UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Etanol, Deficiência de Ácido Fólico e
Associação Desses Dois Fatores Durante a
Gestação de Camundongos Swiss**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências Médicas –
Opção: Patologia Experimental

Ribeirão Preto
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Etanol, Deficiência de Ácido Fólico e
Associação Desses Dois Fatores Durante a
Gestação de Camundongos Swiss**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências Médicas –
Opção: Patologia Experimental.

Pós-Graduanda: Cristiane Minot Gutierrez

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cesar Peres

Ribeirão Preto
2007

O meu olhar é nítido como um girassol

O meu olhar é nítido como um girassol.
Tenho o costume de andar pelas estradas
Olhando para a direita e para a esquerda,
E de vez em quando olhando para trás...
E o que vejo a cada momento
É aquilo que nunca antes tinha visto,
E eu sei dar por isso muito bem...
Sei ter o pasmo comigo
Que tem uma criança se, ao nascer,
Reparasse que nascera deveras...
Sinto-me nascido a cada momento
Para a eterna novidade do mundo...

Creio no mundo como um malmequer,
Porque o vejo. Mas não penso nele
Porque pensar é não compreender...
O mundo não se fez para pensarmos nele
(Pensar é estar doente dos olhos)
Mas para olharmos para ele e estarmos de acordo.

Eu não tenho filosofia: tenho sentidos...
Se falo na Natureza não é porque saiba o que ela é,
Mas porque a amo, e amo-a por isso,
Porque quem ama nunca sabe o que ama
Nem sabe porque ama, nem o que é amar...

Amar é a eterna inocência,
E a única inocência é não pensar...

Fernando Pessoa (Heterônimo Alberto Caeiro)

Aos meus pais, **Antonia** e **José Luiz** e meus irmãos, **Júnior** e **Rodrigo**:

A gratidão é um sentimento digno que deve existir no homem que recebe benefícios da vida. Sempre a devemos às pessoas que nos deram as mãos nos momentos mais difíceis. A ajuda na hora certa é responsável por tudo de bom que nos venha a acontecer. Amo muito vocês!

Ao meu namorado **Marcos**:

Meu amor, que tantas vezes alimentou-me com suas próprias energias para que eu não tropeçasse no caminho. Esquecendo-se até de si mesmo, ele ouviu intermináveis vezes minhas narrações dos experimentos, foi obrigado a conhecer cada etapa desenvolvida e ainda agüentou as minhas crises nos momentos em que o projeto e eu mesma parecíamos enguiçar. É ele quem me dá chão, quem cuida do meu jardim para que eu possa florir.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Luiz Cesar Peres**:

Existem pessoas que não se tornam especiais pela maneira de ser, ou de agir, mas pela profundidade com que atingem nossos sentimentos. Meu carinho e minha gratidão por todos esses anos de amizade, dedicação, ensinamento, companheirismo e acima de tudo respeito (ah! e pelos puxões de orelha também, por exemplo, agora sei que não devo sair por aí chamando todos que não conheço de tiozinhos ou tiazinhas!).

Meu **Deus**, vos dou infinitas graças por me haverdes criado, por me haverdes conservado durante esta caminhada e preservado minha esperança e força de vontade para que eu conseguisse chegar ao fim desta importante etapa da minha vida.

Ao **Departamento de Patologia** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que me acolheu, abrindo-me suas portas para a realização da minha Pós-Graduação.

Às minhas amigas e companheiras de trabalho, **Camila Nunes de Moraes Ribeiro, Giovanna Arcaro de Lima e Maira Yuli Yanaguita** pela grande força que me deram durante a realização do meu projeto e por todo carinho e respeito que sempre tiveram comigo. Adoro vocês meninas!

A **todos os meus amigos e amigas** que mesmo não fazendo parte do meu dia-a-dia, sempre torceram pela minha vitória. Adoro todos vocês!

À secretária do Departamento de Patologia, **Rosângela Mazzucato C. de Paiva** pela amizade, carinho e respeito que sempre teve com a minha pessoa.

À ex-funcionária do Biotério do Departamento de Patologia, **Maria Aparecida Apolinário Caetano** pela contribuição na fase experimental deste trabalho.

À secretária do Departamento de Patologia, **Edna Pio** pelo respeito e grande auxílio que deu na etapa final do meu doutorado.

Aos meus companheiros e ex-companheiros de pós-graduação, **Cibele, Mara, Cristina, Érica, Cristiane, Marcela, Lenaldo, Andiana, Lucinei, Ricardo, Renata, Jussara, Stéfano, Alessandra, Milena, Juliana e Gisele** pela amizade, apoio e muito respeito que me deram durante essa jornada. Valeu pessoal!

