o a un encefalocele) y en columna vertebral (espina bífida), dando lugar al fallecimiento del niño. Según datos del Ministerio de Salud un 6% (5) de la mortalidad infantil en el país se debe a malformación del feto, si se da el nacimiento de un niño aparentemente saludable este podría presentar problemas de aprendizaje y problemas de locomoción durante su infancia.

Por los puntos anteriormente mencionados es que se realiza este trabajo, para determinar la frecuencia de Anemia Megaloblástica en mujeres embarazadas pues se debe considerar la posibilidad de que la deficiencia de estas vitaminas en nuestro medio puede ser similar o incluso mayor a la que presentan el resto de los países en vías de desarrollo así mismo es importante analizar los factores predisponentes a este problema así como su incidencia en determinadas etapas del embarazo; para esta finalidad existen diferentes formas para evaluar al ácido fólico y la cobalamina desde el análisis microbiológico hasta el radioinmunoanálisis, sin embargo para este trabajo se emplea la técnica de quimioluminiscencia por su elevada sensibilidad y especificidad.

IV. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Determinar la frecuencia de Anemia Megaloblástica en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer durante el periodo Septiembre - Diciembre de 2009, mediante evaluación cuantitativa de Acido Fólico y Cobalamina en suero por el método de Quimioluminiscencia.

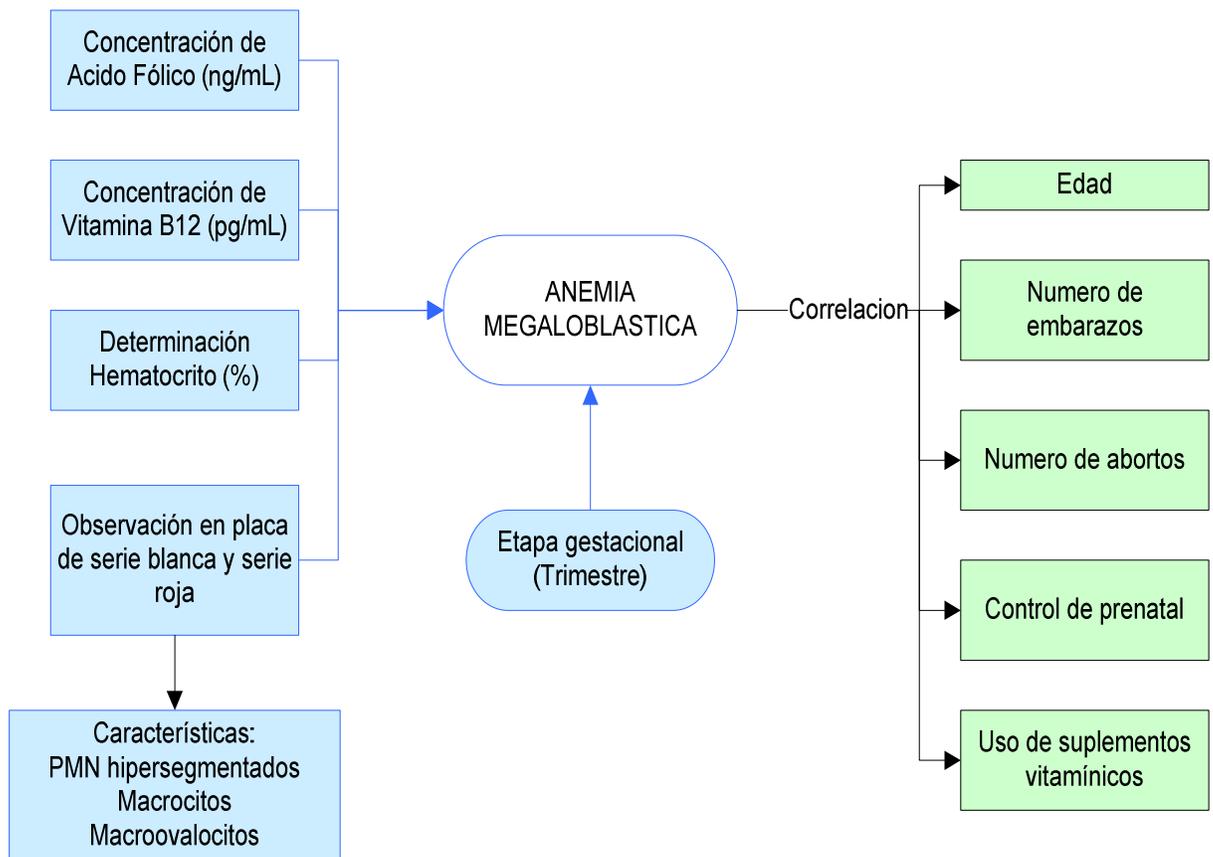
B. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Determinar la concentración de Acido fólico sérico y Cobalamina en la población en estudio por el método de Quimioluminiscencia.
- ✓ Relacionar la concentración de Acido Fólico y Valor Hematocrito con la presencia de hipersegmentación y macrocitos en placa de la población en estudio.
- ✓ Determinar la frecuencia de Anemia Megaloblástica en relación a la edad de las participantes del estudio.
- ✓ Evaluar la presencia o ausencia de Anemia Megaloblástica, de acuerdo al periodo gestacional.
- ✓ Relacionar la presencia de Anemia Megaloblástica con la asistencia o no al control prenatal desde el primer trimestre de gestación por parte de las pacientes en estudio.
- ✓ Determinar la frecuencia de Anemia Megaloblástica en relación al uso o no de suplementos vitamínicos.
- ✓ Relacionar la frecuencia de abortos en la pacientes en estudio con la presencia de deficiencia de acido fólico y vitamina B12.

V. DISEÑO TEORICO

A. MODELO TEORICO

En el presente esquema, se hace referencia a las variables consideradas para la realización de esta tesina. Se puede observar la correlación en cada una de las variables tratadas tomando en cuenta los datos de concentración de ácido fólico y cobalamina y el perfil hemático para considerar la presencia o ausencia de anemia megaloblástica, el periodo o intervalo gestacional, y su relación con aspectos tales como el número de gestaciones, número de abortos, el empleo de suplementos vitamínicos durante la etapa gestacional y el tiempo de control de prenatal, todos estos datos presentados son analizados y discutidos en el transcurso del presente trabajo.



B. MARCO REFERENCIAL

El embarazo esta asociado con una reducción progresiva de los niveles de ácido fólico sérico y eritrocitario que se debe a el incremento del catabolismo del Folato, la anemia megaloblástica durante el embarazo es frecuente, y se diagnostica típicamente en el segundo y tercer trimestre de embarazo. (6) Como tal este cambio fisiológico esta asociado a un crecimiento y diferenciación celular rápida tanto para la madre y el feto, donde tanto la demanda metabólica y de nutrientes (vitaminas, hierro, calcio) suele incrementarse hasta el doble de los requerimientos diarios; así un 20% y 30% de las mujeres presentan un incremento de las demandas de vitamina B12 y ácido fólico respectivamente (7); al no verse tratado podría dar lugar al desarrollo de anemia no necesariamente megaloblástica sino también del tipo ferropénica, en la mayoría de los casos la anemia megaloblástica se debe a una dieta pobre en frutas y vegetales crudos que según evidencias epidemiológicas contribuyen a una mortalidad y morbilidad materno-infantil elevada puesto que en varios países se demuestra la existencia de una deficiencia nutricional tanto de macro como micronutrientes en mujeres en edad reproductiva. (8)

Como se indicó entre las consecuencias de la deficiencia de ácido fólico se incluyen la anemia megaloblástica y una elevada incidencia en problemas tales como defectos del tubo neural, que incluyen malformaciones congénitas durante la primera etapa del desarrollo embrionario, también incluyen riesgo de abortos recurrentes, preeclampsia, y toxemia de embarazo.

En un estudio realizado en Ontario, Canada con un grupo de adolescentes embarazadas a las cuales se dosifico ácido fólico, vitamina B12 se encontró que un 7% de estas pacientes presentaba una disminución del ácido fólico y un 3% de ellas se encontraba en el límite marginal mientras que un 20 % presentaba una deficiencia de vitamina B12, en el estudio realizado en placa se halló que un 24 % de estas mismas pacientes evidenciaban una macrocitosis e hipersegmentación. (9)

En otro estudio realizado en Venezuela se determino la prevalencia de la deficiencia de ácido fólico y vitamina B12 en mujeres embarazadas, este estudio demostró que alrededor de un 63% de la población estudiada mostro alguna disminución de ácido fólico considerando tanto la deficiencia (menor a 3 ng/mL) y niveles bajos de ácido fólico (3 – 6 ng/mL), con una deficiencia similar de vitamina B12, la distribución realizada demostró que existió una alta prevalencia de disminución del ácido fólico durante el primer trimestre de embarazo, así mismo realizando un estudio

socioeconómico en estas pacientes se mostro que un 31,06% de deficiencia de acido fólico y un 60,49% de vitamina B12 esta asociado a un estrato IV en la escala económica. (10)

En otros estudios realizados en mujeres embarazadas indican una alta incidencia de la deficiencia de estos dos factores en muchos países, que no están asociados de forma necesaria a niveles socioeconomicos bajos así mismo en Canadá en el año 2000 se demostró una prevalencia de anemia megaloblástica de un 27% que fue inducida por disminución de acido fólico.(11)

Para llegar a contrarrestar los porcentajes elevados de deficiencia de acido fólico y cobalamina, además de anemia megaloblástica durante el embarazo se han instaurado programas de salud que hacen que exista una disminución de esta frecuencia en países como México (reducción del 5%)(12), en estos programas se da una terapia oral con acido fólico y cobalamina; esta terapia surge como consecuencia de los diferentes estudios que indican la importancia del acido fólico durante el embarazo, formación apropiada del feto y la salud materna que será comentada mas adelante.

Otras investigaciones que se refieren a la presencia de anemia que afecta la salud materna indica que la macrocitos es el hallazgo común en este tipo de deficiencia, que coincide con una moderada a severa anemia, esta macrocitos es mas común en el tercer trimestre de gestación (13), es mas se ha verificado que durante los últimos dos trimestres de embarazo el volumen de los eritrocitos se incrementa en un 20 a 30 % (14); por ello el acido fólico ha sido usado para el tratamiento de anemias macrocíticas; otro punto a considerar es que en el estudio realizado por Smithells *et al* mostraron que la suplementacion multivitaminica fue muy efectiva para reducir defectos en el túbulo neural del feto (15).

La principal causa de aumento de los requerimientos de folatos durante el embarazo se debe al incremento de la eritropoyesis materna que produce un aumento de las necesidades de acido fólico entre 5 a 10 veces.

Problemas tales como la malformación del túbulo neural, anencefalia se han visto reducidos en un 50 a 70% debido a la administración de acido fólico y vitamina B 12 durante el periodo periconcepcional (1 – 3 meses después de la concepción o alrededor de la 6 – 8 semanas de gestación)(15).

Así mismo el Instituto de Salud Pública en E.E.U.U. Ha recomendado que toda mujer en edad fértil debe consumir 400µg diarios de acido fólico diariamente para reducir el riesgo de tener un bebe con deformación del túbulo neural o en su defecto presentar

una anemia severa que afectaría su salud durante el alumbramiento (16), esto se debe a la tasa de neonatos con defectos de túbulo neural afecta a aproximadamente 4000 embarazos por año en E.E.U.U. (17).

Otro problema que afecta a la salud materna son los abortos recurrentes que han sido reportados en mujeres con deficiencia de folato, así mismo la deficiencia de vitamina B12 ha sido asociada con infertilidad, con abortos recurrentes muy tempranos (alrededor de la 5ta. semana de la concepción) mientras que el ácido fólico está asociado a abortos recurrentes tempranos (antes de 12ava. semana tras la concepción). (18).

VI. MARCO TEORICO

a. ANEMIA EN EL EMBARAZO.

La anemia desde el punto de vista funcional se define como una disminución en la capacidad de la sangre para transportar oxígeno a los tejidos, lo que provoca hipoxia tisular. En la medicina clínica se refiere a una disminución en la concentración normal de hemoglobina.

Actualmente la anemia del embarazo se define como la presencia de un nivel de hemoglobina inferior a 10.5 g/dL en cualquier momento del proceso gestacional (19). La prevalencia de esta patología aumenta entre las mujeres de países en vías de desarrollo debido fundamentalmente a factores nutricionales y la falta de asistencia al control prenatal.

1) Cambios fisiológicos en el embarazo.- El volumen sanguíneo materno se incrementa de forma considerable durante el embarazo, dicho incremento resulta de un aumento del plasma. El volumen plasmático crece alrededor de 40 a 60 % en una gestación normal. El incremento del volumen plasmático es proporcional al peso del feto, siendo también mayor en caso de gestación múltiple. La masa eritrocitaria aumenta de forma constante a lo largo del embarazo, aunque en menor medida que el volumen plasmático (20 – 30 %) (Tabla No. 1). Por ello se produce una hemodilución fisiológica que ocasiona un descenso en el valor hematocrito (4 -6 %) (19).

Esta anemia dilución o hidremia empieza a producirse a partir de la sexta semana, alcanzando su valor máximo en la 24 semana y a veces algo más tarde, estabilizándose más tarde hasta el puerperio y retornando a la normalidad entre la primera y tercera semana después del parto. Manteniéndose la morfología normocítica y normocromica. (19)

Este aumento de volumen sanguíneo que ocurre en la madre, es necesario para poder producir un aumento de los requerimientos nutricionales y sirve para poder compensar al aumento metabólico y de necesidades de perfusión de la unidad feto- placentaria; así como para poder compensar la pérdida sanguínea que ocurrirá posteriormente durante el parto.

La anemia que aparece en el embarazo es frecuentemente de tipo hipo regenerativa y se atribuye a una deficiencia de hierro, folatos y cobalamina

(vitamina B12), dando lugar a una anemia ferropénica que es la mas común en el embarazo o una anemia megaloblástica.

Cambios en el volumen plasmático durante el Embarazo				
	Mujer no Gestante	Semanas de Embarazo		
		20	30	36
Volumen plasmático (mL)	2566	3150	3750	3850
Masa celular eritroide (mL)	1367	1450	1550	1650
Volumen sanguíneo (mL)	4000	4600	5300	5500

Tabla No 1. Cambios en el volumen plasmático durante el Embarazo
Fuente: Hospital Lleres Acostas. *Protocolo de manejo de anemia en el Embarazo*, 2002.

b. DEFINICION DE ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

La anemia megaloblástica resulta de un defecto de la maduración nuclear, y se atribuye principalmente a una eritropoyesis ineficaz. La anemia se denomina de esta manera Megaloblástica en un intento por describir el aspecto gigantesco anormal de los precursores eritroides (megaloblastos) en la medula ósea. (ver Fig. 1) (20). En la anemia megaloblástica las células más afectadas son las que tienen un recambio más rápido, especialmente los precursores hematopoyéticos como se menciona y las células del epitelio digestivo. La multiplicación celular es lenta, pero el desarrollo del citoplasma prosigue normalmente, por ello las células megaloblásticas tienden a ser grandes con un cociente ARN/ADN aumentado. (21)

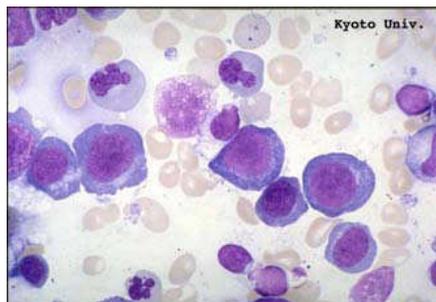


Fig 1. Anemia megaloblástica, Medula Ósea. Tinción Giemsa
Fuente: Soler Díaz. *Macrocitosis y Megaloblastosis*, 2006.

Los progenitores eritroides megaloblásticos tienden a destruirse en la médula, por ello la celularidad medular esta aumentada con frecuencia, pero la producción de eritrocitos esta disminuida. El mecanismo es siempre la carencia (en el 95% de las anemias megaloblásticas) de algunos de los factores vitamínicos (acido fólico o vitamina B₁₂) que intervienen en la síntesis del DNA. La deficiencia del acido fólico se debe con mas frecuencia a un consumo inadecuado en la dieta, o a un *incremento de la demanda metabólica como ocurre durante el embarazo.* (23)

c. ACIDO FOLICO

El Acido Fólico es la sustancia de referencia de un grupo grande de compuestos conocidos como folatos, así el acido fólico es el nombre común del Acido Pteroilglutamico, que sintetizan muchos vegetales y bacterias diferentes, las verduras y la frutas constituyen la principal fuente alimentaria de esta vitamina.

1) Estructura química. El acido fólico, o acido pteroilglutamico estructuralmente esta constituido por tres partes: a) Pteridina, un anillo que contiene nitrógeno (con una sustitución en su estructura), b) una molécula de acido *p*- amino-benzoico y c) uno o mas residuos de acido L-glutamico unidos por enlaces peptidicos. (14) (ver Fig. 2)

Esta estructura se constituye como la variante inerte del folato en su forma no reducida, puede hallarse parcialmente reducida como Dihidrofolato (DHF) o como Tetrahidrofolato (THF) que se produce por la reducción de cuatro hidrógenos del anillo de pteridina (totalmente reducido) siendo esta ultima la forma biológicamente activa del folato, que es capaz de aceptar diferentes fragmentos de un carbono, estos se encuentran unidos al N₅, al N₁₀ o conjuntamente a ambos formando las coenzimas del Acido Fólico, las cuales pueden sufrir interconversiones en el interior de las células mediante cambios en la cadena lateral.

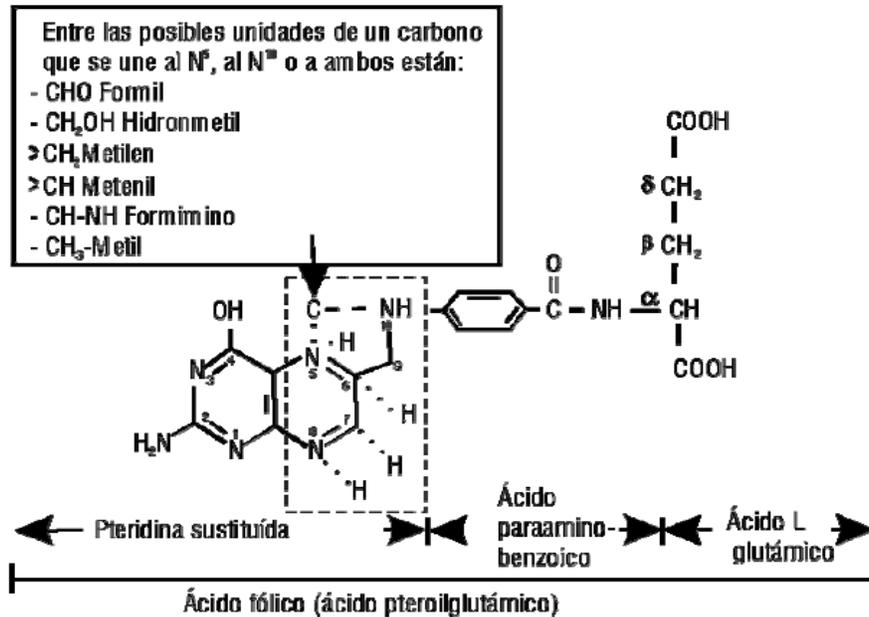


Fig 2. Estructura de la molécula de Acido Fólico
Fuente: Paz R. Manejo, control y prevención de Anemia Megaloblástica, 2006.

Debido a que el folato interviene en varias reacciones de transferencia de grupos monocarbonados intracelulares, este puede hallarse bajo la forma de diversos derivados activos. (Ver Tabla No. 2)

Derivados activos del Acido tetrahidrofólico (THF)	
Derivado activo	Grupo químico
5,10-metilen-THF	$-CH_2-$
5,10-metenil-THF	$-CH =$
5-formimino-THF	$HCNH$
10-formil-THF	HCO
10-hidroximetil-THF	$HOCH_2$
5-metil-THF	CH_3

Tabla No 2. Derivados activos del THF
Fuente: Sans, S. Hematología Clínica, 1988.

