

91

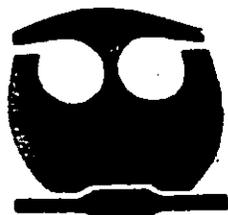


# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## DETERMINACION CUANTITATIVA DE FOLATOS EN QUIMICA CLINICA.

**TRABAJO ESCRITO**  
VIA EDUCACION CONTINUA  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
**P R E S E N T A :**  
NORMA ANGELICA MORENO HERNANDEZ



**EXAMENES PROFESIONALES**  
FACULTAD DE QUIMICA  
MEXICO, D.F. FEBRERO DEL 2001.

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente. Prof. RODOLFO PASTELIN PALACIOS.

Vocal. Prof. RAUL NIETO CAMACHO.

Secretario. Prof. SATURNINO DE LEON CHAPA.

1er. Suplente. Prof. PATRICIA ELVIRA BERRONES RUIZ.

2do. Suplente. Prof. RUTH EDITH MARTIN FUENTES.

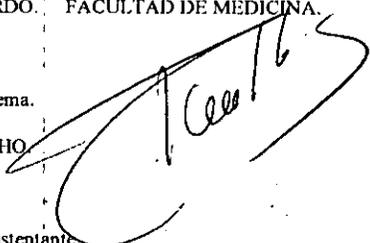
Sitio donde se desarrolló el tema:

BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA...

HEMEROTECA, J.J. IZQUIERDO. FACULTAD DE MEDICINA.

Nombre y firma del asesor del tema.

Q.B.P. RAUL NIETO CAMACHO



Nombre completo y firma del sustentante

NORMA ANGÉLICA MORENO HERNÁNDEZ.



## DEDICATORIAS

A creador de este Universo, porque ahora se que es grande y que nos ha permitido conocer un poco de su mundo.

A mi padre Alfredo y mi madre Maria Elena.

A mis hermanos

Maria Silvia, Alfredo Arturo, Mirsa, Eduardo, Alba Verónica, Melba Leticia, Álvaro Gabriel, Francisco Armando, Maria Claudia, Alma Noelia, Leandra Alicia, Rafael Elias, Sandra Berenice.

A mis queridos sobrinos

Nicolás, Nayeli, Marsha Talía, Diana, Jania, Elena Standehui, Rafael Israel, Francisco, Omar Alfredo, Yúsil, Luis Oscar, Alyair, Ariadne, Álvaro Sosai, Alma Karina, Africa Abril, Carón, Mirsa Alejandra, Alejandrillo.

Para ti Cielo

No es que muera de amor, muero amor, de amor de ti, de mis labios sin ti, de mi piel sin ti, y de lo insoportable que soy sin ti.

## ÍNDICE

	Paginas
1. Introducción	1.
2. Información general	2.
2.1. Folatos	2.
2.2. Acido fólico y sus derivados	3-9.
2.3. Fuentes nutricionales de los folatos	10.
2.4. Requerimientos diarios de folatos	10-11.
2.5. Metabolismo y absorción de los folatos	11-13.
2.6. Reacciones de transferencia de grupos funcionales monocarbonados en las que participan los folatos	14- 24.
2.7. Deficiencia de vitamina B <sub>12</sub>	25.
2.8. Fármacos que interfieren con al síntesis de ácidos nucleicos	25-27.
2.9. Trastornos fisiopatológicos asociados con la deficiencia de folatos	28.
2.10. Signos clínicos de la anemia	29.
2.11. Anemia megaloblástica	30-32.
3.0. Métodos cuantitativos para la determinación de folatos	33.
3.1. Métodos microbiológicos	33-36.
3.1.1 Método microbiológico <i>Streptococcus faecalis</i>	33-36.
3.1.2. Método microbiológico <i>Streptococcus faecalis</i> con el medio base para ácido fólico	37-40.
3.1.3. Método microbiológico <i>Lactobacillus casei</i>	41-45
3.1.4. Método microbiológico <i>Tetrahymena gelei</i>	46-47.
3.1.4. Método microbiológico <i>Bacillus coagulans</i>	48-49.
3.2. Métodos inmunológicos	50-51.
3.2.1. Método Inmunológico por quimioluminiscencia CIBA-CORNING	52-59.
3.2.2. Método Inmunológico por quimioluminiscencia BECKMAN-COULTER	60-73.
3.2.3. Método inmunológico por RIA. ICN—PHARMACEUTICAL	74-78.
4.0. Discusión	79-83.
5.0. Conclusiones	84.
6.0. Bibliografía	85.

## 1. INTRODUCCION.

Planteamiento del problema.

El trabajo escrito elaborado vía cursos de Educación Continua es una opción para presentar la prueba escrita del examen profesional, para ello se imparten cursos, uno de estos cursos es el diplomado en Hematología que consta de varios módulos, este diplomado enfatiza la importancia de los estudios de laboratorio que se aplican para el diagnóstico de las enfermedades hematológicas y que se convertido en una herramienta indispensable para la practica clínica.

En el módulo de mecanismos fisiopatológicos de los eritrocitos, se estudia los ensayos para evidenciar las anemias que se pueden clasifican por su mecanismo fisiopatológico que son, por pérdida o destrucción de la hemoglobina y/o eritrocitos y por algún fallo en su síntesis por la carencia de nutrimentos. Dentro de las carenciales se encuentran las anemias debido a la falta de vitaminas como lo son el ácido fólico y / o cobalamina. La deficiencia de una de estas vitaminas tiene como consecuencias una anemia megaloblástica que es lo menos grave; con un diagnóstico y tratamiento adecuado se puede devolver la salud al individuo que la padece. La consecuencia más grave de la carencia de estas vitaminas se presentan en los productos de mujeres embarazadas produciendo defectos por cierre de tubo neural. Así también los ancianos y niños expuestos a una carencia por folatos y/ o cobalamina pueden padecer alteraciones del sistema nervioso.

La determinación de la concentración de folatos, tiene aplicación directa en el área clínica se utiliza para detectar una carencia de la vitamina y como criterio en el diagnóstico de anemia megaloblástica, así también como se ha observado una asociación entre la deficiencia de folatos en las alteraciones por cierre de tubo neural. Este trabajo tiene como objetivo compilar la información fundamental que se requiere para implementar la determinación de la concentración de folatos y las técnicas microbiológicas e inmunológicas que se han utilizado para la determinación de folatos en el laboratorio clínico.

El interés sobre el tema se origina por la deficiente información detallada en los libros especializados sobre el procedimiento técnico para implementar la determinación de folatos. El trabajo incluye la información general sobre folatos, su función, los métodos microbiológicos e inmunológicos que se han utilizado para cuantificar folatos en suero y eritrocitos. La determinación de folatos en la Medicina es una herramienta para el diagnóstico de anemia megaloblástica y el seguimiento del tratamiento de la anemia megaloblástica y de los padecimientos neurológicos por desnutrición.

## 2. INFORMACIÓN GENERAL.

### 2.1. FOLATOS

Folatos es un término genérico que se refiere a una familia de compuestos relacionados, todos estos compuestos presentan modificaciones de la forma simple de la vitamina ácido fólico (ácido pterilglutámico, ptaglu). El ácido fólico se encuentra en la naturaleza en cantidades pequeñas, es fácilmente asimilable por las células y se transforma en un cofactor activo. Los folatos son modificados por reducción del anillo de pteridina y por la poliglutamación de la cadena terminal del ácido glutámico. La reducción incluye dihidrofolatos y tetrahidrofolatos, los folatos que contienen la cadena poliglutamato son denominados folilpoliglutamatos. Los folilpoliglutamatos en los tejidos de los mamíferos contienen principalmente cinco residuos de ácido glutámico, (folilpentaglutamatos) y de seis residuos de ácido glutámico (folilhexaglutamatos).

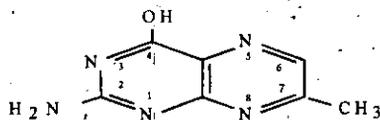
Los residuos de glutamato de la cadena poliglutamil se enlazan por el carbono gamma-carbonilo de un ácido glutámico, con el alfa-amino de otro ácido glutámico adyacentes para formar la unión peptídica (enlace isopeptídico). Estos enlaces son diferentes de los que se llevan a cabo en las proteínas, donde los aminoácidos se unen por el alfa-carbonilo y alfa-amino.<sup>1,7</sup>

## 2.2. ACIDO FOLICO Y SUS DERIVADOS.

El ácido fólico y sus derivados se lograron identificar paulatinamente entre los años de 1931 a 1943 como un principio activo capaz de curar varias anemias nutricionales en los animales y así también se demostró que actúa como factor de crecimiento para varios microorganismos como *Lactobacillus casei* y *Streptococcus lactis*. El primer compuesto cristalino fue obtenido de hígado por Pfiffer y Stokstad en 1943. Pfiffer en 1947 lo obtuvo de la fermentación de la cerveza el ácido fólico. La estructura del compuesto fue elucidada por Stokstad y sus colaboradores en 1948.<sup>2</sup>

La molécula esta formada por :<sup>3-10</sup>

Un derivado de pteridina.



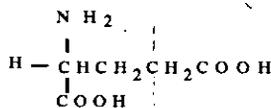
Pteridina

Un residuo de ácido p-aminobenzoico.



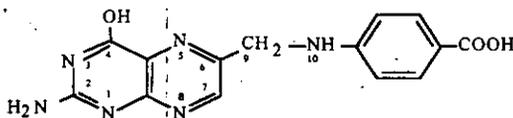
Acido p-aminobenzoico

Un residuo de ácido glutámico.



Acido glutámico

El derivado de pteridina y residuo de ácido p-aminobenzoico forman el ácido pterico



Acido pterico

El ácido pterico y el residuo de ácido glutámico se unen para formar el ácido fólico cuyo nombre sistemático que es<sup>2,3</sup>: N-[4-{[(2-amino-4-hidroxi-6-pteridinil) metil] amino} benzoil].

La literatura revisada de los años sesenta y setenta concuerdan con nombrar al N-[4-{[(2-amino-4-hidroxi-6-pteridinil) metil] amino}benzoil] por nombre común: ácido fólico, pero difieren mucho con los sinónimos y abreviaturas que se les asignó cuando se descubrieron. La información mas actualizada de la década de los noventa, concuerdan con las estructuras que proponen los autores de los sesenta y setenta pero las abreviaturas son diferentes y no mencionan sinónimos, solo nombres comunes. Se incluyen las estructuras de los derivados del ácido fólico para que el lector conozca las diferencias estructurales sutiles que tienen todos estos derivados del ácido fólico, conociendo esta diferencia estructural tan pequeña el lector podrá reconocer a que derivado hace referencia otra bibliografía o si se enfrenta a un sinónimo no conocido o a una abreviatura. Es muy importante conocer las diferencias estructurales de los derivados del ácido fólico ya que todos forman un conjunto de moléculas de derivados de pteridinas al que se les ha asignado como nombre común folatos. Los derivados del ácido fólico son importantes cofactores en el metabolismo, conociendo la estructura y su participación en el metabolismo nos ayudara a comprender su función y su aplicación clínica de esta determinación de ácido fólico en el laboratorio clínico. A continuación se describen el nombre común del ácido fólico, sinónimos y abreviaturas que se han utilizado a través del tiempo y de sus derivados con mas de un residuo de ácido glutámico.

Nombre común: ácido fólico (AF) o ácido pteroilglutámico (PGA).

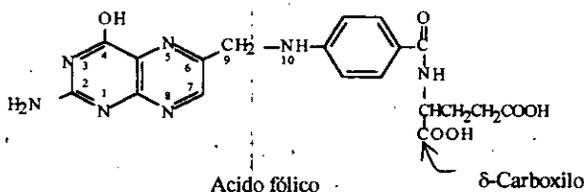
Sinónimos: folacina, folato, vitamina Bc, factor de crecimiento del *Lactobacillus casei*.

Función : Precursor de folatos.

Formula molecular condensada: C<sub>19</sub> H<sub>19</sub> N<sub>7</sub> O<sub>6</sub>

Peso molecular: 441.41

Estructura:

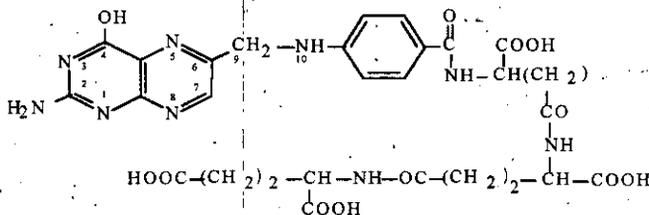


Dos derivados poliglutamados ( folilpoliglutamatos) del ácido fólico son conocidos <sup>1</sup>:

1. El ácido pteroildi-glutamilglutámico que es el nombre común<sup>2,3</sup>

Abreviaturas: PGAG<sub>2</sub>, PGAGG, PG<sub>3</sub>A.

Sinónimos: pteroiltriglutamato (TPGA), pteroterina, folilidiglutamato, ácido glutámico, pteroil-γ-glutamil-γ-glutamil (ter, folato G<sub>2</sub>), factor de fermentación de *Lactobacillus casei*, aislado de *Corinebacterium spp* por Hutchings en 1948.



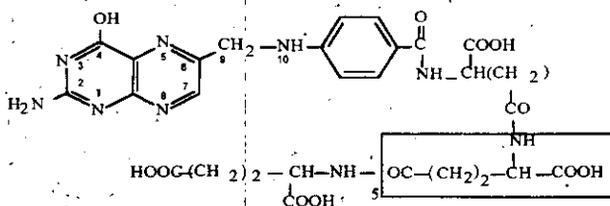
Acido pteroildi-glutamilglutámico

2. Acido pteroilhexa- glutamilglutámico es el nombre común<sup>2,3</sup>

Abreviaturas: (PG<sub>7</sub>A, PGAG<sub>6</sub>). Sinónimos: ácido pteroilheptaglutámico, heptoterina, vitamina Bc conjugada, factor de fermentación de *Lactobacillus casei*.

Aislado del fermento de cerveza por Pffifer en 1946.

Estructura:



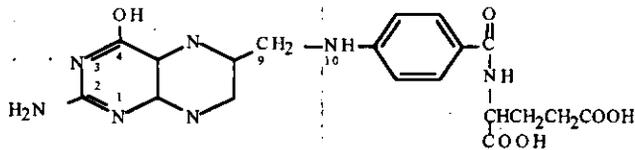
Acido pteroilheptaglutámico

Los derivados de folatos, que poseen actividad biológica, son derivados de ácido 5,6,7,8,-tetrahidrofólico (PGA-H<sub>4</sub>, FAH<sub>4</sub>) se ejemplificaran algunos con sus nombres comunes, sinónimos y estructuras <sup>2,3</sup>

a) Nombre común: ácido tetrahidrofólico (folato-H<sub>4</sub>),

Sinónimos: folacina ( FA-H<sub>4</sub>, FH<sub>4</sub> ), folato ( tetrahidro-PGA, THPGA).

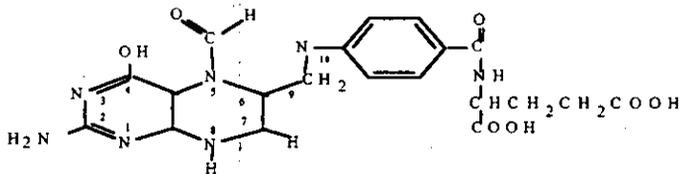
Estructura:



Acido 5,6,7,8, tetrahidrofólico

- b)  $N^5$ -formil-5,6,7,8, tetrahidrofólico glutámico es el nombre común. Se puede encontrar con las siguientes abreviaturas ( $N^5$ -formil-FAH<sub>4</sub>,  $N_5$ -CHO-PGA-H<sub>4</sub>, 5-CHO-PGA-H<sub>4</sub>); Sinónimos: ácido 5-formil-PGA-H<sub>4</sub> ( $N^5$ -Formil-PGA-H<sub>4</sub>), ácido folínico, ( $N^5$ -formilfolato-PGA-H<sub>4</sub>, 5-formilfolato-PGA-H<sub>4</sub>), ácido folínico, c) ( $5$ -FoFA-H<sub>4</sub>,  $5$ -CHO-FH<sub>4</sub>), factor citrovorum (CF, LCF) y leucovorina.

Estructura:



$N^5$ -Formiltetrahydrofolato

- d)  $N^{10}$ -formil -5,6,7,8,tetrahidrofólico es el nombre común.

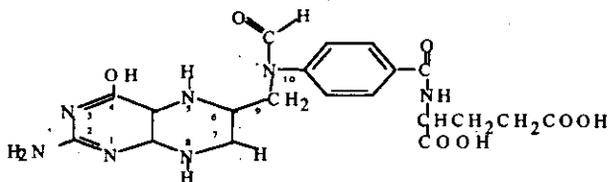
Abreviaturas: ( $N^{10}$ -formil-FAH<sub>4</sub>).

Sinónimos: ácido  $N^{10}$ -formilpteroilglutámico ( $N^{10}$ -CHO-PGA, folato),

10-formilpteroilglutámico (10-CHO-PGA, 10 ácido fólico),

ácido  $N^{10}$ -formilfólico ( $N^{10}$  folacina, ácido  $N^{10}$  fólico).<sup>3</sup>

Estructura:

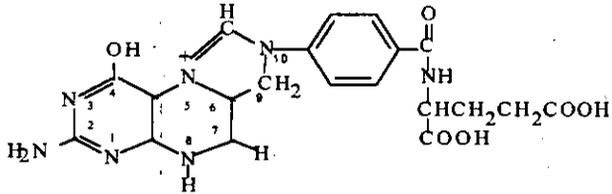


$N^{10}$ -Formiltetrahydrofolato

d)  $N^5, N^{10}$ -metenil -5,6,7,8,tetrahidrofólico nombre común.

Sinónimos: anhidroleucovorina, isoleucovorina,  $N^{5-10}$  formil-FAH<sub>4</sub>.<sup>3</sup>

Estructura:

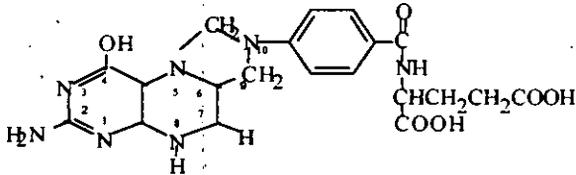


$N^5, N^{10}$ -Metenil 5,6,7,8-tetrahidrofólico

e)  $N^5, N^{10}$ -metilentetrahidrofólico nombre común,

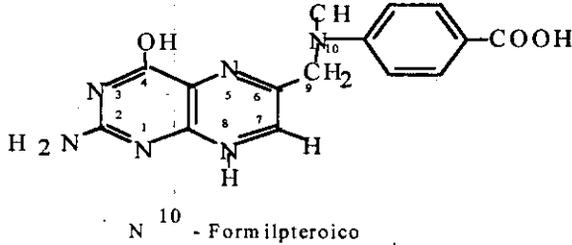
Sinónimos: metileno activo, formaldehído activo,  $N^{5-10}$  hidroximetil-FAH<sub>4</sub>.<sup>3</sup>

Estructura:



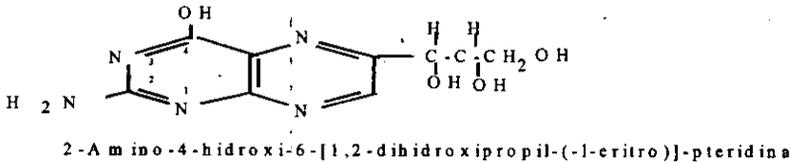
Acido  $N^5, N^{10}$ metil 5,6,7,8-tetrahidrofólico

Otras pteridinas son derivados del ácido fólico y existen en la naturaleza, son de importancia metabólica, como lo son: ácido N<sup>10</sup>-formil pterico ( rhizopterin ) aislada de cultivo de *Rhizopus nigricans* por Keresztesy en 1943.

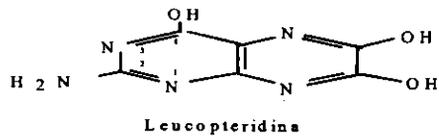
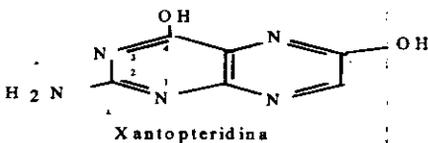


biopterina ( factor critidia ) el cual mantiene el crecimiento de *Crithidia fasciculata* es aislada por Patterson en 1958, su formula es 2-amino-4-hidroxi-6-1,2-dihidroxipropil-(L-eritro), se encuentra en la orina, así también ha sido aislada de la jalea real de miel de abeja por Buternandt- Rembolden 1958, y de *Drosophila melanogaster* por Forrest y Michell en 1955.

Estructura :

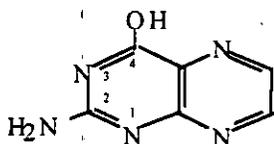


xantopteridina y leucovorina, fueron aisladas de alas de mariposa en 1891 por Gowland Hopking



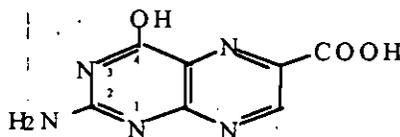
Otros derivados también fueron aislados principalmente por Wieland y sus colegas en 1940, se encuentran extensamente distribuidas en crustáceas, insectos y vertebrados de sangre fría estos son:<sup>1,2</sup>

a) Acido 2-amino-4-hidroxipteridina



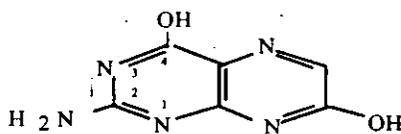
2-Amino-4-hidroxipteridina

b) Acido 2-amino-4-hidroxipteridina-6-carboxílico



2-Amino-4-hidroxipteridina-6-carboxilo

c) Isoxantopteridina.



