

EL METABOLISMO DEL ACIDO FOLICO EN LA TOXEMIA DEL EMBARAZO¹

DRES. JAVIER SOBERÓN ACEVEDO,^{2, 3} JOSÉ CHÁVEZ AZUELA,³ JORGE SORIA³
J. JESÚS ESPINOSA HERNÁNDEZ³ Y MACRINA MASSON³

Se estudia la eliminación urinaria del ácido formamino-glutámico (FIGLU) en 90 pacientes, divididas en 4 grupos: según se tratara de mujeres con embarazo normal o complicado con toxemia leve, toxemia severa o eclampsia; se investigó la eliminación de este metabolito en forma espontánea, bajo carga de histidina y con carga de ácido fólico. Las pacientes con embarazo normal, tienen incrementos de eliminación, que sugieren deficiencia mínima de ácido fólico. En las pacientes con embarazo complicado, esta deficiencia es mayor, de acuerdo con la gravedad del padecimiento y es indudable en la toxemia grave y en la eclampsia convulsiva. Se observa que el fenómeno es modificado por la administración exógena de ácido fólico, ocurriendo regresión a la normalidad, en la excreción urinaria de FIGLU. Se plantea la hipótesis de que en la toxemia del embarazo existe deficiencia de ácido fólico, sin que con ello se pretenda aseverar que ésta constituya el factor etiológico. (Gac. Méd. Méx. 97: 813, 1967).

CONSIDERACIONES GENERALES

LA CONCEPCIÓN, la proliferación del huevo, la anidación y el desarrollo posterior del producto, dependen fundamentalmente de una división y un metabolismo normal de las células; a su vez, la vida, carácter y comportamiento de las células estriba básicamente en los ácidos ribonucleico

(RNA) y desoxirribonucleico (DNA), y una deficiencia de los mismos trae como consecuencia un disturbio en el metabolismo normal de todas las células y tejidos.¹ Por otro lado, como ha sido demostrado, el ácido fólico y sus derivados juegan una parte vital en la síntesis de los ácidos nucleicos esenciales y son de esta forma, de gran importancia en la reproducción celular.^{2, 3, 4} El embarazo está caracterizado por gran proliferación celular, merced a la cual la mujer embarazada tiene necesidades cada vez mayores de

¹ Trabajo de ingreso a la Academia Nacional de Medicina presentado en la sesión ordinaria del 30 de noviembre de 1966.

² Académico numerario.

³ Hospital de Ginecobstetricia Núm. 1. Instituto Mexicano del Seguro Social.

los ácidos nucleicos y por lo tanto de los cuales depende fundamentalmente la síntesis del ácido nucleico.^{5, 6}

Desde los trabajos de Chanarin en 1959,^{7, 8} quedó demostrada esta creciente demanda durante el embarazo, al demostrarse estrecha relación entre los niveles de ácido fólico y el crecimiento fetal. Su deficiencia siempre se manifiesta en forma primaria en los tejidos de más rápido crecimiento, y por esta razón sus antagonistas, como el metotrexate, han sido usados con éxito satisfactorio en el tratamiento de los tumores coriales, pues su efecto se muestra principalmente sobre las células tumorales.⁹ Quizá uno de los primeros conocimientos obtenidos en relación al metabolismo del ácido fólico en el embarazo, fue el hallazgo de que algunos fármacos considerados como sus antagonistas eran capaces de causar abortos o malformaciones fetales cuando se administraban durante la gestación.

Es hasta los últimos cinco o seis años que la literatura médica se ha enriquecido con el aporte de investigaciones referentes al metabolismo del ácido fólico durante el embarazo. Los primeros y el mayor número de estos estudios en esta materia se llevaron a cabo determinando carencias del ácido fólico con el objeto de descubrir anemias gravídicas a raíz del descubrimiento de que éstas no eran debidas exclusivamente a carencia de hierro. En efecto, se pudo demostrar que la deficiencia en ácido fólico es de tanta o de mayor importancia que la de hierro en el origen de dichas anemias.^{10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17}

La escasa importancia que se le ha-

bía dado al ácido fólico en otras alteraciones patológicas del embarazo proviene, no de su desconocimiento, sino de la falta de técnicas adecuadas para su determinación, ya que los métodos clásicos como la punción esternal y la investigación de megaloblasto y de otras alteraciones en sangre circulante periférica, sólo son útiles cuando las deficiencias son tan importantes que llegan por su intensidad o duración a producir modificaciones medulares.^{18, 19, 20, 21} Posteriormente, se idearon técnicas químicas, microbiológicas y radioisotópicas, para determinar niveles séricos de ácido fólico, pero su costo elevado, complejidad e inexactitud obligaron a idear métodos más útiles y menos complicados.^{22, 23}