En condiciones fisiológicas y en la naturaleza, sus formas mas abundantes son las que poseen mas de una molécula de acido glutámico (es decir Poliglutamatos), de manera que en los alimentos aproximadamente un 90% del contenido en folatos se hallan bajo la forma de poliglutamatos. (22)

2) Función. La función del THF consiste en transferir unidades de carbono de los donadores a los receptores. Con esta capacidad el folato desempeña una función vital en el metabolismo de los nucleótidos y de los aminoácidos.

La principal reacción de transferencia de carbono se produce cuando el carbono de la cadena lateral de la serina se intercambia al THF para formar el THF N^{5,10} – metileno. A continuación el THF N^{5,10} – metileno se transfiere al uracilo del desoxiuridilato (dUMP) para formar el desoxitimidilato (dTMP), una pirimidina del DNA, nucleótido imprescindible en la síntesis de este ácido nucleico, esta reacción es catalizada por la enzima timidilato-sintasa. Esta reacción, a su vez, produce dehidrofolato (DHF) una variedad inactiva del folato. El DHF se reduce para regresar a la variedad activa, THF, mediante la enzima dehidrofolato reductasa (DHF reductasa). En manera alternativa el THF N^{5,10} – metileno puede oxidarse a THF para la biosíntesis de las purinas. En la deficiencia de ácido fólico, parece que un bloqueo en la conversión de dUMP a dTMP da lugar a la síntesis defectuosa de DNA (ver Fig. 3).

El THF N^{5,10} – metileno deriva del 5-metil-THF a través de una reacción en la que interviene la cobalamina, parece evidente que la cobalamina facilita la entrada de 5- metil-THF en las células, por tanto el papel de este factor en la síntesis del DNA sería facilitar la acción del folato. (23)

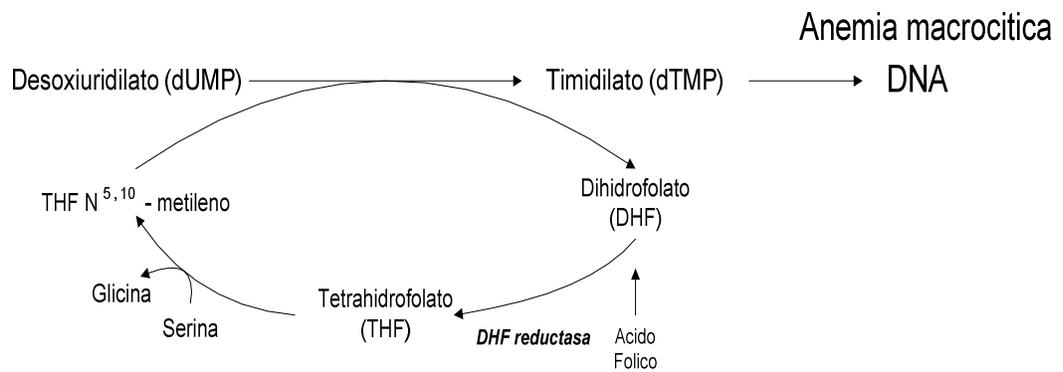


Fig 3. Reacciones bioquímicas del ácido fólico y sus derivados
Fuente: **McKenzie, S.** *Hematología Clínica*, 2000.

El metabolismo de la histidina a ácido glutámico también requiere del THF. El metabolito intermedio de esta reacción es el FIGLU (Ácido Formiminoglutámico), el cual requiere del THF para su conversión en ácido

glutamico (ver Fig. 4). Una deficiencia de folato impide esta reacción y resulta en un aumento en la excreción del FIGLU.

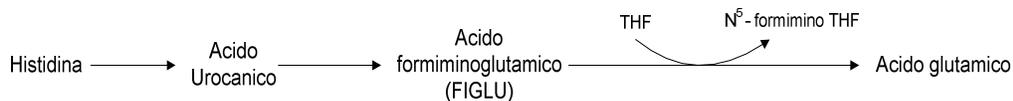


Fig 4. Reacciones bioquímicas del ácido fólico y sus derivados
Fuente: McKenzie, S. *Hematología Clínica*, 2000.

3) Fuentes y requerimiento diario del folato. La mayor parte del folato sintetizado por las bacterias intestinales se elimina por las heces, la única fuente son los alimentos, puesto que este factor es sintetizado solamente por las bacterias y las plantas, son ricos en folatos los vegetales frescos de hojas verdes y amarillas, las legumbres, los cereales y las frutas cítricas; entre los alimentos de origen animal destacan por su alto contenido de esta vitamina órganos como el hígado y el riñón. Sin embargo, la leche materna posee cantidades suficientes para el lactante. Así mismo la pérdida de este factor puede deberse a un prolongado tiempo de cocción que produce una pérdida de más del 90%; pues algunas formas de Ácido Fólico que se encuentran en los alimentos son lábiles y pueden destruirse fácilmente.

Las necesidades diarias mínimas, en el hombre adulto son de 200 mg/día y en la mujer de 180 mg/día; durante el Embarazo y la Lactancia estos aumentan a 400 y 280 mg/día, respectivamente y durante el Primer Año de Vida son de 3,6 mg/Kg/día; que son cubiertos por una alimentación mixta normal que contiene entre 400 y 600 ug de folatos. (23)

Las personas normales tienen alrededor de 5 a 20 mg de Ácido Fólico en diversos depósitos corporales, la mitad de ellos en el Hígado, la ingesta diaria cubre las pérdidas que se producen del mismo a través de la descamación cutánea, orina, sudor y secreciones externas diversas. Según ello, si cesa por completo la ingesta, las reservas del organismo se agotan en 3 – 4 meses, tiempo en el cual se desarrolla la anemia megaloblástica en personas normales sin demanda metabólica elevada. (20)

4) Absorción, transporte y depósitos de folato en el organismo. La absorción del folato se produce a nivel del duodeno del intestino delgado (porción proximal principalmente) pero el yeyuno y el ileon pueden asumir esta

función, donde las células mucosas del intestino poseen una enzima la Folato desconjugasa o conjugasas (γ - Glutamil Carboxipeptidasas), activadas por zinc, que se encuentra en los bordes en cepillo de la mucosa intestinal, esta enzima hidroliza los Poliglutamatos alimenticios y los transforma en monoglutamatos y diglutamatos, únicas formas absorbibles en el yeyuno proximal. (22)

Aunque el mecanismo de transporte de los monoglutamatos a través de la célula epitelial del intestino se desconoce, parece que la mayoría de la moléculas de monoglutamato absorbidas son reducidas en la propia célula por la enzima dihidrofolato reductasa que adiciona dos pares de átomos de hidrogeno transformándolas en 5 – metil-THF, que es la forma predominante en el plasma, pasa al interior de las células después de trasladarse por un portador que es específico para las formas Tetrahidro de la vitamina. (19)

En la sangre, prácticamente todo el folato se halla bajo la forma de 5- metil-THF (monoglutamato) unido débilmente y de forma inespecífica a proteínas plasmáticas diversas en especial a la albumina. El exceso de folato circulante se deposita preferentemente en el hígado bajo la forma de Poliglutamatos siendo este su principal tejido de reserva en el organismo (25).

La redistribución de las reservas hepáticas a los tejidos depende en gran medida de la Circulación Enterohepática. En la mayor parte de los tejidos el Folato permanece dentro de la célula, en contraste con el Folato Hepático que es movilizado rápidamente durante la deprivación de Folato (25).

Una vez en la célula, el grupo *N5-Metilo* se separa gracias a una reacción que exige la presencia de Cobalamina y entonces el Folato se vuelve a convertir en la forma de poliglutamato; este proceso se lleva a cabo por parte de la enzima Folil-Poliglutamato Sintetasa, cuyo mejor sustrato es el FH4 que es posiblemente el sustrato fisiológico. (Ver Fig. 5)

La formación de poliglutamato puede servir para que las células retengan el Folato. Se desconoce la función de este fijador del Folato y de su precursor unido a la membrana, pues ni el fijador ni el precursor tienen relación con el portador del tetrahidrofolato, pero se señalan variaciones de su concentración en diferentes estados como en el embarazo y en situaciones como la deficiencia de folato y esta asociada con la ingestión de anticonceptivos.

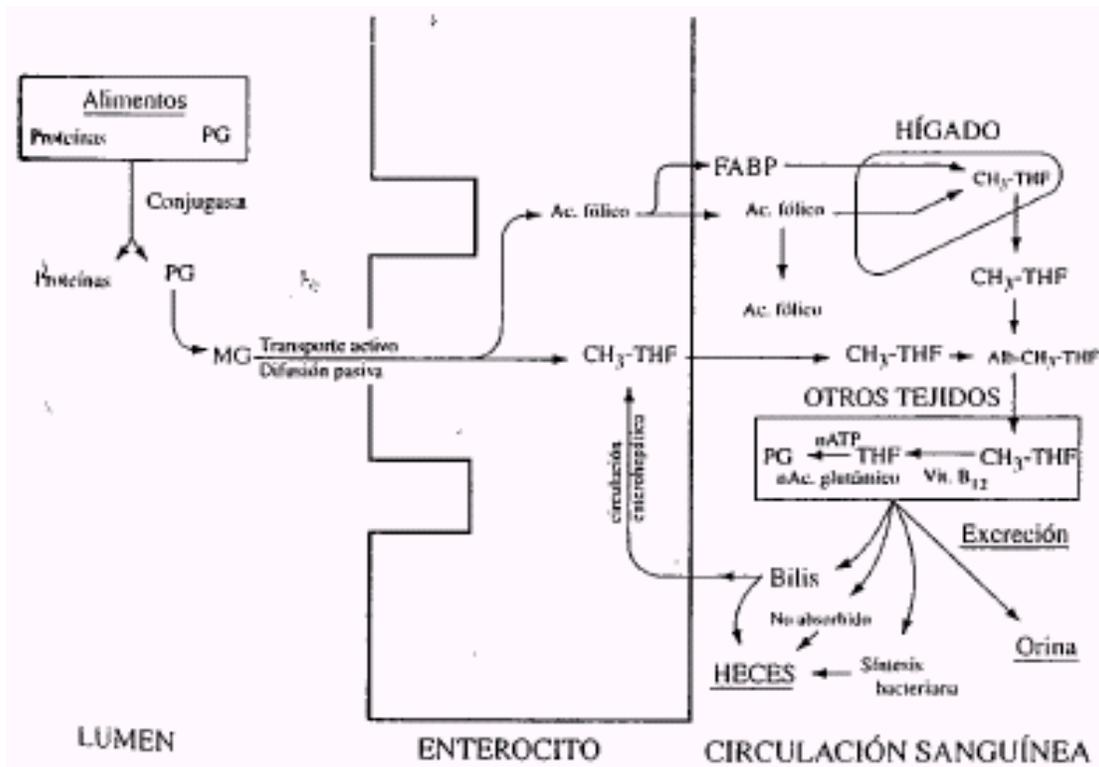


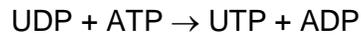
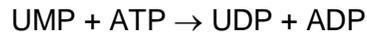
Fig 5. Absorción, transporte del ácido fólico
Fuente: Camacho, J. *Acido fólico en la nutrición humana*, 2002.

Parte del folato penetra también en los eritroblastos, que al madurar a hematíes lo acumulan en su interior (la membrana eritrocitaria es impermeable al folato), por ello y debido a la relación entre el contenido de folato eritrocitario y la disponibilidad de ácido fólico por el organismo para la maduración eritroblastica, el valor del mismo constituye un reflejo del contenido en folato intracelular y en cierto modo del nivel del folato del organismo. (26)

5) Fisiopatología de la deficiencia del ácido fólico. La deficiencia de ácido fólico produce una disminución en la síntesis del 5,10 N-metil THF, la coenzima necesaria en la conversión del uridilato a timidilato, una pirimidina componente del DNA. Consecuentemente, hay una disminución notable en la velocidad de síntesis del DNA.

La evidencia indica que en la deficiencia del ácido fólico los pasos individuales en la síntesis del DNA son normales, pero hay un aumento considerable de copias erróneas del DNA. Normalmente, los monofosfatos de

nucleosido se interconvierten a difosfatos y trifosfatos por medio de cinasas que usan ATP como donante de fosfatos.



Sin embargo, en la deficiencia de ácido fólico el dUMP (uridilato) se convierte a dUTP a una velocidad que excede la capacidad de la enzima UTP pirofosfatasa para convertir el dUTP de regreso a dUMP, el precursor de dTMP (timidilato). Como resultado el dUTP se acumula y el timidilato se vuelve escaso. La DNA polimerasa no puede hacer distinción entre el residuo del uridilato y el residuo del timidilato y, así el uridilato abundante se incorpora de forma errónea en la copia de DNA. Entonces el mecanismo corrector del DNA debe retirar el residuo de uridilato y sustituirlo con timidilato. Este mecanismo de corrección debe ser prolongado debido a la escases de dTTP. (25)

Todas las células en rápida división se afectan por la deficiencia de folato, en especial los eritrocitos, los leucocitos, las plaquetas y el epitelio intestinal. Las células hematopoyéticas muestran cambios megaloblásticos característicos. Los precursores eritroides de la médula ósea muestran patrones visibles de cromatina nuclear vinculados con los cambios en la estructura de la cromatina. Los cromosomas, largos, delgados, y menos plegados, se observan como cromatina abierta laxa en los frotis teñidos de sangre. Los cambios nucleares se acompañan con macrocitos, y esta puede estar vinculada con la disminución de las divisiones mitóticas. El RNA continúa la síntesis de proteína a una tasa normal, pero el desarrollo nuclear se retarda; por tanto, el volumen citoplasmático continúa en expansión. (27)

La médula ósea indica un incremento de tres veces en la eritropoyesis, pero la cifra de reticulocitos en sangre periférica es escasa, lo cual indica un alto grado de eritropoyesis ineficaz. La supervivencia de los eritrocitos en la sangre periférica también disminuye de manera significativa. Esta maduración y supervivencia anormales de los eritrocitos produce anemia. Las plaquetas y los leucocitos también proliferan y maduran anormalmente; por lo tanto, puede existir una pancitopenia de la sangre periférica con células morfológicamente anormales. Como se ha mencionado, la anomalía más clásica del leucocito

vinculada con la anemia megaloblástica es la hipersegmentación de los neutrófilos. (20)

6) Causas de la deficiencia de Acido Fólico. Las causas de la deficiencia de acido fólico se pueden observar en la Tabla 3.

CAUSAS DEL DÉFICIT DE ACIDO FÓLICO
<p><i>Ingesta inadecuada</i></p> <p>Desnutrición y dieta pobre en folatos Técnicas de cocimiento (destrucción del folato) Pobreza Alcoholismo</p>
<p><i>Malabsorción de causa intestinal</i></p> <p>Esprue tropical Esclerodermia Amiloidosis Esteatorrea</p>
<p><i>Inducida por fármacos</i></p> <p>Antifolicos antagonistas (metrotexato, trimetoprim, triamtereno y pentamidina) Anticonvulsivantes (difenilhidantoina) Anticonceptivos orales</p>
<p><i>Aumento de requerimiento</i></p> <p>Prematuridad Embarazo Lactancia Hemolisis crónica</p>

Tabla No 3. Causas de la deficiencia de Acido Fólico
Fuente: Sans, S. *Hematología Clínica*, 1988.

a) Ingesta inadecuada.- La causa mas común de deficiencia de folato es una ingestión dietética inadecuada de acido fólico. Los grupos de la población más vulnerables a la malnutrición son los deprimidos económicamente, los ancianos y los alcohólicos. Debido a que las reservas de folato son bajas, las deficiencias de folato se desarrollan en 2 a 4 meses o más agudamente si son expuestos a eventos que incrementan en forma importante las necesidades como infecciones severas o embarazo. Además del problema económico influyen los hábitos alimenticios, la cocción de los alimentos por tiempo prolongado y con abundante cantidad de agua (25). Los alcohólicos cuya dieta consiste principalmente de grandes cantidades de alcohol tienen una deficiencia de muchas vitaminas además de la

deficiencia de ácido fólico, el alcohol provoca una disminución rápida (entre 2 – 4 a días) de los niveles séricos de folato (23).

Dentro del grupo infantil, el aporte deficiente es más frecuente en niños prematuros, los cuales cuentan con bajas reservas al nacer, pues durante su etapa intrauterina lo obtuvieron en cantidades insuficientes. (25)

b) Malabsorción de causa intestinal.- Se tienen a enfermedades como el Sprue no tropical, que incluye a la enteropatía inducida por el gluten denominada así porque los pacientes exhiben sensibilidad intestinal anormal a este; se cree que sea mediada por mecanismos autoinmunes. Los pacientes en su mayoría presentan pérdida de peso, malestar abdominal, indigestión, diarrea intermitente o continua y anemia porque se registra deficiencia conjunta de folatos, hierro y en menor medida de vitamina B12.

El Sprue tropical afecta a las porciones más distales del intestino delgado y puede ocasionar cambios combinados de deficiencia de Ácido Fólico y Vitamina B12. Después de un intervalo de semanas a meses sobreviene una etapa carencial secundaria a la malabsorción, al cabo de 6 meses se agrega anemia megaloblástica. (25)

c) Inducida por fármacos.- La interferencia con el metabolismo de los folatos ocasionada por ciertas drogas puede conducir a anemia megaloblástica. Hay dos grandes grupos de drogas: 1) las que solo ocasionalmente causan anemia megaloblástica por un mecanismo de acción que no está bien conocido aun; los anticonvulsivantes, el fenobarbital y los anticonceptivos orales; 2) las drogas que inhiben la acción de la enzima dihidrofolato reductasa, de gran importancia en el metabolismo de los folatos que causan siempre anemia megaloblástica tales como el metotrexate, el trimetoprim.

d) Aumento de requerimiento.-

Anemia megaloblástica del embarazo, La deficiencia de folato es probablemente la más común de las deficiencias de vitaminas en el mundo, las mujeres embarazadas están especialmente predispuestas a desarrollar una deficiencia de ácido fólico debido al considerable incremento en los requerimientos de folato durante el embarazo (26).

El folato juega un papel importante pues es necesario para el aumento del útero, el crecimiento de la placenta y el feto, y para incrementar el volumen celular durante el embarazo. En muchos casos el folato consumido en la dieta no es suficiente para compensar el incremento de la demanda, es así que en el embarazo se exhibe un balance negativo del folato que se refleja en la reducción del folato sérico, folato intraeritrocitario y la aparición de neutrófilos hipersegmentados.

En estudios recientes se ha observado que mujeres embarazadas con una disminución de folato sérico y presencia de anemia megaloblástica dan a luz a recién nacidos con niveles normales de folato sérico, esto sugiere que se ha desarrollado un sistema eficiente que asegura el estado del folato en el feto a expensas de la madre, sin embargo el feto no es absolutamente inmune a la deficiencia de folato, y en algunas circunstancias la deficiencia de folato de la madre puede traer consecuencias severas que incluye abortos inminentes, ruptura de placenta, nacimientos prematuros y defectos de túbulo neural (DTN). (29)

Así pues durante el embarazo los requerimientos de ácido fólico se incrementa de cinco a diez veces debido a la transferencia del folato al feto en crecimiento, lo cual depleta las reservas maternas aun en presencia de deficiencia severa previa (21). Situaciones agravantes son la dieta pobre, la gestación múltiple, infección, medicación. Así pues durante el embarazo los requerimientos de ácido fólico pueden llegar hasta unos 400 mg/dL. En este periodo también se presenta, en condiciones normales, una anemia dilucional causada por el aumento del volumen plasmático en el 40% sobre lo normal; este fenómeno puede instaurarse alrededor del sexto mes de gestación lo que hace que el hematocrito y la hemoglobina disminuyan sin que ello se afecte el aporte de oxígeno al feto. A pesar de lo señalado, la morfología de la médula ósea no se modifica, lo cual permite diferenciar la anemia fisiológica del embarazo de una verdadera anemia megaloblástica por déficit de ácido fólico. Por otro lado, los neutrófilos hipersegmentados, que son guían confiable de anemia megaloblástica temprana.

