



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

ISSN: 1676-2444

jbpm1@sbpc.org.br

Sociedade Brasileira de Patologia
Clínica/Medicina Laboratorial
Brasil

Arcaro de Lima, Giovanna; Minot Gutierrez, Cristiane; Yuli Yanaguita, Maira; Nunes de
Morais Ribeiro, Camila; Rubéns Machado, Hélio; Peres, Luiz Cesar
Sacarose como veículo de suplementação dietética de ácido fólico em camundongos
prenhes

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 45, núm. 1, febrero, 2009, pp.
25-30

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
Rio de Janeiro, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541946006>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Sacarose como veículo de suplementação dietética de ácido fólico em camundongos prenhes

Primeira submissão em 04/11/08
Última submissão em 20/02/09
Aceito para publicação em 20/02/09
Publicado em 20/02/09

Saccharose as a vehicle for the supplementation of folic acid in pregnant mice

Giovanna Arcaro de Lima¹; Cristiane Minot Gutierrez²; Maira Yuli Yanaguaita¹; Camila Nunes de Moraes Ribeiro³; Hélio Rubéns Machado⁴; Luiz Cesar Peres⁵

unitermos	resumo
Sacarose	<p>Introdução: A ingestão adequada de folato é essencial durante a embriogênese, e sua deficiência está associada à ocorrência de defeitos no fechamento do tubo neural. Objetivo: Determinar se a sacarose é um bom veículo para a suplementação de folato em camundongos. Materiais e métodos: Quarenta camundongos Swiss fêmeas foram divididos nos grupos: C: ração comercial + água <i>ad libitum</i>; DS: ração balanceada isenta de folato + folato adicionado à sacarose diluída na água por 14 dias; D/DS: ração balanceada isenta de folato + água com sacarose sem folato por 14 dias seguida de ração balanceada isenta de folato + folato adicionado à sacarose diluída na água por mais 14 dias; D: ração balanceada isenta de folato + água com sacarose sem folato por 14 dias. Os animais de todos os grupos experimentais receberam ração balanceada isenta de folato + folato adicionado à sacarose diluída na água durante os três dias do acasalamento e nos 15 dias restantes até o sacrifício. Resultados: Os animais dos grupos D e D/DS apresentaram alopecia, palidez ocular e adinamia enquanto consumiam água com sacarose sem folato, sinais que foram revertidos quando receberam folato adicionado à sacarose diluída na água. Não houve diferença entre os grupos em relação a prenhez, implantes, fetos vivos, reabsorção, morte fetal tardia, nível sérico de folato e contagem de hemácias ao final do experimento, não tendo sido observadas anomalias congênitas em nenhum dos grupos. Conclusão: A sacarose é um meio adequado para a suplementação de folato na dieta.</p>
Ácido fólico	
Camundongos	
Gravidez	

abstract	key words
<p>Adequate folate intake is essential during embryogenesis and its deficiency is associated with neural tube defects. Objective: To investigate if saccharose is a good vehicle for the supplementation of folate in mice. Materials and methods: 40 Swiss female mice were allocated into the following groups: C (commercial mouse food + ad libitum water); DS (folate-free balanced diet + saccharose with folate diluted in water for 14 days); D/DS (folate-free balanced diet + folate-free saccharose diluted in water for 14 days, followed by folate-free balanced diet + saccharose with folate diluted in water for 14 days); D (folate-free balanced diet + folate-free saccharose diluted in water for 14 days). Mice from all experimental groups received folate-free balanced diet + saccharose with folate diluted in water during their three-day mating period and thereafter 15 days until animals were put down. Results: Mice from groups D and D/DS showed alopecia, pale eyes and adynamia while on folate-free saccharose water regimen. These symptoms disappeared after the introduction of saccharose with folate diluted in water. No statistical difference was noted among groups as to pregnancy, number of implants, live fetuses, reabsorption, late fetal death, serum folate levels and red blood cells count and no congenital abnormalities were identified in any groups by the end of the experiment. Conclusion: Saccharose is a suitable vehicle for the dietary supplementation of folate.</p>	<p>Saccharose Folic acid Mouse Pregnancy</p>