Isoxantopteridina

### 2.3. FUENTES NUTRICIONALES DE LOS FOLATOS.

Los folatos se encuentran distribuidos en los vegetales verdes como son los espárragos, brócoli, espinacas, lechugas, etc. estos vegetales contienen los mayores porcentajes, pero también se encuentran en frutas como limones, plátanos y melón, otros alimentos que los contienen son el hígado, riñón, setas, nueces, leguminosas y productos de trigo entero. La vitamina es sintetizada por varias bacterias, el 7,8 dihidrofolato es el producto de síntesis más encontrado.<sup>10</sup>

En la siguiente tabla se describe el contenido de ácido fólico de diversos alimentos comunes.<sup>9,11</sup>

Alimento	Porción	Acido fólico en ug
Hígado	100 g	217
Frijoles	1 tasa	150 - 290
Cereales fortificados	30 g	50 - 200
Brócoli crudo	1 tasa	63
Espinaca cruda	½ tasa	54
Naranja	1 mediana	40
Lechuga	½ tasa picada	38

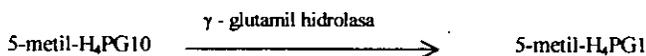
### 2.4. REQUERIMIENTOS DIARIOS DE FOLATOS.

Los requerimientos diarios mínimos de ácido fólico son 50 ug. Una dieta variada y equilibrada contiene un exceso en esta cantidad. Las recomendaciones oficiales diarias (RDAs) en el hombre adulto son de 200 ug y en la mujer deben de ser 180 ug. El aumento de los requerimientos de ácido fólico se presenta en anemia hemolítica, leucemia, durante el embarazo, la lactancia y en enfermedades malignas.<sup>1</sup> Las necesidades se duplican durante el embarazo debido a que el feto requiere de folatos para la formación de células, durante la gestación se aconseja un aporte doble, esto es, 400 ug al día y durante la lactancia una cantidad de 500 ug. La RDAs para niños es de 10 mg por Kg de peso corporal, en la etapa de desarrollo de un individuo la RDA recomienda 3.6 ug / kg por día.<sup>1,9,11</sup>

Los lactantes alimentados con leche pasteurizada o esterilizada generalmente necesitan aporte de folatos. En el hombre con un aporte deficiente puede dar lugar a la aparición de síntomas carenciales en un periodo de 3 a 4 meses. Los ancianos cuya dieta es poco variada e inadecuada, las personas que ayunan, las mujeres embarazadas, las mujeres que toman anticonceptivos, y los alcohólicos están expuestos a desarrollar una carencia de folatos. La asociación entre el uso de anticonceptivos y el consumo de alcohol aumenta más el riesgo, cuando un individuo tiene un aporte deficiente diario de 5 ug, puede desarrollar anemia megaloblástica en 4 semanas.<sup>9,20</sup>

## 2.5. METABOLISMO Y ABSORCIÓN DE LOS FOLATOS.

Los folatos que son aportados por la dieta se encuentran principalmente como folilpoliglutamatos, el significado de folilpoliglutamato se refiere al número de aminoácidos de ácido glutámico que contienen los derivados de ácido fólico que pueden ser hasta de diez. Los folilpoliglutamatos no cruzan fácilmente la membrana de las células, el transporte es deficiente por el intestino, el hígado y las células de otros órganos, existen eventos enzimáticos que garantizan la conversión de folilpoliglutamatos a folilmonoglutamatos, esta transformación se requiere para su eficiente absorción, tanto los folatos de origen animal y vegetal existen como folilpoliglutamatos de largas cadenas de péptidos glutamil, la enzima  $\gamma$ -glutamil hidrolasa, es la que cataliza la hidrólisis de folilpoliglutamatos a folilmonoglutamatos, el enterocito tiene unida a la membrana la enzima  $\gamma$ -glutamil hidrolasa.



Unos ejemplos del contenido de folilpoliglutamatos son los siguientes, el hígado de pollo así como el de rata el 70 % del contenido de folatos son derivados de N<sup>5</sup>-metil THF que incluyen varios tipos de poliglutamatos. El 80 % de los folatos contenidos en los leucocitos humanos son conjugados, los eritrocitos humanos contienen un nivel total de folatos de 135 a 600 ng /mL, la mayor parte de estos folatos contienen cuatro o más residuos glutamil.

El contenido de folilpoliglutamatos de larga cadena en el hígado esta inversamente relacionada con el total de la concentración de folatos presentes en el hígado.

Los humanos contienen suficiente  $\gamma$ -glutamil hidrolasa para convertir los folilpoliglutamatos de los alimentos que contienen de cuatro a diez residuos de ácido glutámico en folilmonoglutamatos.

La enzima  $\gamma$ -glutamil hidrolasa se requiere para la eficiente absorción de folatos relacionados con la dieta, la enzima no se requiere para la absorción del ácido fólico que es la presentación farmacéutica y de 5-formil- $H_4$ pteglu. La enzima  $\gamma$ -glutamil hidrolasa reconoce la unión  $\gamma$ -glutamil y no es capaz de hidrolizar otros enlaces  $\alpha$ -peptídicos típicos presentes en las proteínas. La absorción en el intestino, no está claramente elucidada, el yeyuno proximal es el principal sitio de absorción de folatos, la absorción con una dosis oral de 1 mg de ácido fólico no conjugado comienza en minutos y el valor pico es alcanzado de una a dos horas. Una vez realizada la absorción por el intestino los folatos se encuentran en el torrente sanguíneo en forma monoglutamil. La principal forma de folatos en el suero es 5-metil- $H_4$ folilmonoglutamato. Los folatos absorbidos pueden ser convertidos a la forma 5-metil durante su paso por el enterocito y el hígado, y tener como consecuencia un aumento de 5-metil- $H_4$ folilmonoglutamato en el torrente sanguíneo.

Absorción de folatos  $\xrightarrow{\text{Hígado}}$  5-metil- $H_4$ folilmonoglutamato

Una pequeña cantidad de folatos de los alimentos está hidrolizada en folilmonoglutamato por que muchos animales y plantas contienen  $\gamma$ -glutamil hidrolasa, el cocimiento elevado de los alimentos destruye la actividad de la enzima. Fuera de la célula, los folatos se reducen y se oxidan. Los folatos absorbidos desde el intestino son reducidos a un nivel de tetrahidrofolato por la dihidrofolato reductasa. Esta enzima también reduce formas dihidrofolato en la biosíntesis de timidilato. Con la excepción de dihidrofolato reductasa, el funcionamiento óptimo de los cofactores de tetrahidrofolato deben de ser en la forma poliglutamato. Una vez que los folilmonoglutamatos plasmáticos son transportados dentro de la célula, se realiza un aumento de enlaces poliglutamil esto es catalizado por la folilpoliglutamato sintetasa. Esta enzima utiliza como sustrato tetrahidrofolatos monoglutamados, algunos estudios sugieren que tetrahidrofolatos y/o

$N^{10}$ -formiltetrahidrofolatos pueden servir como sustrato fisiológico para la adición del primer glutamato, los poliglutamatos son generados de la mezcla de tetrahidrofolatos; por lo tanto los tetrahidrofolatos poliglutamados son derivados de cadena larga con actividad de sustrato detectable, la formación de la cadena poliglutamil se lleva a cabo en dos eventos y por cada residuo de glutamato adicionado se requiere la energía de una molécula de ATP.



En estos eventos se requiere la retención de la vitamina dentro de la célula. La larga cadena poli aniónica impide que pasen fuera a través de la membrana celular. Bajo condiciones fisiológicas existen folatos con predominio de pentaglutamatos y hexaglutamatos. La folilpoliglutamato sintetasa tiene la especificidad de quitar y aumentar glutamatos a los folatos, así también de antifolatos. En general en los estudios de distribución,

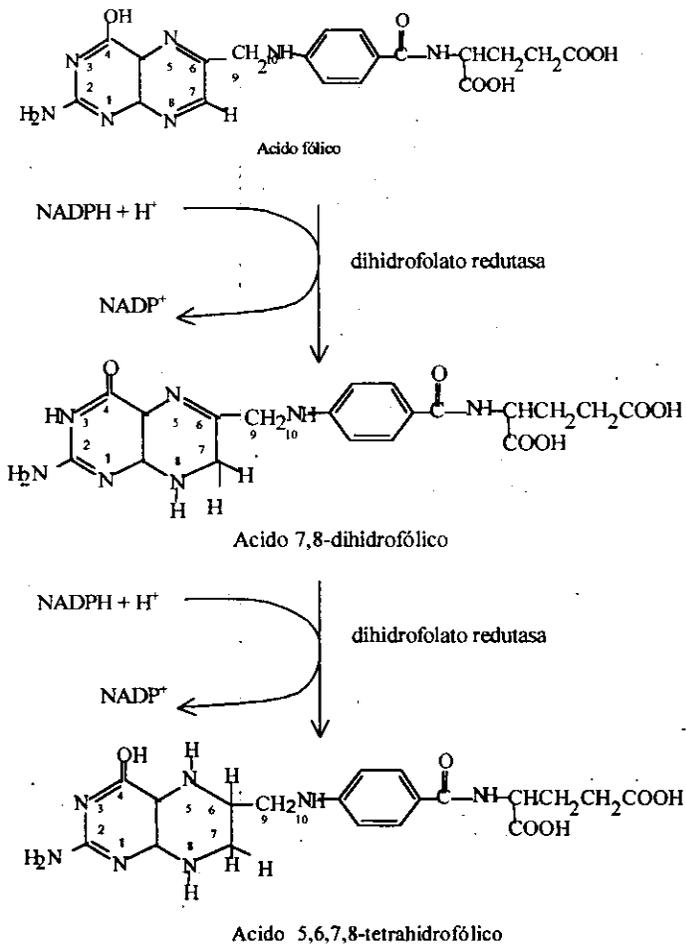
N<sup>10</sup>-formiltetrahidrofolatos y N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolatos son los cofactores presentes en grandes cantidades en tejidos y células.<sup>1,3,6,7</sup> En las determinaciones de folatos por medio de los métodos microbiológicos los más utilizados es por la proliferación de *S. Faecalis* o de *L. casei* estos microorganismos no utilizan 5- metil tetrahidrofolato o poliglutamatos de cadena pequeña.

#### Actividad de los derivados de ácido fólico en bacterias.<sup>1,10</sup>

Derivado de ácido fólico	<i>Periococcus cerevisiae</i> *	<i>S. faecalis</i> *	<i>Lactobacillus casei</i>
Derivados de TFH			
N <sup>5</sup> -meti TFH	+	+	+
Folatos y pteroil diglutamatos	-	+	+
N <sup>5</sup> -meti TFH, N <sup>5</sup> -meti IDFH y pteroil triglutamatos	-	-	+

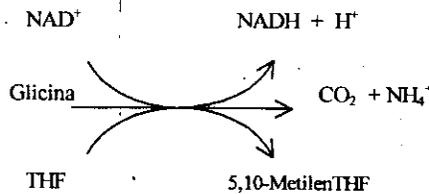
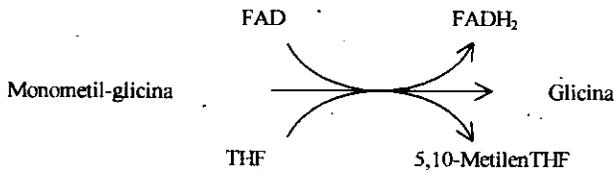
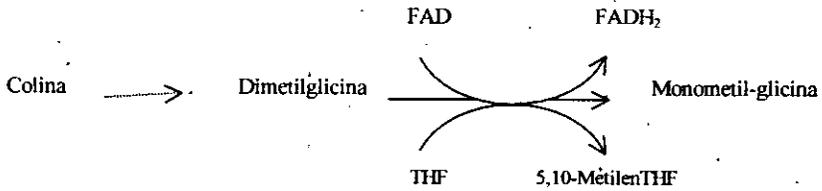
## 2.6. REACCIONES DE TRANSFERENCIA DE GRUPOS FUNCIONALES MONOCARBONADOS EN LAS QUE PARTICIPAN LOS FOLATOS.

El tetrahidrofolato (THF) es derivado del ácido fólico (latín: *folium*, hoja), antes de ser una coenzima activa, THF debe ser enzimáticamente reducida en dos eventos, ambas reducciones son catalizadas por la dihidrofolato reductasa (DHFR) y nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) como coenzima<sup>4,5,6</sup>



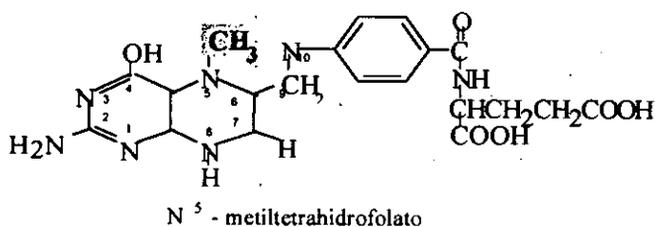
Los diferentes derivados del THF son los cofactores más versátiles en la biosíntesis de macromoléculas, su función es transferir o aceptar grupos funcionales monocarbonados para la biosíntesis de aminoácidos y nucleótidos.

El Tetrahidrofolato no transfiere grupo funcional, está implicado directamente en el catabolismo de oxidación de colina para formar glicina, dióxido de carbono y se genera  $N^5, N^{10}$ - metilentetrahidrofolato las reacciones son:



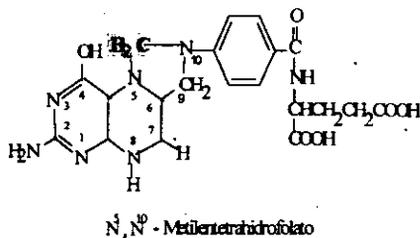
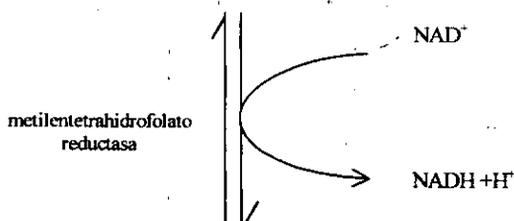
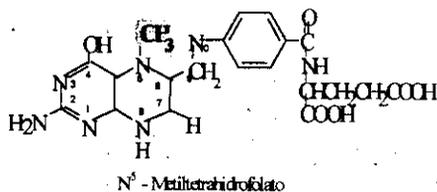
LOS GRUPOS FUNCIONALES MONOCARBONADOS DE LOS DIFERENTES DERIVADOS DEL THF  
SE PUEDEN ENCONTRAR EN TRES ESTADOS DE OXIDACIÓN.

En su forma más reducida  $N^5$ -metiltetrahidrofolato transfiere grupos metilo ( $CH_3$ )<sup>4,5</sup>



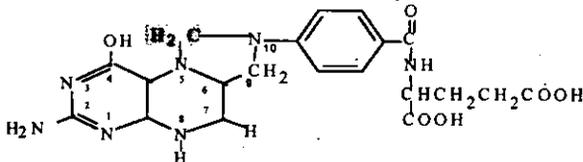
Las interconversiones enzimáticas de los derivados de tetrahidrofolatos que generan

$N^5$ -metiltetrahidrofolato son:



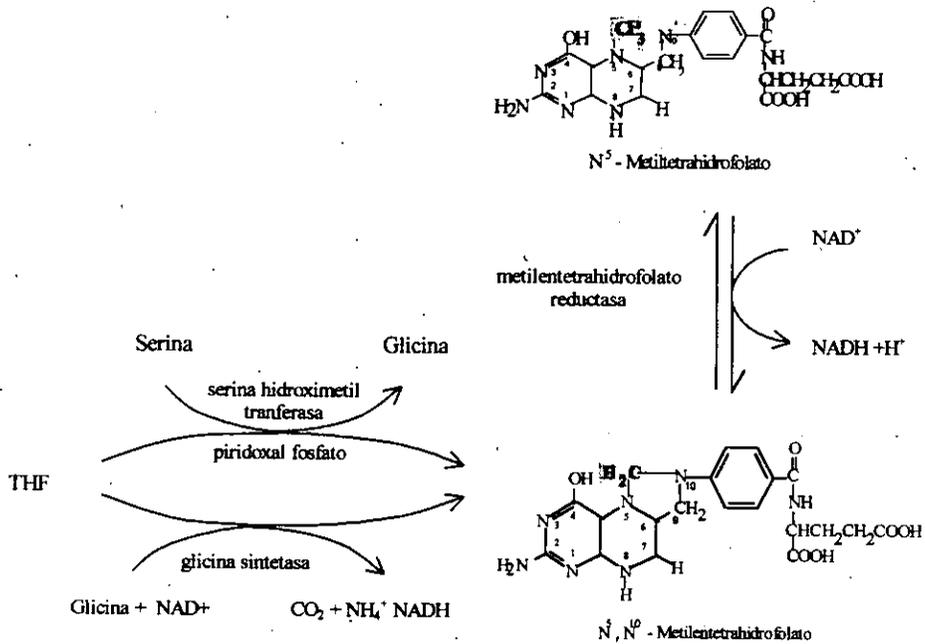
La función del  $N^5$ -metiltetrahidrofolato es transferir un grupo metilo a homocisteína para generar metionina en el ciclo de metilos activados este evento es catalizado por la homocisteína transferasa, y esta mediada por la metilcobalamina que es una coenzima derivada de la vitamina  $B_{12}$ . El THF puede transferir un grupo metilo en su átomo  $N^5$ , pero su potencial no es elevado para la mayoría de las metilaciones biosintéticas. El principal donador de metilos activados es la S-adenosilmetionina (SAM). La S-adenosilmetionina se sintetiza mediante la transferencia del grupo adenosilo del ATP al átomo de azufre de la metionina adyacente, lo cual lo hace mucho más reactivo que el  $N^5$ -metiltetrahidrofolato. El elevado potencial de transferencia de metilos de la S-adenosilmetionina hace posible la transferencia a una amplia gama de aceptores, la metilación de fosfatidiletanolamina para formar fosfatidilcolina que es un fosfolípido muy abundante en las membranas celulares y fuente de colina en la biosíntesis de esfingolípidos. La metilación de ácido guanidoacético para formar creatina, la metilación del ácido gamma-amino butírico para formar gamma- butirobetaina, que a su vez se oxida para formar L- carnitina y en la formación de epinefrina y de norepinefrina<sup>4</sup>.

En su forma intermedia  $N^5, N^{10}$ - metilentetrahidrofolato transfiere grupos metileno ( $-CH_2-$ )<sup>4,5</sup>

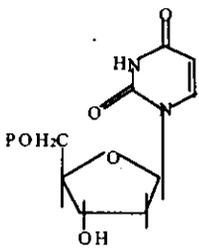


$N^5, N^{10}$  - Metilentetrahidro folato

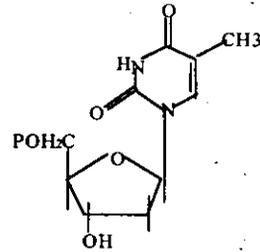
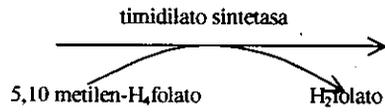
$N^5, N^{10}$ - metilтетраhidrofolato es la principal fuente de unidades de carbono y se genera a través de la biosíntesis de la serina, del catabolismo de la glicina y de las ínter conversiones de los diferentes derivados de los folatos.



El  $N^5, N^{10}$ - metilтетраhidrofolato se utiliza directamente en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidinas, transfiere su grupo metileno en la metilación de la deoxiuridina 5'- monofosfato (dUMP, o ácido deoxiuridílico) transformando en deoxitimina 5'- monofosfato (dTMP, o ácido deoxitimidílico), la reacción esta catalizada por timidilato sintetasa.

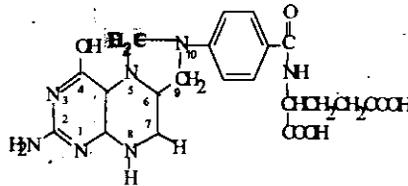
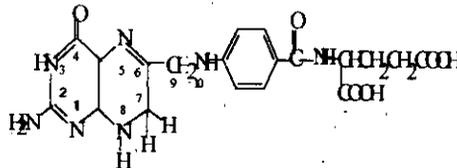
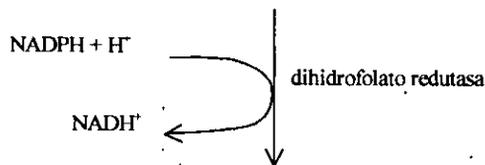


Deoxiuridina 5'-monofosfato



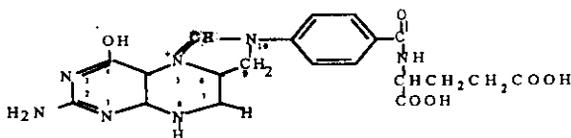
Deoxitimidina 5'-monofosfato

El N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>- metilentetrahidrofolato se oxida a dihidrofolato y se regenera a THF por la acción de la dihidrofolato reductasa, utiliza NADPH como agente reductor.<sup>1,7,8.</sup>

N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Metilentetrahidrofolato

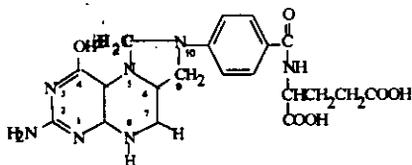
Acido 7,8-dihidrofolico

En su forma más oxidada  $N^5, N^{10}$ -meteniltetrahidrofolato contiene un grupo metenilo y es intermediario para la formación de  $N^{10}$ -formiltetrahidrofolato. ( $\text{=C-H}$ ).<sup>4,5</sup>

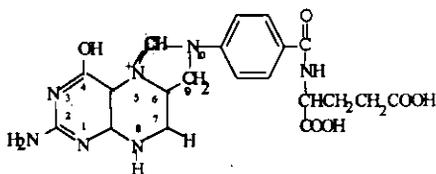


$N^5, N^{10}$ -Metenil 5,6,7,8-tetrahidrofólico

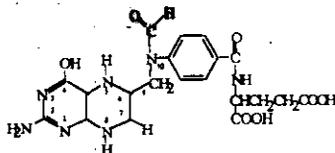
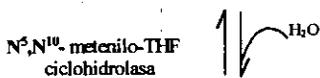
$N^5, N^{10}$ -meteniltetrahidrofolato no transfiere su grupo metenil, este grupo funcional es hidratado para producir  $N^{10}$ -formiltetrahidrofolato, la reacción es catalizada por una enzima polipeptídica multifuncional que adiciona ácido fórmico a derivados de tetrahidrofolato dependiente de ATP.