La lactancia es otro factor que incrementa las demandas del ácido fólico, pues 1 litro de leche materna contiene de 50 a 100 mg de ácido fólico, este valor es en sí el requerimiento basal diario de un recién nacido, es por este motivo que se realiza la suplementación necesaria de la madre durante este periodo. La carencia de ácido fólico puede afectar al crecimiento fetal y posnatal durante el primer año de vida, donde hay una estrecha correlación entre los niveles de ácido fólico y la disminución de los percentiles peso/talla. (30)

En sí hay algunos autores que plantean que el parto prematuro, la toxemia del embarazo, el desprendimiento prematuro de la placenta y los defectos en el cierre del tubo neural están relacionados en ocasiones con la disminución real del ácido fólico en suero y en los tejidos. (31). Debe considerarse deficiencia de folatos en cualquier paciente embarazada que se anemiza sin causa aparente, en especial durante el tercer trimestre de embarazo o en el postparto.

Metabolismo del ácido fólico en el embarazo. Los requerimientos del ácido fólico en una mujer embarazada se cifran de 0.05 – 0.1 mg/día. Durante el embarazo, el incremento de la eritropoyesis materna y el crecimiento fetal provocan un aumento en dichas necesidades, recomendándose un mínimo de 0.15 mg/día. El ácido fólico es transportado de forma activa a través de la placenta hasta el feto, se ha encontrado en muestras de sangre de cordón umbilical la presencia de proteínas fijadoras de folato. Las concentraciones séricas de ácido fólico disminuyen a lo largo de una gestación normal, pudiendo llegar al final del embarazo al 50% del valor previo a la concepción del feto. (6)

d. VITAMINA B12 O COBALAMINA.

Esta vitamina es un complejo órgano-metálico, en el que un átomo de cobalto está situado dentro un anillo de corrina.

1) Estructura química. La vitamina B12 es una cobalamina (PM: 1355) que resulta de la unión asimétrica de 4 anillos pirrólicos (anillo de la corrina) en torno a un átomo central de cobalto (Co⁺⁺), cuya configuración es similar a la

del grupo hemo de la hemoglobina. Pero a diferencia del Hemo, la Cobalamina no puede sintetizarse en el organismo y debe ser aportada por los alimentos.

El anillo de la corrina es parecido al de la porfirina, y se diferencia del mismo por el carácter asimétrico de las uniones entre el grupo pirrol. El Co^{++} , al igual que el Fe^{++} en el grupo Hemo, se une a la corrina para constituir la llamada cobalamina. En esta estructura, el Co^{++} posee 6 valencias de coordinación, de esta cuatro establecen enlace covalente con los correspondientes nitrógenos de los anillos pirrólicos. (Ver Fig. 6)

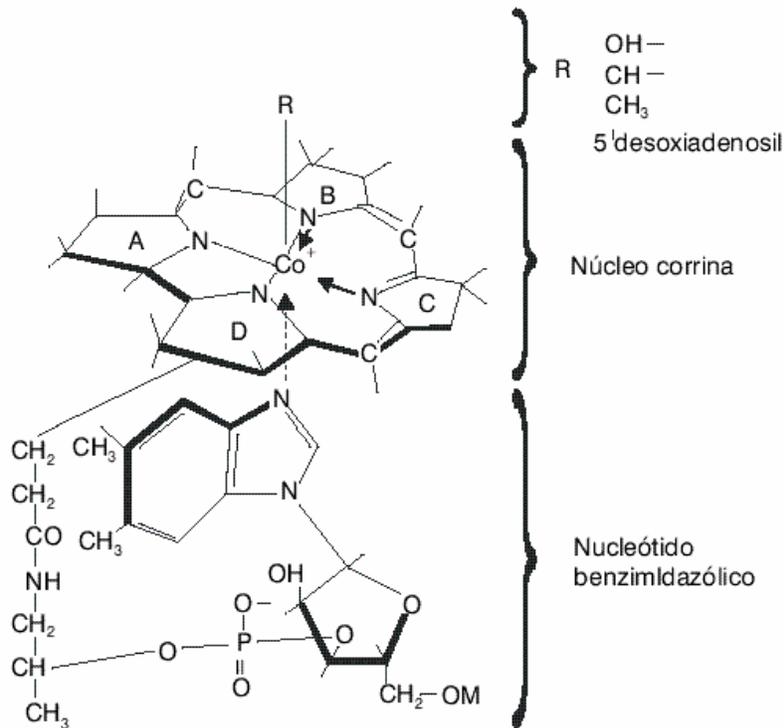


Fig 6. Estructura de la Vitamina B12 o Cobalamina
Fuente: Soler J. *Anemias macrocíticas y megaloblasticas*, 2006.

La quinta valencia de coordinación se halla siempre unida a unseudonucleotido complejo (5,6 -dimetilbencimidazol) y la sexta valencia, al unirse a radicales diferentes, origina los diversos derivados activos de la cobalamina. (Tablas No. 4)

La *hidroxicobalamina* y la *ciancobalamina* (vitamina B12) son formas no fisiológicas de la cobalamina, pero en el organismo se transforman de forma

espontanea en metil y desoxiadensil- cobalamina que son las formas activas o coenzimas. (20)

FORMAS ACTIVAS DE LA COBALAMINA		
Nombre	Radical	Localización preferente
Cianocobalamina (Vitamina B12)	-CN (cianida)	-----
Metilcobalamina	-CH ₃ (metilo)	Plasma sanguíneo
Desoxiadensilcobalamina	-5-desoxiadensil	Hígado de mamíferos
Hidroxicobalamina	-OH (hidroxilo)	Preparado farmacológico

Tabla No 4. Formas activas de la Cobalamina
Fuente: Sans, S. *Hematología Clínica*, 1988.

La Ciancobalamina por exposición a la luz y a los agentes reductores pasa rápidamente a la forma de hidroxicobalamina. La mayor parte de la Vitamina B12 de las células y el hígado se encuentran en las mitocondrias en forma de 5- desoxiadensilcobalamina, mientras que la metilcobalamina es la principal forma de cobalamina en el plasma, aunque pequeñas cantidades de esta coenzima se pueden encontrar en las células.

En el plasma y otros órganos se han detectado otros corrinoides que contienen Co ⁺⁺ que no son cobalaminas, llamados Análogos por su semejanza estructural con la vitamina. El significado biológico de estos análogos de la cobalamina no es aun conocido, pero se ha verificado que algunos de los ellos son inertes y otros también poseen actividad coenzimatica o en otros casos son toxinas o inhibidores de la Vitamina B12.

2) Fuentes Dietéticas y Requerimientos. Aunque la Vitamina B12 es sintetizada activamente por un gran número de bacterias intestinales que se hallan de modo habitual en el organismo humano, el aprovechamiento de ésta es mínimo, ya que la síntesis ocurre en sitios muy distales del lugar de absorción fisiológica de la Vitamina (23). Como producto de esto, la Vitamina B12 debe ser necesariamente aportada por los alimentos, cuya mayor fuente dietética se encuentra en las proteínas animales, ya que las frutas, los cereales y las verduras suelen carecer de Vitamina B12.

Los alimentos más ricos en Vitamina B12 son las vísceras como el hígado (reserva natural), los riñones o el corazón de ovinos (22). En general, la Cobalamina no se destruye por la cocción, pero en condiciones alcalinas y en

presencia de vitamina C puede perderse cierta cantidad de Vitamina cuando ésta se somete a cocción a altas temperaturas.

El 30 % de la Vitamina B12 de los alimentos puede ser análogo de la Cobalamina más que la vitamina nutricionalmente activa o Cobalamina unida a Cobalofilinas (proteínas R), lo que puede limitar su biodisponibilidad. Los requerimientos mínimos diarios de Vitamina B12 oscilan alrededor de los 2 mg, cantidad completamente cubierta por una alimentación mixta normal que contenga entre 5 y 30 mg de Cobalamina, de los que se absorben de 1 a 5 mg. (Ver Tabla 5).

	Grupo de edades	mg Vitamina B ₁₂ / día
	0-2,9 meses	0,3
Lactantes	3-5,9 meses	0,4
	6-11,9 meses	0,5
	1-1,9 años	0,7
Niños	2-5,9 años	1,0
	6-9,9 años	1,5
	10 años o más	2,0
Adultos	Hombre-Mujer	2,0
	Mujer embarazada	2,5
	Mujer lactando	2,5

Tabla No 5. Requerimiento de la Cobalamina según sexo y edad
Fuente: Soler J. Anemias macrocíticas y megaloblasticas, 2006.

3) Absorción de la Vitamina B12. La Vitamina B12 sólo resulta sintetizada por los microorganismos y puede adquirirse por la ingestión de carnes en las cuales ya existe acumulada la vitamina.

El tracto gastrointestinal humano está provisto de un complejo sistema para la absorción eficiente de las mínimas cantidades de Vitamina B12 de la dieta, el cual consta de 5 pasos:

- ✓ Liberación de las Cobalaminas de los Alimentos.
- ✓ Unión de las Cobalaminas y sus Análogos por las Cobalofilinas del estómago.

- ✓ Digestión de las Cobalofilinas en la parte alta del intestino por las Proteasas Pancreáticas con transferencia solamente de las Cobalaminas al Factor Intrínseco [FI].
- ✓ Adhesión del Complejo Vitamina B12- FI al Receptor Específico en el Íleon.
- ✓ Endocitosis y Unión Intracelular a la Transcobalamina II (TcII). (25)

Se debe mencionar que bajo condiciones fisiológicas existen 3 tipos de proteínas que se unen a la vitamina B12 para su absorción: las Haptocorrinas, el Factor Intrínseco y la Transcobalamina. La cobalamina casi nunca se encuentra libre sino conjugada con alguna de estas proteínas.

En el estomago la Vitamina B12 es liberada por la digestión peptídica y por la acción de los ácidos del estomago, este paso es importante para la absorción normal de la vitamina. Una vez liberada del alimento, las cobalaminas se unen a las Cobalofilinas, llamadas también Haptocorrinas o Proteínas R, glicoproteínas (66 kD) que tienen una alta afinidad al pH ácido de las secreciones gástricas.

En el estomago, además, se produce la secreción por las células parietales del Fundus y del Cardias, del Factor Intrínseco de Castle (FI), una glicoproteína termolábil, estable a pH alcalino y que es resistente a la digestión proteolítica y que une a las cobalaminas con alta afinidad y alta especificidad (no une a los análogos de la cobalamina). En su estructura tiene 2 sitios de unión específicos: uno para la cobalamina situado cerca del extremo carboxilo terminal y otro para un Receptor específico Ileal ubicado en el extremo amino terminal.

En presencia de Cobalamina, 2 moléculas del monómero se combinan rápidamente para formar un dímero que une 2 moléculas de Vitamina B12. Cada miligramo de FI une aproximadamente 30 mg de Cobalamina y la cantidad de esta proteína secretada diariamente es suficiente para unir de 40 a 80 mg de Vitamina B12.

La secreción de FI está a cargo de las mismas células que producen al Ácido Clorhídrico, por lo que es estimulada por la presencia de Alimentos en el estómago, por la Gastrina e Histamina.

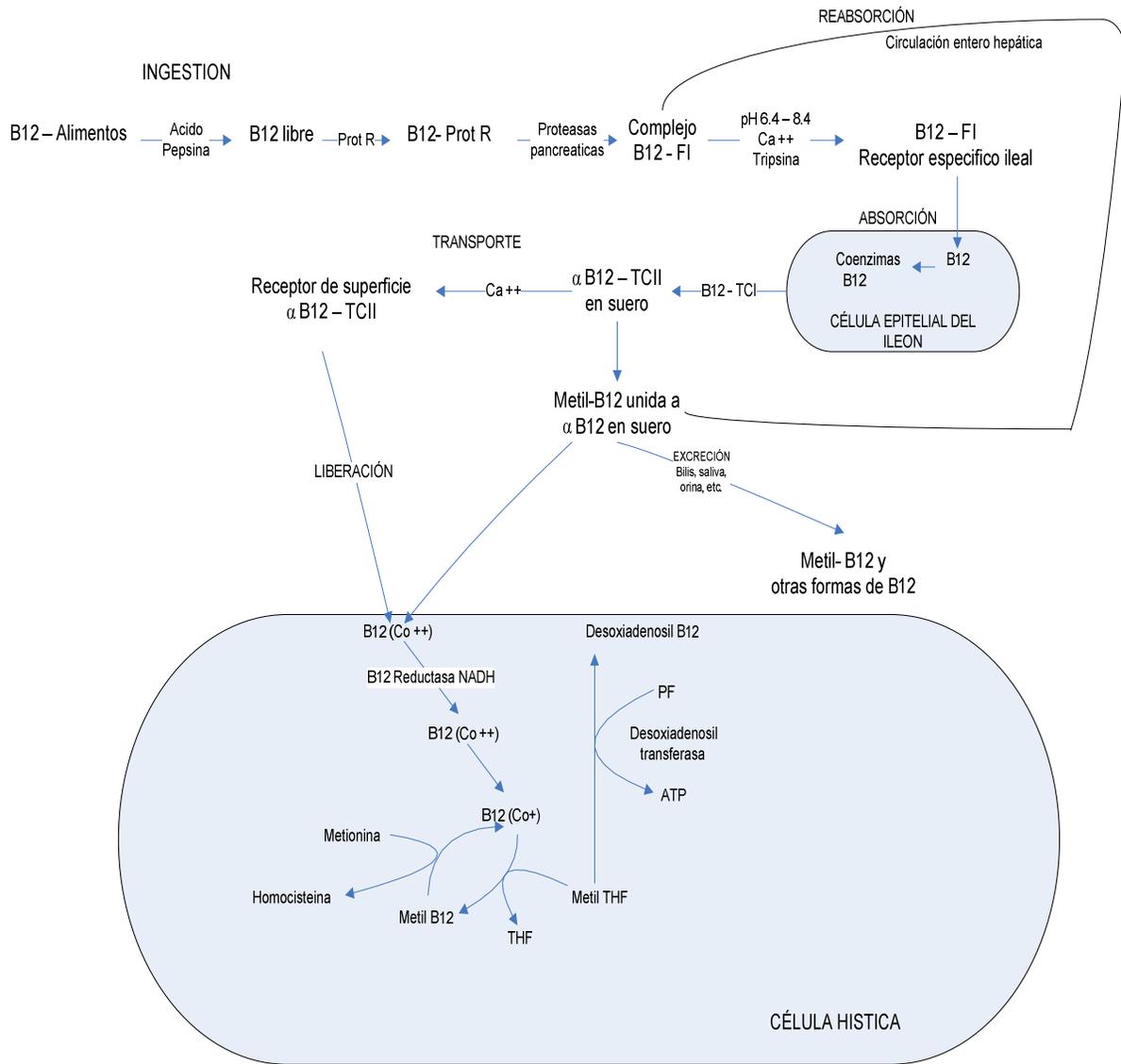


Fig 7. Metabolismo de la Vitamina B12

Fuente: Forrellat, M. Vitamina B₁₂: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia, 2008.

Cuando el complejo Haptocorrina (Proteínas R-Vitamina B12) pasa al duodeno este es expuesto a las enzimas pancreáticas y al pH alcalino del intestino, donde la Proteína R es hidrolizada y la Vitamina B12 queda libre para unirse al FI que presumiblemente la envuelve para protegerla de las enzimas proteolíticas, formando así el complejo FI-Vitamina B12. Este complejo al ser resistente a la digestión, transita a través del intestino hasta llegar al Ileon que es el *Sitio de Absorción de la Cobalamina*, dado que los enterocitos ileales son específicos para esta función.

Al llegar al lleon, los complejos *FI – Vitamina B12* se unen a los Receptores Específicos de la Membrana de las microvellosidades de la célula mucosa (proceso que se realiza a pH 6,4 – 8,4 y requiere cationes divalentes Ca^{++}).

Posteriormente, el *Receptor unido al Complejo FI-Vitamina B12* es internalizado en la célula por endocitosis, pasando a los lisosomas, en donde después de un periodo de 4 – 5 horas se libera la Vitamina B12 por la degradación del FI; las moléculas de Receptores se reciclan hacia las microvellosidades para la captación de nuevos complejos FI- Vitamina B12.

Por su parte, la Vitamina B12 libre en el citosol del enterocito se une a la *Transcobalamina II*, una glicoproteína de transporte que se encarga de su distribución a los tejidos y a los hematíes pasando así a la circulación portal. Este proceso puede durar varias horas y el máximo de Vitamina en sangre se alcanza en 8 horas aproximadamente después de la ingestión. (21)

Aunque la Transcobalamina II es importante para el transporte de la vitamina B12 a los tejidos extrahepáticos metabólicamente activos (Médula Ósea y Cerebro, principalmente), ésta representa sólo el 20 % del total circulante en el plasma; dado que cerca del 80 % de la Vitamina B12 está unida a la Transcobalamina I y III. (25)

La Transcobalamina I parece actuar como almacén de la Vitamina dado que tiene una vida media de 7 a 10 días. Aunque la TC II es el receptor de la Cobalamina recién absorbida, la mayoría de la Cobalamina esta unida a la Transcobalamina I; esto se explica debido a el hecho que la cobalamina unida a la *TC II* desaparece rápidamente de la sangre ($t_{1/2}$ de alrededor de 1 hora), mientras que la eliminación de Cobalamina unida a *TC I* exige muchos días.

4) Metabolismo.- Para llegar a ser útil a la célula, la Cianocobalamina y la Hidroxicobalamina deben llegar a ser convertidas en *5' desoxiadenosil y metilcobalamina*; que son las formas coenzimáticamente activas de la cobalamina. La Cianocobalamina y la Hidroxicobalamina son primero reducidas a Co^{2+} por reductasas dependientes de NADPH y NADH, que están presentes en las mitocondrias y los microsomas.

Durante esta reducción, el cianuro y el hidroxilo son desplazados del metal. Una parte de las Cobalamina (Co^{++}) son reducidas en la mitocondria a la forma intensamente reducida Co^{+} la cual es alquilada por el ATP para formar *5' desoxiadenosilcobalamina* en una reacción en la que la porción 5'

desoxiadenosil del ATP es transferida a la cobalamina y los 3 fosfatos son liberados como trifosfato inorgánico. El resto de la cobalamina se une a la N5 metiltetrahidrofolato- homocisteína metil transferasa citosólica, donde es convertida en *metilcobalamina*.

5) Función metabólica. La cobalamina es un cofactor esencial para dos enzimas de las células humanas: la metionina sintasa y la metilmalonil-CoA sintasa. Existen dos formas de Cobalamina con actividad metabólica que se diferencian por el grupo alquilo unido a la sexta posición de coordinación del átomo de Cobalto: la metilcobalamina y la adenosilcobalamina que dan lugar a 2 rutas fisiológicas importantes.

Isomerización del metilmalonil-CoA a succinil-CoA. La 5-Desoxiadenosil cobalamina actúa como coenzima activo catalizando la reacción en la que el enzima *metilmalonil CoA mutasa* realiza un reordenamiento químico, la conversión de L-MetilmalonilCoA en Succinil CoA; esta reacción es muy importante en la reutilización mitocondrial de la propionil-CoA (procedente de la oxidación de los ácidos grasos) para obtener energía en forma de ATP, el déficit de la 5-Desoxiadenosil cobalamina produce una acumulación intracelular de metilmalonil-CoA; se plantea que la acumulación de este compuesto en el tejido nervioso sería el principal responsable de las manifestaciones neurológicas asociadas al déficit de la vitamina B12.