1. Alunas de iniciação científica, Curso de Fisioterapia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

2. Pós-graduanda do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

3. Pós-graduanda do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

4. Docente do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP.

5. Docente do Departamento de Patologia da FMRP/USP.

Suporte financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

Introdução

A ingestão adequada de folato é vital para a divisão celular e para a homeostase devido ao papel essencial das folato coenzimas na síntese do ácido nucleico, na regeneração da metionina e no lançamento, na oxidação e na redução de unidades de carbono necessárias para o metabolismo global⁽⁸⁾, o que é particularmente importante durante a embriogênese. Além disso, sabe-se que a deficiência de folato está associada ao aumento da ocorrência de defeitos de fechamento do tubo neural (DFTN)⁽²⁾.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a ingestão diária de 0,4 mg de ácido fólico para todas as mulheres em idade fértil devido ao grande número de gestações não-planejadas^(1, 20). Isso pode ser obtido por utilização de suplementos de ácido fólico, seleção de alimentos ricos em folato ou consumo de alimentos fortificados⁽⁷⁾, sendo que este último mostrou ser a maneira mais efetiva⁽¹³⁾. Alimentos como farinha de trigo, leite, pão, centeio e suco de laranja demonstraram boa biodisponibilidade e aumento real dos níveis desta vitamina em plasma e eritrócitos, conseguindo chegar aos níveis preconizados pela OMS.

Países como Canadá, China, Estados Unidos, Costa Rica, Chile e Argentina, que adotaram a política de fortificação alimentar com ácido fólico, identificaram queda acentuada na incidência de DFTN^(10, 16, 23). No Brasil, por meio de uma resolução do Ministério da Saúde, tornou-se obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com 1,5 mg/kg de ácido fólico a partir de 1º de julho de 2004⁽⁵⁾.

Estudos mostraram que, no Brasil, o veículo mais frequentemente consumido por mulheres mães de crianças com menos de 5 anos, o que representa a população das mulheres em idade fértil (de 12 a 40 anos de idade), é o açúcar. Praticamente 100% das mulheres ingerem açúcar, 90%, pães e doces e 75%, massas⁽³⁾. Além disso, em comparação com outros países, o Brasil é o maior consumidor mundial *per capita* de açúcar, o que justifica este trabalho experimental em camundongos prenhes, que visa testar se o açúcar de cana refinado (sacarose) é um bom veículo para a administração de ácido fólico.

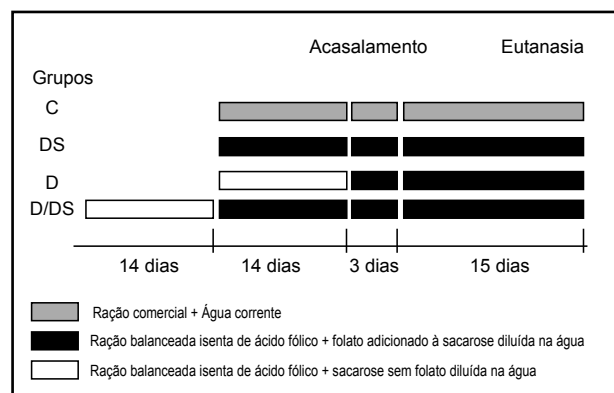
Material e Métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP – 121/2005).

Foram utilizados, no total, 46 camundongos fêmeas, sendo seis para quantificação de folato sérico, e nove machos, linhagem Swiss, mantidos em caixas individuais apropriadas, em ambiente com proteção sonora e rigoroso controle automático de ciclos claro/escuro de 12 horas cada, baixa luminosidade, sistema de exaustão automático com várias trocas de ar por dia e temperatura constante de 22°C, com acesso a dieta e água *ad libitum*. As fêmeas utilizadas receberam a denominação de matrizes, foram pesadas diariamente e divididas em quatro grupos com 10 animais cada: controle (C), deficiente-suplementado (DS), deficiente (D) e deficiente/deficiente-suplementado (D/DS).