El mayor adelanto obtenido en la técnica para determinar la deficiencia del ácido fólico, es a través de la medición enzimática de la excreción urinaria del ácido formiminoglutámico.^{24, 25, 26, 27, 28} Esta prueba se basa en la interrupción del metabolismo de la histidina que ocurre en ausencia o deficiencia de ácido fólico. En el hígado de los mamíferos existe una enzima que cataliza la eliminación del grupo amino de la histidina, formándose un ácido no saturado, el ácido urocánico; otra enzima denominada urocanasa, también presente en el hígado, cataliza la fijación de agua sobre el ácido urocánico, dando lugar finalmente al ácido formiminoglutámico (FIGLU). El grupo formilo de éste es posteriormente eliminado, posiblemente como ácido fórmico, produciéndose ácido glutámico y amoníaco más agua, pero para que este proceso bioquímico se lleve a

cabo es necesaria la presencia de ácido fólico. En su ausencia o déficit, se ve bloqueado el paso de FIGLU a ácido glutámico y, como consecuencia lógica, este metabolito se acumulará en el organismo en proporción directa a la deficiencia de ácido fólico.^{29, 30, 31, 32, 33} (Figura 1).



FIG. 1. El metabolismo de la histidina.

Después de los primeros estudios en relación con la anemia, han aparecido reportes de trastorno del metabolismo de ácido fólico, buscando su conexión con el aborto,^{34, 35, 36} la prematuridad,^{37, 38} el desprendimiento prematuro de placenta normoinsera^{39, 40} y las malformaciones congénitas.^{41, 42} Ahora bien, se concibe a la deficiencia de ácido fólico en el embarazo como el principal resultado de aumento en su demanda merced al rápido crecimiento tisular del producto. En la mayoría de los casos, esta mayor demanda es suplida por una dieta satisfactoria, pero si ésta es inadecuada o si la demanda es excesiva,

ocurre la deficiencia.^{43, 44} Por otro lado, en la poco conocida etiología de la toxemia gravídica últimamente se ha dado gran importancia como elemento causal al factor nutricional.^{45, 46, 47} Esto ha motivado que en nuestra institución, donde existe un grupo de especialistas dedicados exclusivamente al estudio de los apasionantes problemas de la toxemia gravídica, al través de la llamada "Clínica de la toxemia del embarazo", se haya dado capital importancia a los factores nutricionales, habiendo ya aparecido algunas investigaciones al respecto,^{48, 49} y considerándoseles todavía como factor de estudio capital, en donde puede estar fincado gran parte del problema.

El objeto fundamental de esta investigación es tratar de saber si en la mujer que padece los diversos grados de toxemia gravídica existe realmente insuficiencia de ácido fólico y secundariamente, tratar de observar en qué forma esta insuficiencia pueda afectar el curso del padecimiento o actúe como uno de los factores determinantes de toxicosis gravídica.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio fue realizado en la sección de toxemias del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 1 del I.M.S.S., con la colaboración del Departamento de Bioquímica y del Departamento de Hematología del mismo Hospital.

Se tomó como material de trabajo a 90 pacientes, de las que 16 cursaban con embarazo normal en el tercer trimestre de la gestación, y 74 mujeres embarazadas con la misma edad de la

gestación, pero con la característica de sufrir toxemia gravídica. A su vez este último grupo fue dividido de acuerdo con el grado de evolución del padecimiento, siguiendo para ello el criterio señalado en las normas del hospital, en preeclampsia leve que comprendió 25 enfermas, preeclampsia grave con 33 casos y eclampsia convulsiva con 16.

Al hacer la valoración de los niveles de ácido fólico, se dividieron los 90 casos estudiados en dos grupos diferentes, cuyo número fue más o menos semejante para cada uno de ellos, en ambos se hicieron las determinaciones administrando previamente dieta apteica por 24 horas, con el objeto de disminuir hasta donde fuese posible la ingesta alimenticia de histidina y mantener a las pacientes en las mismas condiciones basales. En el primer día se llevó a cabo un control sin agregar ningún fármaco, dando una carga de 500 cc. de agua y recolectando la orina durante las 5 horas siguientes, tiempo de recolección que fue siempre el mismo para los controles sucesivos; en el segundo día se agregó por vía oral una carga de 10 gr. de histidina pura; al tercer día se efectuó un segundo control únicamente con la carga de agua señalada y para el primer grupo de pacientes, se realizó al otro día y en las mismas condiciones un tercer control y a los 10 días después un control final. En cambio, en el segundo grupo de pacientes, al día siguiente del segundo control se llevó a cabo la recolección después de haber inyectado por vía intramuscular una ampolla de tres miligramos de ácido fólico y al día siguiente una nueva determinación, después de una segunda

inyección de ácido fólico; por último, como en el primer grupo, se efectuó un control final a los 10 días sin ninguna carga.