Desmetilación de la homocisteína a metionina. Esta reacción catalizada por la enzima homocistein-metil-transferasa se halla íntimamente relacionada con el metabolismo del ácido fólico, ya que esta acoplada a la transformación de 5 – metil-THF (forma circulante del ácido fólico) en THF. La forma activa de la vitamina B12 en esta reacción es la metilcobalamina y su déficit condiciona un descenso del THF o de una de sus formas activas intracelulares, en especial del 5,10-metilen-THF, cofactor fundamental en la síntesis del DNA. (Ver Fig. 8)

Metionina Sintasa:



Fig 8. Reacción química para la síntesis de Metionina
Fuente: Soler J. Anemias macrocíticas y megaloblásticas, 2006.

Como se menciona al existir un déficit se trastorna el metabolismo del folato, y al tratarse de la Metionina un sustrato para la síntesis del DNA se presenta el *Patrón de Maduración Megaloblástica* que se observa en los pacientes con deficiencia de Vitamina B12.

Cuando existe una carencia de Cobalamina, el *N5- Metiltetrahydrofolato no conjugado* que acaba de pasar a la circulación no puede convertirse en otras formas de Tetrahydrofolato mediante la transferencia de Metilos. Ésta es la llamada *hipótesis* del “Atrapamiento de Folatos”. Como el *N5-Metiltetrahydrofolato* es un mal sustrato de la enzima de conjugación, gran parte del mismo se mantiene en forma no conjugada y sale lentamente de las células. Así, aparece el déficit tisular de Folatos y, seguidamente, la Eritropoyesis Megaloblástica. Esta hipótesis explica que los depósitos de Folato estén considerablemente disminuidos en la carencia de Cobalamina, dado que tanto la Vitamina B12 como el Folato participan coadyuvándose en las mismas vías metabólicas y por ende exista una disminución desproporcionada de los Folatos conjugados con respecto a los No Conjugados, aunque en el suero existan valores de folato normales. También ayuda esto a explicar que los Folatos en grandes dosis sean capaces de producir una remisión hematológica parcial en los pacientes con carencia de Cobalamina.

Las alteraciones Megaloblásticas, tanto en la carencia de Cobalamina como en la de Folato, están relacionadas con una deficiencia de producción de dTMP. Además, el exceso de Desoxiuridilato que se acumula puede fosforilarse e incorporarse erróneamente al ADN en lugar del Timidilato; el emparejamiento de bases puede resultar afectado por este reemplazo de T por U. (Ver Fig. 9)

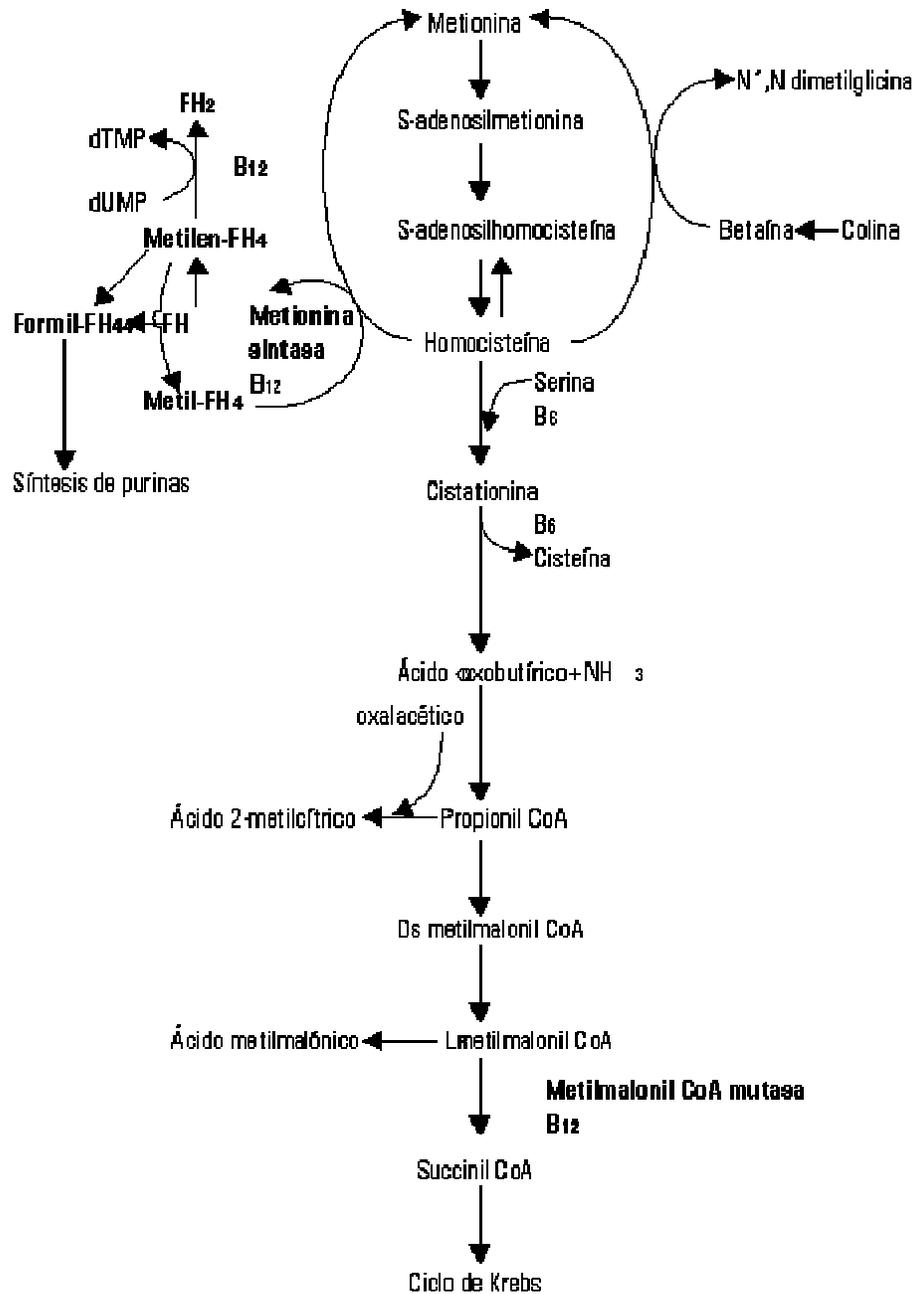


Fig 9. Vías metabólicas en las que participan el ácido fólico y la cobalamina
Fuente: Pita, Gisela. *Ácido fólico y vitamina B12 en la nutrición humana*, 2008

6) Causas de la deficiencia de Vitamina B12. Las causas de deficiencia de Vitamina B12 se resumen en la Tabla No.6

CAUSAS DEL DÉFICIT DE VITAMINA B12	
<i>Alteraciones de la dieta</i>	
En vegetarianos Dietas pobres en productos animales	
<i>Alteraciones de absorción</i>	
I.	Defectos gástricos
	1. Anemia perniciosa
	2. Gastritis
II.	Defectos intestinales
	1. Malabsorción.
	2. Uso de drogas: Colchicina, Neomicina
III.	Defectos metabólicos
	1. Deficiencia de B12 (disminución de TC II o aumento de TC I)
	2. Producción deficiente de coenzima B12.

Tabla No 6. Causas de la deficiencia de Vitamina B12
Fuente: **Velez, H.** *Hematología, 2002.*

De esta lista la causa mas frecuente de deficiencia de Vitamina B12 es la anemia perniciosa cuyo defecto principal es la falta de la secreción del factor intrínseco asociado con la atrofia de la mucosa glandular del fundus gástrico.

7) Metabolismo de la Vitamina B12 en el Embarazo. Aproximadamente el 20% de las mujeres muestra un descenso fisiológico en el nivel de vitamina B12 sérica durante el embarazo. Se ha encontrado que existe una concentración significativamente elevada de vitamina B12 en el cordón umbilical lo que supone que existe un gradiente de los niveles de vitamina B12 de la madre al feto mediada por un transporte activo. (32)

Así mismo la deficiencia de vitamina B12 puede ser responsable de abortos espontáneos, debido a que la vitamina B12 esta involucrada en el metabolismo de metionina – homocisteina lo que daría lugar a una hiperhomocisteinemia causante de los abortos. (18)

e. **HEMATOPOYESIS MEGALOBLASTICA.** Se denomina hematopoyesis megaloblástica a un conjunto tanto de alteraciones morfológicas como bioquímicas de las células hematopoyéticas que aparecen como consecuencia de una disminución en la síntesis de DNA durante la fase S del ciclo celular. Como consecuencia de ello, la mayoría de las células hematopoyéticas se hallan en un intento laborioso, la mayoría de los casos frustrado, de duplicar su contenido en DNA y así poder iniciar la división celular (ver Fig 10) (33). Aunque

la causa mas frecuente de hematopoyesis megaloblástica es la carencia de vitamina B12 y/o acido fólico existen otros mecanismos adquiridos o congénitos capaces de alterar la maduración nuclear y originar una expresividad clínica y morfológica similar. Estas formas de megaloblastosis no carencial suelen ser refractarias a dosis farmacológicas de una o ambas vitaminas.

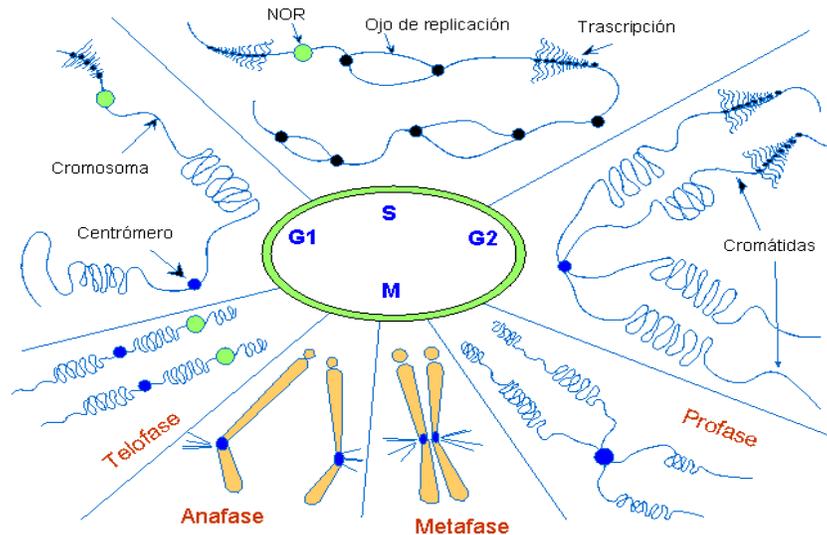


Fig 10. Síntesis de DNA y fases del Ciclo Celular
Fuente: Rocha K. Ciclo Celular, 2008.

Aunque la hematopoyesis megaloblástica afecta simultáneamente a todas las líneas, las alteraciones eritroblásticas hacen que la anemia sea el signo más significativo de la enfermedad.

1) Alteraciones bioquímicas. La megaloblastosis obedece a un descenso de la síntesis de DNA. En la hematopoyesis normal, las células con capacidad de autoduplicarse se encuentran, la mayor parte del tiempo, en fase de reposo. Cuando se inicia la división celular doblan rápidamente su contenido en DNA, se dividen, y cada célula vuelve a la fase de reposo.

En la hematopoyesis megaloblástica, por el contrario, el alargamiento de la fase S hace que en cualquier momento se hallen muchas mas células intentando duplicar su contenido en DNA que en fase de reposo. Por ello su observación en el microscopio óptico muestra un tamaño superior al normal y una cromatina finamente reticulada, característica del retraso madurativo nuclear. Debido a que esta alteración no se acompaña de trastornos en la síntesis de RNA o de hemoglobina, el citoplasma de los eritroblastos presenta un contenido hemoglobínico normal, de acuerdo con su etapa madurativa

correspondiente. El descenso de la síntesis de DNA junto a una síntesis normal de ARN y hemoglobina es el sustrato bioquímico de las alteraciones morfológicas características de los megaloblastos, conocidas como "disociación madurativa núcleo citoplasmática", de tanto valor en el diagnóstico de la enfermedad. (22)

La hematopoyesis megaloblástica se acompaña de otras alteraciones bioquímicas secundarias que pueden apreciarse a nivel de las propias células (aumento de ciertas actividades enzimáticas relacionadas con la glucólisis) o en el plasma sanguíneo (elevación de la actividad lacticodeshidrogenasa o LDH serica y de la bilirrubina no conjugada). El aumento de la actividad LDH serica y de la hiperbilirrubinemia "indirecta" son una consecuencia de la eritropoyesis ineficaz característica de la megaloblastosis, cuya presencia puede demostrarse mediante cinética. La eritropoyesis ineficaz constituye el mecanismo fisiopatológico principal de la anemia megaloblástica, aunque ello contribuye también la hemólisis periférica de los hematíes (macrovalocitos) surgidos de la eritropoyesis megaloblástica.

2) Alteraciones morfológicas. El trastorno madurativo nuclear afecta de manera simultánea a las 3 líneas celulares sanguíneas (eritropoyética, granulopoyética y trombocítica), por lo que en mayor o menor grado se expresa morfológicamente a nivel de todas ellas. Las alteraciones morfológicas de la hematopoyesis megaloblástica son manifiestas tanto en la médula ósea como la sangre periférica.

La *médula ósea* se caracteriza por un aumento de la riqueza celular, preferentemente a expensas de las serie eritroblastica. La mayoría de los eritroblastos presentan alteraciones morfológicas que consisten en un aumento del tamaño y una disociación madurativa nucleocitoplasmica (megaloblastos). En general, la megaloblastosis puede observarse en todos los estadios madurativos de la eritropoyesis: promegaloblastos, megaloblastos basofilos, megaloblastos policromáticos grandes, megaloblastos policromáticos pequeños y megaloblastos ortocromáticos. (18)

Debe destacarse que la presencia de megaloblastos ortocromáticos es de gran ayuda diagnóstica, ya que tales células presentan unas características morfológicas muy diferentes a las de los correspondientes eritroblastos normales con igual grado de maduración, es decir un mayor tamaño nuclear

(cromatina finamente reticulada) y citoplasma abundante con elevado contenido en hemoglobina.

Estas alteraciones se acompañan prácticamente siempre de alteraciones morfológicas de las restantes líneas madurativas celulares sanguíneas. En la línea granulopoyética, el bloqueo madurativo nuclear produce la aparición de metamielocitos de tamaño superior al normal que, en general, contienen una cantidad de DNA superior a la del estado diploide normal (2N), estas células se denominan metamielocitos gigantes y al igual que los megaloblastos, son una consecuencia de la asincronía madurativa entre el núcleo y el citoplasma celular. Gran número de estos elementos no maduran a polinucleares neutrofilos y desaparecen en la propia medula (granulopoyesis ineficaz) con lo que si la granulopoyesis ineficaz es lo más intensa, puede causar leucopenia. La eritropoyesis megaloblástica tiene su expresión a nivel de sangre periférica a través de alteraciones morfológicas características. Así, los hematíes se caracterizan por un tamaño superior al normal (VCM mayor a 100 fL) y una forma generalmente oval (macrovalocitos). En los casos de anemia muy intensa pueden observarse también eritroblastos circulantes o "hematíes nucleados". Al igual que sucede en la medula ósea, las alteraciones morfológicas de sangre periférica no se limita a los hematíes, sino que afectan también a las otras células, siendo el hallazgo mas frecuente una hipersegmentación y aumento del tamaño de los polinucleares neutrófilos.

f. DIAGNOSTICO DE LA ANEMIA MEGALOBLASTICA.

1) Datos clínicos. El principio de la anemia megaloblástica puede ser insidiosa con la sintomatología clásica de una anemia, es decir letargia, debilidad y palidez amarilla o cérea. La perdida de peso, apetito, nauseas, diarrea, úlceras bucales y perdida de pelo suelen ser quejas comunes. Es característica de una deficiencia crónica la glositis con una lengua roja carnososa, dolorosa e hinchada.

Las perturbaciones neurológicas se producen solo en la deficiencia de cobalamina y no de acido fólico, en ocasiones los pacientes presentan una disfunción neurológicas incluso antes del desarrollo de la anemia o de la macrocitosis. (20).

2) Datos de laboratorio.

a) **Sangre periférica.** La anemia megaloblástica es clásicamente normocrómica macrocítica. El VCM suele ser mayor de 100 fL y pueden llegar a alcanzar un volumen de 140 fL. En la deficiencia de cobalamina es posible que una macrocitosis preceda por meses a años al desarrollo de la anemia. (Ver Fig. 11)



Fig. 11. Anemia megaloblástica, sangre periférica. Tinción Giemsa
Fuente: **Soler Díaz**. *Macrocitosis y Megaloblastosis*, 2006.

Las alteraciones epiteliales en las vías gastrointestinales pueden deteriorar la absorción de otro componente como el hierro, si con la anemia megaloblástica coexiste una deficiencia de hierro, esta produce característicamente una anemia microcítica hipocromica, de manera que la macrocitosis puede enmarcarse. Los valores hemáticos varían considerablemente. Las cifras de hemoglobina y de eritrocitos varían de normales a muy bajos; en algunas ocasiones la cifra de eritrocitos puede ser menor a 1×10^{12} /L. En la deficiencia de cobalamina la anemia no es siempre evidente. A diferencia de otras anemias, que afectan de forma clásica a los eritrocitos, las anemias megaloblásticas afectan a tres líneas celulares: eritrocitos, leucocitos y plaquetas. (20)

En el frotis teñido de sangre las características distintivas de la anemia megaloblástica incluyen la triada de macrocitos ovales (macroovalocitos), cuerpos de Howell-Jolly, y neutrófilos hipersegmentados. La anisocitosis es de moderada a intensa con normocitos y unos cuantos microcitos además de los macrocitos. La presencia de policromatofilia y eritrocitosis nucleados indica un inútil intento de la médula ósea para aumentar la masa eritrocitaria periférica. En la anemia megaloblástica pueden encontrarse neutrófilos hipersegmentados (con más de cinco lóbulos) aun en ausencia de macrocitosis. Por tanto es posible que los neutrófilos

hipersegmentados sea un indicio de anemia megaloblástica en presencia de una enfermedad coexistente la cual tienda a mantener el volumen de los eritrocitos por debajo de los 100 fL. (22)

b) Medula ósea. Si los hallazgos en sangre periférica sugieren una anemia megaloblástica, el examen de la medula ósea ayuda a establecer un diagnóstico definitivo donde la anemia megaloblástica se caracteriza por una maduración nuclear y citoplasmática asincrónica en todas las líneas celulares mieloides y eritroides. Es frecuente la detención del desarrollo de las líneas celulares en la fase S de la síntesis de DNA. En estos estados la medula ósea es hiper celular con un aumento de los precursores eritroides y disminución de la proporción mieloide a eritroide (M:E). El núcleo de los megaloblastos contiene la cromatina laxa abierta que se tiñe de forma deficiente. Los leucocitos y las plaquetas también muestran las características clásicas de un defecto de maduración nuclear. Se diagnostica la presencia de metamielocitos gigantes y neutrofilos en banda con cromatina laxa abierta en los núcleos.

c) Análisis de deficiencia de ácido fólico. Entre los métodos para el análisis de este componente se hallan el análisis microbiológico, el radioinmunoanálisis y la quimioluminiscencia. El análisis microbiológico usa bacterias cuya proliferación y replicación requieren ácido fólico. El microorganismo más usado es el *Lactobacillus casei*. El radioinmunoanálisis es más rápido y conveniente que los análisis microbiológicos y no es afectado por antibióticos.