Aos funcionários do Departamento de Patologia, **Toninho, Lena, Mônica, Lígia, Márcia, Auristela, Laura, Adriana, Érica e Elaine** pela amizade, incentivo e respeito pela minha pessoa.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo grande auxílio prestado durante esses anos todos.

Aos funcionários do Biotério da Clínica Médica, **Adalberto, Maurício e Roni** pela sua disponibilidade em ensinar-me uma técnica importante para que eu pudesse realizar uma das etapas da metodologia deste projeto.

Às funcionárias do Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, **Albina e Roberta** pela boa vontade e disposição para que eu realizasse uma etapa prática fundamental deste trabalho.

À **Capes, Fapesp e Faepa** pelo auxílio financeiro recebido.

Ao meu gato, **Tommy Luiz Henrique** que apesar de inúmeras horas de abandono, sempre me recebeu com alegria quando eu chegava em casa e teve muita paciência durante esses anos todos. Amo você meu filhinho!

Aos inocentes **animaizinhos**, cujo sacrifício proporciona passos importantes ao desenvolvimento científico.

E por fim agradeço a todos aqueles que não tiveram a oportunidade de conhecer quem eu realmente sou ou porque simplesmente não quiseram ou porque não fizeram questão disso:

“Aquele que luta contra nós fortalece nossos nervos e aprimora nossas qualidades. Nosso antagonista trabalha por nós.” (Edmund Burke)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE GRÁFICOS.....	xx
LISTA DE FIGURAS.....	xxvi
 RESUMO.....	 xxvii
SUMMARY.....	xxxix
 1. INTRODUÇÃO.....	 01
1.1 ETANOL E GESTAÇÃO.....	02
1.2 MARCADORES BIOLÓGICOS.....	05
1.3 EFEITOS NOCIVOS DO ETANOL SOBRE O FETO.....	07
1.4 DEFEITOS DE FECHAMENTO DO TUBO NEURAL.....	08
1.5 FOLATO E GESTAÇÃO.....	10
1.6 ÁCIDO FÓLICO.....	13
1.7 RECEPTORES DE ÁCIDO FÓLICO.....	18
1.8 HOMOCISTEÍNA.....	19
1.9 GENES E FOLATO.....	20
1.10 AGENTES AMBIENTAIS.....	22
 2. JUSTIFICATIVA.....	 24
 3. OBJETIVO.....	 26
 4. MATERIAL E MÉTODO.....	 28
4.1 EXPERIMENTOS.....	30
4.1.1 EXPERIMENTO 1.....	30
4.1.2 EXPERIMENTO 2.....	31
4.2 EXAME CLÍNICO.....	32
4.3 EXAME SOROLÓGICO.....	33
4.4 EXAME HEMATOLÓGICO.....	33
4.5 COLETA DOS FETOS.....	34
4.6 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	35

5. RESULTADOS.....	36
5.1 EXPERIMENTO 1.....	37
5.1.1 EFEITO DA APLICAÇÃO DAS DOSES.....	37
5.1.2 DOSAGEM DE ÁCIDO FÓLICO.....	37
5.1.3 QUANTIFICAÇÃO DE HEMÁCIAS.....	38
5.1.4 DESEMPENHO REPRODUTIVO MATERNO.....	39
5.1.5 ANOMALIAS CONGÊNITAS.....	41
5.1.6 COMPRIMENTO VÉRTICE-SACRAL FETAL.....	44
5.1.7 PESO CORPÓREO FETAL.....	48
5.1.8 DIÂMETRO PLACENTÁRIO.....	52
5.1.9 PESO PLACENTÁRIO.....	55
5.1.10 NÚMERO DE FETOS MACHOS E FÊMEAS.....	59
5.1.11 GANHO PONDERAL DIÁRIO DAS MATRIZES.....	59
5.2 EXPERIMENTO 2.....	61
5.2.1 EFEITO DA APLICAÇÃO DAS DOSES.....	61
5.2.2 EXAME CLÍNICO.....	61
5.2.3 DOSAGEM DE ÁCIDO FÓLICO.....	62
5.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE HEMÁCIAS.....	63
5.2.5 DESEMPENHO REPRODUTIVO MATERNO.....	64
5.2.6 COMPRIMENTO VÉRTICE-SACRAL FETAL.....	68
5.2.7 PESO CORPÓREO FETAL.....	71
5.2.8 DIÂMETRO PLACENTÁRIO.....	74
5.2.9 PESO PLACENTÁRIO.....	77
5.2.10 NÚMERO DE FETOS MACHOS E FÊMEAS.....	80
5.2.11 GANHO PONDERAL DIÁRIO DAS MATRIZES.....	80
5.3 COMPARAÇÃO DOS EXPERIMENTOS 1 E 2	82
5.3.1 GRUPO C X GRUPO DF.....	82
A. DOSAGEM DE ÁCIDO FÓLICO.....	82
B. QUANTIFICAÇÃO DE HEMÁCIAS.....	83
C. DESEMPENHO REPRODUTIVO MATERNO.....	84
D. COMPRIMENTO VÉRTICE-SACRAL FETAL.....	86
E. PESO CORPÓREO FETAL.....	88
F. DIÂMETRO PLACENTÁRIO.....	90
G. PESO PLACENTÁRIO.....	91
H. NÚMERO DE FETOS MACHOS E FÊMEAS.....	93