$N^5, N^{10}$ -Meteniltetrahidrofolato

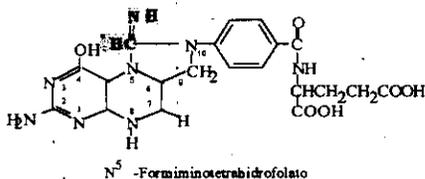


$N^5, N^{10}$ -Metenil 5,6,7,8-tetrahidrofólico

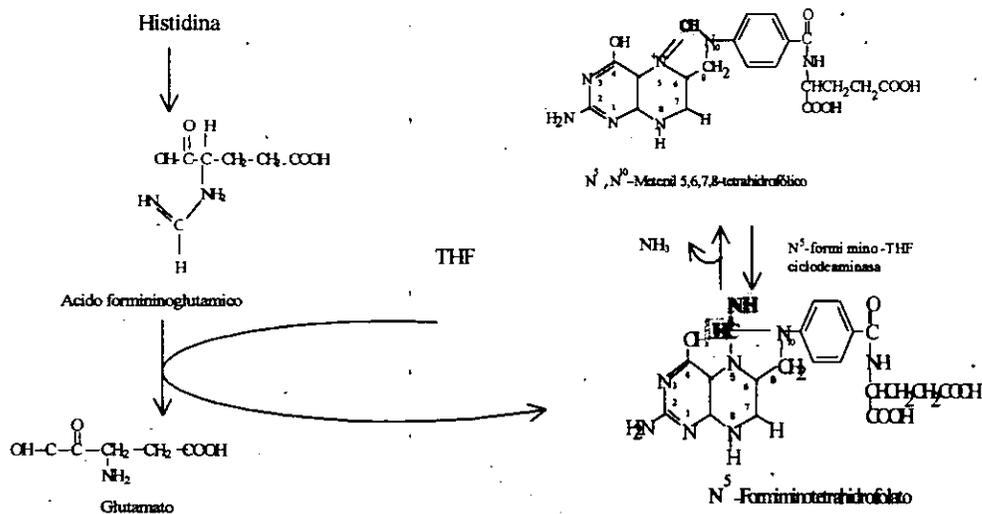


$N^{10}$ -Formiltetrahidrofolato

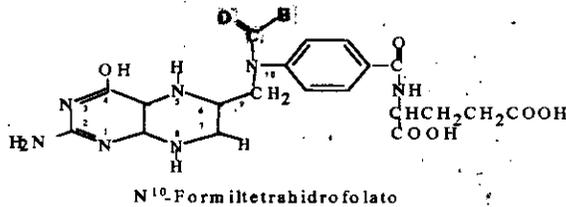
Otro derivado de tetrahidrolato es  $N^5$ -formiminotetrahidrolato ( $\text{CH}=\text{NH}$ ).<sup>4,5</sup>



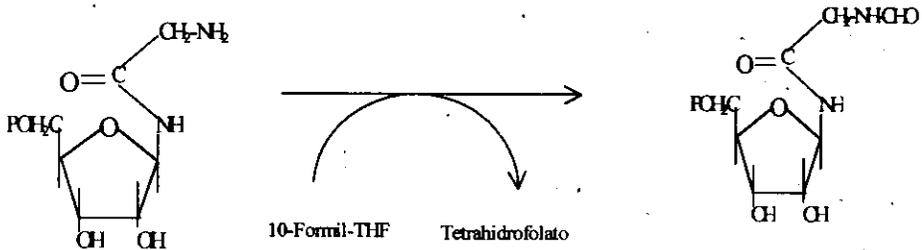
$N^5$ -formiminotetrahidrolato se genera en el catabolismo de la histidina, un intermediario de la degradación de la histidina es el ácido formiminoglutámico, que por la acción de la enzima formiminotransferasa/ciclodaminasa cataliza la transferencia del grupo formimino, del ácido formiminoglutámico al tetrahidrolato para formar  $N^5$ -formiminotetrahidrolato, la enzima tiene dos sitios activos uno de ellos cataliza esta transferencia del grupo formimino, y el otro sitio activo cataliza la conversión de  $N^5$ -formiminotetrahidrolato a  $N^5,N^{10}$ -meteniltetrahidrolato.



*N*<sup>10</sup>-formiltetrahidrofolato se requiere en la vía de la biosíntesis de purinas transfiriendo grupos formilo



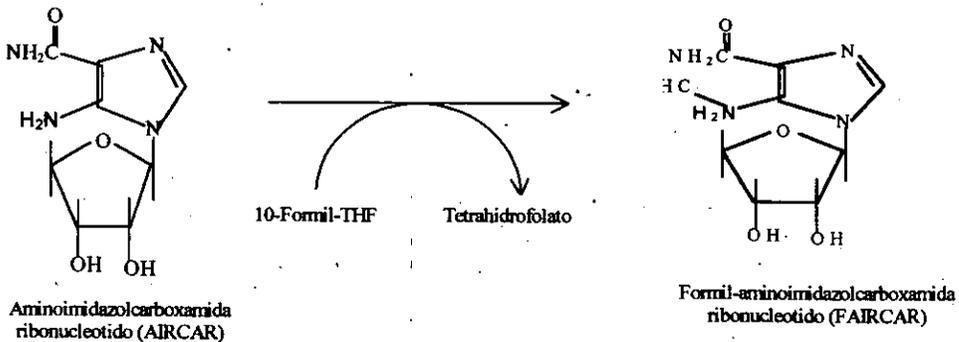
*N*<sup>10</sup>-formiltetrahidrofolato se genera de la oxidación de *N*<sup>5</sup>,*N*<sup>10</sup>-metilmetiltetrahidrofolato para formar *N*<sup>5</sup>,*N*<sup>10</sup>-metilmetiltetrahidrofolato a su vez es hidratado para producir *N*<sup>10</sup>-formil-THF. Así también *N*<sup>10</sup>-formil-THF se genera de la formilación de THF y de la isomerización de *N*<sup>5</sup>-formil-THF. El *N*<sup>10</sup>-formil-THF participa en dos eventos de la biosíntesis de las purinas, el primero es en la conversión de glicinamida ribonucleótido (GAR) para formar formil-GAR.



Glicinamida ribonucleótido (GAR)

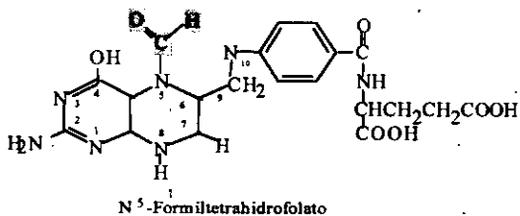
Formilglicinamida ribonucleótido (GAR)

Y la segunda participación del *N*<sup>10</sup>-formiltetrahidrofolato en la biosíntesis de purinas es en la formilación de aminoimidazolcarboxamida ribonucleótido (AIRCAR) para formar formil-AIRCAR.



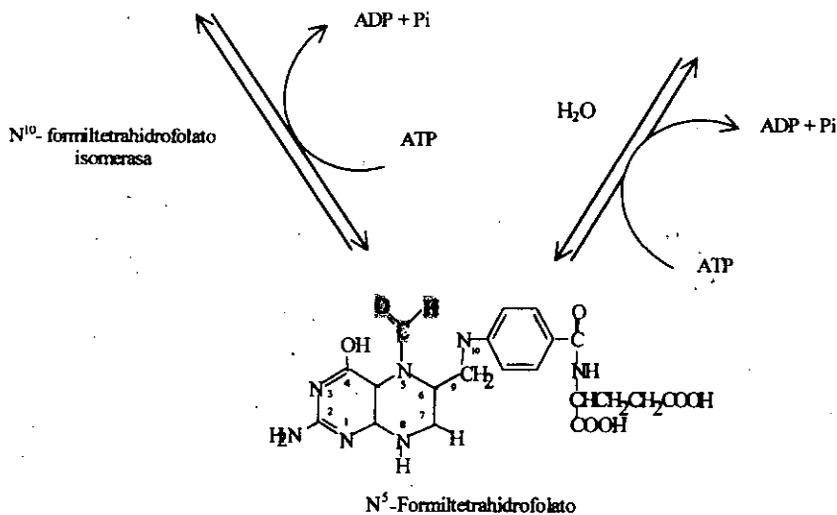
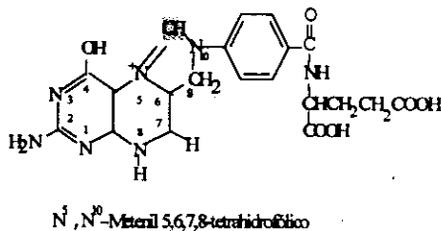
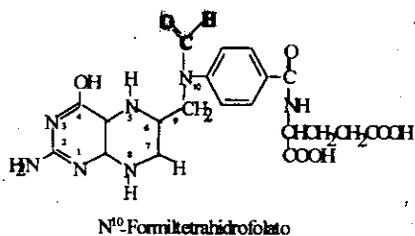
*N*<sup>5</sup>-formiltetrahidrofolato es intermediario para formar *N*<sup>10</sup>-formiltetrahidrofolato y *N*<sup>5</sup>,*N*<sup>10</sup>-meteniltetrahidrofolato

1.4.3

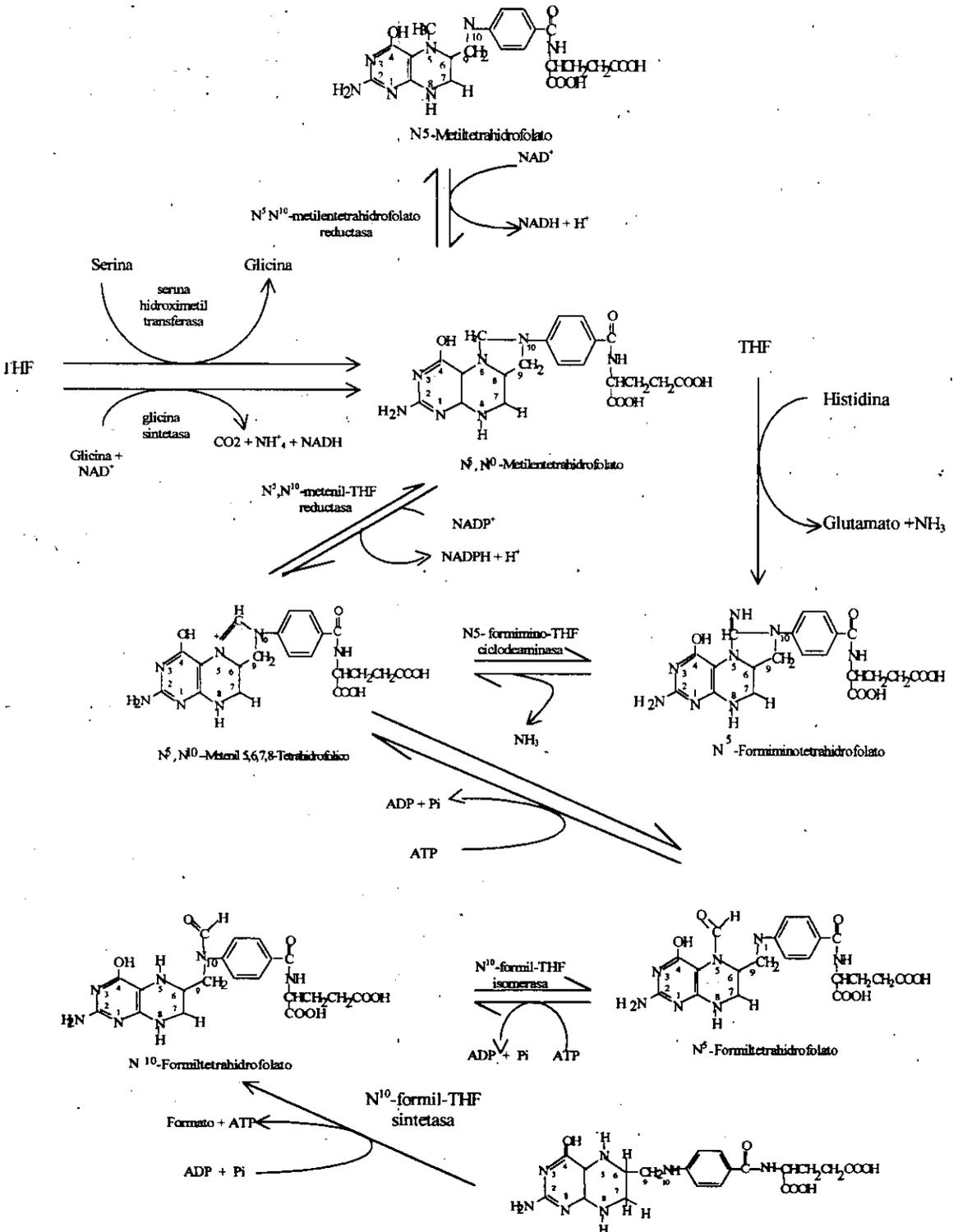


Las interconversiones enzimáticas de derivados de tetrahidrofolatos que generan

*N*<sup>5</sup>-formiltetrahidrofolato son:



Esquema de las interconversiones de folatos. 4,5.



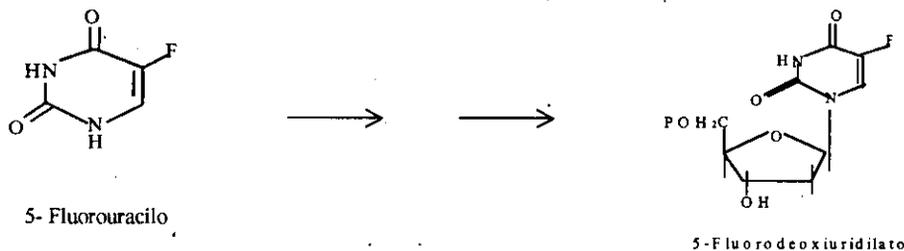
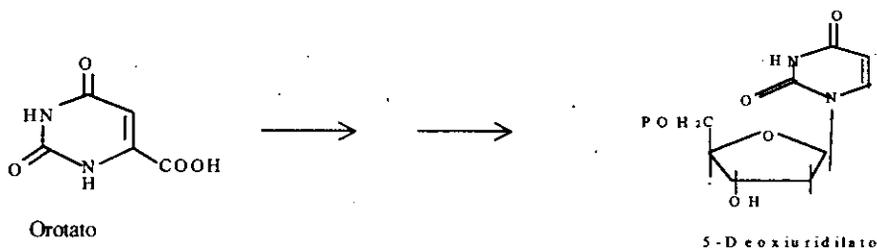
## 2.7. DEFICIENCIA DE VITAMINA B<sub>12</sub>.

La deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> puede tener como consecuencia una disminución de la biosíntesis de timidilato y purinas, así también una declinación en el crecimiento, se puede atribuir a una deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> o de folatos. La metionina sintetasa es una enzima dependiente de vitamina B<sub>12</sub>, esta involucrada en el ciclo de reacciones que transforman metionina a homocisteína. Esta regeneración es disminuida por la deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>, teniendo una acumulación de homocisteína y de N<sup>5</sup>-metil-tetrahidrofolato dentro de la célula. La acumulación de N<sup>5</sup>-metil-tetrahidrofolato se presenta debido a tetrahidrofolato, con la consecuencia de la disminución en la realización de las reacciones que requieren o dependen de tetrahidrofolato.<sup>4-7</sup>

## 2.8. FARMACOS QUE INTERFIEREN CON LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

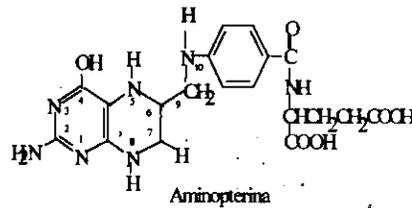
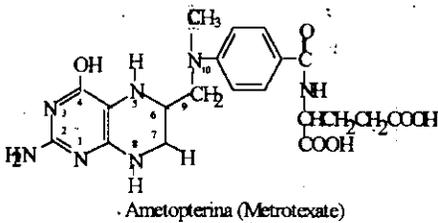
Los antimetabolitos son generalmente estructuras análogas a alguno de los intermediarios de una vía metabólica, este antimetabolito tiene como objetivo alterar el producto final de la biosíntesis de alguna macromolécula que este implicada en un mecanismo fisiopatológico de una enfermedad específica de importancia clínica, el 5-fluorouracilo interfiere en la biosíntesis de nucleótidos de pirimidina, específicamente para inhibir la síntesis de un nucleótido de timidina. La siguiente explicación y el posterior esquema son una breve descripción de la biosíntesis de pirimidinas en donde el intermediario orotato, es desplazado por un análogo, el 5-fluorouracilo, este se incorpora a la ruta y forma 5-fluorodeoxiuridilato en lugar de formar 5'-deoxiuridina, el evento siguiente en la biosíntesis normal es la transformación de un nucleótido de uracilo a un nucleótido de timina, este se realiza mediante una reacción catalizada por timidilato sintetasa que transforma de 5'-deoxiuridina (dUMP) a 5'-deoxitimina (dTMP), la reacción es inhibida irreversiblemente por 5-fluorodeoxiuridilato (F-dUMP).

Esta es una breve descripción de la biosíntesis de nucleótidos de timidina y como interfiere el 5-fluorouracilo como antimetabolito; la molécula orotato es intermediario en la biosíntesis de pirimidinas, es desplazado por un análogo; el 5-fluorouracilo.



La formación de 5-fluorodeoxyuridilato en la biosíntesis de bases pirimidicas tiene como consecuencia la inhibición de la enzima timidato sintetasa por el 5-fluorodeoxyuridilato, una probable explicación de la inhibición de esta enzima es la siguiente: el átomo de azufre de la cistina 146 de la enzima timidilato sintetasa se adiciona al C-6 del F-dUMP, el radical  $\text{CH}_2$  del  $\text{N}^5$ , el  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$  metilentetrahidrofolato se adiciona entonces al C-5, formando un enlace covalente, posteriormente la enzima no se puede separar del F-dUMP por el ion  $\text{F}^+$ , de este modo se bloquea la catálisis, formando un complejo covalente entre F-dUMP, el  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -metilentetrahidrofolato y el grupo sulfhidrido de la enzima, este mecanismo es un ejemplo de un sustrato suicida, en la que una enzima transforma un sustrato en inhibidor, este producto inmediatamente inactiva la propia actividad catalítica, de esta forma inhibe

pirimidinas a conducido a la aplicación clínica del 5-fluorouracilo como agente antitumoral para inhibir la síntesis de 5'-deoxitimina monofosfato. La inhibición de dUMP a dTMP tiene como consecuencia un incremento gradual de dUMP en la célula, una pequeña cantidad de dUMP es convertido a ácido uridin trifosfato (dUTP). Normalmente la enzima ácido dexosirribonucleico polimerasa reconoce: ácido adenintrifosfato (dATP), ácido timidintrifosfato (dTTP), ácido guanosintrifosfato (dGTP), ácido citosintrifosfato (dCTP), como sustratos para la síntesis de ADN, con el incremento de los niveles de dUTP en la célula, una pequeña cantidad de uracilo comienza a incorporarse dentro del polímero de ADN. Esta base anormal en la cadena de ADN es reconocida por las enzimas de reparación de la célula, el intento por reparar el ADN anormal tiene como consecuencia una ruptura accidental de la cadena de ADN y una posterior muerte celular. Los antifolatos son compuestos que interfieren con la formación de los cofactores de tetrahidrolato, de dihidrolato o de ácido fólico por inhibición de la enzima dihidrolato reductasa. La aminopterina y la ametopterina (metrotexato), son análogos de tetrahidrolatos, estas moléculas son potentes inhibidores competitivos de la dihidrolato reductasa. El metrotexato es un fármaco valioso en el tratamiento de muchos tumores de crecimiento rápido, tales como leucemia aguda y coriocarcinoma, el metrotexato es muy tóxico debido a que afecta tanto a las células malignas y a las no malignas.