En todas las pacientes se utilizó el método de Tabor y Wyngarden,²⁵ con la modificación hecha en el Hospital para determinar la excreción de ácido formiminoglutámico por orina, como valor indicativo del nivel de ácido fólico en las pacientes, ya que como se dijo anteriormente, el ácido fólico es un cofactor en el metabolismo degradativo de la histidina y cuando falta éste, se encuentra un aumento en la excreción urinaria de FIGLU. La técnica seguida para este proceso fue la siguiente: Se utilizó enzima cristalina preparada por la casa Sigma Chemical Co., practicándose curvas de concentración de sustrato y de actividad de la enzima, con las cuales se registró buena actividad a una concentración de 665 mg., equivalente a 0.332 unidades por cada determinación.

El proceso se llevó a cabo colocando en tubos de ensayo de 10 × 75, 0.1 ml. de amortiguador de fosfatos de potasio 1 M a pH 7.2, 0.1 ml. que equivalen a 0.75 uM de ácido tetrahidrofólico 0.25 ml. de la preparación enzimática y agua destilada hasta 0.8 ml., se desencadena la reacción con 0.2 ml. de orina problema previamente filtrada. Se incubaba a 25°C. por 30 minutos, deteniendo la reacción con 0.3 ml. de ácido perclórico al 10%; se deja reposar dos horas a la temperatura ambiente; se centrifuga y lee a longitud de onda de 365 mμ en espectrofotómetro Zeiss. Con el fin de evitar la posible alteración en la lectura por la presencia de cromógenos, se corre

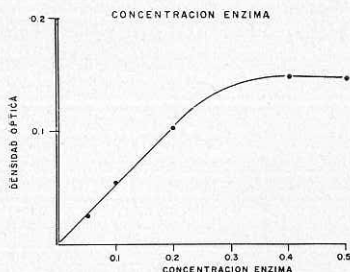


FIG. 2. Concentración de la enzima.

un control para cada muestra, a la cual se le añade la enzima después de parar la reacción con el ácido perclórico, obteniendo una lectura que se resta a cada muestra problema. Al mismo tiempo se hace un blanco de reactivos sin orina, con el cual se lleva a cero de densidad óptica. Todas las determinaciones se hacen por duplicado (Figs. 2 y 3).

Con el objeto de valorar si la carencia de ácido fólico podría ser determinada a través del mielograma, en todos los casos se llevó a cabo estudio de médula ósea, por medio de punción biopsia del esternón.

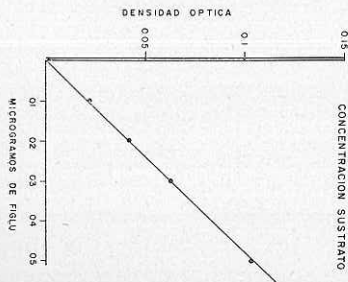


FIG. 3. Concentración del sustrato.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se mencionan en forma resumida en las Tablas 1, 2, 3, 4 y 5. Se hace notar en la Tabla 1 que, con edades semejantes de gravidez, el peso del producto desciende de acuerdo con la gravedad del padecimiento. En las Tablas 2, 3, 4 y 5 los

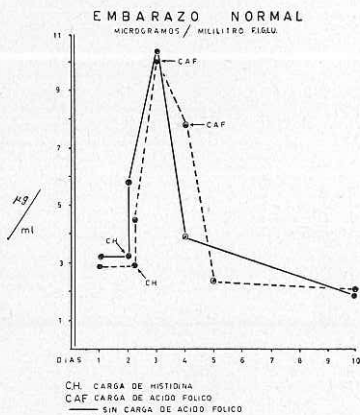


FIG. 4. Gráfica de los resultados en el embarazo normal.

datos han sido presentados como promedios de los resultados obtenidos en todos los casos estudiados en cada grupo; las cifras han sido dadas en microgramos por mililitro. Se señala también el incremento de microgramos sobre el primer control y el porcentaje de incrementos sobre el mismo control para tratar de hacer más objetivas las diferencias en los resultados.