Os animais do grupo DS receberam ração balanceada isenta de ácido fólico (RBIAF) e água contendo sacarose e ácido fólico (ASF) por 14 dias, durante os três dias de acasalamento e por mais 15 dias até a eutanásia. Os animais do grupo D receberam ração RBIAF e água contendo sacarose e sem ácido fólico (AS) por 14 dias, sendo que durante os três dias de acasalamento e nos 15 dias restantes até a eutanásia, a água foi substituída por ASF. Os animais do grupo D/DS receberam ração RBIAF e água AS por 14 dias, ração RBIAF e água ASF por outros 14 dias e foram assim mantidos pelos três dias de acasalamento e nos 15 dias restantes até a eutanásia. Os animais do grupo C foram mantidos com ração comercial (RC) e água corrente (AC) em todas as fases do experimento (esquema). Não foi determinado o primeiro dia da gestação em nenhum dos grupos.

A ração depletada de folato foi produzida pela empresa Rhoster® – Indústria e Comércio Ltda., de acordo com recomendações internacionais para alimentação animal. O sulfatiazol a 1% (Anaperan®) foi adicionado à água com o objetivo de eliminar as bactérias da biota intestinal capazes de produzir ácido fólico. Para evitar a coprofagia, os animais que receberam esta ração foram isolados de suas fezes pela substituição da maravalha por uma grade colocada no fundo da caixa na qual foram alojados^(4, 6).



C: grupo controle; DS: deficiente-suplementado; D: deficiente; D/DS: deficiente/deficiente-suplementado.

A ASF era composta por solução de sacarose (100 g/kg da dieta), ácido fólico (2 mg/kg da dieta) e sulfatiazol a 1%, enquanto que a AS o era por solução de sacarose (100 g/kg da dieta) e sulfatiazol a 1%, sem ácido fólico. A suplementação de ácido fólico e a quantidade de sacarose utilizados seguiram o recomendado pelo American Institute of Nutrition Rodent Diets (AIN)⁽¹⁷⁾. A ração comercial contém 3 mg/kg de folato.

O exame clínico dos animais objetivou identificar a presença de alopecia, desde pequenas regiões até grandes áreas, em diversos locais do corpo (focinho, cabeça, nuca, dorso, abdômen, patas), palidez ocular e adinamia, indicativos de anemia.

A quantificação de ácido fólico de seis fêmeas prenhes dos grupos D e D/DS foi realizada em amostras de soro tratado com ácido ascórbico coletadas no momento da eutanásia com o analisador IMMULITE 2000 (PIL2KFO-11, 2004-04-20), cujo princípio do procedimento se baseia em um processo de imunoensaio competitivo⁽¹²⁾. O controle de qualidade para o processo de imunoensaio foi o seguinte:

- valores dos coeficientes de variação intraensaio do ácido fólico: 6,9%; 4,1%; 2,4%;

- valores dos coeficientes de variação interensaio do ácido fólico: 8,8%; 5,7%; 5,2%;

- dose mínima detectável pelo aparelho: 3 ng/ml.

O exame hematológico foi realizado pela determinação do número de hemácias por mm³ de sangue total em amostras de sangue das fêmeas prenhes coletadas no momento da eutanásia, tendo sido diluído na proporção de 1/200 com líquido diluidor isotônico (3,8 g de citrato de sódio, 2 ml de formol a 40% e 100 ml de água destilada) e analisado na câmara de Neubauer. No procedimento técnico foi necessário pipetar 4 ml do líquido diluidor e 0,02 ml de sangue, agitar suavemente, encher os retículos da câmara de Neubauer e fazer a contagem das células. Para o cálculo final de hemácias por mm³ de sangue basta multiplicar o número de hemácias obtido por 10.000.

Para determinar a eficiência do tratamento indutor de deficiência de ácido fólico, seis animais foram mantidos durante 14 dias com dieta RBIAF, sendo que três consumiram água ASF e outros três, AS, após o que foram sacrificados para coleta de sangue, quando foram determinadas a concentração de ácido fólico e a contagem do número de hemácias da mesma maneira já citada (**Tabelas 1 e 2**).

Tabela 1

Comparação da quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro das matrizes que receberam RBIAF e ASF com a das que receberam RBIAF e AS (média ± desvio padrão).

Dosagem de ácido fólico no soro (ng/ml)	Tratamento		Valor de p
	RBIAF	RBIAF	
	+	+	
	ASF	AS	
	n(3)	n(3)	
Após 14 dias com a respectiva dieta	24 ± 0,266	15,78 ± 0,278*	0,05

*Significativamente diferente (p < 0,05).