Las células de la médula ósea, las células epiteliales del tubo digestivo y los folículos pilosos son muy vulnerables a esta acción tóxica de este antagonista de folatos, el procedimiento de la quimioterapia es tratar al paciente con cáncer con una dosis letal de metrotexato y unas horas después rescatar al paciente por la administración masiva de 5-formil tetrahidrolato y/o timidina. El Trimetoprim también es un antifolato, fue descubierto por George Hitchings y Getrude Elion, el trimetoprim se une con más afinidad a la dihidroreductasa de las bacterias que a la de los mamíferos y se utiliza como agente antibacteriano en la terapéutica médica.<sup>1, 4-7</sup>

## 2.9. TRASTORNOS FISIOPATOLOGICOS ASOCIADOS CON LA DEFICIENCIA DE FOLATOS.

En 1962, Herbert especificó la consecuencia por la deficiencia de folatos, que es el inicio de una anemia megaloblástica. Después de haberse iniciado una dieta deficiente en folato, las diversas anomalías se establecen :

después de 3 semanas de deficiencia de los niveles de folatos séricos bajos; 5 semanas después, neutrófilos hipersegmentados en médula ósea; 7 semanas después, neutrófilos hipersegmentados en sangre periférica con un incremento en la médula ósea de mitosis anómalas y de megaloblastos basílicos intermedios; 10 semanas después, médula ósea con algunos metamielocitos grandes y megaloblastos policromatófilicos intermedios; 13 semanas después elevada excreción de ácido formiminoglutámico (FIGLU) en la orina, 17 semanas después, folatos en eritrocitos bajo; 18 semanas después, macroovalocitos de los eritrocitos con un elevado número de metamielocitos grandes en la médula ósea; 19 semanas después, médula ósea francamente megaloblástica.

Después de 20 semanas, anemia.

Hasta después de 20 semanas todavía no aparecen las alteraciones del epitelio intestinal, sin ingesta de folatos en la dieta, la anemia aparece en el hombre en un periodo de 3 a 6 meses. Los cambios morfológicos de la sangre periférica y de la médula ósea en la anemia megaloblástica debida a deficiencia de folatos son muy similares a los de la deficiencia de cobalamina.<sup>20</sup>

## 2.10. MANIFESTACIONES GENERALES DE LA ANEMIA.

Se considera que la anemia se presenta cuando la concentración de la hemoglobina o el hematócrito se sitúan por debajo del límite inferior del intervalo de referencia del 95 % con respecto a la edad, el sexo y la altitud geográfica del individuo.

Valores de referencia por debajo de los cuales se considera que existe anemia a nivel del mar.<sup>20</sup>

20. Edad ( años)	Hemoglobina (g / dL)	Hematócrito (L/L)
0.6 a 4	11	0.33
5 a 9	11.5	0.34
10 a 14	12	0.36
Adultos: varones	14	0.42
Adultos: mujeres	12	0.36
Mujeres gestantes	11	0.33

### SIGNOS CLINICOS DE LA ANEMIA.

Ciertos signos y síntomas clínicos provienen de la menor capacidad de la sangre para transportar oxígeno y por lo tanto, son más o menos proporcionales a la concentración de hemoglobina y al volumen sanguíneo, y depende de la velocidad de estos cambios. Los factores que la modifican son los ajustes de compensación de gasto cardiaco, la frecuencia respiratoria y la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Si la anemia se desarrolla crónicamente en un individuo no atacado gravemente por otra enfermedad, es probable encontrar concentraciones de hemoglobina hasta de 6 g / dL, sin que se originen molestias ni síntomas físicos, mientras el individuo esté en reposo.

En general, un individuo anémico se queja de propensión a la fatiga y disnea de esfuerzo, ocasionales desfallecimientos, vértigos, palpitaciones y cefaleas. Los hallazgos físicos más comunes son palidez, pulso rápido, hipotensión, fiebre ligera, leve edema maleolar y soplos sistólicos. Además de estos signos y síntomas generales, existen muchos datos clínicos propios del tipo específico de anemia. Las causas de la anemia se dividen en tres categorías fisiopatológicas importantes como son: la producción deficiente de eritrocitos, pérdida de sangre y destrucción de eritrocitos. La presencia de una anemia no constituye una enfermedad, sino un signo de un trastorno subyacente, cuyo mecanismo fisiopatológico debe identificarse para planificar un tratamiento adecuado para la recuperación de la salud del individuo que la padece. Un detalle crítico en el tratamiento de las anemias es que debe ser específico, lo que implica la necesidad de establecer el diagnóstico del mecanismo fisiopatológico que causa la anemia, el estudio detallado del diagnóstico de la anemia es establecido por las pruebas de laboratorio que cuantifican el grado de anemia; uno de los estudios fundamentales es la biometría hemática, que proporciona el análisis completo del hemograma y proporciona datos, como índices eritrocitarios, recuento de plaquetas, otros estudios como lo son: el recuento de reticulocitos, estimación de la policromatofilia, y una revisión de la morfología celular en una extensión de sangre periférica teñida, y un esquema establecido para la clasificación etiológica de la anemia. Una de las tres categorías de las causas fisiopatológicas de la anemia es por producción deficiente de eritrocitos y puede ser causada por deficiencia de hierro, de cobalamina o de folatos; a la anemia por producción deficiente de eritrocitos por deficiencia de folatos se le denomina anemia megaloblástica y se asocia generalmente a una alimentación insuficiente.<sup>11,20</sup>

### 2.11. ANEMIA MEGALOBLASTICA.

Sangre periférica. La anemia megaloblástica causa una anemia denominada macrocítica, debido a la morfología que se observa en los eritrocitos en una frotis de sangre teñido, las anemias macrocíticas asociadas a megaloblastosis difieren de las no megaloblásticas por la presencia en la sangre de macroovalocitos y neutrófilos gigantes hipersegmentados. La pancitopenia se presenta, es elevado el volumen corpuscular medio de los eritrocitos y se observan macroovalocitos, anisocitosis y poiquilocitosis. Se observa en ocasiones el punteado basófilo, cuerpos de Howell-Jolly múltiples, hematíes nucleados con cariorrexis e incluso megaloblastos. Los gránulocitos poseen un número aumentado de lóbulos como consecuencia de una maduración anormal. La hipersegmentación se define como la presencia de cinco lóbulos en más de 5 % de los neutrófilos, o de cualquier neutrófilo con seis lóbulos o más.

Médula: La anemia megaloblástica se caracteriza por el agrandamiento de todas las células de proliferación rápida del organismo, incluidas las de la médula. La anomalía más importante es la disminución de la capacidad de síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN). Las células presentan una prolongada fase de reposo intermitótico y un bloqueo precoz de la mitosis. El número de figuras mitóticas aumenta. La síntesis de ácido ribonucleico (ARN) se altera menos que la de ADN, por lo que la maduración citoplasmática y su desarrollo continúan, con el consecuente aumento del tamaño de las células. La cromatina fina y la prominente paracromatina dan lugar a un patrón de cromatina claramente más abierto que el de la serie normoblástica. Los núcleos sufren cariorrexis con facilidad apareciendo numerosos cuerpos de Howell-Jolly. Suelen haber más células parecidas al pronormoblasto y al normoblasto basófilo que los promegaloblastos y megaloblastos basófilos que aparecen en la eritropoyesis normal. A este fenómeno se le ha denominado detención de la maduración o asincronía nucleocitoplasmática. Los megaloblastos policromáticos gigantes son muy característicos. En la serie granulocítica, las células son mayores y presentan un retraso en la maduración nuclear y una masa citoplasmática grande, los gránulos son mayores, el patrón de cromatina es menos condensado y como consecuencia el núcleo no se tiñe bien. La médula ósea es hiperplásica, la médula amarilla se va sustituyendo por médula roja, que se extiende hacia los huesos largos. El número de precursores eritroides aumenta (megaloblastos) y el cociente mieloide -eritroide disminuye. Si el proceso megaloblástico es incompleto o el paciente no está tratado adecuadamente, los resultados pueden ser sólo parciales. Las alteraciones granulocíticas son muy útiles para valorar una anemia megaloblástica debido a que las alteraciones persisten por largo tiempo. Los hallazgos medulares son como consecuencia del efecto de la alteración en la síntesis

de ácidos nucleicos con megaloblastosis y del estrés hipóxico, que da lugar a un aumento de número de células eritroides.<sup>11,20</sup>

### ERITROCINETICA.

En las anemias megaloblásticas aumenta la masa eritroide, se acelera el recambio de hierro plasmático y aumenta el urobilinogeno urinario y fecal. Estos índices nos indican un aumento de la eritropoyesis total hasta tres veces su ritmo habitual, la disminución de hierro en los hematíes circulantes y la reticulopenia indican una reducción de la eritropoyesis eficaz. Estos hallazgos implican la presencia de eritropoyesis ineficaz. Además de mayor destrucción de precursores eritroides defectuosos en la médula, la supervivencia de los hematíes circulantes es corta, lo que trae como consecuencia una hemólisis, la bilirrubina indirecta sérica aumenta, así también el hierro sérico, el monóxido de carbono, la deshidrogenasa láctica. La muramidasa en suero puede aumentar y esto indica una granulopoyesis ineficaz. La anemia megaloblástica casi siempre se debe a una deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> o de ácido fólico. Y lo anterior es similar para ambas deficiencias.<sup>20</sup>

### CAUSAS MÁS FRECUENTES DE LA ANEMIA POR DEFICIENCIA DE ACIDO FOLICO.

Los folatos se absorbe en el duodeno y en la porción superior del yeyuno. En la ausencia de la ingesta, los depósitos hepáticos proporcionan sólo un suministro de 2-4 meses. Las causas más frecuentes:

1. La ingesta dietética limitada de folatos.
2. La ingesta de alcohol que interfiere en la absorción de los folatos.
3. Las personas que llevan una dieta marginal ( té, tostadas ).
4. Los lactantes con deficiencia de vitamina C (anemia megaloblástica de la infancia). Dado que el feto obtiene el suministro de folatos de la madre en el embarazo son susceptibles de desarrollar una anemia megaloblástica.
5. La mala absorción intestinal.
6. En Esprue tropical, la mala absorción es secundaria a la atrofia de la mucosa intestinal.
7. Pacientes tratados con anticonvulsivos, anticonceptivos orales por periodos prolongados disminuyen la absorción, así también los antimetabolitos (metrotexate), y antimicrobianos (trimetoprin /sulfametoxazol) que interfieren con el metabolismo de folatos.
8. En la gestación, la lactancia, la diálisis crónica, las anemias hemolíticas crónicas.

La anemia por carencia de folatos (anemia megaloblástica) puede manifestarse en los niños menores de dos años sometidos a lactancia artificial, durante la gestación, después de una diarrea prolongada, debido a trastornos de absorción de folatos.

La anemia megaloblástica representan el 20% de todas las gestaciones. En los países en vías de desarrollo se observa una anemia muy difusa causada igualmente por la carencia de folatos. Se admite igualmente que entre las mujeres grávidas de los países desarrollados es muy frecuente una carencia de folatos. La exposición del feto a una carencia de folatos puede causar deformidades y alteraciones del sistema nervioso central y del cerebro. El labio leporino también puede ser consecuencia de carencia de folatos. El consumo excesivo de alcohol, la pérdida prolongada del apetito y una amplia gama de enfermedades crónicas, entre las que figuran la alergia al gluten, pueden ocasionar la carencia. Un estudio británico ha demostrado que el 24% de los pacientes quirúrgicos sufren una carencia de folatos, mientras que otros estudios indican que hasta el 70 – 80 % de los ancianos de un instituto geriátrico padecían una carencia de esta vitamina, que se manifiesta con depresión y apatía. Otros síntomas de la carencia de folatos son infecciones de la cavidad oral, vértigo, problemas respiratorios y coloración amarillenta de la piel. También se han observado alteraciones cutáneas en mujeres grávidas y en las que toman anticonceptivos. En ciertas malformaciones fetales, como la espina bífida y al anencefalia es un problema de salud pública, que ha recomendado suministrar suplementos de esta vitamina y las del grupo B en todas las mujeres en edad fértil. Si bien se ha recomendado para las gestantes 0.4 mg de folato/día, son muchas las mujeres que en este estado ingieren cantidades menores. El cuadro clínico de las deficiencias de folatos en el hombre incluye manifestaciones inespecíficas de anemia megaloblástica, que son similares a las que se observan en la deficiencia de vitamina B<sub>12</sub> (megaloblastosis, glositis, aumento de deshidrogenasa láctica en suero) además de ciertas características específicas que hacen posible el diagnóstico de deficiencia de folatos, independientemente de la causa subyacente.

Estas características son:

Disminución de los niveles séricos de folatos (cifras normales 6 a 15 ng / mL).

Disminución de los niveles eritrocitarios de folatos (cifras normales 150 a 600 ng / mL de células) y respuesta clínica plena al tratamiento con dosis fisiológicas de ácido fólico.<sup>11,12,20</sup>

### 3.0 METODOS CUANTITATIVOS PARA LA DETERMINACION DE FOLATOS.

#### 3.1 METODOS MICROBIOLÓGICOS.

3.1.1 METODO MICROBIOLÓGICO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO FOLICO EN SUERO UTILIZANDO Streptococcus faecalis, PROPUESTO POR CAPPS HOBBS Y FOX. MODIFICADO POR EL USO DE CITRATO DE SODIO.

PROPOSITO: El medio de cultivo Bacto para la determinación de ácido fólico, se utiliza para determinar la concentración de ácido fólico. El microorganismo que se utiliza para el ensayo es Streptococcus faecalis ATCC 8043.

FUNDAMENTO: El medio de cultivo bacto para la determinación ácido fólico contiene, a excepción de ácido fólico todos los nutrientes y vitaminas esenciales para la proliferación de Streptococcus faecalis ATCC 8043, con la adición de ácido fólico de diferentes concentraciones crecientes conocidas se obtiene la proliferación del microorganismo, esta proliferación se relaciona con la concentración de ácido fólico, la cual puede ser medida por turbidimetría y obtener una relación lineal entre la concentración de ácido fólico y densidad óptica de la proliferación.

#### MATERIAL.

- Tubos de ensayo.
- Matraz Erlenmeyer 500 , 1000 ml
- Vaso de precipitado 100, 500 mL.
- Espátula.
- Gradillas.
- Algodón.

#### EQUIPOS.

- Fotómetro.
- Incubadora.
- Autoclave.
- Estufa.
- Balanza

#### REACTIVOS.

- Agua destilada o desionizada.
- Estándar de ácido fólico.
- Cepa de Streptococcus faecalis ATCC 8043.
- Agar Bacto Lactobacilli AOAC o
- Agar de ensayo Micro(cultivo Stock de los estándares).

- Caldo Bacto Lactobacilli AOAC o,
- Caldo de inóculo Bacto p/el ensayo Micro. (Inoculo de *Streptococcus faecalis*).
- Medio de cultivo comercial, Bacto para *Streptococcus faecalis* ATCC 8043 para la determinación de ácido fólico, que contenga la siguiente formula:

FORMULA.	
Casaminoácidos	12 g
Dextrosa	40 g
Citrato de sodio	20 g
L-cistina	0.2 g
DL-triptofano	0.2 g
Sulfato de adenina	20 mg
Guanina hidrociorada	20 mg
Uracilo	20 mg
Tiamina hidrociorada	0.2 mg
Piridoxina hidrociorada	4 mg
Riboflavina	2 mg
Niacina	2 mg
Acido paraminobenzóico	200 ug
Biotina	0.8 ug
Pantotenato de calcio	400 ug
Fosfato dipotásico	1 g
Fosfato monopotásico	1 g
Sulfato de magnesio	0.4 g
Cloruro de sodio	20 mg
Sulfato ferroso	20 mg
Sulfato de manganeso	20 mg
pH final 6.8 ± 0.2 a 25° C.	
100 gramos en 2.6 litros de agua.	

PROCEDIMIENTO PARA OBTENER LA CEPA DEL INOCULO, POR MEDIO DE LA RESIEMBRA  
DE *Streptococcus faecalis* ATCC 8043.

La cepa de *Streptococcus faecalis* ATCC 8043, se resiembr a con un hisopo en el medio de cultivo agar bacto lactobacilli AOAC o en agar de ensayo micro bacto, incubar de 35 a 37 grados centígrados por un tiempo de 24 a 48 horas, posteriormente los tubos son conservados bajo refrigeración. Las resiembras se realizan mensualmente. El inóculo para el ensayo se prepara resembrando de la cepa de *Streptococcus faecalis* ATCC 8043 en 10 mL de caldo bacto lactobacilli AOAC o caldo de inóculo para el ensayo micro bacto.

Incubar 24 horas de 35 a 37 ° C. Posteriormente las células se centrifugan, bajo condiciones asépticas, el sobrenadante líquido se decanta. Las células se suspenden en 10 mL de cloruro de sodio estéril al 0.85%. La

suspensión es usada como inóculo en cada uno de los tubos del ensayo con el medio estéril bacto para el ensayo de ácido fólico.

#### PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO BACTO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO

##### FOLICO.

Agregar 7.5 g de medio bacto para el ensayo de ácido fólico, a 100 mL de agua destilada o desionizada, calentar a ebullición durante 2 a 3 minutos, agitar y deshacer los precipitados que se formen, adicionar 5 mL del medio a los tubos del ensayo por utilizar (un tubo por cada determinación), y añadir 1 mL de los diferentes sueros problema, controles y estándares (la curva estándar se puede obtener usando ácido fólico preparando las siguientes concentraciones 0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 ng / 10 mL), ajustar el volumen total de todos los tubos a 10 mL con agua destilada o desionizada. Esterilizar todos los tubos en autoclave durante 10 minutos a 15 libras de presión (121° C).

Después de la inoculación del microorganismo incubar los tubos a los que se les adiciono, controles y muestras a una temperatura de 35 a 37 grados centígrados durante 16 a 18 horas una vez terminado el tiempo los tubos son refrigerados de 15 a 30 minutos para detener el crecimiento antes de obtener las lecturas turbidimétricas.

##### RESULTADOS.

Para el cálculo de la concentración de ácido fólico se requiere trazar la gráfica de la curva estándar que se realiza en cada corrida, es importante que para cada ensayo se realice la curva estándar por las diferentes condiciones experimentales que pudieran influir con los resultados entre cada corrida.

Interpolar la absorbancia en la curva estándar de cada control y problema.

##### CURVA ESTANDAR

Preparación: disolver 50 mg de ácido fólico USP estándar de referencia o su equivalente, en 30 mL de NaOH 0.1N y 300 mL de agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 (con una solución de HCl 0.5 N) y agregar agua destilada para obtener un volumen de 500 mL.

Tomar 10 mL de la primera dilución y agregar agua destilada p/500 mL. Ajustar el pH 7.5 (con una solución de HCl 0.5 N) agregar agua destilada hasta obtener un volumen de 1000mL.

Tomar 100 mL de la segunda dilución y agregar agua destilada hasta 500 mL. Ajustar el pH 7.5 con una solución de HCl 0.5 N y agregar agua destilada hasta obtener un volumen de 1000mL.

La última dilución contiene 100 ng de ácido fólico, se debe preparar el estándar para cada ensayo. La solución estándar para el ensayo se obtiene: a 10 mL de la solución stock agregar agua destilada hasta obtener 500 mL., está solución contiene 2 ng de ácido fólico por mL. Usar 0, 2, 3, 4, 5 mL. para cada tubo del ensayo de la curva de calibración. Los tubos después del periodo de incubación son refrigerados de 15 a 30 minutos para detener el crecimiento. El método puede ser sustituido por un método nefelométrico y construir la curva con los valores obtenidos.

Sensibilidad: Utilizando el medio de ensayo ácido fólico bacto se detectan concentraciones en un intervalo de 2 a 10 ng/ 10 mL.<sup>14</sup>

### 3.1.2 VALORACION MICROBIOLÓGICA CON *Streptococcus faecalis* ATCC 8043 PARA ACIDO

#### FOLICO CON EL MEDIO BASE DE ACIDO FÓLICO.

##### FUNDAMENTO.

Algunas bacterias y levaduras sólo pueden crecer en presencia de determinadas vitaminas. Sembrando tales microorganismos en medios de cultivo definidos, que contienen todos los componentes esenciales para el crecimiento óptimo, salvo la vitamina que se quiere valorar, se impide totalmente o por lo menos se reduce drásticamente la multiplicación del microorganismo sembrado, añadiendo la vitamina en cuestión, en cada caso, se obtiene un crecimiento que depende de la cantidad de vitamina añadida. Las cantidades de vitamina presentes se calculan por la turbidez producida por el crecimiento o por la determinación cuantitativa de un metabolito del microorganismo (por ejemplo, ácido láctico).

##### REACTIVOS.

- Medio de cultivo caldo deshidratado para ensayo de vitamina ácido fólico con la siguiente formula:

Fórmula.	
D (+) - glucosa anhidra	40 g
Hidrolizado de caseína exento de vitaminas	12 g
Asparagina	200 mg
DL - alanina	400 mg
L- cistina	200 mg
DL- triptofano	200 mg
Adenina	20 mg
Guanina	20 mg
Uracilo	20 mg
Xantina	20 mg
Ácido 4- aminobenzóico	200 ug
D(+) biotina	0.8 ug
D(+) pantotenato de calcio	400 ug
Ácido nicotínico	2 mg
Piridoxal clorhidrato	4 mg
Riboflavina	2 mg
Tiamina dicloruro	2 mg
Hidrogenofosfato dipotásico	1 g
Sulfato de hierro II	20 mg
Composición	g / L
Dihidrogenofosfato dipotásico	1 g
Sulfato de magnesio	400 mg
Sulfato de magnesio II	20 mg
Acetato de sódico	20mg
Adicionalmente Tween 80	0.4 mL
pH	6.8
Preparación / litro	76 g

## Composición del Caldo Micro-inoculum.

Proteasa	5.0
Extracto de levadura	20.0
D(+) - glucosa	10.0
Dihidrogenofosfato potásico	2.0
Tween® 80	0.1

## PREPARACION

Disolver 76 g del medio de cultivo caldo deshidratado para ensayo de vitamina ácido fólico en 1000 mL de agua totalmente desionizada y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121° C. pH 6.7 ± 0.1.