El resultado del mielograma, llevado a cabo en las pacientes en estudio, ma-

	EDAD MATERNA	GRAVIDEZ	EDAD DEL EMBARAZO	PESO DEL PRODUCTO
EMBARAZO NORMAL	26	3	38	3 154
TOXEMIA LEVE	32	5	37	2 761
TOXEMIA SEVERA	31	5	37	2 859
ECLAMPSIA	23	3	37	2 468

TABLA 1. Datos de edad materna, gravidez, edad del embarazo y peso del producto en los diferentes grupos.

E M B A R A Z O N O R M A L								
	CONTROL I	CARGA HISTIDINA	CONTROL II	CONTROL III	CONTROL 10 DÍAS	ACIDO FOLICO I	ACIDO FOLICO II	CONTROL ACIDO FOLICO
DIA	1	2	3	4	10	4	5	10
MICROGRAMOS POR MILILITRO	3.357	5.885	10.387	3.950	1.900	7.943	2.228	2.376
MICROGRAMOS DE INCREMENTO SOBRE CONTROL:I		2.528	7.030	0.593	0	4.586	0	0
%DE INCREMENTO SOBRE CONTROL:I		75	209	18	0	137	0	0

TABLA 2. Resultados obtenidos en el embarazo normal.

T O X E M I A L E V E								
	CONTROL I	CARGA HISTIDINA	CONTROL II	CONTROL III	CONTROL 10 DÍAS	ACIDO FOLICO I	ACIDO FOLICO II	CONTROL ACIDO FOLICO
DIA	1	2	3	4	10	4	5	10
MICROGRAMOS POR MILILITRO	7.674	12.110	23.081	7.854	5.183	17.685	3.992	4.050
MICROGRAMOS DE INCREMENTO SOBRE CONTROL:I		4.436	15.407	0.180	0	10.011	0	0
%DE INCREMENTO SOBRE CONTROL:I		58	201	2	0	130	0	0

TABLA 3. Resultados obtenidos en el grupo de toxemia leve.

T O X E M I A S E V E R A								
	CONTROL I	CARGA HISTIDINA	CONTROL II	CONTROL III	CONTROL 10 DIAS	ACIDO FOLICO I	ACIDO FOLICO II	CONTROL ACIDO FOLICO
DIA	1	2	3	4	10	4	5	10
MICROGRAMOS POR MILILITRO	6.394	30.174	20.655	9.810	4.351	9.220	4.798	5.409
MICROGRAMOS DE INCREMENTO SOBRE CONTROL I		23.780	14.261	3.416	0	2.826	0	0
% DE INCREMENTO SOBRE CONTROL I		372	223	53	0	44	0	0

TABLA 4. Resultados obtenidos en el grupo de toxemia grave.

nifestó en todas ellas hiperplasia global y reacción normoblástica moderada; en el 22% de los pacientes se encontró la aparición de células intermedias entre pronormoblastos y megaloblastos, correspondiendo todas ellas a los grupos de toxemia severa y eclampsia.

DISCUSIÓN

Por los datos anteriores podemos observar que en el grupo de pacientes con embarazo normal (Fig. 4), existen ni-

veles de FIGLU urinario de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antes de administrar histidina y un ascenso inmediato después de su ingesta, con nivel máximo al tercer día de estudio de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; estas cifras son comparables a las informadas por Hibbard,^{34, 37, 39} quien encuentra 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en sus pacientes control después de administrar histidina. Alcanzado el máximo de eliminación, el descenso es rápido y se mantiene en niveles aún menores que el control inicial. Es interesante no-

E C L A M P S I A								
	CONTROL I	CARGA HISTIDINA	CONTROL II	CONTROL III	CONTROL 10 DIAS	ACIDO FOLICO I	ACIDO FOLICO II	CONTROL ACIDO FOLICO
DIA	1	2	3	4	10	4	5	10
MICROGRAMOS POR MILILITRO	6.760	57.932	7.833	26.300		8.433	6.902	6.025
MICROGRAMOS DE INCREMENTO SOBRE CONTROL I		51.172	1.073	19.540		1.673	0.142	0
% DE INCREMENTO SOBRE CONTROL I		757	16	289		25	2	0

TABLA 5. Resultados obtenidos en el grupo de pacientes eclámpicas.

tar, en contra de lo reportado,^{6, 14, 30, 34} que el máximo de eliminación no se obtiene después de 5 horas de la ingesta de histidina, sino que se prolonga hasta las 24 horas siguientes. En este grupo al administrar cargas de ácido fólico, la curva de eliminación desciende paralela a la anterior, pero llega más rápidamente a cifras menores del control inicial, para después seguir un patrón de eliminación semejante.