5.3.2 GRUPO Eb X GRUPO DFeb.....	93
A. DOSAGEM DE ÁCIDO FÓLICO.....	93
B. QUANTIFICAÇÃO DE HEMÁCIAS.....	95
C. DESEMPENHO REPRODUTIVO MATERNO.....	96
D. COMPRIMENTO VÉRTICE-SACRAL FETAL.....	98
E. PESO CORPÓREO FETAL.....	100
F. DIÂMETRO PLACENTÁRIO.....	102
G. PESO PLACENTÁRIO.....	103
H. NÚMERO DE FETOS MACHOS E FÊMEAS.....	105
5.3.3 GRUPO Ea X GRUPO DFEa.....	106
A. DOSAGEM DE ÁCIDO FÓLICO.....	106
B. QUANTIFICAÇÃO DE HEMÁCIAS.....	107
C. DESEMPENHO REPRODUTIVO MATERNO.....	108
D. ANOMALIAS CONGÊNITAS.....	110
E. COMPRIMENTO VÉRTICE-SACRAL FETAL.....	111
F. PESO CORPÓREO FETAL.....	113
G. DIÂMETRO PLACENTÁRIO.....	115
H. PESO PLACENTÁRIO.....	116
I. NÚMERO DE FETOS MACHOS E FÊMEAS.....	117
6. DISCUSSÃO.....	119
7. CONCLUSÃO.....	142
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145
9. APÊNDICE.....	174

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

10-formil-THF   10-formil-tetrahidrofolato

5,10-MTHF   5,10-metileno-tetrahidrofolato

5-MeTHF   5-metil-tetrahidrofolato

AFPMMF   Ausência de Fusão dos Processos Maxilares, Mandibulares e Frontonasal

AMC   Agenesia de Membros e Cauda

C   Controle

CETEA   Comitê de Ética em Experimentação Animal

cm   Centímetro

CO₂   Dióxido de carbono

DCC   Defeitos Cardíacos Congênitos

DF   Controle da Deficiência de Folato

DFEa Deficiência de Folato + Etanol alta dose

DFEb Deficiência de Folato + Etanol baixa dose

DFTN Defeitos de Fechamento do Tubo Neural

dg   Dia gestacional

DNA   Ácido Desoxirribonucléico

Ea   Etanol alta dose

Eb   Etanol baixa dose

FAE   Efeitos Alcoólicos Fetais

FAEEs   Ésteres Etilícos dos Ácidos Graxos

FAS   Síndrome Alcoólica Fetal

FR- α Receptor alfa de folato

FR- β Receptor beta de folato

g   Grama

GC Grupo Controle

GDF Grupo Controle da Deficiência de Folato

GDFEa Grupo Deficiência de Folato + Etanol alta dose

GDFEb Grupo Deficiência de Folato + Etanol baixa dose

GEa Grupo Etanol alta dose

GEb Grupo Etanol baixa dose

i.p. Injeção intraperitoneal

Kg Kilograma

L Litro

mg Miligrama

ml Mililitro

mm³ Milímetro cúbico

MTHFR Metileno Tetrahydrofolato Redutase

n Número total

n.s. Não significante

ng Nanograma

nmol Nanomol

OMS Organização Mundial da Saúde

PABA Ácido p-aminobenzóico

rc Ração comercial

RCIU Restrição do Crescimento Intra-Uterino

rdf Ração isenta de ácido fólico

ROS Espécies Reativas de Oxigênio

SNC Sistema Nervoso Central

THF Tetrahydrofolato

v/v Volume por volume

LISTA DE TABELAS

EXPERIMENTO 1 – DIETA COM ÁCIDO FÓLICO

Tabela 1 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) nas amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 38