La cepa del ensayo *Streptococcus faecalis* ATCC 8043, puede ser adquirida en American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA.

## INSTRUMENTOS.

Fotómetro con filtro de longitud de onda a 546 nm

Autoclave.

Incubador.

Preparación de las muestras:

Proceso de extracción: extraer el ácido fólico del material a investigar con agua que contenga algunas gotas de NaOH 1M y calentar.

La liberación del ácido fólico ligado necesita un pretratamiento enzimático:

- a) Homogeneizar 1 g de material a investigar en 150 mL de tampón de fosfatos 0.05 N (pH 7.2).
- b) Esterilizar (15 min. a 121° C), añadir 20 mg de enzima pancreática (anhidra) e incubar durante 24 horas a 37° C.
- c) Llevar a esterilización la suspensión (5 min. a 121°C) enfriar y filtrar.

Suspensión de Inoculación:

- a) Del cultivo madre del microorganismo del ensayo *Streptococcus faecalis* (ATCC 8043) sembrar en caldo microinoculum y se incuba durante 20 horas a 37° C.
- b) Centrifugar las bacterias, lavar tres veces con solución salina fisiológica estéril y ajustar la suspensión a  $2 \times 10^8$  gérmenes/ml.

Patrón:

- Solución de calibración:

- Disolver 50 mg de ácido fólico (anhidro) en 30 ml de sosa cáustica 0.01N.
- Añadir 300 ml de agua destilada y de ajustar a pH de 7.8 completar hasta 500 ml. De esta solución madre que contienen 100 ug / ml preparar, antes de su uso, la solución patrón correspondiente, hasta 2 ng/ml.
- Preparar una serie de diluciones con las siguientes concentraciones:

0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 10 ng de ácido fólico, añadir 0.0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 ml de solución patrón en los tubos y completar con agua bidestilada hasta 5ml.

Los tubos para el control del cultivo y del control de esterilidad contienen solamente 5 ml de agua.

Concentración de ng ácido fólico/ 10 mL	0.0	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	10.0
mL de solución patrón	0.0	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	5.0
Agua destilada	10.0	9.75	9.5	9.0	8.0	6.0	5.0

Muestras: preparar los tubos para las muestras al igual que para la solución patrón, completar hasta 5 ml con agua bidestilada.

Preparar el medio de siembra para el ensayo,

- Disolver 76 g del medio del ensayo para la determinación de ácido fólico, cultivo en caldo, con tween 20® en 1000 ml de agua bidestilada y hervir brevemente.
- Ajustar el pH a 6.8, 25 ° C, añadir a todos los tubos de calibración, muestras y controles 5 ml de medio de cultivo cerrar con tapa y esterilizar en autoclave durante 10 minutos, a una temperatura de 115.° C.
- Dejar enfriar los tubos, y sembrar con 1 gota de inóculo de siembra, a excepción de los controles de esterilidad, e incubar durante 16 a 20 horas a 37 ° C.

Evaluación: medir fotométricamente a una longitud de onda de 546 nm de la densidad óptica de las soluciones de calibración y de la muestra frente al cultivo de control.

Para obtener la gráfica de la curva de calibración registrar los valores de la absorbancia en las ordenadas y las cantidades de ácido fólico en las abscisas en escala logarítmica.

Una evaluación solo tiene validez si la DO a 546 nm, en una cubeta de 1 cm de espesor es menor de 0.150 para el control del cultivo, medido frente a un blanco de agua. Los controles de esterilidad no deben presentar crecimiento alguno.

#### CONTROL DE CALIDAD DEL CALDO DE ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO.

CEPA DE ENSAYO. *Streptococcus faecalis* ATCC 8043.

INÓCULO DE SIEMBRA : ajustar a 50% de absorbancia ( 630 nm, cubeta de 1 cm , frente a 0.9 % de NaCl.)

CRECIMIENTO : La curva de calibración muestra crecimiento escalonado de a 200 ng a 2000 pg de ácido fólico.<sup>15</sup>

**3.1.3. ENSAYO MICROBIOLÓGICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO FÓLICO EN SUERO UTILIZANDO *Lactobacillus casei* ATCC 7469 PROPUESTO POR FLYNN, WILLIAMS, O'DELL Y HOGAN. MODIFICADO POR BAKER, HERBER, FRANK, PASHER, HUNTER, WASSERMAN SOBOTKAWATERS Y MOLLIN.**

PROPOSITO: El medio de cultivo para ácido fólico se utiliza para determinar la concentración de ácido fólico. El microorganismo que se utiliza para el ensayo es *Lactobacillus casei* ATCC 7469.

FUNDAMENTO: El medio de cultivo para ácido fólico contiene todos los nutrientes y vitaminas esenciales para la proliferación de *Lactobacillus casei* ATCC 7469 a excepción de ácido fólico, con la adición de diferentes concentraciones crecientes de ácido fólico la proliferación del microorganismo puede ser valorada por turbidimetría para cuantificar la concentración de ácido fólico.

**MATERIAL.**

- Tubos de ensayo.
- Matraz Erlenmeyer 500, 1000 mL.
- Vaso de precipitado 100, 500 mL.
- Espátula.
- Gradillas.
- Algodón.

**EQUIPOS.**

- Fotómetro.
- Incubadora.
- Autoclave.

**REACTIVOS.**

- Estándar de ácido fólico.

- *Lactobacillus casei* ATCC 7469

- Medio de cultivo comercial, Bacto *Lactobacillus casei* ATCC 7469 para la determinación ácido fólico, con la siguiente fórmula:

FORMULA.	
Casiton tratado con carbón	10 g
Dextrosa	40 g
Acetato de sodio	40 g
L-cistina hidrociorada	0.2 g
DL-triptofano	0.2 g
Asparagina	0.6 g
Sulfato de adenina	20 mg
Xantina	20 mg
Uracilo	20 mg
Complejo monoleato de sorbitan	0.1 g
Glutación reducido	5 mg
Guanina hidrociorada	20 mg
Uracilo	20 mg
Tiamina hidrociorada	4 mg
Piridoxina hidrociorada	400 ug
Niacina	2 mg
Riboflavina	1 mg
Acido paraminobenzóico	200 ug
Biotina	0.8 ug
Pantotenato de calcio	400 ug
Fosfato dipotásico	1 g
Fosfato monopotásico	1 g
Sulfato de magnesio	0.4 g
Cloruro de sodio	20 mg
Sulfato ferroso	20 mg
Sulfato de manganeso	20 mg
pH final $6.8 \pm 0.2$ a $25^\circ \text{C}$ .	
100 gramos en 2.13 litros.	

#### BUFFER A BACTO FOLICO.

Uso: El amortiguador bacto ácido fólico, se requiere en el medio bacto ácido fólico *Lactobacillus casei* para la determinación de ácido fólico. Es utilizado para preparar tanto los estándares así como los especímenes de suero.

#### FORMULA.

Ingredientes por litro.

Fosfato monopotásico .....10.80 g

Difosfato dipotásico.....3.40 g

Acido ascórbico.....1 g

pH final  $6 \pm 0.05$  a  $25^\circ \text{C}$ . 15.4 gramos en 1 litro se obtiene una solución 0.1 M de Buffer A bacto.<sup>14</sup>

## PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

Agregar 9.4 g de medio bacto ácido fólico *L. casei* para la determinación de ácido fólico, en 100 mL de agua destilada o desionizada, adicionar 50 mg de ácido ascórbico, calentar a ebullición durante 1 a 2 minutos. Agitar y deshacer los precipitados que se formen, agregar 5 mL a los tubos que se van a utilizar en el ensayo, adicionar 1 mL de los estándares, controles y los sueros problema a los diferentes tubos, ajustar el volumen total de todos los tubos a 10 mL con agua destilada o desionizada, esterilizar en autoclave durante 5 minutos a 15 libras de presión (121°C).

## PROCEDIMIENTO.

### PREPARACIÓN DEL CULTIVO STOCK Y DEL INOCULO.

El cultivo stock de *Lactobacillus casei* ATCC 7469, se prepara con un hisopo en el medio de cultivo en tubo de agar bacto *Lactobacilli casei* AOAC. Incubar de 35 a 37 ° C durante 24 a 48 horas, al termino de la incubación los tubos son conservados bajo refrigeración. Las resiembras se realizan mensualmente. El inóculo para el ensayo se prepara del cultivo stock de *Lactobacillus casei* ATCC 7469 en 10 mL de caldo de inóculo bacto p/el ensayo micro. Incubar 16 a 18 horas de 35 a 37 ° C, centrifugar las células bajo condiciones asépticas, decantar el sobrenadante, suspender las células en 10 mL de medio bacto ácido fólico *Lactobacillus casei*, resedimentar las células por centrifugación bajo condiciones asépticas, decantar el sobrenadante. finalmente resuspender las células 10 mL de medio bacto ácido fólico *L. Casei*, tomar un 1 mL y diluir con 99 mL con el mismo medio, una gota de esta última suspensión se usa como inóculo en cada uno de los tubos del ensayo.

Algunos laboratorios prefieren utilizar solución de cloruro de sodio al 0.85% en vez de medio basal para lavar y diluir el inóculo. Es importante para cada ensayo se repita la curva de calibración por las diferentes condiciones de temperatura, esterilización, proliferación, etc., lo cual influye en la precisión y exactitud de los resultados.

## LA CURVA ESTÁNDAR

Se proponen las siguientes concentraciones de ácido fólico para la curva de calibración.

0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1.0 ng/ 10 mL.

Disolver 20 mg de ácido fólico seco, en 100 mL de una solución que contiene 20 mL de etanol y 80 mL de agua desionizada. Ajustar la solución a un pH de 10 con NaOH 0.1 N para disolver el ácido fólico, volver a ajustar el pH de 7.0 con HCl 0.05 N. Esta solución contienen 200 ug / mL de ácido fólico. Diluir 1 mL de esta solución con 999 mL de agua destilada o desionizada para tener una solución 200 ng / mL, finalmente diluir 1 mL de 200 ng / mL en 999 mL de amortiguador bacto ácido fólico, esta solución contiene 0.2 ng / mL de ácido fólico y es la que se utilizara para preparar las concentraciones propuestas de los estándares Usar 0.0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL para cada tubo de la curva estándar.

## PRESERVACION DE LOS ESPECIMENES: SUERO.

1. Separar el suero del coagulo sanguíneo.
2. Evite la hemólisis y los restos de las células presentes en el suero.
3. En un tubo de ensayo limpio tomar 5 mL de suero y agregar 25 mg de ácido ascórbico.
4. Si la determinación de ácido fólico no se realiza inmediatamente congelar las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## PREPARACION DE LOS ESPECIMENES: SUERO

1. Descongelar el suero que contiene ácido ascórbico.
2. Hidratar el amortiguador A bacto ácido fólico con 45 mL de agua desionizada, adicionar 5 mL de este amortiguador hidratado al tubo que contiene el suero, homogeneizar.
3. Incubar la solución amortiguadora mas el suero a  $37^{\circ}\text{C}$  por 90 minutos y posteriormente esterilizar la mezcla a 15 libras de presión ( $121^{\circ}\text{C}$ ), durante 2.5 minutos.
4. Centrifugar los tubos para precipitar las proteínas y transferir el sobrenadante a tubos limpios y secos.

La solución limpia es la que se usara para el ensayo de ácido fólico.

#### PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO FOLICO TOTAL.

1. Usar 0.5, 1.0, 1.5, mL u otros volúmenes para preparar un extracto del suero como se describe a continuación.
2. Agregar a cada tubo 5 mL de medio bacto ácido fólico casei hidratado y suficiente agua destilada o desionizada para obtener un volumen total de 10 mL.
3. Esterilizar los tubos por 5 minutos a 15 libras de presión (121° C).
4. Preparar el cultivo stock y el inóculo como se describió, agregar una gota del inóculo a cada tubo del ensayo.
5. Incubar los tubos por 18 a 24 horas a  $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ . Determinar la proliferación mediante la turbides producida al finalizar la incubación. Los tubos pueden ser refrigerados de 15 a 30 minutos para evitar la proliferación antes de la lectura.

#### DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ACIDO FOLICO EN LAS MUESTRAS.

La cantidad de ácido fólico en las muestras se calcula por la interpolación en la curva estándar los resultados de los valores de absorbancia obtenidos de los diferentes estándares, para realizar los cálculos tomar en cuenta la dilución de la muestra.

Los resultados del método puede ser sustituidas por las lecturas obtenidas de un nefelómetro, construir la curva estandar con los valores obtenidos.<sup>14</sup>

### 3.1.4 METODO MICROBIOLÓGICO PARA DETERMINACION DE FOLATOS UTILIZANDO

#### *Tetrahymena geleii* DESCRITO POR JUKES

El microorganismo *Tetrahymena geleii* es un protozoo ciliado el cual se ha estudiado sus propiedades fisiológicas. Los requerimientos nutricionales son muy similares a los de los animales superiores, es capaz de utilizar ácido pteroiltriglutámico, ácido pteroilheptaglutámico y ácido pterilglutámico en cantidades equimolares. En este ensayo para la determinación de ácido fólico no es necesario el tratamiento con conjugasas.

El microorganismo, *T. geleii*, se mantiene por transferencia del microorganismo en el siguiente medio de cultivo:

Peptona proteosa. 2%
Fracción de Wilson's de hígado 0.05%
Dextrosa. 1%
pH 6.8

Preparar un inóculo de *T. geleii*: hacer una dilución de un cultivo de 72 horas con solución salina al 0.9% hasta obtener un equivalente de 0.0005 mL del cultivo original.

Realizar el ensayo en tubos de 12 x 100 mm, el volumen final del ensayo es de 2 mL, adicionar los estándares y muestras a los diferentes tubos asignados y adicionar un mL de medio basal doble. Tapar los tubos y esterilizarlos por 10 minutos a 121° C y enfriar e inocular como se describió. Inclinar los tubos en un ángulo de 75 grados para mantener una área mayor de contacto con el aire, después de la incubación de 72 horas de 23 a 25 ° C, estimar el crecimiento por método turbidimétrico, de los estándares y las muestras. Realizar la curva de calibración, el máximo crecimiento se debe de observar con el tubo que contienen 1 ug de ácido pteroilglutámico.<sup>3</sup>

MEDIO BASAL PARA EL ENSAYO DE ACIDO FOLICO CON <i>T. geleii</i> .	
DL- alanina	110 ug/mL
L-arginina	206 ug
L-ácido aspártico	122 ug
Glicina.	10 ug
Acido glutámico	233 ug
L-histidina	87 ug
DL- isoleucina	276 ug
L-lisina	272 ug
L - fenilalanina	250 ug
L-prolina	169 ug
DL- serina	394 ug
DL- treonina	326 ug
DL-triptofano	72 ug
DL-valina	162 ug
Nicotinamida	0.1 ug
DL- metionina	248 ug
D-Uracilo	10 ug
Pantotenato de calcio	0.1 ug
Piridoxal hidrociorada	0.1 ug
Hidrociorado de piridoxina	1 ug
Piridoxamina hidrociorada	0.1 ug
Tiamina hidrociorada	1 mg
Riboflavina	10 mg
Biotina	0.005 mg
DL-ácido tioctico	0.01mg
Cloruro de colina	0.01 mg
Sulfato de magnesio	1 mg
Sulfato ferroso	0.4 g
25 Sulfato de manganeso	0.5 g
Cloruro de cobre	5 g
Cloruro de calcio	50 g
Cloruro de fierro	1.25 g
Cloruro de zinc	0.05 g
Acido guanidílico	30 g
Acido adenilico	20 g
Acido citidilico	25 g
tween 80	10 mg/mL
dextrosa	2.5 mg/mL
Fosfato dipotásico	1 mg/mL
Fosfato monopotásico	1 mg/mL
Acetato de sodio	1 mg/mL

### 3.1.5. METODO PARA LA DETERMINACION DE ACIDO FOLICO CON *Bacillus coagulans*.

*Bacillus coagulans*, es un organismo termofílico, el cual prolifera en presencia de ácido fólico y sus derivados. El uso de este organismo para el ensayo de ácido fólico fue sugerido por Baker, Campbell y Sniff.

Microorganismo : *Bacillus coagulans* ATCC 12245. Se mantienen transfiriendo el cultivo cada mes, en agar nutritivo Slants.

Formula del caldo del inoculo.	
Basamina.	3 g
Glucosa.	2 g
Difosfato de sodio	2.5 g
Monofosfato de sodio	1.0 g
cloruro de amonio.	1.0 g
cloruro de sodio.	1.0 g
sulfato de magnesio.	5.0 mg
sulfato ferroso.	5.0 mg
cloruro de calcio.	5.0 mg
En 100 mL de agua, esterilizar a 121° C por 15 minutos.	

MEDIO BASAL PARA EL ENSAYO DE ACIDO FOLICO CON <i>Bacillus coagulans</i> ATCC 12245	
L-arginina	10.5 mg
L- ácido glutamina	10.0 mg
L - histidina	4.5 mg
DL- Isoleucina	14.0 mg
L- leucina	19.2 mg
L-lisina	19.5 mg
DL- metionina	6.0 mg
L- triptofano	6.0 mg
DL -valina	14.4 mg
Riboflavina	15.0 mg
Acido pantoténico	100 ug
Acido nicotínico	150 ug
Tiamina HCl	15.0 ug
Piridoxal	7.5 ug
Biotina	0.9 ug
Fosfato dipotásico	250 mg
Fosfato disódico	100 mg
Cloruro de amonio	100 mg
Cloruro de sodio	100 mg
Suplementos minerales	0.1 mL
Cloruro de magnesio	0.5 mg
Cloruro férrico	0.5 mg
Cloruro de calcio	0.5 mg
Agua destilada	100 ml

### PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

Centrifugar las células después de 48 horas de incubación a 55°C en el caldo basamin, y posteriormente lavar tres veces con agua destilada. Ajustar las células lavadas a una suspensión con densidad óptica de 0.4 a 525 nm, con agua destilada que corresponde a 0.20 mg del peso seco de células por mililitro. Preparar el inóculo para cada determinación. Curva estándar de 0.5 a 50 ug de ácido fólico por frasco.

### PROCEDIMIENTO.

En los tubos de ensayo designados ajustar el volumen a 2.5 mL con solución salina y adicionar 2.5 mL de medio basal, adicionar 0.1 mL de las muestras, incubar a 55 ° C por 18 horas. Como se utiliza alta temperatura no es necesario esterilizar. Medir el crecimiento turbidimétricamente a 525 nm Hay varias ventajas en este método, no se necesita técnica aséptica por la alta temperatura. Este organismo su crecimiento responde a los derivados del ácido fólico.<sup>3</sup>