En los grupos siguientes, no es posible aún comparar nuestros resultados con los de otros autores, ya que en la literatura a nuestro alcance no se encontraron estudios que hagan mención de esta deficiencia o alteración metabólica del ácido fólico en las toxemias del embarazo. Cabe, pues, hacer notar que este informe constituye, hasta el momento, una de las primeras investigaciones al respecto, que llevan una vez más la tendencia de aportar nuevos horizontes en la etiología y factores causales o predisponentes en las toxemias del estado grávido puerperal.

En el grupo de toxemia leve (Fig. 5), la eliminación de FIGLU es en todo idéntica al anterior, excepto su mayor eliminación, ya que en éste alcanza cifras de 22 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Otros puntos de similitud están dados por el máximo logrado hasta las 24 horas siguientes de la carga de histidina y su mayor descenso cuando se administran cargas de ácido fólico.

Cuando la intensidad de la toxemia es mayor, la eliminación urinaria de FIGLU es diferente a lo observado en los grupos previos, ya que al administrar histidina el máximo nivel se observa a las 5 horas de esta carga, en cifras de

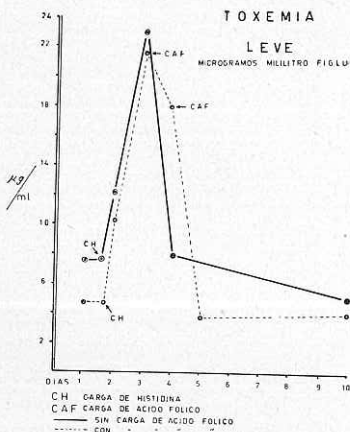


FIG. 5. Gráfica de los resultados en el grupo de toxemia leve.

30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, para el grupo de toxemia grave (Fig. 6). La eliminación posterior es semejante a lo descrito en los grupos previos, tanto si se da carga de ácido fólico, como si este elemento no es administrado. En ambos casos, las cifras finales son siempre menores que la eliminación inicial.

El grupo de pacientes cuyo embarazo se vio complicado con toxemia convulsiva, eclampsia (Fig. 7), ofrece variantes que ameritan consideraciones especiales. Se trata de pacientes con mayor alteración metabólica en este y otros aspectos. En los controles iniciales la concentración del metabolito es idéntica a la observada en la toxemia grave; pero al administrar la carga de histidina las cifras se elevan en proporción importante, llegando 5 horas después hasta 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$; sin embargo, el descenso es

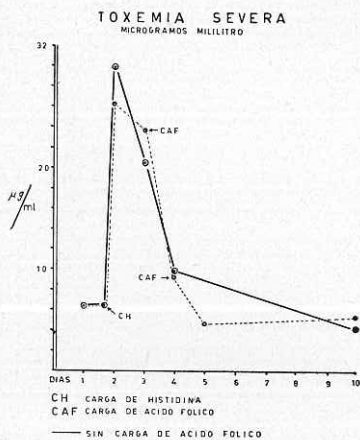


FIG. 6. Gráfica de los resultados en el grupo de toxemia severa.

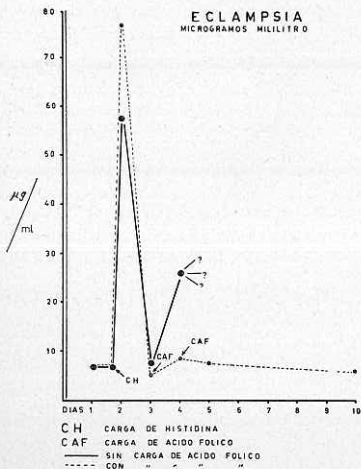


FIG. 7. Gráfica de los resultados en el grupo de eclampsia.

rápido e inmediato hasta niveles aún menores que el inicial. Si en este momento se administra ácido fólico, el patrón de eliminación se mantiene en esos límites. Un fenómeno en todo distinto a lo observado es un segundo ascenso si no se administra ácido fólico y si es de esperar, como pensamos, que el mayor disturbio metabólico existe en estas pacientes, nuevas investigaciones serán necesarias para observar si este segundo ascenso se mantiene, desciende o aumenta y obtener con ello conclusiones más firmes en estos aspectos.