Tabela 2 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 39

Tabela 3 – Número e média de implantes, fetos vivos, reabsorção e morte fetal tardia dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 40

Tabela 4 – Número de fetos vivos normais e com anomalias congênitas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 40

Tabela 5 – Achados macroscópicos em fetos de camundongos dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea) 41

Tabela 6 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea) 44

Tabela 7 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos e fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea) 46

Tabela 8 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea) 48

Tabela 9 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos e fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea) 50

Tabela 10 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 52

Tabela 11 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 54

Tabela 12 – Peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 55

Tabela 13 – Peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 57

Tabela 14 – Número de fetos machos e número de fetos fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 59

Tabela 15 – Média do ganho ponderal (g) diário de camundongos prenhes dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea) nos diferentes períodos gestacionais..... 60

EXPERIMENTO 2 – DIETA SEM ÁCIDO FÓLICO

Tabela 16 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 62

Tabela 17 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 64

Tabela 18 – Número e média de implantes, fetos vivos, reabsorção e morte fetal tardia dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 65

Tabela 19 – Número de fetos vivos normais e com anomalias congênitas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 67

Tabela 20 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 68

Tabela 21 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos e fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 70

Tabela 22 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb

(Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 71

Tabela 23 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos e fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 73

Tabela 24 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 74

Tabela 25 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos e fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 76

Tabela 26 – Peso (g) placentário entre fetos machos e fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 77

Tabela 27 – Peso (g) placentário entre fetos machos e fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 79

Tabela 28 – Número de fetos machos e número de fetos fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 80

Tabela 29 – Média do ganho ponderal (g) diário de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose) nos diferentes períodos gestacionais..... 81

COMPARAÇÃO DOS EXPERIMENTOS 1 E 2

GRUPO C X GRUPO DF

Tabela 30 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 82

Tabela 31 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 83

Tabela 32 – Número e média de implantes, fetos vivos, reabsorção e morte fetal tardia dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 85

Tabela 33 – Número de fetos vivos normais e com anomalias congênitas dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 86

Tabela 34 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 86

Tabela 35 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 88

Tabela 36 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 90

Tabela 37 – Peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 91

GRUPO EB X GRUPO DFEB

Tabela 38 – Número de fetos machos e número de fetos fêmeas dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 93

Tabela 39 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 94

Tabela 40 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 95

Tabela 41 – Número e média de implantes, fetos vivos, reabsorção e morte fetal tardia dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 96

Tabela 42 – Número de fetos vivos normais e com anomalias congênitas dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 98

Tabela 43 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 98

Tabela 44 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 100

Tabela 45 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 102

Tabela 46 – Peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 103

Tabela 47 – Número de fetos machos e número de fetos fêmeas dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 105

GRUPO Ea X GRUPO DFEa

Tabela 48 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 106

Tabela 49 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 107

Tabela 50 – Número e média de implantes, fetos vivos, reabsorção e morte fetal tardia dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 108

Tabela 51 – Número de fetos vivos normais e com anomalias congênitas dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)... 110

Tabela 52 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 111

Tabela 53 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 113

Tabela 54 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 115

Tabela 55 – Peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 116

Tabela 56 – Número de fetos machos e número de fetos fêmeas dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 118

LISTA DE GRÁFICOS

EXPERIMENTO 1 – DIETA COM ÁCIDO FÓLICO

- Gráfico 1** – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 38
- Gráfico 2** – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 39
- Gráfico 3** – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 44
- Gráfico 4** – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 45
- Gráfico 5** – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 45
- Gráfico 6** – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos e fêmeas do Grupo C (Controle)..... 46
- Gráfico 7** – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos e fêmeas do Grupo Eb (Etanol baixa dose)..... 47
- Gráfico 8** – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos e fêmeas do Grupo Ea (Etanol alta dose)..... 47
- Gráfico 9** – Peso corpóreo (g) fetal entre machos dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea) 48
- Gráfico 10** – Peso corpóreo (g) fetal entre fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 49
- Gráfico 11** – Peso corpóreo (g) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..... 49
- Gráfico 12** – Peso corpóreo (g) fetal entre machos e fêmeas do Grupo C (Controle)..... 50