RBIAF: ração balanceada isenta de ácido fólico; ASF: água suplementada com ácido fólico; AS: água isenta de ácido fólico.

Tabela 2

Comparação do número de hemácias por mm³ de sangue das matrizes que receberam RBIAF e ASF com o das que receberam RBIAF e AS (média ± desvio padrão).

Número de hemácias por mm ³ de sangue (milhões/mm ³)	Tratamento		Valor de p
	RBIAF	RBIAF	
	+	+	
	ASF	AS	
	n(3)	n(3)	
Após 14 dias com a respectiva dieta	4,55 ± 0,235	3,64 ± 0,399*	0,01

*Significativamente diferente (p < 0,01).

RBIAF: ração balanceada isenta de ácido fólico; ASF: água suplementada com ácido fólico; AS: água isenta de ácido fólico.

A eutanásia de todas as matrizes foi realizada pela inalação de atmosfera saturada por dióxido de carbono (AGA®). Anotaram-se o número de implantes, representados por fetos vivos, reabsorções (morte fetal precoce) e morte perinatal (morte fetal tardia), e a presença de qualquer alteração. Todos os dados foram analisados por método não-paramétrico ANOVA, Kruskal-Wallis pelo programa Prism® versão 4.0, considerando-se $p < 0,05$.

Resultados

Os animais dos grupos D e D/DS apresentaram sinais clínicos de deficiência de folato, como alopecia, palidez ocular e adinamia durante a fase do tratamento com água isenta de ácido fólico, recuperando suas características usuais após a introdução de água suplementada com folato, enquanto os animais dos grupos C e DS não exibiram, em nenhum momento, estes sinais.

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando da comparação da concentração de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro das matrizes que receberam

RBI AF e ASF com as que receberam RBI AF e AS, enquanto a dosagem de ácido fólico no soro realizada no final do experimento foi superior a 24 mg/ml para os animais de todos os grupos (Tabela 1).

Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) quando da comparação do número de hemácias por mm³ de sangue das matrizes que receberam RBI AF e ASF com o daquelas que receberam RBI AF e AS (Tabela 2). Esse quadro mudou após a suplementação com ácido fólico de acordo com a contagem de hemácias no final do experimento, sendo que para a maioria dos animais a melhora clínica já era notada após 24 h e para os demais ocorreu em dois a três dias.

Não houve diferença estatística entre os grupos com relação à fertilidade. Desenvolveram prenhez seis (60%) matrizes do grupo C, sete (70%) do grupo DS, seis (60%) do grupo D/DS e 10 (100%) do grupo D (**Tabela 3**). Da mesma forma, não houve diferença estatística entre todos os grupos com relação ao número de implantes, de fetos vivos, de reabsorção e de morte fetal tardia (Tabela 3). Não foram observadas anomalias congênitas ou qualquer outra alteração nos fetos vivos de qualquer dos grupos (Tabela 3).

Tabela 3

Número e média de fêmeas prenhes, implantes, fetos vivos, reabsorção e morte fetal tardia.

Achados	Grupos				Valor de p
	C	DS	D/DS	D	
		<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
Fêmeas prenhes	6 (60)	7 (70)	6 (60)	4 (40)	n.s.
Média por matriz	0,6	0,7	0,4		
Implantes	89 (100)	76 (100)	67 (100)	40 (100)	n.s.
Média por matriz	8,9	7,6	6,7	4,0	
Fetos vivos	86 (96,6)	74 (97,3)	60 (89,5)	40 (100)	n.s.
Média por matriz	8,6	7,4	6,0	4,0	
Reabsorção	3 (3,3)	2 (2,6)	6 (8,9)	0	n.s.
Média por matriz	0,3	0,2	0,6	0	
Morte fetal tardia	0	0	1 (1,5)	0	n.s.
Média por matriz	0	0	0,1	0	

n.s.= não-significativo; C: grupo controle; DS: deficiente-suplementado; D: deficiente; D/DS: deficiente/deficiente-suplementado.