Tomando como base el "incremento" de eliminación urinaria de FIGLU (Fig. 8), los resultados son por demás significativos, ya que a mayor severidad de la toxemia hay mayor incremento de

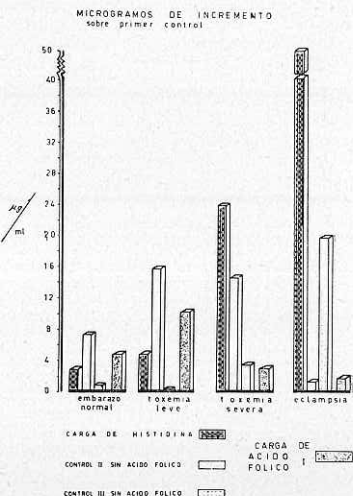


FIG. 8. Gráfica de incremento de eliminación urinaria de FIGLU.

eliminación; como aparece claramente si comparamos los 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$. de la embarazada normal con los 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la paciente con eclampsia.

La gran mayoría de los autores^{5, 25, 26, 29, 36, 37} ha tomado como base de sus estudios la eliminación de FIGLU después de 5 horas de administrada la carga de histidina. Nuestros resultados nos permiten afirmar que es necesario seguir determinaciones más adelante, ya que en los grupos de embarazo normal y toxemia leve esta eliminación máxima se observa hasta las 24 horas.

La administración de ácido fólico da lugar a niveles menores de eliminación urinaria de FIGLU; sin embargo, los grupos que menos responden a la primera dosis (3 mg.) son los de embarazo normal y toxemia leve, no sucediendo así en los restantes y es hasta la segunda dosis que el incremento de FIGLU es de 0 en todos los grupos analizados. Sin dejar de reconocer que esta dosis total de 6 mg. puede no ser la adecuada, si es notoria la respuesta al fármaco cuando la toxemia reviste gravedad indudable, esto significa, quizá que a mayor respuesta, mayor deficiencia primaria de ácido fólico.

Con el fin de ejemplificar más nuestros resultados, hemos determinado el porcentaje de incremento de eliminación urinaria de FIGLU; obsérvese la gran diferencia porcentual que hay entre el grupo de embarazadas normales y el de pacientes con eclampsia, la que es de 200 y 750%, respectivamente (Fig. 9).

La causa de las alteraciones metabólicas en la toxemia del embarazo permanece sin determinar; las investigacio-

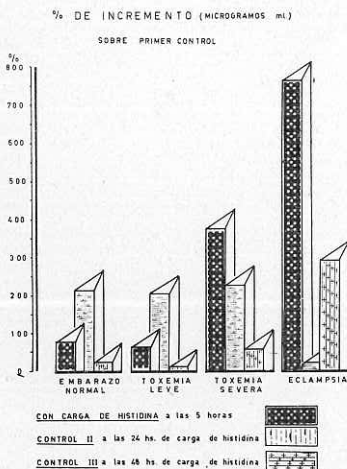


FIG. 9. Gráfica de porcentaje de incremento de eliminación urinaria de FIGLU.

nes para explicar la etiología han seguido cursos varios y los resultados son contradictorios, debiendo quedar señalado que se han invocado factores hormonales y en los últimos años estados de carencia nutricional.

No pensamos que los resultados de nuestro estudio, que sugieren la existencia de deficiencia de ácido fólico, indiquen que ésta constituya el factor determinante de la toxemia del embarazo. Pero conviene indicar que el fenómeno parece revestir importancia trascendental, ya que las únicas fuentes de histidina son la vía exógena y las proteínas tisulares, por lo que en presencia de dieta carente de ácido fólico, puede postularse interferencia con la secuencia metabólica que conduce a la formación de purinas y nucleótidos. Por ser estos

elementos por demás indispensables en el desarrollo tisular, puede concebirse que al estar alterada esta secuencia metabólica por deficiencia primaria de ácido fólico, se produzcan productos con bajo peso y alteraciones del tipo de la hipoplacentosis en estos estados de toxemia pura.

Dado el número reducido de pacientes en algunos de nuestros grupos, no podemos emitir conclusiones definitivas. Esta investigación constituye sólo una fase inicial de nuestro programa.