Gráfico 13 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos e fêmeas do Grupo Eb (Etanol baixa dose).....	51
Gráfico 14 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos e fêmeas do Grupo Ea (Etanol alta dose).....	51
Gráfico 15 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).....	53
Gráfico 16 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).....	53
Gráfico 17 – Diâmetro (cm) placentário entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)..	54
Gráfico 18 – Peso (g) placentário entre fetos machos dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea)	55
Gráfico 19 – Peso (g) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).....	56
Gráfico 20 – Peso (g) placentário entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).....	56
Gráfico 21 – Peso (g) placentário entre fetos machos e fêmeas do Grupo C (Controle).....	57
Gráfico 22 – Peso (g) placentário entre fetos machos e fêmeas do Grupo Eb (Etanol baixa dose).....	58
Gráfico 23 – Peso (g) placentário entre fetos machos e fêmeas do Grupo Ea (Etanol alta dose).....	58
Gráfico 24 – Média do ganho ponderal (g) diário de camundongos prenhes dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea) durante o período gestacional.....	60

EXPERIMENTO 2 – DIETA SEM ÁCIDO FÓLICO

Gráfico 25 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 63

Gráfico 26 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 64

Gráfico 27 – Média de fetos vivos dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 66

Gráfico 28 – Média de reabsorção dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 66

Gráfico 29 – Média de morte fetal tardia dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 67

Gráfico 30 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 69

Gráfico 31 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 69

Gráfico 32 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 70

Gráfico 33 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 72

Gráfico 34 – Peso corpóreo (g) fetal entre fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 72

Gráfico 35 – Peso corpóreo (g) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 73

Gráfico 36 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 75

Gráfico 37 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 75

Gráfico 38 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 76

Gráfico 39 – Peso (g) placentário entre fetos machos dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 78

Gráfico 40 – Peso (g) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 78

Gráfico 41 – Peso (g) placentário entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 79

Gráfico 42 – Média do ganho ponderal (g) diário de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose) durante o período gestacional.... 81

COMPARAÇÃO DOS EXPERIMENTOS 1 E 2

GRUPO C X GRUPO DF

Gráfico 43 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 83

Gráfico 44 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 84

Gráfico 45 – Média de reabsorção de camundongos prenhes dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 85

Gráfico 46 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 87

Gráfico 47 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre fêmeas dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 87

Gráfico 48 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 88

Gráfico 49 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 89

Gráfico 50 – Peso corpóreo (g) fetal entre fêmeas dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 89

Gráfico 51 – Peso corpóreo (g) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 90

Gráfico 52 – Peso (g) placentário entre fetos machos dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 91

Gráfico 53 – Peso (g) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 92

Gráfico 54 – Peso (g) placentário entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato)..... 92

GRUPO Eb X GRUPO DF Eb

Gráfico 55 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DF Eb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 94

Gráfico 56 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DF Eb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 95

Gráfico 57 – Média de fetos vivos dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DF Eb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 97

Gráfico 58 – Média de reabsorção dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 97

Gráfico 59 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).....99

Gráfico 60 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre fêmeas dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).....99

Gráfico 61 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 100

Gráfico 62 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 101

Gráfico 63 – Peso corpóreo (g) fetal entre fêmeas dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 101

Gráfico 64 – Peso corpóreo (g) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 102

Gráfico 65 – Peso (g) placentário entre fetos machos dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 103

Gráfico 66 – Peso (g) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 104

Gráfico 67 – Peso (g) placentário entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 104

Gráfico 68 – Média de fetos vivos fêmeas entre os Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose)..... 105

GRUPO Ea X GRUPO DFEa

Gráfico 69 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 106

Gráfico 70 – Número de hemácias por mm ³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).....	107
Gráfico 71 – Média de fetos vivos dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).....	109
Gráfico 72 – Média de reabsorção dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).....	109
Gráfico 73 – Média de morte fetal tardia dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).....	110
Gráfico 74 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).....	112
Gráfico 75 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre fêmeas dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).....	112
Gráfico 76 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).....	113
Gráfico 77 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).....	114
Gráfico 78 – Peso corpóreo (g) fetal entre fêmeas dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).....	114
Gráfico 79 – Peso corpóreo (g) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).....	115
Gráfico 80 – Peso (g) placentário entre fetos machos dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).....	116
Gráfico 81 – Peso (g) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).....	117
Gráfico 82 – Peso (g) placentário entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)...	117

Gráfico 83 – Média de fetos vivos fêmeas entre os Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose)..... 118

LISTA DE FIGURAS

EXPERIMENTO 1 – DIETA COM ÁCIDO FÓLICO

Figura 1 – Fotos macroscópicas da vista superior do segmento cefálico de fetos do Grupo C (Controle), com aspecto normal e do Grupo Ea (Etanol alta dose), com exencefalia e anencefalia..... 42