Discussão

No Brasil, praticamente 100% das mulheres em idade fértil ingerem açúcar⁽³⁾, o que poderia, portanto, ser utilizado como veículo para suplementação vitamínica. Como a adição de folato no açúcar é viável e permite boa biodisponibilidade mesmo com o uso culinário⁽¹⁸⁾, esta pode ser uma alternativa para a sua suplementação alimentar.

Com base no Programa de Combate aos Distúrbios por Deficiência de Iodo no Brasil⁽¹⁵⁾ podemos afirmar que, no período de 1982-1992, devido a este trabalho profilático com o sal iodado, praticamente toda a população brasileira, em especial as gestantes, estaria recebendo doses adequadas de iodo, resultando na profilaxia das alterações neurológicas em recém-nascidos e, seguramente, em perspectivas de melhor nível de vida em etapas futuras⁽¹¹⁾. O mesmo poderia ser obtido com a suplementação dietética de ácido fólico no açúcar, já que o Brasil é o maior produtor mundial deste produto, com uma produção que, em 2006, superou a marca de 30 milhões de toneladas⁽¹⁴⁾.

Estudos demonstraram que no primeiro trimestre gestacional o nível de vários micronutrientes, particularmente folato, estava mais baixo em mães de recém-nascidos afetados com DFTN do que em mães de crianças saudáveis⁽⁹⁾, por isso é muito importante a avaliação do papel da nutrição materna. A suplementação periconcepcional materna com vitaminas contendo ácido fólico é o único fator identificado como tendo significativa relação com a redução do risco de DFTN em larga escala^(2, 9).

O presente estudo mostrou adequação para os objetivos pretendidos, visto que as matrizes de todos os grupos tiveram o desenvolvimento esperado. Os animais que desenvolveram prenhez tiveram gestação normal até o momento da cesárea, sem a interferência de outros fatores que não os desejados. Isto se traduziu pelo número de implantes, que não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos, o que era esperado, pois os animais dos grupos DS, D e D/DS receberam suplementação de folato adicionado à sacarose diluída na água durante todo o período gestacional, e o grupo C recebeu a ração comercial durante todo o experimento.

A indução da deficiência de ácido fólico através da RBAF e AS utilizada por 14 dias iniciais nos grupos D e D/DS foi eficiente, confirmada por exames clínico, sorológico e contagem de hemácias, sem outras deficiências nutricionais, uma vez que a dieta depletada de folato foi produzida de forma balanceada e apresentou todos os demais nutrientes em quantidades recomendadas pelo AIN⁽¹⁷⁾. Esta carência foi rapidamente revertida com a oferta de ASF no período adequado a cada grupo, o que ficou demonstrado pelo fato de não haver diferença estatística no número de implantes do grupo D em relação aos demais.

Estudos populacionais demonstraram o efeito protetor da ingestão de folato antes da concepção e durante as primeiras seis semanas de gravidez, com redução do risco de ocorrência e recorrência dos DFTNs em cerca de 50% a 80%^(5, 9). Em adição, a suplementação de ácido fólico não apenas reduz a incidência de DFTN, mas de todas as anomalias congênitas indistintamente^(10, 16), possivelmente por impedir que eventos celulares deletérios ocorram por interferência na replicação celular e aumento da apoptose. Nossos resultados mostram que não foram observadas anomalias congênitas em qualquer um dos grupos e que, inclusive, não houve diferença estatística entre eles em relação às reabsorções e mortes fetais tardias, o que seria esperado caso houvesse persistência da deficiência de ácido fólico^(21, 22).

Por outro lado, nossos resultados mostram que o aumento da oferta de sacarose não produziu efeitos indesejados sobre as matrizes e seus fetos. Alguns estudos mostraram que o excesso de sacarose é um dos fatores indutores de anomalias congênitas, mormente dos DFTNs⁽¹⁹⁾. Além disso, a hiperglicemia é sabidamente teratogênica⁽¹⁹⁾, mas nossos resultados mostram que a oferta de sacarose não chegou a produzir efeitos danosos, possivelmente porque as matrizes não eram diabéticas e, assim, não havia motivo para apresentarem hiperglicemia.

Em suma, o presente estudo mostrou que a ração isenta de ácido fólico foi eficiente na indução de deficiência desta vitamina no período de 14 dias nos animais, resultando em anemia, mas que foi completamente revertida pela suplementação, demonstrando que a sacarose pode ser veículo alternativo para esta finalidade.