Por lo que se refiere a los resultados obtenidos en el mielograma, se hace notar que las alteraciones encontradas corresponden a anemias ferroprivas y no a deficiencia de ácido fólico, pero es de hacer notar el hecho de que existen 22% de casos con células intermedias entre pronormoblastos y megaloblastos, es que puede interpretarse como una manifestación de deficiencia inicial de ácido fólico. Este fenómeno está presente sólo en los casos de mayor gravedad del padecimiento, que de acuerdo con las determinaciones de formiminoglutámico ya señalados en nuestro estudio, son los de mayor deficiencia de ácido fólico. Esto permite suponer, como ya había sido señalado por otros autores,^{11, 13, 15, 19, 31} que sólo las deficiencias severas o muy prolongadas de ácido fólico son capaces de producir alteraciones en la médula ósea, y en cambio las modificaciones discretas no dan manifestaciones en el mielograma.

REFERENCIAS

1. Trowbridge, J. L.: *Folic acid deficiency in pregnancy. A severely neglected clinical entity*. J. Maine Med. Ass. 55: 223, 1964.
2. Bachi, C., Coscia, G. C., Rossi, M. y Cagliero, L.: *Clinical Study on serum folic acid at terms of normal pregnancy*. Minerva Méd. 52: 3728, 1961.
3. Salzman, N. P., Eagle, H. I. y Sebring, E. D.: *The utilization of glutamine, glutamic acid and ammonia for the biosynthesis of nucleic acid bases in mammalian cell cultures*. J. Biol. Chem. 230: 1001, 1958.
4. Reynolds, J. J. y cols.: *The biosynthesis of folic acid*. J. Biol. Chem. 239: 317, 1964.
5. Griffin, M. J.: *The biosynthesis of folic acid*. J. Biol. Chem. 239: 106, 1964.
6. Lillie, E. W.: *Obstetrical aspects of megaloblastic anaemia of pregnancy*. J. Obst. Gynec. British. Comm. 69: 736, 1962.
7. Balldridge, R. C.: *The metabolism of histidine. Effects of folic acid deficiency*. J. Biol. Chem. 231: 207, 1958.
8. Chanarin, I., Mac Gibson, B. M., O'Sullivan, W. S. y Mollin, D. L.: *Folic acid deficiency in pregnancy. The pathogenesis of megaloblastic anemia of pregnancy*. Lancet 2: 634, 1959.
9. O'Brien, S. A.: *The role of the folate in cellular division*. Review Cancer Res. 22: 267, 1962.
10. Chanarin, I., Rothman, D. y Watson Williams, E. S.: *Normal formiminoglutamic acid excretion in megaloblastic anaemia in pregnancy. Studies on histidine metabolism*. Lancet 1: 1068, 1963.
11. Chararin, I.: *Iron deficiency and its relation to folic acid status in pregnancy; result of a clinical trial*. Brit. Med. J. 1: 480, 1965.
12. Chisolm, M.: *Figlu acid excretion in anaemia of pregnancy*. Brit. Med. J. 1: 1366, 1964.
13. Echevarri, H.: *Research on possible folic acid deficiency in severe anemias of the last 3 months of pregnancy: preliminary study*. Rev. Columbia Obst. Gynec. 15: 271, 1964.
14. Fox M. R. y Ludwin, W. S.: *Excretion of formiminoglutamic acid as an index of vitamin B12, folic acid and methionine deficiencies*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108: 703, 1961.
15. Fraser, J. L.: *Megaloblastic anemia in pregnancy and the puerperium*. Am. J. Obst. Gynec. 89: 532, 1964.
16. Salomons, E.: *Association of anaemia in pregnancy and folic acid deficiency*. J. Obst. Gynec. British. Comm. 69: 724, 1962.
17. Varadi, S.: *Iron and folic deficiency in pregnancy*. Brit. Med. J. 5434: 656, 1965.