La quimioluminiscencia es un método reciente de uso para la detección de ácido fólico y presenta una elevada sensibilidad y especificidad, este es un ensayo competitivo quimioluminiscente en fase líquida, su alta especificidad se debe al uso de un ligando marcado y un sistema de detección antiligando, la sensibilidad del ensayo es de 0,8 ng/mL.

Para diagnosticar la deficiencia de Folato deben disminuir los valores tanto séricos como del eritrocito. El Folato del eritrocito es un reflejo del Folato disponible cuando el eritrocito madura en la medula ósea, siendo entonces que el Folato intraeritrocitario es un indicador de las reservas de Folato. Las concentraciones escasas del Folato en suero suelen indicar una deficiencia inminente del ácido fólico y preceden a la deficiencia de

Folato del eritrocito. Ni el Folato sérico o el del eritrocito son buenos indicadores de las reservas de Folato en presencia de deficiencia de cobalamina ya que esta es necesaria para conservar la variedad conjugada del Folato dentro de las células. (34)

d) Análisis de deficiencia de Vitamina B12. La cobalamina en suero es un reflejo de las reservas corporales de la vitamina. Puede medirse por el análisis microbiológico convencional, con el análisis de dilución con radioisótopo o por quimioluminiscencia.

El análisis microbiológico emplea bacterias que requieren cobalamina para su proliferación. Los dos microorganismos más comúnmente usados *Lactobacillus leichmanii* y *Euglena gracilis*. Estas bacterias proliferan normalmente en medios de cultivo definidos con adición de grandes cantidades de cobalamina. La proliferación bacteriana en los medios de cultivo sin adición de cobalamina, pero con la muestra de suero de paciente se compara con la curva de proliferación bacteriana en el medio de cultivo definido con concentraciones conocidas de cobalamina.

El radioinmunoanálisis es el método preferido para determinar los niveles de cobalamina, es más rápido y fácil de realizar, para este método se usa factor intrínseco purificado como proteína fijadora, solo se enlaza y mide la cobalamina, y los resultados son similares a los de los análisis microbiológicos. (20)

La quimioluminiscencia es un método de uso reciente, este es un inmunoensayo enzimático competitivo en fase sólida que emplea el factor intrínseco purificado porcino, donde la vitamina presente en la muestra de suero compete con un análogo que compete con el análogo de la fase sólida por una serie de puntos de unión de la vitamina B12 en el factor intrínseco purificado, para la detección se introduce un anti factor intrínseco porcino marcado con fosfatasa alcalina que reacciona con el sustrato quimioluminiscente. (32)

La cobalamina en el suero puede presentarse disminuida falsamente (sin que haya deficiencia real de vitamina B12) en la deficiencia de ácido fólico, en el embarazo, con el uso de anticonceptivos orales, con terapéutica anti fólica (con el uso de análisis microbiológico).

VII. MARCO CONCEPTUAL

1. **Astenia:** f. Falta o pérdida de fuerza. ⁽³⁵⁾
2. **Anisocitosis:** f. Desigualdad en el tamaño de las células, especialmente de los glóbulos rojos. ⁽³⁵⁾
3. **Cobalofilinas:** f. Llamadas también Haptocorrinas o Proteínas R, son glicoproteínas (66 kD) que tienen una alta afinidad al pH ácido de las secreciones gástricas, que se encargan del transporte de vitamina B12. ⁽³⁵⁾
4. **Cuerpos de Howell- Jolly:** Gránulos esféricos de color morado o violeta en el eritrocito. Estas inclusiones de DNA suelen presentarse de forma aislada en la célula, se acompañan de anomalías de la maduración nuclear como la anemia megaloblástica ⁽²⁰⁾
5. **Eritroblasto:** m. Célula nucleada, precursora de la serie eritrocítica. De acuerdo con su basofilia citoplasmática, se clasifican en eritroblasto basófilo, policromatófilo y acidófilo. ⁽³⁵⁾
6. **Esteatorrea:** f. Presencia de grandes cantidades de grasa en las deposiciones. ⁽³⁵⁾
7. **Factor intrínseco (FI):** f. Proteína secretada por la mucosa gástrica que permite la absorción de la vitamina B12. ⁽³⁵⁾
8. **Hidrocefalia:** f. Dilatación anormal de las de las cavidades ventriculares cerebrales a consecuencia de una alteración de la dinámica normal del líquido cefalorraquídeo. ⁽³⁵⁾
9. **Macrocitosis:** f. Formación de macrocitos (eritrocito grande, de 8, 5 a 11 μ m de diámetro) ⁽³⁵⁾
10. **Megaloblasto:** f. Precursor eritroide nucleado grande con retardo de la maduración nuclear con respecto a la maduración citoplasmática. ⁽³⁵⁾
11. **Neutrófilos hipersegmentados:** Granulocito maduro presente en sangre periférica en la anemia megaloblástica, cuyo núcleo está segmentado con más de 5 lóbulos. ⁽³⁵⁾
12. **Nucleosido:** Combinación de un azúcar y una base purínica o pirimidínica, producto de la desnaturalización de un nucleótido. ⁽³⁵⁾
13. **Pirimidina:** Es la 1,3 – diacina, sustancia heterocíclica cuyos derivados son componentes de los ácidos nucleicos (timina, citosina, uracilo). ⁽³⁵⁾
14. **Preeclampsia:** Estado de toxemia que precede a la aparición de la eclampsia. ⁽³⁵⁾
15. **Puerperio:** f. Sobreparto, periodo desde el parto hasta que los órganos genitales y el estado general vuelven a adquirir las características anteriores a la gestación. ⁽³⁵⁾

VIII. DISEÑO METODOLÓGICO

A. POBLACIÓN EN ESTUDIO

La población en estudio para esta investigación estuvo constituido por 51 mujeres embarazadas cuya edad oscilaba entre 17 a 41 años, cada una de las cuales se encontraba en diferente periodo gestacional (es decir primer, segundo y tercer trimestre de gestación), se trataron de pacientes externas que asistieron al Hospital de la Mujer realizando su control de natalidad durante los meses de agosto a diciembre de la gestión 2009, a cada una de las cuales se realizo un cuestionario (Anexo 1) previo Consentimiento Informado (Anexo 2). El muestreo realizado para el estudio fue de tipo no aleatorio debido a que la población en estudio fue determinada mediante proceso de selección en base a los siguientes criterios:

1) Criterios de Inclusión

Pacientes externas que asistieron a la unidad de laboratorio del Hospital de la Mujer, así mismo estas pacientes se hallaban en estado de gestación (en cualquiera de los tres trimestres de embarazo).

2) Criterios de Exclusión

No se admitieron en el estudio pacientes expuestas frecuentemente a animales o a productos séricos animales, dado que los anticuerpos heterofílicos presentes en el suero causan interferencia, así mismo pacientes que emplearon algún tipo de fármaco considerado antifólico o anticobalaminico (metrotexato, trimetoprim, triamtereno y pentamidina), y que cursen alguna otra enfermedad diagnosticada previamente.

B. AMBITO DE ESTUDIO

La presente tesina se realizo en la ciudad de La Paz , en la zona de Miraflores, Avenida Saavedra donde se halla ubicado el “Hospital de la Mujer”, que cuenta con varios servicios a disposición de la población, entre los servicios prestados se halla la unidad de Laboratorio a cargo de la Dra. Nancy Siles, a esta unidad de servicio acuden pacientes externas e internas que se hallan en gestación u otras que se realizan un control de prevención o diagnostico de alguna patología, siendo las pacientes gestantes

que acuden a este servicio de forma externa las participantes de este estudio, fue en este ambiente donde se realizó el levantamiento de datos y la recolección de muestras. El procesamiento de cada una de las muestras obtenidas se realizó en el Instituto "SELADIS" ubicado en la Zona Miraflores, Avenida Saavedra, este instituto cuenta con 11 unidades de Laboratorio que incluyen el área de Hematología a cargo de la Dra. Zorka Castillo y la unidad de Endocrinología y Biomarcadores a cargo de la Dra. Heidi García, fue en estas unidades donde se realizó la parte práctica del presente trabajo.

C. TIPO DE INVESTIGACION

Se trató de un estudio de investigación transversal y observacional.

D. ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis estadístico se emplearon los indicadores estadísticos de Frecuencia Absoluta, Chi cuadrado, Tablas y Coeficiente de Contingencia y ANOVA de un factor, cada uno de estos indicadores fue evaluado empleando los programas SPSS 15.0 y Excel 2007.

E. TECNICA, MATERIALES Y METODOS

1) Materiales y reactivos

a) Material

- Micropipetas marca "Eppendorff" de 10 – 100 uL; 100 – 1000 uL
- Parafilm
- Baño de aceite a 100 °C
- Termómetro de mercurio
- Hornilla eléctrica
- Tubos eppendorf de 1mL
- Tubos colectores
- Capilares con heparina
- Portaobjetos
- Cronómetro
- Gradillas para tubos y eppendorf
- Jeringas de 5 mL
- Torundas de algodón

b) Equipos

- Centrifugadora “Presvac”
- Microcentrifugadora para capilares “Haematokrit 210 – Hettich”
- INMULITE 1000 Systems
- Microscopio “Olimpus BH-2”

c) Reactivos

- EDTA al 7% ¹
- Tinción Wright ²
- Tampón Fosfato ³

Acido fólico

- Proteína de unión de Acido Fólico (captura al Acido Fólico de la muestra)
- Fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada con antiligando
- Solución trabajo: Solución Tampón borato – KCN
- Solución Ditiotritol
- Ajustadores de Acido Fólico

Vitamina B12

- Solución trabajo: Solución Tampón Borato-KCN
- Solución Ditiotritol
- Ajustadores para Vitamina B12
- Proteína de unión para Vitamina B12 (FI porcino purificado)
- Fosfatasa alcalina conjugado a un Ac murino anti-Factor intrínseco
- Agua INTI
- Solución LECO

2) Método: Quimioluminiscencia.

La Quimioluminiscencia (QL) se define como la emisión de radiación electromagnética (normalmente en la región del visible o del infrarrojo cercano) producida por una reacción química. Como la intensidad de emisión está en función a la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción, es posible cuantificar al analito de estudio. La aplicación de la QL se llevo a cabo gracias al estudio de varias sustancias como el luminol y la lucigenina. (36)

^{1,2,3} Preparación ver Anexo No. 3

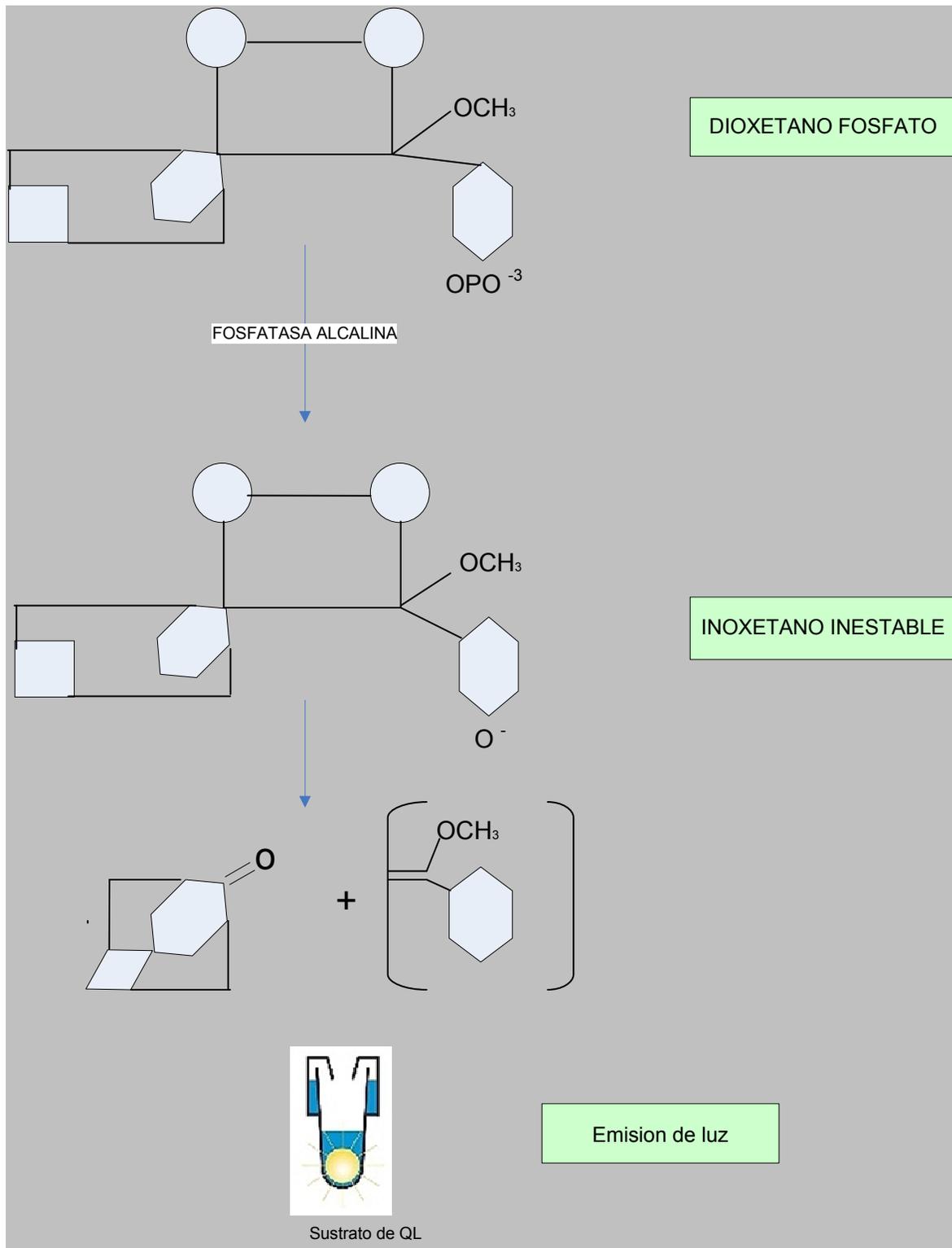


Fig 12. Fundamento de la Quimioluminiscencia
Fuente: García, AM. Quimioluminiscencia una interesante alternativa para detección analítica en sistemas de flujo

3) Equipo.

El equipo empleado para la determinación de Acido Fólico y Vitamina B12 (Cobalamina) fue INMULITE 1000, equipo automatizado que cuenta con un sistema complejo que monitorea de manera constante los reactivos, identificando las muestras mediante código de barras al igual que el tipo de pruebas a ser realizada en cada una de las muestras; debido a su alta especificidad y sensibilidad se ha empleado el equipo en detección de marcadores tumorales y hormonales principalmente.



Equipo: Inmulite 1000

4) Obtención de la muestra

- Mediante punción venosa se obtuvo la cantidad de sangre requerida, a partir de las venas de la flexura del codo (vena mediana basilica, vena mediana del antebrazo, para después alicuotarla primero en un tubo que contenía 20 uL de EDTA al 7% (para 1 mL de sangre) y en segundo lugar en un tubo de hemolisis sin anticoagulante; ambos tubos en cada caso fueron identificados previamente.
- Una vez obtenida la muestra, se procedió al llenado del cuestionario (Anexo No.2) según lo establecido previo consentimiento informado. (Anexo No. 3) de cada una de las pacientes.
- Una vez coagulada la muestra esta es centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos, para obtener al menos 600 uL de suero (que no contenga restos de fibrina ni presente hemolisis dado que son interferentes para la cuantificación de ácido fólico y vitamina B12).
- El suero fue separado inmediatamente y fue también identificado, así mismo esta muestra fue protegida de la exposición a la luz y llevada a -20°C para su conservación.

- La muestra de sangre entera con EDTA al 7% fue analizada rápidamente determinando el hematocrito y realizando el frotis sanguíneo respectivo.

5) Determinación de Acido Fólico por Quimioluminiscencia.

a. Utilidad del análisis.

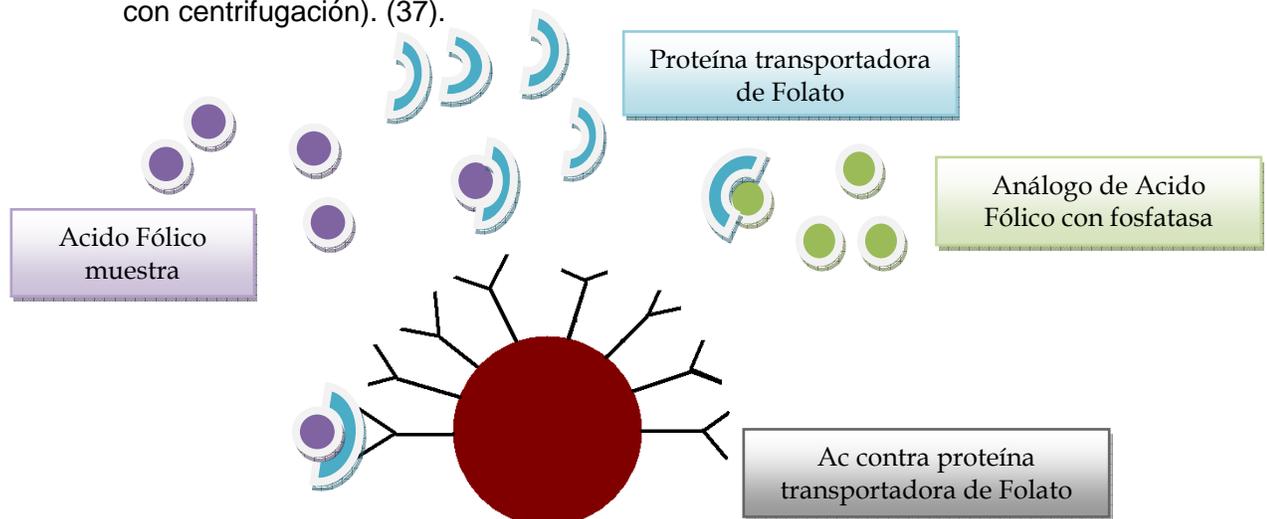
El análisis es empleado para la medición cuantitativa de ácido fólico en suero, o sangre entera tratada con ácido ascórbico, como ayuda en el diagnóstico clínico y tratamiento de anemia megaloblástica. (37)

b. Método.

Se trata de un ensayo competitivo quimioluminiscente en fase líquida.

c. Fundamento del análisis

El ensayo contiene ligando marcado, proteína de unión inmovilizada in situ y un sistema de detección por antiligando. La fase sólida, es una bola de poliestireno encerrada dentro la Unidad de Reacción que esta recubierta con un anticuerpo monoclonal murino específico para la proteína transportadora de ácido fólico. Después del tratamiento de la muestra, la muestra del paciente, el análogo de ácido fólico marcado con ligando y la proteína transportadora de ácido fólico, se introducen simultáneamente en la Unidad de Reacción que contiene una bola de poliestireno recubierta con el análogo de ácido fólico y se incuba por 30 minutos a 37°C. Durante la incubación el ácido fólico presente en la muestra compite con el análogo del ácido fólico marcado con ligando por una cantidad limitada de proteína transportadora de ácido fólico, siendo la misma capturada por el anticuerpo que recubre la bola de poliestireno (el análogo no ligado es entonces eliminado por un lavado con centrifugación). (37).



d. Límites del Método.

No se puede emplear el método de quimioluminiscencia en pacientes sometidos a quimioterapia con Metotrexato. Los anticuerpos heterofilicos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas de los componentes del ensayo provocando interferencias con los inmunoanálisis in vitro. Las muestras de pacientes expuestos frecuentemente a animales presentan este tipo de interferencia. (35)

e. Técnica.