Referências

1. BAILEY, L. B.; GREGORY, J. F. Folate metabolism and requirements. *J Nutr*, v. 129, p. 779-782, Bethesda 1999.
2. BARBER, R. C. *et al.* The role of folate transport and metabolism in neural tube defect risk. *Mol Genet Metab*, v. 66, p. 1-9, 2007.
3. BATISTA, F. M.; BARBOSA, N. P. *Alimentação e nutrição no Brasil, 1974-1984*. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição, 1989.
4. BURGOON, J. M. *et al.* Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. *Teratology*, v. 65, p. 219-27, 2002.
5. CASTILLA E.E. *et al.*; Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations (ECLAMC). Preliminary data on changes in neural tube defect prevalence rates after folic acid fortification in South America. *Am J Med Genet A*, v. 123, n. 2, p. 123-8, 2003.
6. CRACIUNESCU, C. N. *et al.* Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr*, v. 134, p. 162-6, 2004.
7. DEPARTMENT OF HEALTH. London, Scottish Office Home and Health Department, Welsh Office, Department of Health and Social Services Northern Ireland, Folic acid and the prevention of neural tube defects, Report from an Expert Advisory, 1992.
8. DROGUETTI, D. C.; PENTEADO, M. D. V. C. Ácido fólico. In: PENTEADO, M. D. V. C. (ed.). *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. 1. ed. São Paulo: Manole, 2003.
9. HASENAU, SUZAN, M. Neural tube defects: prevention and folic acid. *Am J of maternal/Child Nursing*, v. 27, n. 2, p. 87-91, 2002.
10. HONEIN, M. A. *et al.* Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA*, v. 285, n. 23, p. 2981-6, 2001.
11. KNOBEL, M.; MEDEIROS-NETO, G. Moléstias associadas à carência crônica de iodo. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 48, p. 53-61, 2004.
12. MCNEELY, M. D. D. Folic acid assay. In: KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J. (eds.). *Clinical chemistry*. Saint Louis: CV Mosby, 1984.
13. MCNULTY, H.; CUSKELLY, G. J.; WARD M. Response of red blood cell folate to intervention: implications for folate recommendations for the prevention of neural tube defects. *Am J Clin Nutr*, v. 71, suppl. 5, p. 13085-115, 2000.
14. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 30 jun. 2008.
15. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Departamento de Atenção Básica*. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br>>. Acesso em: 30 jun. 2008.
16. RAY, J. G. Folic acid food fortification in Canada. *Nutrit Rev*, v. 62, n. 535-9, 2004.
17. REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the reformulation of the AIN-76 Rodent Diet. *J Nutr*, v. 123, p. 1939-51, 1993.
18. SCHNEIDER, M. *et al.* Reaction of folic acid with reducing sugars and sugar degradation products. *J Agric Food Chem*, v. 50, p. 1647-51, 2002.
19. SHAW, G. M. *et al.* Neural tube defects associated with maternal periconceptional dietary intake of simple sugars and glycemic index. *Am J Clin Nutr*, v. 78, p. 972-8, 2003.
20. STEPANUK, K. M. *et al.* Folic acid supplementation use among women who contact a teratology information service. *Am J Obstet Gynecol*, v. 187, p. 964-7, 2002.
21. TAGBO, I. F.; HILL, D. C. Effect of folic acid deficiency on pregnant rats and their offspring. *Can J Physiol Pharmacol*, v. 55, p. 427-33, 1976.
22. THENEN, S. W. Gestational and neonatal folate deficiency in rats. *Nutrit Res*, v. 11, p. 105-16, 1991.
23. U. S. PUBLIC HEALTH SERVICE. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Folate status in women of childbearing age: United States, 1999. *Morb Mortal Week*, v. 27, n. 42, p. 962-5, 2000.

Endereço para correspondência

Luiz Cesar Peres
Department of Histopathology
Consultant Pathologist
Sheffield Children's Hospital NHS Trust
Western Bank
Sheffield – United Kingdom
S10 2TH
Tel.: (+44 114) 226 0738
e-mail: cesar.peres@sch.nhs.uk