18. Chanarin, I., Bennett, Mc. y Berry, V.: *Folic acid deficiency in pregnancy. The pathogenesis of megaloblastic anemia of pregnancy*. J. Clin. Path. 15: 269, 1962.
19. Dawson, D. W.: *The bone marrow picture of folic acid deficiency in pregnancy*. J. Obst. Gynec. Brit. Comm. 69: 38, 1962.
20. Elliot, B. A.: *Source of elevated serum enzyme activities in patients with megaloblastic erythropoiesis secondary to folic acid deficiency*. Brit. Med. J. 5435: 626, 1965.
21. Kohler, H. G.: *Leucopenia as a manifestation of folic acid deficiency in pregnancy*. J. Obst. Gynec. Brithis. Comm. 69: 736, 1962.
22. Edozien, J. C.: *Determination of formiminoglutamic acid by ion-exchange chromatography*. Lancet 2: 1149, 1964.
23. Metz, J., Stevens, K., Krawitz, S. y Brandt, V.: *The plasma clearance of injected doses of folic acid as an index of folic acid deficiency*. J. Clin. Path. 14: 622, 1961.
24. Berry, V.: *Urinary figlu excretion in pregnancy*. Brit. Med. J., 1: 1103, 1963.
25. Luhby, A. L., Cooperman, J. M. y Teller, D. W.: *Excreción urinaria de ácido formaminoglútmico aplicación en el diagnóstico de la deficiencia de ácido fólico*. Am. J. Clin. Nut. 7: 397, 1959.
26. Rannler, D. H. y Rabinowitz, J. C.: *A proceeding for the microdetermination of formic acid in periodate oxidation mixtures*. Anal. Biochem. 4: 116, 1962.
27. Rabinowitz, J. C. y Pricer, W. F.: *An enzymatic method for the determination of formic acid*. J. Biol. Chem. 229: 321, 1957.
28. Spray, G. H. y Witts, L. J.: *Excretion of figlu as an index of folic acid deficiency*. Lancet 2: 702, 1959.
29. Goresky, R. A.: *The renal excretion of folic acid*. J. Clin. Invest. 42: 1841, 1963.
30. Hibbard, E. D.: *Figlu excretion. A screening test for folic acid deficiency in pregnancy*. J. Obst. Gynec. British. Comm. 69: 739, 1962.
31. Martin, R. G.: *The first enzyme in histidine biosynthesis: The nature of feedback inhibition by histidine*. J. Biol. Chem. 238: 257, 1963.
32. Silverman, M. C. y Gardiner, R. C.: *Method for determination of the acid formaminoglutamic in the urine*. J. Nat. Canc. Inst. 20: 71, 1958.
33. Spolter, P. D. y Baldrige, R. C.: *The metabolism of histidine*. J. Biol. Chem. 238: 2071, 1963.
34. Hibbard, B. M.: *The role of folic acid in pregnancy: with particular reference to anaemia, abortion and abortion*. J. Obst. Gynec. Brit. Comm. 71: 529, 1964.
35. Martin, R. G.: *Serum folic-acid activity and vaginal bleeding in early pregnancy*. J. Obst. Gynec. Brit. Comm. 71: 400, 1964.
36. Martin, R. H.: *Excretion of folic acid in recurrent abortions*. Lancet 1: 670, 1965.
37. Hibbard, B. M., Hibbard, E. D. y Jeffcoate, M. A.: *Folic acid and reproduction*. Act. Obst. Gynec. Scand. 44, Fasc. 3.375-400, 1965.
38. Shojama, A. M.: *Folic Acid deficiency and prematurity*. J. Pediat. 64: 323, 1964.
39. Hibbard, M. D. y Hibbard, E. D.: *Aetiological factors in abruptio placentae*. Brit. Med. J. 12: 1430, 1963.
40. Husain, O. A.: *Folic acid deficiency in pregnancy*. J. Obst. Gynec. Comm. 70: 821, 1963.
41. Hibbard, E. D.: *The figlu-excretion test and defective folic-acid metabolism in pregnancy*. Lancet 2: 1146, 1964.
42. Hibbard, E. D.: *Folic acid metabolism and human embryopathy*. Lancet 1: 1254, 1965.
43. Girdwood, R. H.: *A folic acid excretion test in the investigation of intestinal malabsorption*. Lancet 2: 53, 1953.
44. Santini, R.: *The distribution of folic acid active compounds in individual foods*. J. Pediat. 64: 323, 1964.
45. Brewer, T. H. y Miali, J. B.: *Role of malnutrition, hepato dysfunction and gastrointestinal bacteria in the pathogenesis of acute of pregnancy*. Am. J. Obst. & Gynec. 84: 1253, 1962.
46. Burke, B. S.: *Nutrition studies during pregnancy*. Am. J. Obst. and Gynec. 46: 38, 1953.
47. Hobson, W.: *Adietary and clinical survey of pregnant women with particular reference to toxemia of pregnancy*. J. Hyg. 46: 198, 1948.
48. Castelazo Ayala, L., Calderón Márquez, J. J., Chávez Azuela, J., Maquero, M.: *Factores placentarios, nutricionales y hepáticos en la etiopatogenia de la toxemia gravídica*. Gac. Méd. Mex. 95: 967, 1960.
49. Maquero, M., Castelazo Ayala, L., Cervantes, L.: *Nutritional status and liver function in toxemia of pregnancy*. Obst. and Gynec. 23: 224, 1964.