Técnica: Determinación de Acido Fólico por Quimioluminiscencia	
Principio	El ácido fólico presente en la muestra compete con el análogo de ácido fólico marcado con ligando por el transportador de ácido fólico que se une al anticuerpo presente en la bola de poliestireno.
Método	Ensayo competitivo quimioluminiscente en fase líquida
Ciclos de incubación	2 x 30 minutos
Tipo de Muestra	Se puede emplear suero, sangre entera heparinizada pretratada con ácido ascórbico al 1%
Volumen requerido de muestra	Se requiere al menos 200 uL.
Conservación	Si la muestra no es analizada en 8 horas, se debe congelar a - 20°C estable entre 6 - 8 semanas. No exponer a la luz.
Unidades	Los resultados se expresan en ng/mL
Valores de referencia	3 - 24 ng/mL

f. Características analíticas.

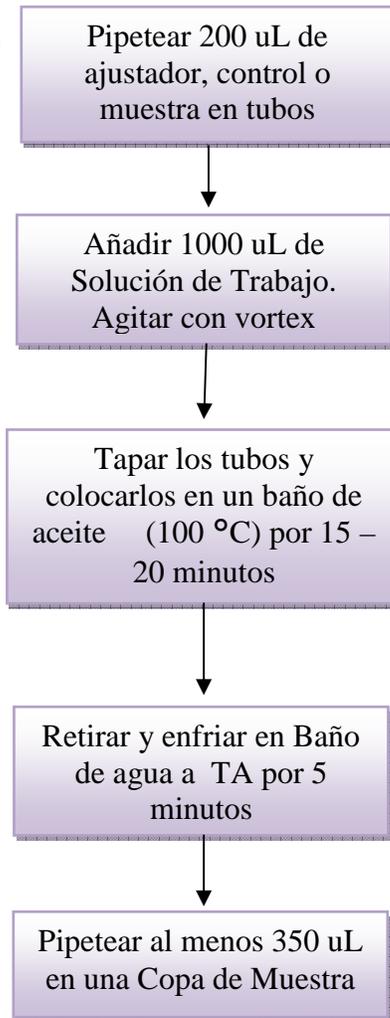
Intervalo de calibración.- 1 a 24 ng/mL

Sensibilidad.- 0.8 ng/mL

Especificidad.- La proteína transportadora es muy específica para ácido fólico y exhibe baja reactividad cruzada con otras sustancias presentes en la muestra del paciente.

g. Ensayo.

PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA



Solución de Trabajo:

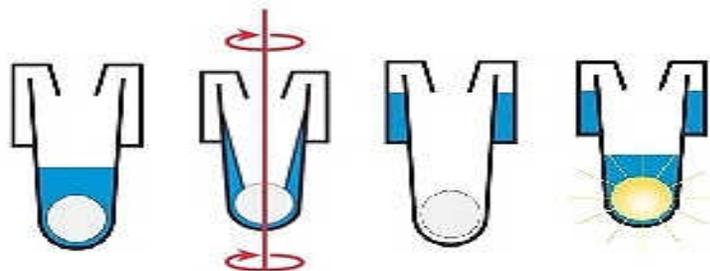
Sol. Tampón Borato-KCN	1000 ul
Folato marcado con ligando	20 uL
Solución DTT	20 uL

Todos los volúmenes corresponden a un ensayo de reacción, debiendo multiplicarse por no. de test a realizarse

Estabilidad:

Las muestras tratadas son estables a TA durante 1 hora antes de su análisis.

INTRODUCIR EN EL EQUIPO INMULITE PARA SU PROCESAMIENTO



La muestra y el reactivo son pipeteadas automáticamente en la unidad de ensayo, la cual es entonces incubada a 37° con una agitación intermitente.

Tras la incubación la unidad de ensayo es centrifugada a alta velocidad sobre su eje vertical. El fluido de reacción es forzado verticalmente y completamente.

Una serie de lavados retira eficientemente el material no unido a la perla o a la parte interior del tubo.

El sustrato quimioluminiscente se añade a la unidad de ensayo. La emisión de luz es leída con un foto contador de alta sensibilidad.

6) Determinación de Cobalamina por Quimioluminiscencia.

a. Utilidad del análisis.

El análisis es empleado para la medición cuantitativa de cobalamina en suero y plasma heparinizado, como ayuda en el diagnóstico y tratamiento de anemia megaloblástica. (34)

b. Método

Inmunoensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida.

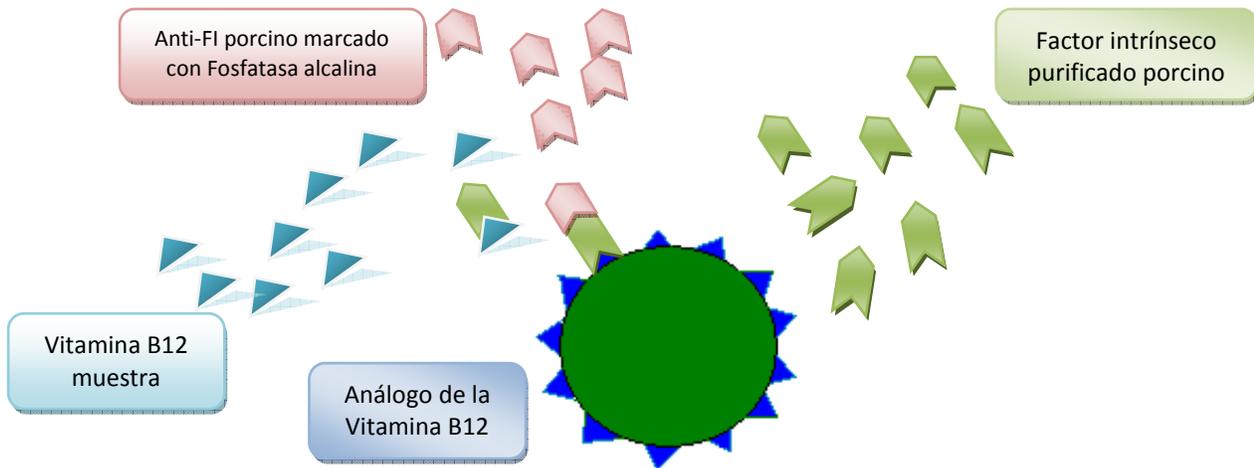
c. Fundamento

La determinación de Vitamina B12 incluye un paso previo de desnaturalización por calor. La vitamina B12 en la muestra del paciente se libera de las proteínas transportadoras por incubación a 100 °C en presencia de ditionitrito y cianuro potásico para inactivar las proteínas transportadoras de vitamina B12, incluso a niveles extremos, así como anticuerpos frente a factor intrínseco.

Después del paso de desnaturalización, la muestra tratada del paciente y el factor intrínseco purificado porcino, se introducen simultáneamente en la Unidad de Reacción que contiene una bola de poliestireno recubierta con un análogo de la vitamina B12 y se incuban durante aproximadamente 30 minutos a 37 °C con agitación intermitente. Durante la incubación, la vitamina B12 presente en la muestra compite con el análogo de la fase sólida por una serie de puntos de unión de la vitamina B12 en el factor intrínseco purificado. Se introduce antifactor intrínseco porcino marcado con fosfatasa alcalina y la Unidad de Reacción se incuba durante otro ciclo de 30 minutos. El conjugado no ligado se elimina por un lavado con centrifugación, después del cual se añade el sustrato para después incubarlo por 10 minutos más. (34).

d. Límites del Método

Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas de los componentes del ensayo provocando interferencias con los inmunoanálisis. Las muestras de los pacientes que están frecuentemente expuestos a animales o a productos séricos animales pueden presentar interferencias que ocasionen un resultado anómalo. (34)



e. Técnica

Técnica: Determinación de Cobalamina por Quimioluminiscencia	
Principio	La vitamina B12 presente en la muestra, se libera de las proteínas transportadoras mediante pre tratamiento con calor, una vez libre compete con el análogo de vitamina B12 por el FI porcino purificado.
Método	Ensayo enzimático quimioluminiscente competitivo en fase sólida.
Ciclos de incubación	2 x 30 minutos
Tipo de Muestra	Se puede emplear suero o plasma heparinizado.
Volumen requerido de muestra	Se requiere al menos 200 uL.
Conservación	Si la muestra no es analizada en 8 horas, se debe congelar a - 20°C estable entre 6 - 8 semanas. No exponer a la luz.
Unidades	Los resultados se expresan en pg/mL
Valores de referencia	180 - 878 pg/mL

f. Características analíticas.

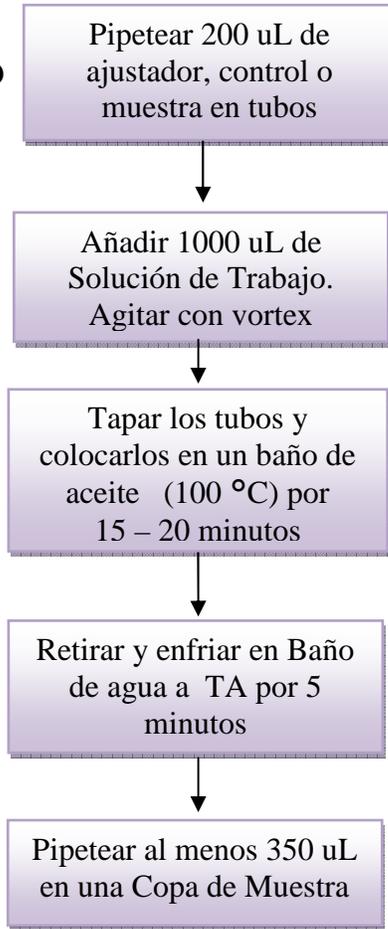
Intervalo de calibración.- 150 - 1200 pg/mL

Sensibilidad.- 125 pg/mL

Especificidad.- En un análisis de mezclas de análogos de Vitamina B12 (conteniendo cobinamida) se demostró que no existe una reacción cruzada incluso a concentraciones altas como 50 000 000 pg/mL.

g. Ensayo.

PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA



Solución de Trabajo:

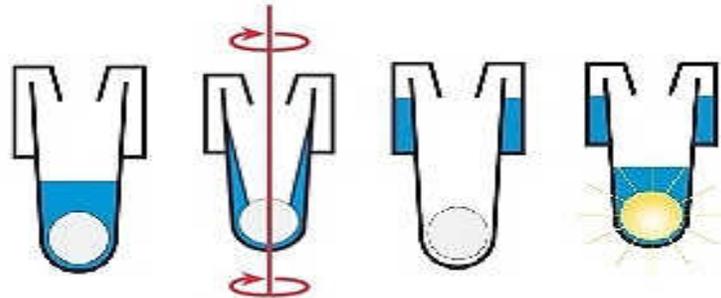
Sol. Tampón Borato-KCN 1000 ul
 Solución Ditiotreitól 20 uL

Todos los volúmenes corresponden a un ensayo de reacción, debiendo multiplicarse por no. de test a realizarse

Estabilidad:

Las muestras tratadas son estables a TA durante 1 hora antes de su análisis.

INTRODUCIR EN EL EQUIPO INMULITE PARA SU PROCESAMIENTO



La muestra y el reactivo son pipeteadas automáticamente en la unidad de ensayo, la cual es entonces incubada a 37° con una agitación intermitente.

Tras la incubación la unidad de ensayo es centrifugada a alta velocidad sobre su eje vertical. El fluido de reacción es forzado verticalmente y completamente.

Una serie de lavados retira eficientemente el material no unido a la perla o a la parte interior del tubo.

El sustrato quimioluminiscente se añade a la unidad de ensayo. La emisión de luz es leída con un foto contador de alta sensibilidad.

7) Determinación de Valor Hematocrito

- Llenar un capilar con la muestra de sangre con anticoagulante EDTA 7%, previa homogenización de la muestra.
- Limpiar con algodón por fuera del capilar.
- Sellar un extremo con plastilina, y dejar en el soporte para hematocrito.
- Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos y sacar inmediatamente de la microcentrifuga para su lectura.
- Realizar la lectura con el lector hematocrito, realizar este procedimiento por duplicado para cada muestra.

8) Tinción Wright y observación en placa

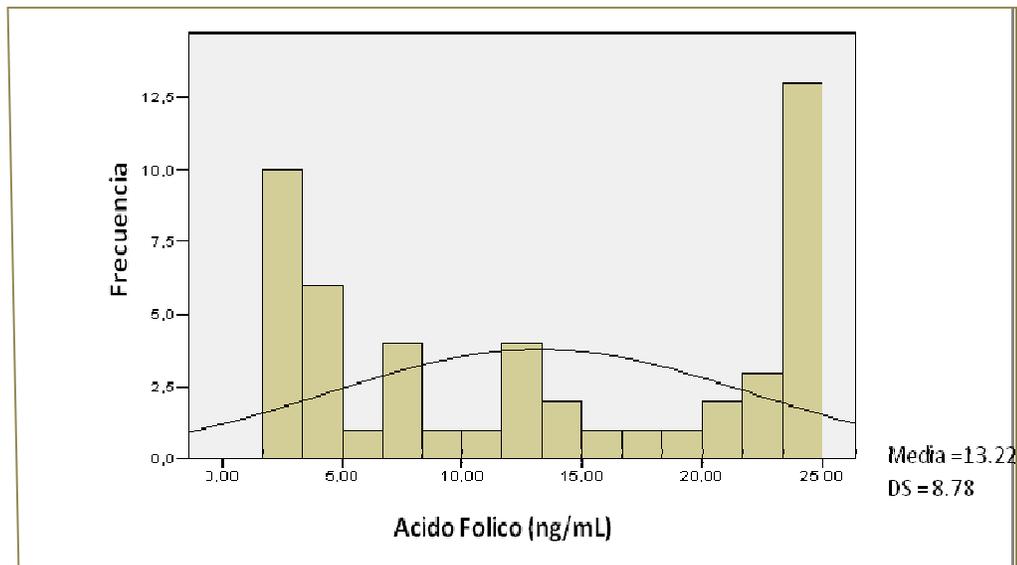
- Realizamos el extendido con la técnica de los 2 portaobjetos. El frotis deberá constar de: cabeza, cuerpo y cola.
- Dejar secar el frotis a temperatura ambiente.
- Identificar la muestra con un lápiz marcándolo en la cabeza del frotis.
- Efectuar la tinción Wright: Cubrir completamente la placa con la tinción Wright dejar actuar por 3 minutos. Pasado el tiempo añadir el Tampón fosfato cubriendo completamente la placa dejar actuar 3 minutos.
- Lavar con agua, con sumo cuidado.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Colocar 1 gota de aceite de inmersión en el frotis y llevar al microscopio.
- Empleando el objetivo de inmersión evaluar tanto la serie roja como la serie blanca (macrocitosis, neutrofilos hipersegmentados).

IX. RESULTADOS

A. Determinación de la concentración de Acido Fólico y Vitamina B12 (Cobalamina) en la población en estudio.

Se llegó a *determinar la concentración de Acido fólico* en la población en estudio ($n=51$), la media de Acido fólico es de 13,22 ng/mL y la desviación estándar es de 8,78. Dado que la muestra esta constituida por mas de 50 pacientes en la prueba de normalidad se asume el test de Kolmogorov-Smirnov que nos indica que los datos no siguen una distribución normal ($p=0.002$), dado que existen valores muy bajos de acido fólico y valores altos.

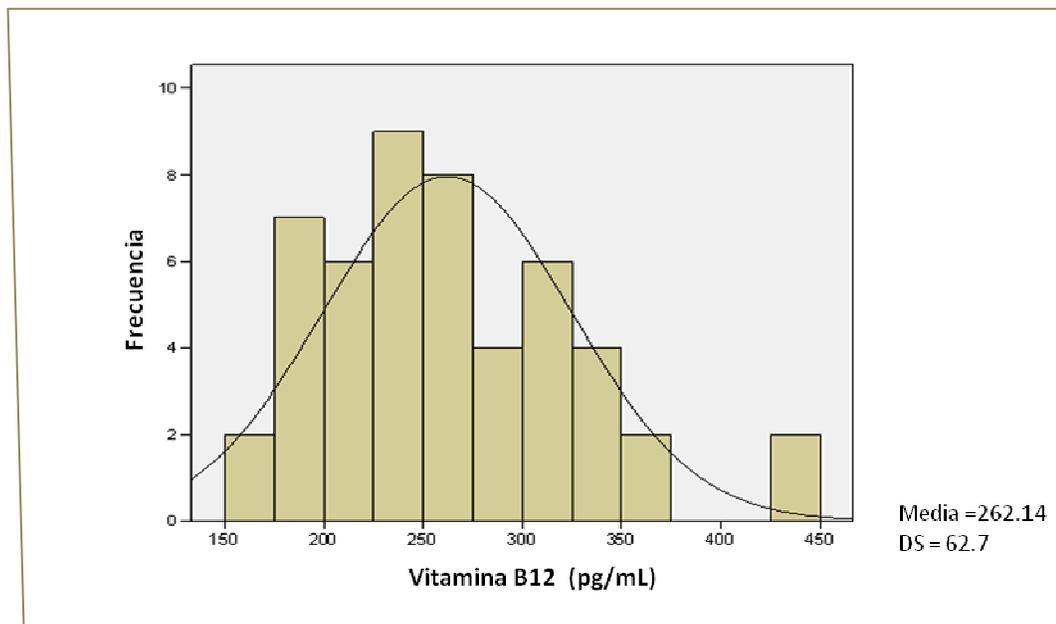
Gráfico No 1. Determinación de la Concentración de Acido Fólico en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer de Septiembre a- Diciembre 2009.



Si $p < 0.05$ no existe una distribución normal en los valores en estudio.

Se determinó también la concentración de Vitamina B12 en la población (n=51), encontrándose que la media de cobalamina es de 262,14 pg/mL, con una desviación estándar de 62,7. Como la muestra está constituida por más de 50 pacientes en la prueba de normalidad se asume el test de Kolmogorov-Smirnov, en este caso se asume que los datos siguen una distribución normal ($p=0.062$). Tomando en cuenta la distribución podemos decir que los valores de cobalamina a la izquierda están más concentrados a la media que los valores de la derecha.

Gráfico No 2. Determinación de la Concentración de Cobalamina en la población en estudio



Si $p > 0.05$ existe una distribución normal en los valores en estudio.

Analizando los datos obtenidos y la distribución de la concentración de Acido fólico y Cobalamina (Vitamina B12) podemos realizar un análisis de la prevalencia de estos dos factores importantes que son un parámetro importante para descartar la presencia de anemia megaloblástica, se presenta a continuación el cuadro de la concentración sérica de acido fólico y vitamina B12 según la clasificación dada por Internacional Life Science Institute (ILSI) y la OPS, que toman en cuenta los siguientes parámetros:

Cuadro No 1. Prevalencia de Acido Fólico y Vitamina B12 en la población en estudio					
ACIDO FOLICO			VITAMINA B12		
Concentración	n	%	Concentración	n	%
Deficiencia (menor a 3 ng/mL)	7	13.7	Deficiencia (menor a 180 pg/mL)	6	11.8
Bajo (3 – 6 ng/mL)	10	19.6	Normal (180 – 878 pg/mL)	45	88.2
Normal (Mayor 6 ng/mL)	34	66.7			

En el cuadro No. 1 se indica que el numero y porcentaje de mujeres embarazadas que presentan una deficiencia de acido fólico representan el 13,7 % (7) del total de la población siendo el 19.6 % la que se halla en el borde marginal, existiendo pacientes con valores de 2,4 ng/mL de acido fólico (franca deficiencia) y pacientes con suplementación vitamínica con valores incluso de 24 ng/mL lo que explicaría que no existe una distribución normal de acido fólico en la población en estudio. Con respecto a la vitamina B12 se encontraron que el 11.8% de las pacientes presentaban una deficiencia de vitamina B12 (n=6) lo que explicaría también la distribución normal muchas de ellas presentaba una concentración sérica de la vitamina próxima a la media, así mismo podemos destacar que existe una prevalencia mayor a presentar una deficiencia y baja concentración de acido fólico durante el embarazo.