Figura 2 – Fotos macroscópicas da vista superior do segmento cefálico de fetos do Grupo C (Controle), com aspecto normal e do Grupo Ea (Etanol alta dose), com anencefalia e ausência de fusão dos processos maxilares, mandibulares e frontonasal..... 42

Figura 3 – Fotos macroscópicas da vista lateral do corpo total de fetos do Grupo C (Controle), com aspecto normal e do Grupo Ea (Etanol alta dose), com agenesia de membros e cauda..... 43

Figura 4 – Fotos macroscópicas da vista lateral do corpo total de fetos do Grupo C (Controle), com aspecto normal e do Grupo Ea (Etanol alta dose), com gastrosquise..... 43

EXPERIMENTO 2 – DIETA SEM ÁCIDO FÓLICO

Figura 5 – Fotos macroscópicas de alguns dos achados observados durante o exame clínico das matrizes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose) 62

RESUMO

Embora os efeitos teratogênicos do etanol sejam bem conhecidos, ele ainda é um agente exógeno muito usado por mulheres em idade reprodutiva e sabe-se que ele interfere com o transporte, absorção e metabolismo do ácido fólico. O objetivo deste trabalho foi determinar os efeitos da administração de etanol, da deficiência do ácido fólico na dieta e da associação desses dois fatores durante a gestação de camundongos Swiss. O estudo foi feito com dois experimentos, no primeiro examinou-se a influência do etanol diluído em salina a 25% (v/v) em doses baixa (0,4g/Kg de peso corporal) e alta (4,0g/Kg de peso corporal) em animais alimentados com ração comercial e no segundo a influência do etanol nas mesmas doses em animais alimentados com dieta deficiente em folato. Em ambos os experimentos os animais foram divididos em 6 grupos com 6 animais cada: C= controle; Eb= etanol baixa dose; Ea= etanol alta dose (Experimento 1) e DF= controle da deficiência de folato; DFEb= deficiência de folato + etanol baixa dose; DFEa= deficiência de folato + etanol alta dose (Experimento 2). Os animais dos Grupos C e DF receberam apenas salina. Etanol e salina foram administrados por via intraperitoneal, em três dias consecutivos da gestação: 7º, 8º e 9º. A eutanásia foi realizada em câmara de CO₂ no 18º dia gestacional e os cornos uterinos foram retirados por cesárea para observação e contagem dos fetos vivos, mortes fetais tardias e reabsorções. Anomalias congênitas foram encontradas apenas no Grupo Ea, representadas por defeito de fechamento do tubo neural isolado (6,45%), agenesia de membros e cauda (6,45%), defeito de fechamento do tubo neural

associado a defeito da face média (2,15%) e gastrosquise (1,08%). Foi observada entre os grupos variação no número de fetos vivos (C= 98,97%; Eb= 97,98%; Ea= 87,74%; DF= 90,91%; DFEB = 72,22%; DFEa= 61,39%), de reabsorções (C= 1,03%; Eb= 2,02%; Ea= 1,89%; DF= 8,08%; DFEB= 14,44%; DFEa= 18,81%) e de mortes fetais tardais (C= 0; Eb= 0; Ea= 10,38%; DF= 1,01%; DFEB= 13,33%; DFEa= 19,80%). Houve variação no comprimento vértice-sacral fetal (machos/fêmeas: C= 2,6/2,5cm; Eb= 2,5/2,5cm; Ea= 2,4/2,3cm; DF=2,4/2,3cm; DFEB= 2,0/2,0cm; DFEa= 1,9/1,8cm), no peso corpóreo fetal (machos/fêmeas: C= 1,50/1,40g; Eb= 1,49/1,40g; Ea= 1,31/1,19g; DF= 1,28/1,17g; DFEB= 0,81/0,82g; DFEa= 0,83/0,73g), no diâmetro placentário (machos/fêmeas: C=0,8/0,8cm; Eb= 0,8/0,7cm; Ea= 0,8/0,7cm; DF= 0,8/0,8cm; DFEB= 0,8/0,8cm; DFEa= 0,7/0,7cm) e no peso placentário (machos/fêmeas: C= 0,14/0,12g; Eb= 0,14/0,11g; Ea= 0,12/0,10g; DF= 0,13/0,11g; DFEB= 0,09/0,09g; DFEa= 0,09/0,09g). Os resultados indicam que alta dose de etanol durante o consumo de ração comercial é mais deletério que baixa dose, pois além de provocar anomalias congênitas, causou restrição do crescimento intra-uterino e placentário e produziu mortes fetais tardias. A deficiência de ácido fólico, por si só, também é deletéria, interferiu com o desenvolvimento fetal e placentário e produziu reabsorções. A associação da deficiência de folato e etanol agravou ainda mais esse desenvolvimento e produziu um maior número de reabsorções e mortes fetais tardias. Além disso, na deficiência de folato, baixa dose de etanol foi tão deletéria quanto alta dose, indicando que a nutrição materna tem um papel fundamental no desenvolvimento fetal. Dessa forma, a ação sinérgica de dois fatores isolados, etanol e deficiência de ácido fólico, permite reforçar a noção do risco humano