### 3. 2 METODOS INMUNOLOGICOS

#### 3.2.1 METODO QUIMIOLUMINISCENTE PARA LA DETERMINACION DE FOLATOS.

##### INTRODUCCION.

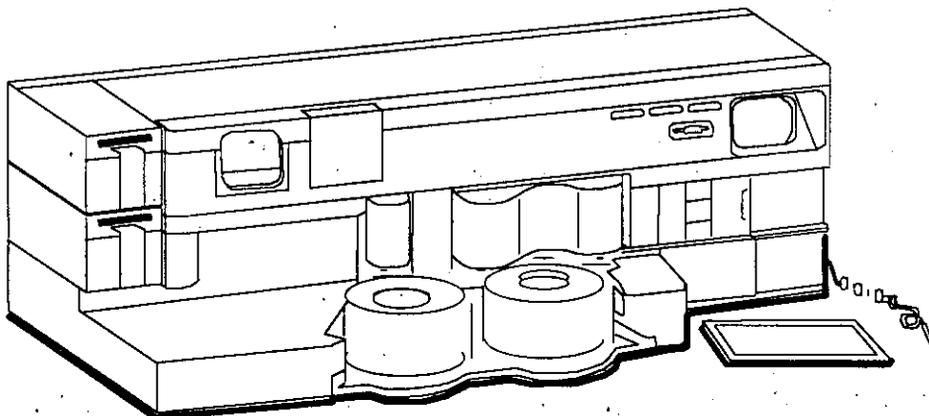
El fenómeno de quimioluminiscencia o bioluminiscencia, es la emisión de luz por moléculas orgánicas, se conoce desde hace 100 años. El luminol fue uno de los primeros compuestos quimioluminiscentes oxidados por el peróxido de hidrogeno en condiciones alcalinas en presencia de un catalizador. Muchos compuestos quimioluminiscentes emiten luz después de una reacción de oxidación. Algunos compuestos no requieren del catalizador. Las aplicaciones analíticas potenciales se reconocieron en 1947 cuando se aisló la luciferaza de las luciérnagas. Pero fue aplicada por sus pioneros Berros y Yola con la determinación de la hormona de la insulina y propusieron la técnica analítica conocida como radioinmunoensayo (RIA). Berson y Yallow fueron los primeros en incrementar la sensibilidad de la reacción antígeno - anticuerpo usando indicadores radioactivos. El RIA es aceptado en 1960 como técnica para la determinación de hormonas esteroides y proteínas por su precisión exactitud y simplicidad. El avance en la tecnología del RIA comienza en 1968 cuando Miles y Helases crean un sistema de unión no competitiva de dos pasos, en donde el anticuerpo y no el antígeno se marca con un radioisótopo, al cual se le denominó sistema de ensayo radioinmunométrico (IRMA). EL ensayo IRMA fue usado para otra nueva innovación, la inmovilización (unión covalente) del anticuerpo en fase sólida. Los sistemas de fase sólida se desarrollaron durante 1970 incluyendo anticuerpo unido a tubos de plástico y a perlas de vidrio grandes o pequeñas. En 1983 se introduce un método de separación que son las partículas paramagnéticas (PMP) como una nueva fase sólida. La separación se logra poniendo las PMP en tubos y una plataforma magnética. Los agregados paramagnéticos se juntan en la área magnética y el sobrenadante es decantado, eliminando la centrifugación. Aunque el RIA es altamente sensitivo, preciso y exacto hay varias desventajas en el método, como son, la corta vida media del radioisótopo y los problemas relacionados con el manejo de compuestos radioactivos. La necesidad de utilizar otras moléculas no radioactivas, deja como alternativa retomar a las moléculas quimioluminiscentes como indicadores de la reacción antígeno - anticuerpo. En 1967 la tecnología luminiscente para ensayos de unión fue descrita usando luminol como indicador y se requiere la adición de un catalizador para que la emisión de luz se lleve a cabo. El éster de acridinio que no necesita el catalizador es desarrollado por Woodhead, McCAPra, y colaboradores. La oxidación del ester de acridinio se lleva a cabo rápidamente, con un pico de emisión que dura un segundo. El ester de acridinio se une al anticuerpo y a su vez se unen a partículas paramagnéticas. Los sistemas automatizados

miden la cantidad de luz que emite durante la reacción de quimioluminiscencia. En el inmunoensayo luminiscente, el antígeno en la muestra del paciente compete con el antígeno unido un enlace covalente a partículas paramagnéticas por sitios de unión limitados en el ester de acridinio unido al anticuerpo. Una relación inversa existe entre la concentración del anticuerpo marcado unido al antígeno y el antígeno en la muestra del paciente. El ensayo inmunoquimiluminométrico es un ensayo de sandwich en el cual el antígeno del paciente es inmovilizado entre el anticuerpo unido un enlace covalente a partículas paramagnéticas y un anticuerpo marcado con ester de acridinio. Existe una relación directa entre la concentración de antígeno en la muestra del paciente y la cantidad de luz emitida durante oxidación del ester de acridinio en la cubeta. La medida de antígeno en la muestra, en el sistema automatizado ACS 180 inyecta reactivo 1 y reactivo 2 en la cubeta que contienen la mezcla de reacción. Esto desencadena la reacción de quimioluminiscencia que resulta en la emisión de fotones de luz. Los tubos fotomultiplicadores PMT, y un fotodetector, detectan las señales de emisión y los convierten en impulsos eléctricos. El sistema ACS 180 cuenta los impulsos eléctricos de la emisión de fotones, interpreta los resultados en la curva maestra de calibración definida para el ensayo, y calcula la concentración. El sistema ACS 180 usa una tarjeta de curva maestra para cada determinación, así también se realiza una calibración de dos puntos usando como base la curva maestra calibración inicial para calibrar todos los ensayos que se realicen. Cada estuche de reactivos específicos contiene una tarjeta de la curva de calibración con la concentración del analito y las unidades relativas de luz (RLUs) para cada punto de la curva maestra. La concentración de la molécula y los RLUs definen la curva de calibración maestra particular para cada lote de estuche de reactivos. El sistema determina la relación matemática entre la curva de calibración y los RLUs de la muestra del paciente, el sistema mide el valor de RLUs de la muestra del paciente y lo interpola en la curva maestra del analito.<sup>16</sup>

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE FOLATOS EN SUERO O EN ERITROCITOS MEDIANTE EL  
SISTEMA AUTOMATIZADO ACS 180 DE CHIRON.

Instrumentos:

1. Centrifuga.
2. Sistema automatizado ACS 180 CHIRON.



Reactivos:

1. Estuche de reactivo ACS 180 folatos, catálogo 672215 p/150 pruebas, catálogo 672216 p/50 pruebas
2. Calibrador folatos ACS catálogo 672176 contienen seis viales, catálogo 672175 dos viales.
3. Estuche de acondicionamiento folatos, catálogo 672218 contienen 1 vial de DDT, 1 vial de reactivo acondicionador A, 1 vial de reactivo acondicionador B y una tarjeta curva maestra.
4. Cubetas de reacción ACS, catálogo 672013.
5. Mutidiluyente 3 ACS, catálogo 672192.
6. Diluyente ácido ascórbico folato / ácido ascórbico ACS, catálogo 672219.
7. Material curva maestra folatos ACS, catálogo 672413.
8. Controles tres niveles, catálogo 976000.

El sistema automatizado ACS 180 CHIRON es un ensayo competitivo en el cual los folatos (antígeno) de la muestra del paciente compite con el reactivo lite (éster de acridinio unido a folatos), por una cantidad limitada de folatos purificados y unidos por un enlace covalente a una proteína con partículas paramagnéticas para limitar los sitios de unión en el anticuerpo unido a éster de acridinio. El ensayo utiliza agente liberador (hidróxido de sodio y DDT) para liberar los folatos de los enlaces endógenos con las proteínas en la muestra. Existe una relación inversamente proporcional entre la cantidad presente de folatos en la muestra y las unidades relativas de luz detectadas por el sistema automatizado ACS 180.

### RECOLECCIÓN DE ESPECÍMENES Y SU MANEJO.

Se recomienda suero para la determinación de folatos en suero. Se requiere sangre con heparina o EDTA para la determinación de folatos en eritrocitos. Tapar y refrigerar los especímenes de 2 a 8 °C sino se van a procesar las muestras inmediatamente, o conservarlas a -20 °C para un mayor tiempo de almacenamiento, no utilizar tubos con gel separador en la toma de muestra de suero, debido a que se ha demostrado interferencia con el ensayo. Si el ensayo no se realiza en las tres primeras horas después de la toma de muestras, determinar el hematocrito y congelar la sangre o el hemolizado. No congelar la muestra por más de dos meses. Se recomienda preparar un hemolizado con ácido ascórbico de reconstitución para folatos ACS. Para la determinación de folatos en eritrocitos, es necesario preparar el hemolizado.

### PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.

Consultar el instructivo del estuche de reactivos que empleará. Reconstituir el ácido ascórbico folatos ACS. Agregar el diluyente al ácido ascórbico liofilizado. Mezclar por inmersión durante 5 minutos. Definir el radio y el system-off del ensayo folatos en eritrocitos.

1. Registrar el system - off del ensayo para folatos en eritrocitos, entrar al menú principal del sistema ACS 180, presionar F5 (manejo del sistema). Presionar F1 (definiciones). Presionar F1 (pruebas). Presionar F3 (salida del sistema), definir en esta pantalla el nombre de Off- system para el hematocrito. Presionar ESC salvar los cambios con la tecla y.

2. Adicionar el radio del ensayo, presionar F2 (adicionar el radio). Definir en esta pantalla el nombre del radio para el ensayo. Asegurar que el nombre que se designara el off\_system sea el mismo para la definición de radio del ensayo. Presionar ESC salvar los cambios con la tecla y.

Acondicionamiento de ensayo folatos ACS. Se necesita una prueba folcon para acondicionar los reactivos del ensayo de ácido fólico, el ensayo de acondicionamiento optimiza los calibradores y las muestras a analizar.

## PREPARACIÓN DEL HEMOLISADO DE ERITROCITOS

Reconstituir el ácido ascórbico ACS folatos. Colectar la muestra en un frasco con heparina o EDTA y mezclar la muestra varias veces, determinar el hematocrito, en un tubo limpio agregar un mL de ácido ascórbico folatos ACS reconstituido, pipetear 50 uL de la muestra dentro del tubo que contiene el ácido ascórbico folato ACS, tapar e invertir la muestra varias veces, proteger el hemolizado de la luz. Dejar el hemolizado a temperatura ambiente, por un mínimo de 30 minutos, no excederse por mas de 120 minutos, congelar el hemolizado si no se utilizara después de tres horas, a  $-20^{\circ}\text{C}$  y no conservarlos por mas de dos meses. Se recomienda preparar un hemolizado con ácido ascórbico de reconstitución folatos ACS. Las muestras con diluyente ácido ascórbico pueden ser almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## CALIBRACIÓN DEL ENSAYO.

Curva maestra de calibración. EL ensayo de folatos ACS requiere una curva maestra de calibración cuando se usa un nuevo lote de reactivos lite y de fase sólida. Usar la tarjeta de la curva maestra y guardar esta información en el manejo del sistema / definiciones / búsqueda de la curva maestra. Definir el reactivo de acondicionamiento para la curva maestra. El ensayo folcon solo requiere la información de la curva maestra de calibración para el ensayo de folatos, cuando se utiliza un nuevo lote de reactivos de acondicionamiento, usar la curva maestra del nuevo numero de lote de los reactivos de acondicionamiento A y B en el manejo del sistema / definiciones / búsqueda de la curva maestra. Presionar F5 (curva maestra). Seleccionar folcon y presionar entrada. Usar el lápiz detector del código de barras, buscar en la tarjeta de la curva maestra y adicionar el numero de lote de los reactivos de acondicionamiento A y B. Usar el lápiz detector del código de barras, buscar en la tarjeta de la curva maestra y adicionar el número de lote de los reactivos de acondicionamiento A y B.

5. Presionar ESC salvar los cambios con la tecla y definir el valor de los calibradores. Para cada nuevo lote de calibradores, usar el valor asignado a la tarjeta registrar el numero de lote y las concentraciones de los calibradores alto y bajos. En el manejo del sistema / definiciones / búsqueda de la curva maestra. Los valores de los calibradores son asignados por la tarjeta de la curva maestra de los estándares de plasma humano, con ácido N-5-metiltetrahidrofólico con alto grado de pureza. En sistema / definiciones / búsqueda de la curva maestra presionar F3 (calibradores), Presionar F1 añadir calibrador. Escribir folcal en el lugar del nombre del calibrador. Usar el lápiz detector del código de barras, buscar en la tarjeta de la curva maestra y adicionar el número de lote y las concentraciones de los calibradores de folatos. Presionar F1 y seleccionar ensayos, seleccionar el folcon y el ensayo

de folatos y presionar F2 (concentraciones). Se mueve el cursor a folcon e introducir 0.0 en lugar correspondiente de la concentración del calibrador bajo. No se necesita introducir el valor del calibrador alto debido a que folcon solo utiliza calibrador bajo. Presionar ESC salvar los cambios con la tecla Y.

#### REALIZACIÓN DE LA CALIBRACIÓN DE DOS PUNTOS.

EL ensayo ACS folatos requiere de una calibración de dos puntos cada tres días y también después que los reactivos han estado en el equipo por más de ocho horas. Cuando se cambia numero de lote la fase lite y la fase sólida o cuando los controles se encuentran fuera de rango.

#### CONTROL DE CALIDAD.

La información para la realización del control de calidad del sistema ACS 180 se encuentra en el manual de referencia. Llevar a cabo control de calidad interno con los controles normales y anormales cuando se realiza la calibración de dos puntos, la realización del control de calidad no debe de exceder en un tiempo no mayor de 24 horas en que se realiza y las determinaciones las muestra, los controles llevan el mismo tratamiento que las muestras. Para el ensayo de ácido fólico ACS CHIRON recomienda usar controles de tres niveles. En el instructivo se encontraran los rangos de los controles. No usar los controles después de la fecha d caducidad.

#### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.

Se requiere de personal capacitado para operar el sistema ACS 180. Antes de comenzar con el procedimiento se debe confirmar:

- Activar los ensayos para folcon y folatos.
- Definir el radio de off- system ensayo para folatos en eritrocitos, si se requiere.
- Definir la curva maestra para los ensayos de folatos y de folcon.
- Introducir el valor de los calibradores de folatos y folcon como se describe en la definición del valor de los calibradores.

#### CALIBRACIÓN DEL ENSAYO DE FOLATOS.

Seleccionar folcal en la pantalla correspondiente, y seleccionar la prueba de folatos y folcon.

Continuar con los controles y muestras de pacientes para la prueba de folatos. Si se requiere probar el radio del ensayo de folatos en eritrocitos.

Presionar el menú principal.

PREPARAR LAS COPAS DE MUESTRAS Y ETIQUETAR CON CÓDIGO DE BARRAS EL CALIBRADOR DE FOLATOS BAJO Y EL CALIBRADOR DE FOLATOS ALTO.

Se Añade un mL de cada calibrador en las copas etiquetadas. Se Colocan las copas de los calibradores en el carrusel de muestras. Se Preparan los tubos primarios, o copas de muestra en el resto del carrusel. Este ensayo requiere de 150uL de muestra para una sola determinación. Adicionar una mayor cantidad para repeticiones del ensayo. Diluir antes si es necesario, realizar las diluciones con multi - diluyente 3 ACS. Colocar el diluyente de las muestras en el carrusel. Preparar las copas de las muestras, etiquetar código de barras el calibrador de folatos bajo. Añadir 250 uL de calibrador bajo, o suero de las muestras en las copas de muestra. Introducir el calibrador bajo y las copas de las muestras en el carrusel, asegurarse de dejar un espacio del calibrador alto o ocupar su lugar con copas de muestras. Imprimir la lista de trabajo, aparecerá la posición del calibrador alto en la lista de trabajo. Preparar los tubos primarios o las copas de las muestras e introducir las al carrusel de muestras. Este ensayo requiere 150 uL de muestra para una sola determinación, para realizar muestras por duplicado añadir el volumen necesario de muestra. Diluir con el mutidiluyente --3 ACS en caso de ser necesario, colocar la muestra diluida en el carrusel parecerá 1 de muestras. Asegurar la corrección matemática del resultado por la dilución. Preparar e introducir al carrusel el DTT. Se puede usar una copa de muestra para el DTT del reactivo Lite y del reactivo de la fase sólida para el procedimiento de folatos y folcon. Asegurar de dispensar la cantidad necesaria de DTT.

Etiquetar con código de barras la copa de muestra con DTT.

Para 50 muestra son necesarios 3 mL de DTT.

Para 100 muestras son necesarios 5.5 mL de DTT.

NOTAS. Cuando se realiza la determinación de folatos y vitamina B<sub>12</sub> juntos, optimizar los espacios de los reactivos en el carrusel.

Presionar la tecla comenzar.

Correr el ensayo folcon antes de correr una calibración de folatos o del ensayo de folatos como se indica a continuación:

Adicionar 10 uL de calibrador bajo y 59 uL de DTT.

Adicionar 74 uL de reactivo A acondicionador y adicionar 400 uL de reactivo B acondicionador

Correr el ensayo de calibración para folatos y el ensayo de folatos como se indica.

Añadir 150 uL de muestra dentro de la cubeta.

Añadir 50 uL de DTT

Añadir 75 uL de agente revelador y incubar por 2.5 minutos a 37 C.

Añadir 200 uL de fase sólida e incubar por 2.5 minutos a 37 C.

Añadir 100 uL de reactivo lite e incubar por 2.5 minutos a 37 C.

Separar, aspirar, y lavar la cubeta con reactivo de lavado.

Añadir 300 uL de reactivo 1 y 300 uL de reactivo 2, inicia la reacción de quimioluminiscencia.

Imprimir los resultados de acuerdo a la opción seleccionada, la cual es descrita en el manual de procedimientos ACS 180.

#### CALCULO DE RESULTADOS.

Folatos en eritrocitos.

Utilizar el siguiente procedimiento para calcular la concentración de folatos en eritrocitos o programar el sistema para que realice los cálculos de folatos en eritrocitos como se describe en el manual de procedimientos ACS 180.

Multiplicar el resultado de folatos del hemolizado por 21 (cuando se prepara el hemolizado se hace una dilución 1:21). Este valor representa la concentración de folatos del total de sangre en ng/mL. Dividir el resultado por el hematocrito, y multiplicarlo por 10 para ajustar el hematocrito el cual se expresa en porcentaje.

$$\text{Folatos en eritrocitos} = \frac{(\text{Resultado de folatos del hemolizado, ng/mL})}{\text{hematocrito}} \times 21 \times 100$$

#### CORRECCION DE FOLATOS EN ERITROCITOS.

En muchos casos el valor de los folatos en suero es muy pequeño comparado con el valor de folatos de eritrocitos. Aunque ocasionalmente el valor de folatos en suero puede ser elevado. Si el valor de folatos en suero es alto y el valor de folatos en eritrocitos bajo, calcular la corrección del valor de folatos en eritrocitos de acuerdo a la siguiente ecuación matemática.

$$\text{CORRECCION DE FOLATOS EN ERITROCITOS} = \text{folatos en eritrocitos ng/mL} - \text{folato en suero ng/mL} \cdot (100 - \text{Hto} / \text{Hto}) \text{ (ng/mL)}$$

## NOTAS DE LA DETERMINACION.

- Desechar los desechos biológicos potencialmente contaminados de acuerdo a los procedimientos implementados por la institución. Así también los materiales de una manera aceptable cumpliendo los requerimientos locales federales y estatales.

- Si el valor numérico de folatos es mayor a 20 ng/mL. Es necesario hacer una dilución de la muestra y volver a realizar la determinación. Las diluciones se realizaran con el multi – diluyente 3 ACS y se recomienda preparar una dilución 1: 2.

Para convertir ng/mL (unidad de masa) a nmol/l (unidades del sistema internacional), usar el factor 2.27 como se indica, 1ng/mL = 2.27 nmol/L.

## LIMITACIONES DE LA TÉCNICA:

La hemólisis aumenta la concentración de folatos en el suero debido a la alta concentración de folatos en los eritrocitos. Metrotexate y leucovorina interfieren en la determinación de folatos debido a que tienen reacción cruzada con proteínas que se unen a folatos

La lipemia no tiene valor significativo si es menor de 1000 mg/dl triglicérido.

La ictericia no tiene valor significativo si es menor de 20 mg/dl de bilirrubina.

## Valores esperados.

Categoría	N	Media (ng/mL)	Rango observado (ng/mL)
Folatos en suero			
Deficiente	57	1.6	0 – 3.1
Normal	560	7.2	1.1 – 20
Folatos en eritrocitos			
Deficientes	52	80.1	0 - 305
Normales	775	295	55 - 1102

Se deben establecer sus rangos normales esperados para la evaluación del resultado de los pacientes.

Las patologías y otros criterios de inclusión en la tabla anterior diagnosticados por frotis de sangre periférica y de médula son: anemia megaloblástica, dieta deficiente de folatos, síndrome de mal absorción, alcoholismo, esprue tropical. Parámetros anormales de concentración media de hemoglobina (MCV), hemoglobina media corpuscular (MCH), hematocrito (HCT). Para las pruebas de folatos, se basan en una población, con una media 2.6 ng/mL (5.9 nmol/L), con una eficiencia diagnóstica de 95%. Para las pruebas de folatos eritrocitos, se basan en una población, con una media 130 ng/mL (295 nmol/L), con una eficiencia diagnóstica de 95%.

#### CARACTERÍSTICAS DEL METODO.

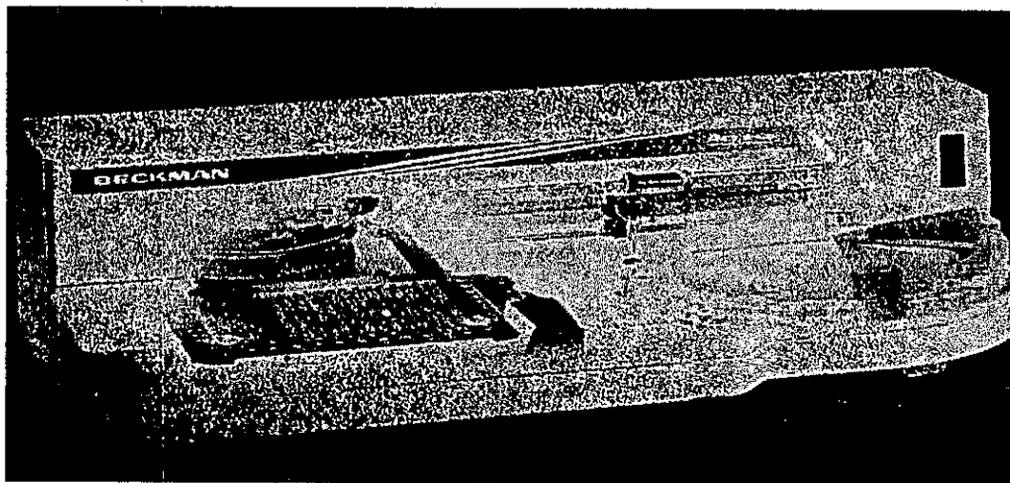
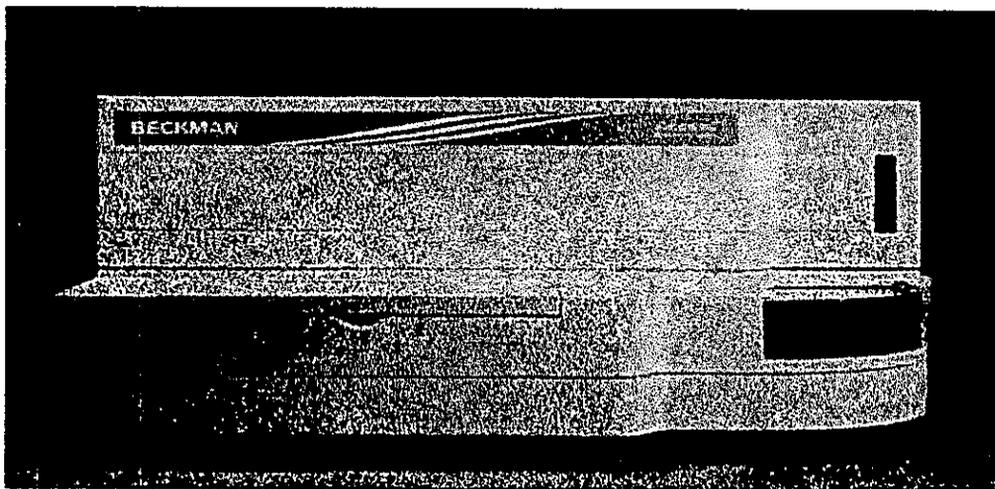
**SENSIBILIDAD.** El ensayo de folatos del sistema ACS mide concentraciones en el intervalo de 20 ng/mL. La sensibilidad del ensayo fue calculada para una concentración igual o mayor de 0.25 ng/mL de folatos, (6 corridas, de 9 replicas, de tres lotes diferentes). La sensibilidad esta definida como la concentración de dos desviaciones estándar del calibrador cero de folatos ACS (0 ng/mL) y representa la menor concentración detectada de folatos que se puede distinguir del cero.<sup>17</sup>

### 3.2.2 ENSAYO PARA LA DETERMINACION DE FOLATOS EL SISTEMA ACCESS DE BECMAN COULTER.

El sistema automatizado de inmunoensayo Access de Beckman Coulter basado en determinaciones por quimioluminiscencia, en su menú de pruebas que realiza, contiene la determinación para folatos en suero humano, plasma (heparina) o eritrocitos.

#### PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

El ensayo para de folatos Access es de tipo competitivo por los receptores de fijación. El ensayo de folatos en suero o plasma (heparina) no requiere de pretratamiento. En el ensayo para la determinación de folatos intracitocitario, si es necesario tratar previamente una muestra de sangre total con un agente lisante compuesto de ácido ascórbico y HSH libre de folatos. Este pretratamiento hemoliza los eritrocitos y convierte los folatos en su forma ácida como lo es el ácido poliglutámico presente dentro de los hematíes en forma de ácido monoglutámico predominante en suero. El tratamiento previo de las muestras de sangre completa, se define como un hemolizado. Una muestra de suero, plasma (heparina), o hemolizado se tratan para liberar los folatos de las proteínas endógenas de fijación. Después de neutralizar la mezcla, una proteína se unen a los folatos, (proteína anti-folato de ratón), posteriormente se añaden a la cubeta de reacción, conjugado de ácido fólico-fosfatasa alcalina, y un anticuerpo de cabra anti-ratón unidos a partículas paramagnéticas. Los folato en la muestra compete con el conjugado de ácido fólico-fosfatasa alcalina por los lugares de fijación sobre una cantidad limitada de proteína de fijación de folatos. Los complejos resultantes se fijan a la fase sólida a través de la proteína de fijación anti-folato de ratón. La separación en un campo magnético y el lavado eliminan las moléculas no unidas a la fase sólida. Se añade un sustrato quimioluminiscente, Lumi-Phos' 530, a la cubeta de reacción, utilizando un luminómetro, se mide la luz generada por la reacción. La producción de luz es inversamente proporcional a la concentración de folatos en la muestra. La concentración en la muestra se determina por medio de una curva de calibración de puntos múltiples acumulada.

**SISTEMA DE IMUNOENSAYO QUIMIOLUMINISCENTE ACCESS**

### INFORMACION DE LOS REACTIVOS.

No. de catálogo 33010: para 100 determinaciones contiene dos estuches, 50 pruebas por cada estuche.

Listo para utilizar. Se almacena en posición vertical a 2 a 10°C. Los envases se deben refrigerar de 2 a 10°C durante dos horas antes de cargarlos en el instrumento. El ESTUCHE de reactivos es estable hasta la fecha de caducidad que figura en la etiqueta cuando se almacena a 2 a 10. Después de la primera utilización, el envase es estable durante 14 días a una temperatura de 2 a 10°C. Las indicaciones de posible deterioro son la rotura de la capa elastomérica en el envase, o valores control de calidad fuera de rango.

Estuche de Reactivos para la determinación de folato: 2 estuches. Todos los antisueros son policlonales.

R1a: Conjugado de ácido fólico-fosfatasa alcalina (bovina) y partículas paramagnéticas recubiertas con IgG antiratón de cabra suspendidas en tampón con seroalbúmina humana (HSA), azida sódica menor al 0, 1% y ProClin 300 al 0,25%.

R1b: Solución de ascorbato sódico, pH = 7.

R1c: Proteína fijadora de folato lácteo (bovino) y proteína fijadora monoclonal de ratón en tampón con HAS, azida sódica menor al 0, 1% y ProClin 300 al 0, 1%.

R1d: Solución de ácido clorhídrico 0.1 N.

R1e: Solución de hidróxido sódico 0.5 N.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES DEL ENSAYO.

1. Para diagnóstico *in vitro*.
2. Material biológico de origen humano usados en la preparación de los reactivos han sido probados y encontrados no reactivos a antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (HCV), y anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1 y HIV-2). Considerando que en la actualidad no existen métodos analíticos que garanticen la ausencia absoluta de agentes infecciosos, se recomienda manipular los reactivos así como las muestras de pacientes considerándolos transmisores potenciales de enfermedades infecciosas.
3. Las muestras de los pacientes así como los hemoderivados pueden ser procesados en forma rutinaria y con el mínimo riesgo siguiendo el procedimiento descrito. No obstante, estos productos deben ser considerados como potencialmente infecciosos y deben por tanto, manipularse obedeciendo las debidas precauciones, sin

considerar su origen, tratamiento ó certificación previa. Utilice un desinfectante adecuado para la descontaminación. Estos materiales y sus contenedores deben ser almacenados y posteriormente eliminados de acuerdo con las normas sanitarias locales.

4. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas metálicas muy explosivas. Al desechar los líquidos, añadir agua en abundancia para evitar la acumulación de azida.
5. Xi. Irritante: hidróxido sódico 0.5 N (NaOH), o en HCl 1.0 N.

R 36/38: Irritante para piel y ojos.

S 2/26: Debe Mantenerse lejos del alcance de los niños. En caso de contacto con los ojos lavar inmediatamente y a fondo con agua y consultar a un médico.

6. Xi. Irritante: 0,25% ProClin 300.

R 43: Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel.

S 28-37: En caso de contacto con la piel, lavar inmediata abundantemente con jabón y agua. No tirar los residuos por la tarja. No derramar jamas agua al producto. Evitar la acumulación de cargas electrostáticas. Evitar golpes y rozamientos. Eliminar los residuos del producto y sus recipientes con todos las precauciones posibles. Use indumentaria protectora adecuada. Utilice guantes adecuados.

#### RECOLECCION DE MUESTRAS Y PREPARACION

Folatos en suero o plasma.(heparina).

1. Los tipos de muestra recomendados son suero y plasma (heparina) de individuos en ayunas. Las muestras deben protegerse de la luz para evitar su deterioro. Si el ensayo no va a completarse inmediatamente, refrigere la muestra de 2 a 8°C. Si el ensayo no se va a realizar antes de transcurridos ocho horas después de la toma de especímenes, o en el caso de que las muestras deban prepararse para envío, congelar a -20°C (9, 10).
2. El Comité Nacional Para la Estandarización de Laboratorios Clínicos (NCCLS) facilita las siguientes recomendaciones para el manejo, proceso y conservación de muestras sanguíneas.
  - Recoger todas las muestras de sangre por venopunción siguiendo las precauciones de rutina.
  - Esperar a que los muestras de suero se coagulen adecuadamente antes de centrifugarlas.
  - Mantener los tubos de ensayo tapados en todo momento.

- Dentro de las dos horas siguientes a la centrifugación, transferir al menos 500  $\mu$ l del suero o plasma (heparina) libre de células a un tubo de conservación herméticamente tapado.
  - Beckman Instruments, Inc, recomienda que las muestras congeladas pueden ser almacenadas hasta 6 meses.
  - Descongelar las muestras solamente una vez.
3. No utilizar muestras hemolizadas. El nivel de folatos en los hematíes es mucho mayor que en el suero o plasma (heparina) lo que conduciría a resultados falsamente elevados.
  4. Las muestras que contienen 10 mg/dL (171  $\mu$ mol/L) de bilirrubina y las muestras lipémicas que contienen el equivalente a 1800 mg/dL (20, 32 mmol/L) de trioleína no afectan a la concentración de folatos. Además, las muestras con 5 g/dl (50 g/L) de albúmina humana añadida a la albúmina endógena en las muestras no afectan a la concentración de folatos del ensayo.

#### Folato intraeritrocitario.

1. Recoger las muestras de sangre total en tubos que contengan EDTA o heparina. Se calcula y se registrar el hematocrito para los cálculos posteriores. La muestra puede almacenarse a 2 a 8°C durante 4 horas como máximo, antes de preparar el hemolizado.
2. Reconstituir el vial de Access agente lisante para folatos intraeritrocitario con 25 mL de agua desionizada. Dejar reposar 20 minutos a temperatura ambiente para su disolución. Agitar suavemente antes de utilizar. La solución puede almacenarse a 2 a 8°C hasta dos semanas. Permitir que la solución alcance la temperatura ambiente antes de su uso.
3. Invertir suavemente la muestra de sangre total varias veces para homogeneizar y combinar 50  $\mu$ L de sangre total con 1 mL de agente lisante.
4. Invertir la mezcla suavemente, varias veces, y dejar que alcance la temperatura ambiente proteger de la luz, por un período mínimo de 90 minutos. Después de 90 minutos, analizar el hemolizado antes de 3 horas o congelarlo a -20°C para su conservación o transporte. El hemolizado puede almacenarse a -20°C durante 30 días como máximo.
5. Para analizar hemolizados congelados, descongelar y dejar que la muestra alcance la temperatura ambiente protegida de la luz. Mezclar la muestra invirtiendo el tubo varias veces. Analizar la muestra antes de 3 horas.

6. Muestras con un contenido de hasta 10 mg/dl (171  $\mu\text{mol/L}$ ) de bilirrubina o lípidos y muestras con un contenido equivalente a 1800 mg/dl (20,32 mmol/L) de trioleína no afectan a la concentración del Folato a medir. Asimismo, muestras con 5 g/dL (50 g/L) de albúmina humana añadida a la albúmina endógena de las muestras, no afectan a la concentración de folatos que se analiza.

## 7. PROCEDIMIENTO

### Material suministrado

R1: Envases de reactivos de folatos.

### Material que se requiere pero no suministrado

1. Calibradores de folatos para el sistema Access

que contenga los siguientes calibradores, 0, 2,5, 5,0, 10,0 y 20,0 ng/mL

2, 3, 6, 7, 13, 22,7 y 45,3 nmol/L

No. de catálogo 33015

2. Sustrato Access

No. de catálogo 81906

3. Tampón de lavado access

No. de catálogo 81907

4. Materiales para control de calidad: sueros control comerciales de tres niveles.

5. Access agente lisante para folatos intraeritrocitario.

No. de catálogo 33017

2 x 25 ml; 1 mL/ prueba

Contenido de cada vial: ácido ascórbico (0.05 g) y albúmina sérica humana. Con cada vial se obtiene 25 ml solución de ácido ascórbico al 0.2%.

### Comentarios sobre el Procedimiento

1. Consultar, en la guía del operador del sistema y/o manual de referencia del inmunoensayo Access, la descripción específica de los siguientes puntos: instalación, puesta en marcha, principios de funcionamiento,

características de las prestaciones del sistema, instrucciones de funcionamiento, procedimientos de calibración, limitaciones de funcionamiento y precauciones, riesgos y mantenimiento y localización de averías.

2. Mezclar los componentes invirtiendo varias veces el estuche antes de colocarlo en el sistema. No invertir los envases abiertos (perforados) - mezclar los reactivos agitándolos suavemente.
3. Se utilizan cincuenta y cinco (55)  $\mu$ l para cada determinación además del volumen de tara del pocillo de la muestra o del tubo de la muestra. Consultar la sección de envases de la guía del operador para determinar el volumen mínimo de la muestra requerido.
4. Sistema Internacional de Medida (SI). Los resultados se expresan en ng/mL. No obstante el sistema puede expresar referencia. Para convertir concentraciones, multiplicar ng/mL por 2,266. Ver la sección de resultados para calcular los ng/mL (nmol/L) de concentrado de eritrocitos.

#### Procedimientos.

1. En la pantalla de Menú Principal se encuentra la función solicitud de pruebas seleccionarla para realizar las pruebas.  
Las pruebas.
2. En cada renglón de la pantalla corresponde a la asignación de una posición de bandeja, introducir la información de la muestra y especificar las pruebas que se van a realizar. Utilizar folatos como nombre de la prueba para muestras suero o plasma (heparina) y RBC fol como nombre del ensayo para hemolizados. Se emplea el mismo envase de reactivos para ambos tipos de muestra.
3. Colocar el tubo que contiene la muestra del paciente en la bandeja de muestras, o transferir la muestra a un tubo y colocarlo en la posición designada en la bandeja de muestras.
4. Pulsar la tecla de ejecución para iniciar el proceso.
5. El sistema pedirá al analista que realice las calibraciones necesarias.
6. El sistema calculará los resultados de la determinación.

#### DETALLES DE CALIBRACION

Una curva de calibración activa es necesaria para todos los ensayos. Para el ensayo de folatos, es preciso calibrar cada 28 días con el fin de mantener una curva activa. En la guía del operador y manual de referencia encontrará

instrucciones completas sobre los procesos de calibración. La sección 6.1 de la guía del usuario describe las necesidades internas de recalibración y las necesidades puntuales al seleccionar la calibración.

#### CONTROL DE CALIDAD

Los materiales de control de calidad simulan las características del suero de pacientes y son esenciales para controlar la exactitud y precisión de los ensayos inmunoquímicos. Como las muestras pueden procesarse en cualquier momento en un formato de "acceso aleatorio" en lugar de "lotes", debe incluirse suero de control por cada período de 24 horas. Incluir sueros control comerciales que abarquen al menos tres niveles del analito. Se siguen las instrucciones del fabricante para su reconstitución y almacenaje. Cada laboratorio debe establecer un valor medio y rangos aceptables para asegurar unos resultados coherentes. Los resultados de los sueros control que no estén comprendidos dentro de los rasgos aceptables pueden indicar que los resultados del ensayo no son válidos. Examinar todos los resultados del ensayo generados desde el último punto aceptable del ensayo de control de calidad para ese analito. Para obtener información sobre los sueros control consultar la guía del operador.

#### RESULTADOS

El programa del sistema calcula los resultados de la prueba del paciente automáticamente utilizando un modelo matemático de curva logística de cuatro parámetros. La cantidad de analito en la muestra se determina, a partir de la producción de luz medida, por medio de la curva de calibración almacenada. Los resultados de la prueba del paciente pueden revisarse utilizando la pantalla de resultados de la muestra. Consultar las instrucciones completas sobre revisión de resultados en la guía del operador.

Utilizar el siguiente procedimiento para calcular los resultados de folatos intraeritrocitario:

1. Multiplicar el resultado de folatos intraeritrocitario por 21 para corregir la dilución 1:21 que fue realizada durante la preparación del hemolizado.
2. Dividir este resultado por el hematocrito del paciente.

$$\text{Folatos intraeritrocitario (ng/mL)} = \frac{\text{folatos del hemolizado} \times 21}{(\text{hematocrito} / 100)}$$

Ejemplo:

Valor de folatos del hemolizado = 3,5 ng/mL.

Hematocrito = 40%

$$\text{Folatos intraeritrocitario (ng/mL)} = \frac{3,5 \text{ ng/mL} \times 21}{(40/100)} = \frac{73,5}{0,4}$$

Folatos intraeritrocitario (ng/mL) = 184 ng/mL. concentrado de eritrocitos

El cálculo descrito asume que el valor de folatos sérico es bajo en relación con el valor de folatos intraeritrocitario. Algunas veces este no es el caso. Utilizar la fórmula siguiente cuando los folatos del suero o plasma (heparina) es elevado y los folatos intraeritrocitario es bajo:

$$\text{Folatos intraeritrocitario (ng/mL)} = \frac{(\text{folato del hemolizado} \times 21) - [\text{folato sérico} \times (1 - \text{hematocrito}/100)]}{(\text{hematocrito}/100)}$$

Ejemplo:

Valor de folatos del hemolizado = 3,5 ng/mL

Valor de folatos de suero o plasma (heparina) = 18 ng/mL

Hematocrito = 40%

$$\text{Folatos intraeritrocitario (ng/mL)} = \frac{(3,5 \times 21) - [18 \times (1 - 40/100)]}{(40/100)} = \frac{62,7}{0,4}$$

Folatos intraeritrocitario (ng/mL) = 157 ng/mL. concentrado de eritrocitos

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Pueden existir anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) en muestras de pacientes que hayan recibido inmunoterapia con anticuerpos monoclonales. Además, en las muestras de pacientes pueden existir anticuerpos heterófilos capaces de unirse a las inmunoglobulinas de ratón o de otros animales. Es necesario evaluar cuidadosamente los resultados de pacientes que se sabe poseen esos anticuerpos.

Folatos en suero o plasma.

Las muestras pueden medirse con exactitud dentro del rango de 0,5 - 20 ng/mL (1,1 - 45,3 nmol/l). Si una muestra contiene más de 20,0 ng/mL (45,3 nmol/L), de folato, el resultado se reportara como > 20,0 ng/mL (> 45,3 nmol/L). Para encontrar la concentración exacta, diluir un volumen de muestra con un volumen igual del Access

Calibrador SO (cero) folatos de Access. Después de ensayar la muestra diluida, multiplicar el valor calculado por el factor de dilución dos. Consultar en la guía del operador las instrucciones detalladas sobre el procesado de las muestras prediluidas. Si una muestra contiene menos de 0,5 ng/mL (1,1 nmol/L), el resultado se comunicará como < 0,5 ng/mL (< 1,1 nmol/L).

#### Folatos intraeritrocitario

Si para un hemolizado de eritrocitos se obtiene el valor > 20,0 ng/mL, calcular el valor mínimo utilizando la ecuación que aparece en la sección de resultados. Reportar el resultado como mayor de este valor mínimo. De forma alternativa diluir un volumen de hemolizado de eritrocitos con un volumen de Access agente lisante de folatos. Después de analizar el hemolizado diluido multiplicar el valor calculado por el factor de dilución 2, ó consultar en la guía del operador las instrucciones detalladas para el procesamiento de muestra prediluida. Utilizar el valor corregido para recalcular los ng/mL del concentrado de eritrocitos utilizando la ecuación que aparece en la sección resultados.

#### Valores esperados

Folatos sérico. Se han analizado sueros de 107 voluntarios sanos y 60 pacientes con déficit de folato, con el objeto de establecer los rangos. El diagnóstico de déficit de folatos se ha basado en el volumen corpuscular, el hematocrito, la presencia de células megaloblásticas en muestras de médula ósea y diagnóstico de folatos por RIA. Los valores normales se encuentran entre 2,0 ng/mL y 20,0 ng/mL (4,5 y 45,3 nmol/L). La deficiencia se encuentran en el rango de 0,4 - 3,0 ng/mL (0,9 - 6,8 nmol/L). Un estimado, no-paramétrico con un 95% de confianza se obtuvieron los siguientes intervalos.

#### Folatos séricos

Unidades	Rango normal	Rango indeterminado	Rango de deficiencia
ng/ml	> 3,0	2,5 - 3,0	< 2,5
nmol/l	> 6,8	5,7 - 6,8	< 5,7

### Folatos intraeritrocitario.

Se analizaron muestras de sangre total de 83 individuos normales para establecer un intervalo de normalidad.

Unidades	Valores normales
ng/mL	> 164
nmol/L	> 372

1. Los resultados de esta determinación deben interpretarse conjuntamente con el cuadro clínico del paciente.
2. Como ocurre con todas las pruebas diagnósticas, los laboratorios deben establecer sus propios intervalos de referencia para garantizar una representación apropiada de poblaciones específicas.

#### Características específicas de funcionamiento. Exactitud y correlación

La comparación de los valores de folatos séricos obtenidos utilizando el ensayo de folatos Access y un lote de fijación a receptores comercial se obtienen los siguientes datos estadísticos:

n	Rango de observaciones (ng/mL)	Intercepto (ng/mL)	Pendiente	r
210	0,50 - 18,58	- 0,616	1,01	0,926

El estudio de comparación de suero y plasma (heparina) para el estuche de reactivos de folatos Access, proporciona los siguientes datos estadísticos:

n	Rango de observaciones (ng/mL)	Intercepto (ng/mL)	Pendiente	r
48	2,53 - 13,87	- 0,097	0,99	0,977

Una comparación de los valores de folatos intraeritrocitario obtenidos utilizando el ensayo de folato Access y los obtenidos con un estuche de reactivos basado en la unión a receptores disponible comercialmente proporciona los siguientes datos estadísticos:

n	Rango de observaciones (ng/mL concentrado de hematies)	Intercepto (ng/mL concentrado de hematies)	Pendiente	r
155	106 - 1445	- 76,0	0,90	0,95

#### Recuperación de la Dilución (linealidad)

Dilución volumétrica de 4 muestras séricos que contienen ácido fólico con el Calibrador SO (cero) de folatos

Access proporciona los siguientes datos:

Muestra 1	Concentración esperada (ng/mL)	Concentración determinada (ng/mL)	Recuperación %
Neto	N/A	14,14	N/A
1/1,5	9,43	9,17	97
1/2	7,07	7,34	104
1/3	4,71	4,61	99
1/4	3,54	3,61	102
1/6	2,36	2,61	110
		% de Recuperación (Media)	102
Muestra 2	Concentración Esperada (ng/mL)	Concentración Determinada (ng/mL)	Recuperación %
Neto	N/A	10,54	N/A
1/1,5	7,03	6,93	99
1/2	5,27	5,63	107
1/3	3,51	3,87	110
1/4	2,64	3,10	117
1/6	1,76	2,14	122
		% de Recuperación (Media)	111

Muestra 3	Concentración esperada (ng/mL)	Concentración determinada (ng/mL)	recuperación %
Neto	N/A	10,71	N/A
1/1,5	7,14	6,69	94
1/2	5,36	5,14	96
1/3	3,57	3,56	100
1/4	2,68	2,70	101
1/6	1,79	1,88	105
		% de Recuperación (Media)	99

Muestra 4	Concentración Esperada (ng/mL)	Concentración Determinada (ng/mL)	Recuperación %
Neto	N/A	9,56	N/A
1/1,5	6,37	6,85	108
1/2	4,78	5,13	107
1/3	3,19	3,66	115
1/4	2,39	2,80	117
1/6	1,59	1,97	124
		% de Recuperación (Media)	114

Precisión: En el ensayo de folatos séricos, tiene una imprecisión en 15% en todo el rango del ensayo. Un estudio realizando uno a dos ensayos por día, con tres replicados por ensayo, proporciona los siguientes datos por medio de un análisis de varianza (ANOVA).