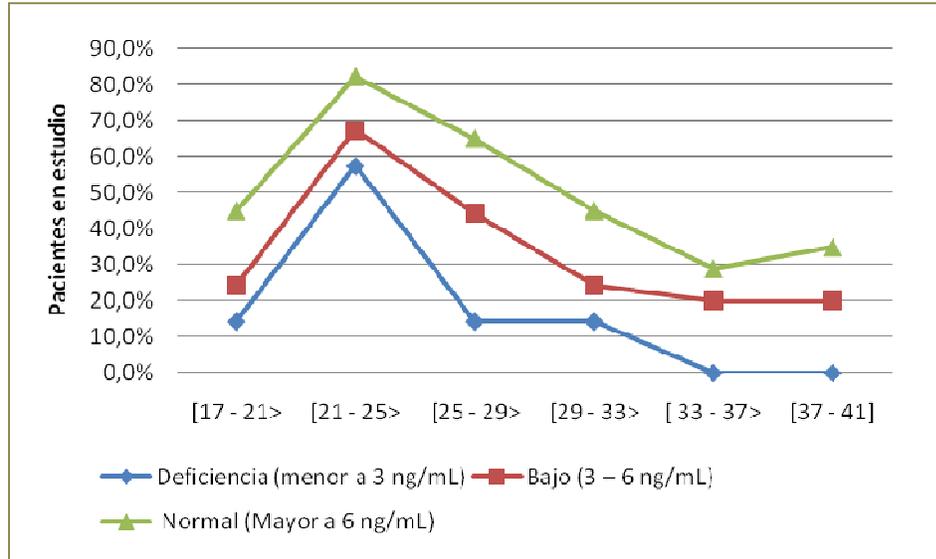
Cuadro No 2. Correlación entre la concentración de Acido Fólico y Vitamina B12 en la población en estudio.			
		Acido Fólico (ng/mL)	Vitamina B12 (pg/mL)
Acido Fólico	Correlación de Pearson	1	-0.156
Vitamina B12	Correlación de Pearson	-0.156	1

Al realizar una correlación de Pearson se aprecia que $r = -0.156$, lo que implica que no existe una correlación entre ambas variables, es decir, no podemos indicar que a valores pequeños de acido fólico se

existen valores séricos mas altos de Vitamina B12, puesto que para ello el valor de r debe ser mayor o igual a 0,5.

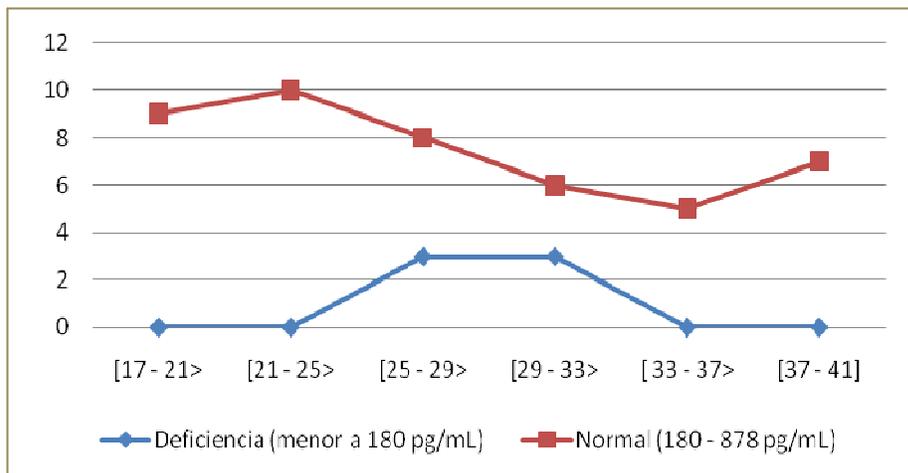
En gráfico No. 3 se representan la concentración de ácido fólico en relación a la edad de las pacientes, encontrándose que del total de las pacientes el grupo de 21 a 25 años de edad es el que presenta una elevada incidencia de deficiencia de ácido fólico llegando a un 57.4%; seguida del grupo etareo de 25 a 29 años con un porcentaje del 17.6%.

Gráfico No 3. Prevalencia de deficiencia de Acido Fólico en la población en estudio según edad.



Los datos presentados en la gráfica No. 4 nos indica que la deficiencia de cobalamina en la pacientes del estudio se presenta entre las edades de 25 a 33 años, siendo la distribución homogénea en este caso pues del total de 11.8 % (n= 6) que representaba la deficiencia de cobalamina; el 5.9 % (n= 3) se halla en el grupo de 25 a 29 años y el otro 5.9 % en el grupo de 30 a 33 años.

Gráfico No 4. Prevalencia de deficiencia de Cobalamina en la población en estudio según edad.



B. Correlación entre la concentración de Acido Fólico, Hematocrito, presencia de macrocitosis e hipersegmentación en placa de la población en estudio.

Se realizó la observación del frotis sanguíneo de cada una de las pacientes en estudio, se observó la presencia de macrocitosis (serie roja) en 5 pacientes que presentaban una deficiencia de ácido fólico, en la placa de sangre periférica de 7 pacientes se observó la presencia de hipersegmentación asociada también con una deficiencia franca de ácido fólico, lo que denota la relación entre estas variables que están asociadas al diagnóstico de anemia megaloblástica ($p=0.000$).

Cuadro No. 3 Correlación entre la concentración de Acido Fólico y la observación de macrocitosis e hipersegmentación en placa		
Concentración de Ac. Fólico	Hipersegmentación (PMN con 6 o más lóbulos)	
	Ausencia	Presencia
<i>Deficiencia (menor a 3 ng/mL)</i>	0	7
<i>Bajo (3 – 6 ng/mL)</i>	1	2
<i>Normal (Mayor a 6 ng/mL)</i>	32	0

Con respecto al *Valor Hematocrito*, este oscila entre 31.07 y 44.03 siguiendo una distribución normal ($p=0.200$), por tanto los datos se distribuyen normalmente con un nivel de significación del 5%. En este aspecto se considera que las pacientes que intervienen en el estudio presentan una anemia franca, debido a la hidremia o a una anemia de tipo carencial, se tomó en cuenta el valor de referencia dado por el IBBA que considera a valores de hematocrito inferiores a 45 % o de 15.5 g/dL para Hemoglobina como una anemia en mujeres, no hallándose datos de referencia para mujeres embarazadas.

Realizando la prueba de media contra un valor hipotético, el resultado nos indica que existe diferencia entre los resultados de hematocrito de la muestra y el valor de prueba empleado (45) dado que $p=0.000$

Cuadro No 4. Estadísticos para la variable: Valor Hematocrito	
Media	40.55
Desviación estándar	3.483
N	51

Cuadro No 5. Comparación de media para el Valor Hematocrito			
t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias
-9,126	50	,000	-4,451

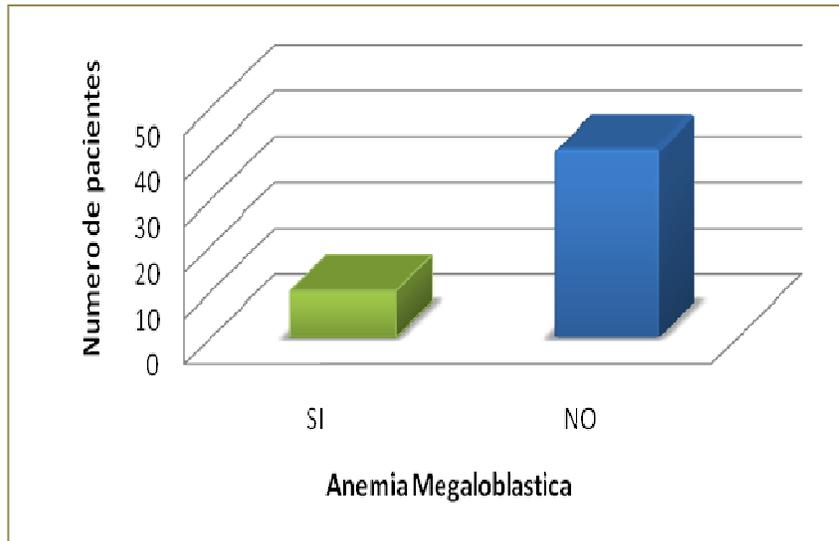
C. Determinación de la Frecuencia de Anemia Megaloblástica en la población en estudio.

Según los resultados obtenidos tanto de la concentración de ácido fólico, cobalamina y observación en placa de macrocitos y neutrófilos hipersegmentados asociados a anemia megaloblástica, se observa que de un total de 51 pacientes embarazadas, 10 presentaban anemia megaloblástica lo que representa un 19.6 % del total.

Cuadro No 6. Frecuencia de Anemia Megaloblástica en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer en Septiembre – Diciembre de 2009

<i>Anemia megaloblástica</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Porcentaje</i>
SI	10	19.6 %
NO	41	80.4 %
Total	51	100 %

Gráfico No 5. Frecuencia de Anemia Megaloblástica en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer en Septiembre – Diciembre 2009.



D. Frecuencia de Anemia megaloblástica según edad.

Se observó que el grupo etareo con mayor frecuencia de anemia megaloblástica es el grupo de pacientes que tienen una edad entre 21 a 24 años constituyendo el 40 % de los 10 casos de anemia megaloblástica verificados en este estudio, encontrándose también que el grupo etareo de 37 a 41 años no presenta ningún caso de anemia.

Así mismo tomando en cuenta el valor del coeficiente de contingencia que es de 0.345 (menor a 0,5) podemos indicar que no existe una relación directa entre ambas variables, por lo tanto no podemos decir que los casos que presentan anemia megaloblástica tienen mayor edad o viceversa.

La edad de las pacientes en estudio oscilan entre 17 a 41 años de edad, y presentan una distribución normal ($p=0.181$).

Cuadro No 7. Prevalencia de anemia megaloblástica en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer de Septiembre - Diciembre 2009 según edad

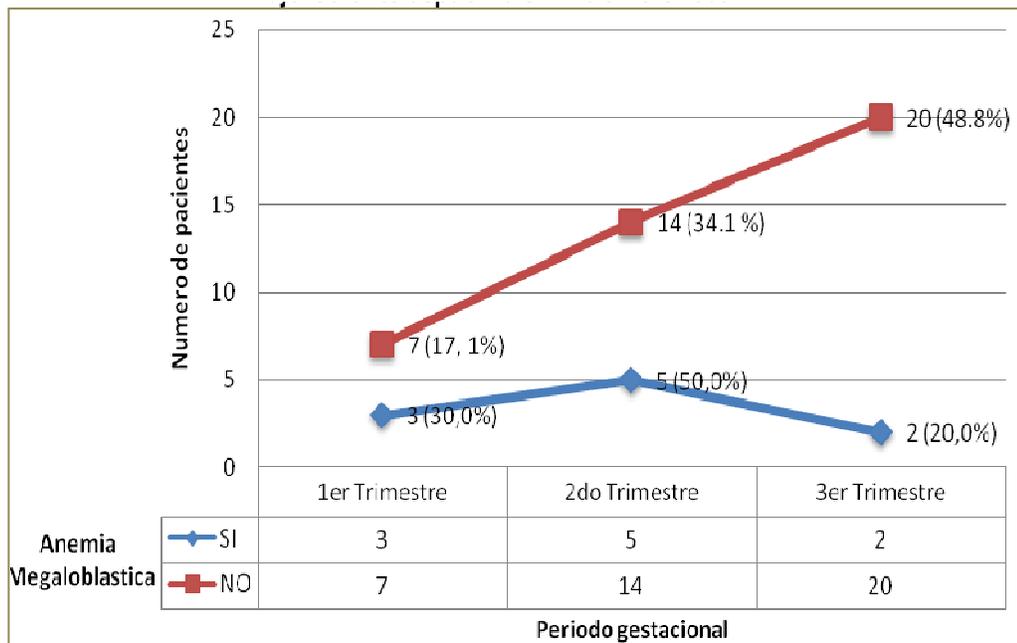
Edad	Anemia Megaloblástica	
	Si	No
Hasta 20 años	2 (20 %)	7 (17.1 %)
21 a 24 años	4 (40 %)	6 (14.6 %)
25 a 28 años	1 (10 %)	10 (24.4 %)
29 a 32 años	1 (10 %)	8 (19.5 %)
33 a 36 años	2 (20 %)	3 (7.3 %)
37 a 41 años	0	7 (17.1 %)
Total	10 (19.6 %)	41 (80.4 %)

$X^2 = 0.229$; $CC = 0.345$

E. Frecuencia de Anemia Megaloblástica según periodo gestacional.

Tomando en cuenta los datos obtenidos de la frecuencia de anemia megaloblástica a nivel general podemos encontrar la distribución según el trimestre de gestación de las pacientes. Se halló que según esta distribución se observa un mayor porcentaje de anemia megaloblástica en pacientes que se hallaban cursando el segundo trimestre de gestación alcanzando un 50% de los 10 casos encontrados, seguido de un 30 % durante en el primer trimestre y un 20 % en el tercer trimestre; del total de pacientes con anemia megaloblástica. Sin embargo tomando en cuenta el $CC=0.42$ se puede decir que no existe una relación directa entre cursar un determinado trimestre de embarazo y cursar anemia megaloblástica.

Gráfico No 6. Frecuencia de Anemia Megaloblástica según periodo gestacional.



CC = 0.42

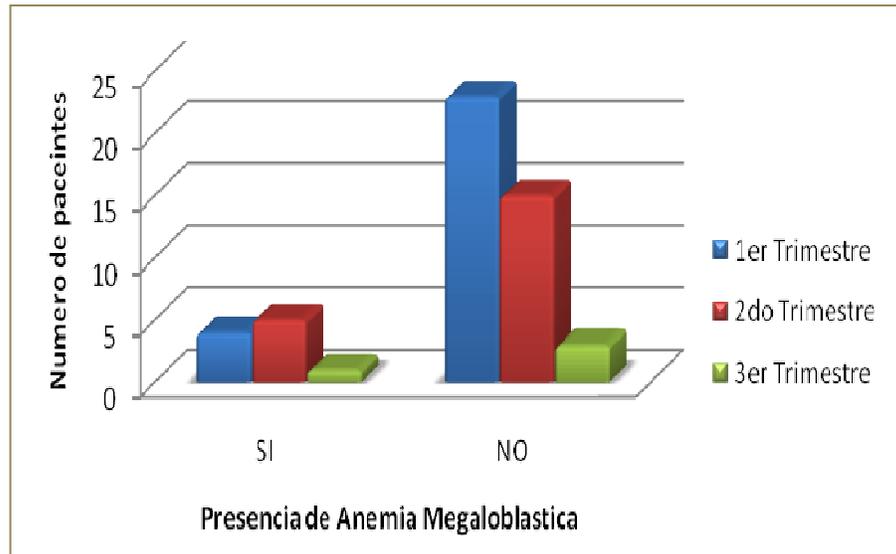
F. Relación entre la presencia de Anemia Megaloblástica y la asistencia al control prenatal en la población en estudio.

Como se puede observar en el cuadro y gráfico siguiente, del total de pacientes que realizan su control a partir del 1er trimestre, cuatro (n=4) presenta anemia megaloblástica, siendo mayor el número de casos de las pacientes que realizaron el control a partir del 2do trimestre siendo 5 el numero de casos en este grupo.

Cuadro No 8. Frecuencia de Anemia Megaloblástica según asistencia a control prenatal en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer durante Septiembre – Diciembre 2009

Anemia Megaloblastica	Control Prenatal			Total
	1er Trimestre	2do Trimestre	3er Trimestre	
SI	4	5	1	10 (19.6%)
NO	23	15	3	41 (80.4 %)
Total	27	20	4	51 (100 %)

Gráfico No 7. Frecuencia de Anemia Megaloblástica según asistencia a control prenatal.



G. Frecuencia de Anemia Megaloblástica y su relación con el empleo de suplementos vitamínicos.

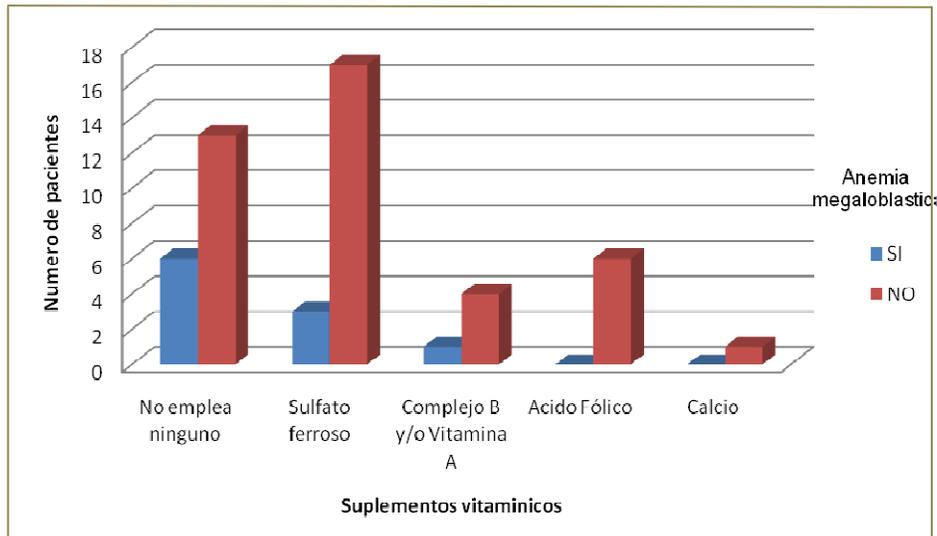
Del total de las pacientes, 19 no tomaron ningún suplemento vitamínico siendo el 37.8 % del total que se realizó el control prenatal periódicamente, así mismo las pacientes que consumieron algún tipo de suplemento vitamínico mostraron menor tendencia a presentar anemia megaloblástica a aquellas que no emplearon ninguno, como es de esperar las pacientes que emplearon ácido fólico no presentaron anemia Megaloblástica, como se observa en el cuadro y gráfico siguiente.

Cuadro No 9. Frecuencia de Anemia Megaloblástica según empleo de suplementos vitamínicos en mujeres embarazadas que asistieron al Hospital de la Mujer durante Septiembre – Diciembre 2009

Anemia Megaloblástica	Vitaminas y Oligoelementos empleados					Total
	No emplea ninguno	Sulfato ferroso	Complejo B y/o Vitamina A	Acido Fólico	Calcio	
SI	6	3	1	—	—	10
NO	13	17	4	6	1	41
Total	19	20	5	6	1	51

CC = 0.45

Gráfico No 8. Frecuencia de anemia Megaloblástica según empleo de suplementos vitamínicos en la población en estudio.



H. Frecuencia de abortos en las pacientes en estudio en relación a la deficiencia de Acido Fólico y Vitamina B12

Para evaluar la frecuencia de abortos y su relación con la deficiencia de ácido fólico y vitamina B12, se pondero los valores de la media y la desviación estándar de estas dos ultimas variables correlacionando las mismas con el número de abortos suscitados en cada paciente. Considerando el valor de cada indicador abajo descrito indicamos que la media mas baja y con un intervalo de desviación estándar mas amplio corresponde a pacientes que tuvieron 2 o mas abortos, al considerar el amplio rango de movimiento podemos aseverar que este rango incluye la deficiencia de ácido fólico y/o Vitamina B12.