em condições semelhantes, já que mulheres jovens tendem a apresentar mais deficiência de ácido fólico e estão mais expostas a comportamentos que levam ao consumo de etanol.

Palavras chave: etanol, deficiência de ácido fólico, anormalidades congênitas, gravidez animal, camundongos.

SUMMARY

In spite of the well known teratogenic effect of ethanol, it is still the most consumed exogenous abuse substance by women of reproductive age. Ethanol also impairs the absorption, transport and metabolism of folic acid. The aim of this study was to investigate the effects of ethanol, dietary deficiency of folic acid and the association of both on the outcome of Swiss mouse pregnancy. We aimed to analyze the result of low (0.4g/Kg) and high (4g/Kg) of ethanol dose diluted in saline 25% (v/v) given to animals fed a commercial diet (Experiment I) or its effect on mice fed a folate-free diet (Experiment II). The pregnant mice were divided in 6 groups of 6 animals each: (Experiment I) C=Control; low dose ethanol (Eb); high dose ethanol (Ea); (Experiment II) DF= Control of Folate deficiency; DFEB= Folate deficiency plus low dose ethanol, and DFEa= Folate deficiency plus high dose ethanol. On the 7th, 8th and 9th gestational day (GD) either saline (Groups C and DF) or ethanol (other groups) were administered by intraperitoneal injection and the sacrifice was on the 18th GD on a CO₂ chamber after which the uterine horns were harvested by cesarean section for examination and counting of live fetuses, late fetal death and resorptions. Congenital anomalies were found only in Group Ea, represented by isolated Neural Tube Defect (NTD) (6.45%), limb and tail agenesis (6,45%), NTD plus middle face anomaly (2,15%) and gastroschisis (1,08%). The number of live fetuses (C= 98,97%; Eb= 97,98%; Ea= 87,74%; DF= 90,91%; DFEB = 72,22%; DFEa= 61,39%), resorptions (C= 1,03%; Eb= 2,02%; Ea= 1,89%; DF= 8,08%; DFEB= 14,44%; DFEa= 18,81%) and late fetal death (C= 0; Eb= 0; Ea= 10,38%; DF= 1,01%; DFEB= 13,33%; DFEa= 19,80%) differed among groups. It was also noted a gender related variation

in crown-rump length (male/female: C= 2,6/2,5cm; Eb= 2,5/2,5cm; Ea= 2,4/2,3cm; DF=2,4/2,3cm; DFEb= 2,0/2,0cm; DFEa= 1,9/1,8cm), body weight (male/female:C= 1,50/1,40g; Eb= 1,49/1,40g; Ea= 1,31/1,19g; DF= 1,28/1,17g; DFEb= 0,81/0,82g; DFEa= 0,83/0,73g), placental diameter (male/female: C=0,8/0,8cm; Eb= 0,8/0,7cm; Ea= 0,8/0,7cm; DF= 0,8/0,8cm; DFEb= 0,8/0,8cm; DFEa= 0,7/0,7cm) and placental weight (male/female: C= 0,14/0,12g; Eb= 0,14/0,11g; Ea= 0,12/0,10g; DF= 0,13/0,11g; DFEb= 0,09/0,09g; DFEa= 0,09/0,09g). Our results indicate that high ethanol dose given to pregnant mice fed on a commercial diet is more deleterious than low dose because it induced congenital anomalies and intrauterine growth restriction, decreased placental weight and diameter and increased fetal death. Isolated folic acid deficiency is harmful to gestation, decreasing fetal and placental development and inducing resorptions. The association of ethanol and folic acid deficiency increased the developmental impairment and induced more resorption and late fetal death. In folate deficient mice, low dose of ethanol was as detrimental as high dose indicating that maternal nutritional status plays a major role in fetal development. In conclusion, the synergistic action of two factors, ethanol and folate deficiency, may help to understand the human risk in similar situation, as young women are prone to this vitamin deficiency and are more exposed to a behavior that stimulate alcohol intake.