Control de Suero Humano Comercial	n	Media General (ng/mL)	Dentro de la serie (% CV)	Imprecisión Total (% CV)
Baja	78	2,50	6,5	11,2
Media	60	4,87	3,8	7,4
Alta	67	13,42	5,4	8,9

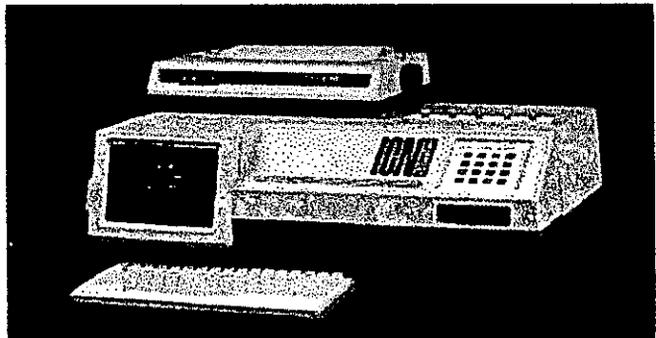
Sensibilidad analítica: El nivel detectable más bajo el ácido fólico distinguible del cero (calibrador S0 de folatos) con un nivel de confianza del 95% es de 0.5 ng/mL (1.1 nmol/mL). Este valor se determina procesando una curva completa de calibración de seis puntos con controles de calidad de tres niveles y diez replicas del calibrador cero. La interpolación del valor de sensibilidad analítica se realiza a partir de la curva en el punto que esta a dos desviaciones típicas del promedio de la señal medida en el calibrador analítico cero.<sup>18</sup>

### 3.2.3 ENSAYO DE UNION COMPETITIVA PARA LA DETERMINACION DE FOLATOS POR RADIOINMUNOANALISIS. SIMULTRAC. FOLATE-SNB. ICN PHARMACEUTICAL.

FUNDAMENTO: La unión competitiva de las proteínas, puede tener la misma afinidad para las proteínas que están contenidos en los estándares y en las muestras de los pacientes. Los folatos no marcados compiten con las especies marcadas para limitar el número de sitios de unión disponibles, en estos sitios de unión específica, esto reduce la cantidad de unión folatos marcados por el sitio específico. Por lo tanto, el nivel de radioactividad es inversamente proporcional a la unión de folatos marcado, lo cual se relaciona con la concentración de la muestra del paciente y de los calibradores. El estuche de reactivos radioinmunoensayo, Simultrac. Folate-SNB. ICN, el ensayo utiliza es el ácido pteroilglutámico (PGA), que esta contenido en los estándares, tanto los folatos del paciente como de los estándares se marcan a través de mezclar e incubar a pH 9.5, a este pH se une, tanto el ácido 5 -metiltetrahidrofólico (MTFA) de la muestra del paciente y el PGA de los estándares que tienen igual afinidad para la unión del reactivo marcador. En este procedimiento, los folatos endógenos del suero son destruidos después de la incubación con el trazador / ditiotreitól por 15 minutos seguido por 10 minutos de extracción por una reacción alcalina a pH 12-13. En esta eliminación se necesita llevar el suero del paciente a una temperatura de 100 °C.

REACTIVOS: Estuche de reactivos: Folate- SNB. ICN PHARMACEUTICAL.

EQUIPOS : Centrifuga.  
Contador gamma.

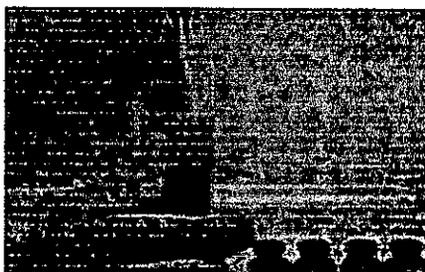


**MATERIAL.** Gradilla.

Micro pipetas de volumen variable de 50 uL hasta 1000 uL.  
Puntas para micro pipetas de 0 a 200 uL y de 200 a 1000 uL.  
Material de cristal volumétrico.  
Contenedor de desechos.

**PROCEDIMIENTO.**

1. Colocar 200 ul de estándares, controles o muestras en los tubos de ensayo.



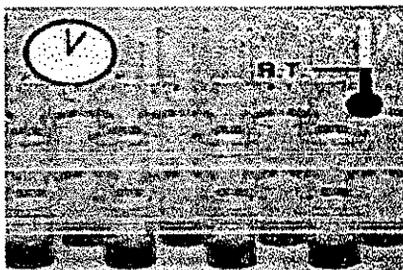
2. Añadir 200 uL de  $^{125}$ I-folatos a cada tubo, homogeneizar. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.



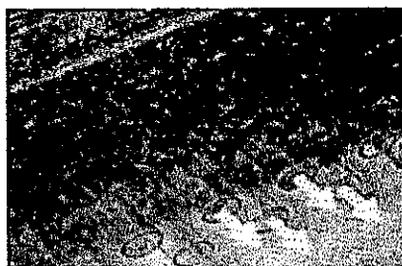
3. Adicionar 100 ul de reactivo de extracción, homogeneizar. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.



4. Agregar 1 mL de fijador a cada tubo, e incubar 60 minutos a temperatura ambiente.



5. Centrifugar por 10 minutos a 1000 x g, decantar el sobrenadante.

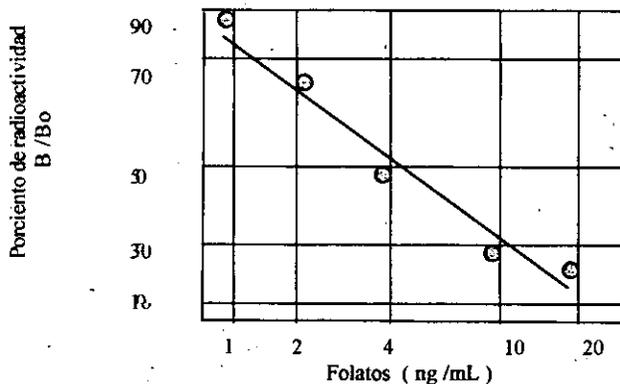


6. Calibrar el contador gamma para  $^{125}\text{I}$  y detectar el nivel de radioactividad de cada tubo y calcular los resultados.<sup>19</sup>



### Calculo de los resultados. Curva estándar.

Determinar el nivel de radiactividad de cada calibrador, control o muestra. Hacer una graficar de el por ciento de radiactividad en las ordenadas y la concentración del correspondiente calibrador para obtener la curva del ensayo, interpolar el por ciento de radiactividad de cada control y muestra para obtener la concentración de folatos.<sup>19</sup>



### Precisión

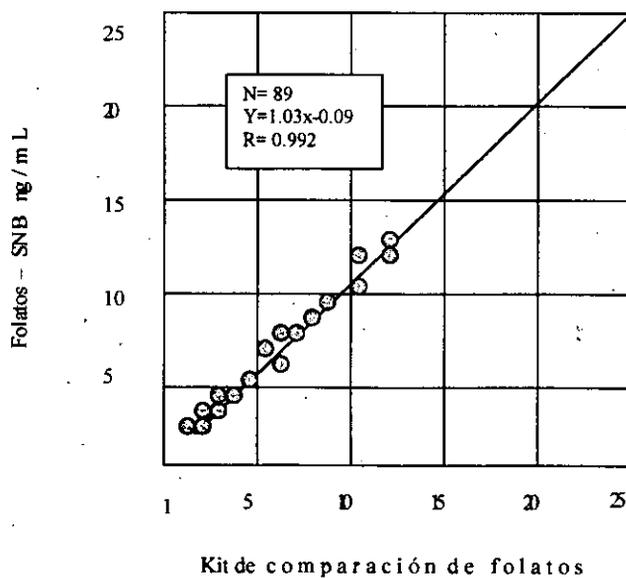
#### Precisión intra-ensayo (ng/ml)

	Nivel I	Nivel II	Nivel III
N	20	20	20
Media	2.36	5.34	4.4
SD	0.15	0.20	0.47
% CV	6.5	3.8	3.2

## Precisión inter-ensayo (ng / mL)

	Nivel I	Nivel II	Nivel III
N	85	85	85
Media	2.35	5.39	15.56
SD	0.27	0.27	1.00
% CV	11.5	5.0	6.5

## Ensayo de correlación



#### 4. DISCUSION.

Al realizar la investigación bibliográfica de los métodos para la determinación de folatos, hay varios puntos que analizar sobre las diferentes técnicas que se han propuesto durante aproximadamente 70 años después del descubrimiento de los folatos. Comenzare con algunos detalles sobre la información que se encuentra con mas facilidad y la que es un poco mas difícil obtener.

1. La información sobre los conocimientos básicos como son definición, estructura, importancia biológica se encuentra un tanto repartida en diferentes capítulos de los libros como son los de bioquímica, nutrición, hematología y fisiología pero no tienen un capítulo bien estructurado sobre el tema en donde se contenga toda la información necesaria para la implementación de un ensayo para cuantificar folatos, la información sobre los detalles técnicos de los ensayos para la determinación de folatos se encontró en manuales especiales de los laboratorios que comercializan reactivos para la determinación de analitos, solo se puede tener acceso a esta información si tiene adquirida esta tecnología. Es difícil encontrar un manual o libro en que se tenga la información de varias técnicas o ensayos para la determinación de la concentración de folatos.
2. Una solicitud para la determinación de folatos, forma parte del diagnóstico y tratamiento del paciente que padece de una deficiencia de la vitamina o padezca anemia megaloblastica, está solicitud obliga al laboratorio de análisis clínicos que realizara el ensayo así también para el analista que lo realizara, poseer un amplio conocimiento de las técnicas que existen para este propósito, esto obliga a adquirir el conocimiento necesario para la determinación. Los métodos cuantitativos para la determinación de folatos deben de ser valorados antes de implementarse en un laboratorio, que emitirá resultados para que el medico tome una decisión en el diagnóstico tratamiento y monitoreo de su paciente. En la investigación bibliográfica se encontraron detalles de contradicción para los métodos microbiológicos introducidos en 1959,<sup>10</sup> en el libro de hematología de William se encuentra diferencias con el autor Tom Brody del libro Nutricional Biochemistry, con respecto al ensayo microbiológico *Lactobacillus casei*, la incongruencia radica en que en el libro de hepatología de Williams indica que el ensayo es preciso, la siguiente tabla ilustra los valores obtenidos en el ensayo de recuperación con *Lactobacillus casei*.<sup>10</sup>

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Contenido de folatos en el suero y eritrocitos con el método *Lactobacillus casei*.

	Folatos en sujetos normales	Deficiencia severa de folatos
Suero, ng / mL	9.8 (6.5 a 19.6)	1.7 (0.6 a 2.5)
Leucocitos ng / mL	92 (60 a 123)	20 (7.0 a 30)
Eritrocitos	336 (165 a 600)	74 (24 a 135)

Pero, Tom Brody especifica que los folilpoliglutamatos se absorben en poca cantidad por las bacterias, por lo tanto los ensayos microbiológicos no son útiles para las determinaciones de folatos en tejidos, para superar el problema se debe realizar un tratamiento con  $\gamma$ -glutamil hidrolasa, que hidroliza los folilpoliglutamatos en folilmonoglutamatos.<sup>1</sup>

La posterior tabla la tendremos que tomar en consideración al realizar un ensayo por algún método microbiológico, indica la actividad de folatos en microorganismos.

Actividad de folatos para tres microorganismos.

Derivado	No relacionados			N <sup>2</sup> -CHO			N <sup>2</sup> -CHNH			N <sup>10</sup> -CHO			N <sup>5</sup> N <sup>10</sup> =CHO			N-CH <sub>2</sub> OH			
	LC	SF	PC	LC	SF	PC	LC	SF	PC	LC	SF	PC	LC	SF	PC	LC	SF	PC	
microorganismos																			
PA	-	+	-																
h <sub>2</sub>																			
h <sub>4</sub>																			
PGA	+	+	-																
h <sub>2</sub>		+	+																
h <sub>4</sub>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
PDGA	+	+	-																
h <sub>2</sub>																			
h <sub>4</sub>				+	+	+													
PIGA	+	-	-																
h <sub>2</sub>																			
h <sub>4</sub>				+	-	+													
PERGA	-	-	-																
h <sub>2</sub>																			
h <sub>4</sub>																			

PA: Acido pterico, PGA: Acido Pteroilglutamico, PDGA: AcidoPteroidiglutamico, H<sub>2</sub>: Dihidro, H<sub>4</sub>: tetrahidro; -CHO: Formil, -CHNH: Formimil, =CH: Metilen, -CH<sub>2</sub>OH: Hidroximetil; LC: *L.casei*, SF: *S.Faecalis*, PC: *P.cerevisiae*; (+): Activo, (-) inactivo.<sup>3</sup>

Con respecto a las cuestiones de trabajo técnico en los métodos microbiológicos se emplea un mayor tiempo y elaboración para realizar del ensayo, así también en los métodos microbiológicos la bibliografía utilizada no refieren datos de sensibilidad ni especificidad, no está descrito el control de calidad para estos ensayos, por lo cual el laboratorio que aplique estas técnicas tendrá que implementar el propio control de calidad probar su exactitud y sensibilidad, así también son mas económicos. Una detalle muy importante es el coeficiente de variación para una determinación de folatos en suero realizado por un ensayo microbiológico el coeficiente de variación debe ser muy pequeño ya que el rango de los valor de referencia de folatos en general oscilar de:

6.5 a 19.6 ng/mL para la determinación con *Lactobacillus casei*.<sup>1</sup>

1.1 a 20 ng/mL para la determinación de folatos por el equipo ACS-180.<sup>17</sup>

y (0.5 a 20 ng/mL) para el sistema Access.<sup>18</sup>

Los ensayos inmunológicos, completamente diferentes a los microbiológicos, tienen la gran ventaja debido a que hay casas comerciales que han estandarizado los métodos basados en cuantificación por quimioluminiscencia y por radioinmunoanálisis, el trabajo por parte del técnico es menor, debido a que los métodos quimioluminiscencia son automatizados o semiautomatizados, los radioinmunoanálisis son manuales pero son de fácil manejo.

El tiempo del ensayo es mucho menor, y un aspecto muy importante es que tienen acceso al control de calidad que se puede realizar con controles de calidad comerciales especiales para este propósito. Por otro lado los anticuerpos que se utilizan son dirigidos contra el tetrahidrofolato, que es uno de los derivados de folatos que abarca la mayor parte de los cofactores y se encuentran en mayor concentración en el suero.

El diagnóstico de deficiencia de folatos está basado en los hallazgos clínicos, la morfología del frotis de sangre periférica y los criterios bioquímicos que incluyen:

Concentración de folatos en suero.

## CRITERIOS DE DEFICIENCIA DE FOLATOS .

Valores normales de folatos y evidencia de deficiencia publicados en 1995. <sup>10</sup>

	Folatos en sujetos normales	Deficiencia severa de folatos
Suero, ng / mL	( 3.0 a 15.0)	reducido
Eritrocitos ng / mL	( 160 a 640)	reducido

El contenido de folatos en el suero se encuentra como folilmonoglutamatos. Los niveles de folatos en el suero no reflejan una deficiencia si el individuo se encuentra bajo un régimen de dieta. El contenido de folatos en los eritrocitos se encuentra como folilpoliglutamatos. El nivel de folatos en los eritrocitos refleja el verdadero estado con respecto al aspecto nutricional del individuo. Un marcador bioquímico indirecto para evidenciar deficiencia de folatos es la homocisteína sérica, que se encuentra muy elevada en el 91% de estas deficiencias de folatos y en 97.5 % de las deficiencias de cobalamina, para hacer un diagnóstico diferencial si el aumento de homocisteína se debe a deficiencia de folatos o de cobalamina se mide el ácido metilmalónico, y un elevado valor de homocisteína superior a lo normal sin incremento del ácido metilmalónico, indica en 87.7% una deficiencia de folatos y se utiliza para diagnosticar un 98.7% de las anemias megaloblásticas por deficiencia de folatos.<sup>20</sup>

## 5. CONCLUSIONES

Para realizar una determinación de folatos se debe de tomar en consideración que el ensayo es muy laborioso para realizarlo por algún método microbiológicos, si la decisión es por quimioluminiscencia o radioinmunoanálisis; y no se cuenta con los recursos económicos adecuados para tener equipos automatizados que ofrecen las casas comerciales no se podrá tener acceso a la realización de la determinación.

Para implementar la determinación de folatos, hay varios aspectos a tomar en cuenta:

1. Si el ensayo que se utilice es de naturaleza inmunológica el costo es elevado por los reactivos y aparato utilizado.
2. Si el ensayo es de naturaleza microbiológicas, son mucho muy económicos pero con alto coeficiente de variabilidad.
3. La información para poder implementar un ensayo para folatos es difícil debido a la escasa información que se encuentra en la bibliografía especializada, la información que hizo posible este trabajo escrito se debe a que las casa comerciales que tienen patentado el ensayo facilitaron la información; una aclaración es que si no hay un interés económico por parte de la empresa para su cliente difícilmente se obtendría la información, además que el 90% de la información que se encontró no se encuentra en español.
4. Así también la definición folatos implica una variedad de derivados del ácido fólico. Este es un factor por lo cual es difícil estandarizar un método que valore un conjunto de moléculas derivadas con diferentes características químicas y fisiológicas, y que para todas ellas se basen en una curva de calibración de su estructura general que es el ácido fólico.

Los métodos para la determinación de folatos en Química Clínica son diversos y la decisión de implementar la determinación depende de la economía del laboratorio; si será en base a un ensayo microbiológico o si se realiza por un ensayo inmunológico. Los ensayos más precisos en la determinación de folatos son los inmunológicos debido a que están estandarizados y automatizados lo que evita errores lo menos posible, así se puede tener la certeza de obtener resultados precisos y confiables para la determinación de folatos. Los ensayos microbiológicos son todavía aceptados pero tienen la desventaja de ser muy laboriosos y no tener un control de calidad adecuado descrito.

## 6. BIBLIOGRAFIA.

1. Brody Tom. Nutritional Biochemistry. Academic Press; London, New York 1994: 357-371.
2. Goodwin. The Biosynthesis of vitamins and related compound. Academic Press; London and New York. 1963: 100 -102.
3. E. Eigen and G.D. Shockman. The Biosynthesis of vitamins and related compound. Academic Press; London and New York. 1960: 435-488.
4. Strayer. Bioquímica tomo II. Interamericana. 1988:570 -576.
5. Voet D. and Voet J. Biochemistry. Jhon Wiles & Sons. Second Edition 1995: 762- 763, 813-816.
6. Devlin T. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations; Wiley-Liss. Thirty Edition. 1992:159 - 161.
7. Rawn J. D. Bioquímica Vol. II. I. Interamericana Mc Graw-Hill 1989: 450-452.
9. Vega Franco L. Importancia del ácido fólico, Dieta Y Salud; 1996( 5) : 1- 12.
10. William J Williams, E Beutler, A Erslev, M. A. Lichman. Hematology. Mc Graw Hills. Thirty Edition. 1983: 321-325.
11. Berlow R., Fletcher A. J., El Manual MERCK de diagnóstico y terapéutica. Editorial Doyma Barcelona Octava edición. 1989:1218-1219, 1236-1239.
12. Tolonea M. Vitaminas y minerales en la salud y la nutrición Ed. Acribia S.A Zaragoza España 1995: 173-174.
13. Chanarin I., Deacon R., Lumb M. Muir M., Perry J. Cobalamin- Folate Interrrelation. A critical review. Blood. 1985 66( 3): 479- 489.
14. Manual DIFCO. 1998: 1088- 1093.
15. Manual MERCK. 1998: 1088- 1090.
16. Manual de referencia. Automated Chemiluminiscence System ACS 180<sup>®</sup> PLUS, ACS 180<sup>®</sup>. CIBA -CORNING. 1995: 2-5, 2-10.
17. Manual de referencia para ensayos. Automated Chemiluminiscence System ACS 180<sup>®</sup> PLUS, ACS 180<sup>®</sup>. CIBA -CORNING. 1995: 2-7 a 2-11 .
18. Manual de Análisis Sistema de Inmunoensayo ACCESS<sup>®</sup>. Beckman Instrument. Inc. 1998.: 17-24.
19. Review. 05/96. SimulTRAC<sup>®</sup>FOLATE-SNB. ICN Pharmaceutical, Inc.
20. J.B. Henry Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. Ed. Masson-Salvat Medicina, novena edición. 1993: 647, 651-652.