Cuadro No 10. Frecuencia de abortos en la población en estudio en relación a la deficiencia de Acido Fólico y Vitamina B12			
No. Abortos	Indicador	Acido Fólico	Vitamina B12
0	Media	13.73	271.4
	Desviación estándar	8.59	57.18
1	Media	12.42	251.28
	Desviación estándar	9.04	72.63
2 o mas	Media	12.30	221.00
	Desviación estándar	10.78	13.78

En el siguiente cuadro se verifican los valores del ANOVA que se empleo para verificar si existía una diferencia significativa entre el Acido Fólico y la Vitamina B12 según el numero de abortos, lo que nos indica que en ninguno de los dos casos hay diferencia entre la media de ambas vitaminas, dado que 0.884 y 0.365 son mayores a $p=0.005$

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Acido Fólico (ng/mL)	Inter-grupos	19,542	2	9,771	,123	,884
	Intra-grupos	3724,024	47	79,235		
	Total	3743,566	49			
Vitamina B12 (pg/mL)	Inter-grupos	8081,209	2	4040,604	1,029	,365
	Intra-grupos	184524,811	47	3926,060		
	Total	192606,020	49			

X. DISCUSION.

Como ya se indico el Acido Fólico y la Cobalamina juegan un papel importante en la síntesis de ácidos nucleicos y por ende se constituyen en un factor importante para el recambio continuo de células como las hematopoyéticas. Como tal la anemia megaloblástica se presenta frente a la deficiencia de uno o ambos factores, esta puede deberse a una dieta alimentaria deficiente o a una sobredamanda tal y como ocurre durante el embarazo donde estos intervendrán en el desarrollo de la placenta, en la hematopoyesis materna que se ve duplicada durante esta etapa fisiológica.

Varios autores han planteado el estudio de estos factores y su importancia en diferentes etapas propias de la gestación; si una mujer en edad reproductiva presenta niveles bajos de ácido fólico antes del embarazo tardara unos 4 meses en llegar a presentar una anemia de tipo megaloblástica, lo contrario ocurre durante el embarazo pues de darse esta situación las reservas de ácido fólico se verían gravemente afectadas dando lugar a una anemia megaloblástica durante las primeras semanas de embarazo dando lugar a los NDT o Defectos de Tubulo Neural, ruptura de placenta y los Abortos Recurrentes Tempranos y los Abortos Recurrentes muy Tempranos según un estudio realizado por Reznikoff *et al* , así mismo si la anemia megaloblástica se presenta durante el segundo y tercer trimestre de gestación dará lugar a preeclampsia, toxemia de embarazo, parto prematuro y desarrollo fetal lento; en nuestro estudio encontramos que del total de 51 pacientes estudiadas un 19,6% de ellas presenta una anemia megaloblástica basándonos para ello en el estudio de la serie roja presencia de macrocitos, anemia (hematocritos inferiores a 42 %) en su mayoría, con respecto a la serie blanca la presencia de neutrofilos hipersegmentados y por ultimo la concentración deficiente de ácido fólico y cobalamina sérica.

Este dato es preocupante pues estaríamos hablando que de cada 10 mujeres embarazadas aproximadamente 2 cursarían por una anemia megaloblástica, esta frecuencia es equiparable a la hallada en un estudio en Ontario, Canada donde 24 % de las mujeres embarazadas presentaba macrocitosis e hipersegmentación (Gadowsky *et al*), en otro estudio realizado en Mexico se encontraron datos similares del 23 % de anemia megaloblástica en ambos casos asociados a niveles socioeconómicos bajos. Debemos reconocer que nuestro país presenta una elevada tasa de pobreza que podría incidir para obtener estos datos de anemia megaloblástica, como se planteo anteriormente la aparición de la anemia megaloblástica y el periodo en el que se halle presente podría dar lugar a diferentes problemas de salud tanto en la madre como en

el feto; así mismo tomando en cuenta estas circunstancias se halló que del total de pacientes con anemia megaloblástica (10 pacientes), 5 (50 %) presenta la anemia en el segundo trimestre de gestación, pudiendo dar lugar a los sucesos antes mencionados. Los valores hallados de deficiencia de Ácido Fólico y Vitamina B12 séricos tomando en cuenta la clasificación de la Internacional Life Science Institute fueron de 13.7 % y 11.8 % respectivamente valores menores a los hallados en México en un estudio reciente donde de 117 mujeres en edad reproductiva se reportó una deficiencia de 28 y 20 % respectivamente (Casanueva *et al*). Países cercanos al nuestro como es el caso de Chile esta contrarrestando esta situación con su programa de fortificación de harina que ha sido evaluado recientemente y que ha mostrado una disminución importante de la deficiencia de ácido fólico.

Si bien los programas de salud también implementados en el país son gratuitos muchas personas no acceden por falta de conocimiento, el Ministerio de Salud coadyuva con la suplementación vitamínica que se da a toda mujer embarazada, pero de todas las pacientes que han intervenido en el estudio 19 no toman ningún suplemento ni el que el programa de salud les brinda, debido a varios factores como la intolerancia a la presentación farmacéutica o en otros casos por que el control prenatal no es realizado desde las primeras semanas de embarazo llegando a verificarse que 24 pacientes del total comenzó su control del prenatal a partir del segundo trimestre de gestación; así mismo de todas las pacientes que consumían ácido fólico como suplemento ninguna de ellas presentó anemia megaloblástica lo que denota una vez más la intervención de este factor para la aparición de la anemia megaloblástica, pues 6 de las pacientes que presentan anemia megaloblástica no empleaban Ácido Fólico como suplemento vitamínico. La elevada deficiencia de estos factores tanto la de ácido fólico como cobalamina podría explicarse al efecto de dilución del embarazo sin embargo varios autores han planteado el cambio de transferencia de nutrientes al feto, el incremento de requerimiento y los problemas de absorción; en especial en países no desarrollados (Zamorano *et al*, Knight *et al*, Allen *et al*).

Como se indicó una de las consecuencias de deficiencia de ácido fólico y la cobalamina es o son los abortos recurrentes tempranos en nuestro estudio se determinó que las mujeres que no tuvieron ningún aborto tienen una media de ácido fólico mayor a las mujeres que tuvieron 1, 2 o más abortos, y que la media de esta vitamina se comporta de forma similar en este último grupo; en esta población el hecho haber presentado o no abortos no es influenciado por una deficiencia de ácido fólico.

XI. CONCLUSIONES

La Anemia Megaloblástica es problema de salud de suma importancia que puede presentarse antes y durante la gestación y es considerado un factor importante de mortalidad materna e infantil, además que de presentarse en las primeras semanas de gravidez da lugar a enfermedades congénitas en el feto, y otra serie de sintomatología en la madre asociada a preeclampsia, toxemia de embarazo, complicaciones durante el parto.

- La concentración de ácido fólico sérico en la población en estudio no presenta una distribución normal ($p = 0.002$), con respecto a esta variable existen valores muy bajos incluso de 2.4 ng/mL lo que indica que durante la gestación la concentración de este factor se ve más afectado a diferencia de la Cobalamina cuya distribución en la población fue normal ($p = 0.062$) aproximándose en la mayoría de los casos a la media de concentración de 262 pg/mL (valor normal).
- Se encontró que todas las pacientes con deficiencia de ácido fólico sérico presentaban macrocitosi e hipersegmentación en placa mientras que 2 de las 3 que presentaban un nivel bajo de ácido fólico sérico presentaban estas mismas características en sus placas, lo que denota la relación entre estas variables que están asociadas al diagnóstico de anemia megaloblástica ($p = 0.000$)
- La frecuencia de anemia megaloblástica llegó a 19.6 % del total de 51 pacientes estudiadas, lo que representa que alrededor de 2 de 10 mujeres embarazadas presenta anemia megaloblástica.
- El periodo gestacional con mayor frecuencia de anemia megaloblástica es el segundo trimestre llegando a un 50 % (5 pacientes) de las 10 pacientes que presentaban la anemia Megaloblástica, afectando por ende el desarrollo del feto e incrementando la probabilidad de preeclampsia en la mujer gestante.
- De un total de 51 mujeres embarazadas, 24 no asiste a su control prenatal desde el primer trimestre de gestación por una serie de condiciones la falta de tiempo, información.
- De todas las mujeres participantes de este estudio 19 no toma ningún suplemento vitamínico, donde 6 de ellas al consumir ácido fólico contrarrestan la presencia de anemia megaloblástica. Y caso contrario las pacientes que no consumen ácido fólico mostraron predisposición de presentar anemia megaloblástica.

XII. RECOMENDACIONES

Una vez concluida esta investigación se sugiere que se brinde charlas a las mujeres que asisten al sistema de salud para obtener mayor información sobre ambos factores vitamínicos y su intervención en la aparición de la anemia Megaloblastica, además de la importancia del consumo de suplementos vitamínicos durante el embarazo; que se amplie el tema base realizando un estudio de la concentración de homocisteina y su intervención como factor importante en la presencia de abortos recurrentes, además de llevar este tema de estudio al área rural donde por lo factores socioeconómicos y el tipo de alimentación se esperaría una frecuencia mucho mas alta de Anemia Megaloblástica a la presentada en esta investigación.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) INAM. Programa Nacional de Lucha contra la Anemia. Bolivia 1992. 14 p
- (2) CENETROP. Estudio de la Prevalencia y causa de anemia en mujeres embarazadas en Santa Cruz de la Sierra. Boletín Informativo. Bolivia 1998; 31 – 43.
- (3) Blanco A, Cunningham I, Ascensio M, Chávez M. Prevalencia de anemias nutricionales de mujeres en edad fértil en Costa Rica. Arch. Latinoamericano Nutricional 51, 19 – 24.
- (4) Casanueva E, Carsolio A, Garza M. Deficiencia de hierro, ácido fólico y vitamina B12 en mujeres mexicanas urbanas en edad reproductiva. Perinatol. Reprod. Hum. (14), 192 – 196
- (5) Ministerio de Salud y Deportes. Análisis de la Situación de Salud de Bolivia 2004. La Paz – Bolivia. Ministerio de Salud y Deportes; 2004.
- (6) Christensen B, Rosenblatt D. Effects of folate deficiency on embryonic development. Baillière's Clinical Haematology. 1997 Sep; 8 (3): 617 – 636.
- (7) Bruinse HW, van der Berg H. Changes of some vitamin levels during and after normal pregnancy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 61, 31 – 37.
- (8) Couto FD, Moreira LMO, dos Santos DB, Reis Mg, Goncalves MS. Folate, vitamin B12 and total homocysteine levels in neonates from Brasil. European Journal of Clinical Nutrition 2007; 61, 382 – 386.
- (9) Gadowsky S, Gale K, Wolfe S, Jory J, Gibson R, O'Connor D. Biochemical Folate, B12, and Iron Status of a Group of Pregnant Adolescents Accessed through the Public Health System in Southern Ontario. Journal of Adolescent Health 2003, 16: 465 – 474.
- (10) Garcia-Casal MN, Osorio C, Landaeta M, Matus P, Fazzino F, Marcos E. High prevalence of folic acid and vitamin B12 deficiencies in infants, children, adolescents and pregnant women in Venezuela. European Journal of Clinical Nutrition 2005; 59: 1064 – 1070.
- (11) Houe J, March S, Ratnam S, Ives E, Brosnan J. Folate and vitamin B12 status in Newfoundland at their first prenatal visit. Can. Medical Association Journal 2000. 1557 – 1559.
- (12) Suarez L, Hendricks K, Felkner M, Gunter E. Maternal serum B12 levels and risk for Neural Tube Defects in a Texas – Mexico Border Population. Science 2003. (2) 13: 81 – 88
- (13) Czeizel A, Tóth M, Rockenbauer M. Population-Based Case Control Study of Folic Acid supplementation during pregnancy. Teratology Journal 1996. 53: 345 – 351.
- (14) De Paz R, Hernández F. Manejo, prevención y control de la anemia megaloblastica secundaria a déficit de ácido fólico. Nutrición Hospitalaria 2006 (2) 1 : 113 – 119.
- (15) A'sok A, Hansen Deborah. Hypothesis: Folate – Responsive Neural Tube Defects and Neuropathies. Teratology 2000. 62: 42 – 50

- (16) Beutler E. Hematología. 1 ed. Marban. España 2005.
- (17) Wald N, Law M, Morris J. Quantifying the effect of folic acid. Public Health 2001; 358: 2069 – 2073.
- (18) Reznikoff M, Zittoun J, Vaylet C, Pernet P, Milliez J. Low vitamin B12 level as a risk factor for very early recurrent abortion. European Journal Obstetrics and Gynecology 2002; 104: 156 – 159.
- (19) Hospital Federico Lleres Acosta: Servicio de Ginecología. Protocolo de manejo de anemia en el embarazo; 2002: 10 – 22.
- (20) Mc Kenzie S. Hematología Clínica. 2 ed. El Manual Moderno. México 2000.
- (21) Soler Díaz J, Latorre J, Navarro R, Pitarch R, Bornay F, Vázquez T *et al.* Macroцитosis y Megaloblastosis. Navarro Editores 2006: 1 – 76.
- (22) Sans S. Hematología Clínica. 1 ed. Doyma. Madrid 1988.
- (23) Vives Corrons J, Aguilar J. Manual de técnicas de laboratorio en Hematología. 2 ed. Masson. Barcelona 2001.
- (24) Arriens, K. Anemia Megaloblastica. Disponible en: <http://www.medlib.med.utah.edu/WebPath/HEMEHTML/HEMEIDX.html>
- (25) Velez H, Rojas W, Borrero J, Restrepo J. Hematología. 6 ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia 2002.
- (26) Lucock M. Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. Molecular Genetics and Metabolism 2000: 121 – 138.
- (27) Watkins, M. Eficacia del Acido Fólico para la Prevención de Defectos de Túbulo Neural. Mental Retardation and Developmental Disabilities 1998: 282 – 290.
- (28) Canary I. Folate and cobalamin. Clin Haematol 1986: 14:629
- (29) Pietrzik K, Thorand B. Folate Economy in Pregnancy. Nutrition 1997 (13) 11.
- (30) Jofre L. Acido fólico y embarazo. Disponible en: <http://www.perinat.org.ar/hematologia1.html>
- (31) Embarazo y lactancia. Disponible en: <http://www.gineconet.com/articulos/1488.htm>
- (32) Pardo J, Gindes L, Orvieto R. Cobalamin (vitamin B12) metabolism during pregnancy. Gynecology and Obstetrics Journal 2003. 84: 77 – 78.



ALEXOS



FRECUENCIA DE ANEMIA MEGALOBLASTICA EN MUJERES EN ESTADO GESTACIONAL QUE ASISTEN AL HOSPITAL DE LA MUJER, MEDIANTE LA EVALUACION CUANTITATIVA DE ACIDO FOLICO Y COBALAMINA



Questionario oral:

Emplea Ud. alguno de estos medicamentos: Metrotexato, Trimetoprim, Triamtereno o Pentamidina	
SI	NO
Otros.....	
Tiene contacto frecuente con animales, perros, gatos, o lana de oveja u otros productos similares:	
SI	NO

Questionario escrito:

- A. Nombre.....
- B. Edadaños
- C. Tiempo actual de gestación.....

Numero de Gestaciones:				
Cero	Uno	Dos	Tres o mas	
Numero de Partos:				
Ninguno	Uno	Dos	Tres o mas	
Número de hijos nacidos vivos:				
Número de Abortos:				
Intervalo intergenésico:				
Enfermedad congénita:				
Si	No			
.....				
Control del prenatal a partir del:				
1er. Trimestre	2do. Trimestre	3er. Trimestre		
Toma tabletas de:				
Vitamina A	Si	Sulfato ferroso	Si	Otros?
	No		No	
Consume de preferencia:				
Verduras		Carnes	Ambos	

Fecha:



FRECUENCIA DE ANEMIA MEGALOBLASTICA EN
MUJERES EN ESTADO DE GESTACIONAL QUE
ASISTEN AL HOSPITAL DE LA MUJER, MEDIANTE
LA EVALUACION CUANTITATIVA DE ACIDO FOLICO
Y COBALAMINA



FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo....., acepto participar de forma voluntaria en el estudio “**Frecuencia de anemia Megaloblastica en mujeres en estado gestacional que asisten al Hospital de la Mujer, mediante la evaluación cuantitativa de acido fólico y cobalamina**”, tomando en cuenta que los resultados proporcionados ayudaran al mantenimiento del bienestar de mi bebe y mi persona. También acepto que conozco los exámenes que me realizaran, así como que los datos que proporcione serán de absoluta confidencialidad.

C.I.....

La Paz,de de 2009



FRECUENCIA DE ANEMIA MEGALOBLASTICA EN MUJERES EN ESTADO GESTACIONAL QUE ASISTEN AL HOSPITAL DE LA MUJER, MEDIANTE LA EVALUACION CUANTITATIVA DE ACIDO FOLICO Y COBALAMINA



EVALUACION DEL FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

1. Nombre.....

2. ¿Conoce el contenido del Formulario del Consentimiento Informado?

SI

NO

3. ¿Hizo preguntas con respecto al Formulario de Consentimiento Informado?

SI

NO

4. ¿Hizo preguntas sobre las dudas que tenia con respecto al Formulario de Consentimiento Informado?

SI

NO

5. ¿Ha tenido suficiente información con respecto a este estudio?

SI

NO

6. ¿Su participación en este estudio es voluntario?

SI

NO

Firma

PREPARACION DE REACTIVOS

ANTICOAGULANTE

EDTA 7%

- Pesar 7 g de EDTA tripotásico.
 - Disolver EDTA – K3 en 80 mL de agua destilada
 - Enrasar a 100 mL con agua destilada y etiquetar.
- * Se emplearan 20 uL del anticoagulante preparado para 1 mL de sangre.

FORMULA LEUCOCITARIA DIFERENCIAL

TINCION WRIGHT

- Polvos colorantes de Wright 0.3 g
- Glicerol 3 mL
- Metanol 97 mL

Alicuotar el volumen necesario de glicerol, verter el mismo en el frasco ambar a emplear para el colorante, arrastrar el remanente empleando el metanol para facilitar la disolución del mismo, una vez empleada aproximadamente la mitad del metanol añadir el reactivo en polvo, agitar constantemente hasta que se disuelva completamente. Etiquetar y guardar de forma apropiada.

TAMPON FOSFATO

- NaCl 4.38 g
- NaH₂PO₄ 2.15 g
- Na₂HPO₄ 8.09 g
- Agua destilada csp 1000 mL

ANEXO No. 4: Toma de Muestra



Área de Toma de muestra
Laboratorio Hospital de la Mujer



Muestras obtenidas por punción venosa



Laboratorio Hospital de la Mujer



Equipo Inmulite 1000

ANEXO No. 5: Cuantificación Acido Fólico y Cobalamina



Preparación de las muestras



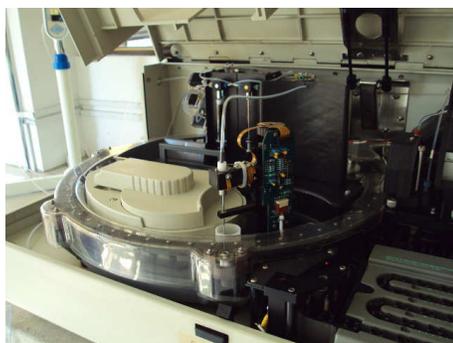
Pretratamiento de las muestras



Baño de Aceite



Baño de Agua Fría



Incubación de las muestras pretratadas



Panel de Control del Equipo

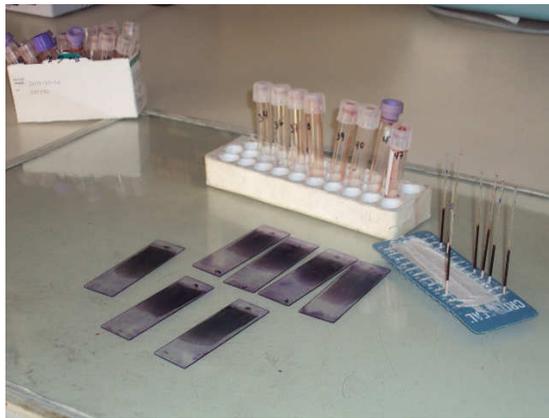
ANEXO No. 6: Determinación de Valor Hematocrito y Valoración de Placa



Microcentrifuga
Haematokrit 210



Microscopio Olimpus BH-2



Determinación de Hematocrito



Neutrófilos hipersegmentados