Key words: ethanol, folic acid deficiency, congenital abnormalities, pregnancy, mice.

INTRODUÇÃO

1.1 ETANOL E GESTAÇÃO

O uso de etanol durante a gravidez é um problema significativo de saúde pública. Aproximadamente 60% das mulheres adultas nos Estados Unidos relatam que consomem álcool pelo menos ocasionalmente e 20% dessas mulheres continuam ingerindo algum álcool durante a gravidez (DAY; COTTREAU; RICHARDSON, 1993; MIDNIAK; CLARK, 1994). Embora a maioria das mulheres grávidas pare ou reduza drasticamente a ingestão de álcool, algumas continuam a ingeri-lo exageradamente (STRATTON; HOWE; BATTAGLIA, 1996).

Desde que Lemoine et al. (1968) na França relataram pela primeira vez os efeitos teratogênicos do álcool na medicina moderna, numerosos estudos clínicos, epidemiológicos e experimentais têm examinado as consequências da exposição pré-natal ao etanol no crescimento e desenvolvimento dos descendentes.

Pessoas em idade reprodutiva estão potencialmente expostas a muitos agentes biológicos e químicos, particularmente substâncias usadas socialmente, como o álcool (CHUDLEY et al., 2005; MILLER et al., 2001; PADMANBHAN; SHAFIULLAH, 2004) que é uma das drogas psicoativas mais usada no mundo (JONES, 1987; LE FOLL; GOLDBERG, 2005; MILLER et al., 2001). Seu uso é comum em nossa sociedade (PADMANABHAN; SHAFIULLAH, 2004; STRÖMLAND; PINAZO-DURÁN, 2002) e por isso há muito interesse em estudar seus efeitos teratogênicos.

O consumo de etanol está associado não apenas com nascimentos anormais, mas também com um aumento na incidência de natimortos e aumento na mortalidade perinatal (HANNIGAN; WELCH; SOKOL, 1992; LEIBER, 1978). Seus efeitos teratogênicos clínicos e experimentais são bem conhecidos, no entanto, ele ainda é um teratógeno exógeno muito usado por mulheres em idade reprodutiva (KOREN; KOREN; GLADSTONE, 1996) e sabe-se que malformações cardíacas,

dos membros e Defeitos de Fechamento do Tubo Neural (DFTN) estão associados ao seu uso durante a gravidez (PADMANABHAN; IBRAHIN; BENER, 2002).

Jones et al. (1973) nomearam como Síndrome Alcoólica Fetal (FAS) as principais características observadas em crianças de mães alcoólatras, que são: distúrbio do desenvolvimento físico com retardo do crescimento pré e pós-natal, distúrbios psicomotores, retardo mental e um conjunto característico de anomalias faciais que compreende pequena fissura palpebral, raiz nasal baixa, hipoplasia do filtro, lábio fino, displasia da mandíbula e baixa implantação auricular. Outras anormalidades que não pertencem à FAS, mas estão associadas com o abuso materno de etanol, são denominadas Efeitos Alcoólicos Fetais (FAE).

A incidência de FAS é relatada em diferentes locais. Em países desenvolvidos, uma em cada seis mulheres em idade reprodutiva consome álcool suficiente para comprometer seu embrião e cerca de metade da população feminina consome álcool socialmente. Uma vez que metade das gestações não é planejada, um quarto de todos os fetos está exposto ao álcool durante o início da gestação (KOREN; KOREN; GLADSTONE, 1996).

A FAS é a principal causa conhecida de retardo mental e de anomalias congênitas em crianças, sua incidência é de aproximadamente 1,9 casos em cada 1000 nascimentos. A incidência é consideravelmente mais alta, cerca de 40%, entre crianças de mulheres alcoólatras crônicas do que entre os descendentes de mulheres que consomem álcool ocasionalmente. A síndrome é mais comum entre os nativos americanos: 4,7 casos em cada 1000 nascimentos (ABEL; SOKOL, 1991) e estima-se afetar cerca de 4000 crianças anualmente nos Estados Unidos, enquanto outras 7000 crianças sofrem de FAE (ABEL, 1995; BEARER et al., 1992).

Crianças com história de exposição materna ao etanol freqüentemente manifestam características de deficiência neuromotora e efeitos em uma variedade de testes intelectuais, comportamentais, educacionais e psicológicos (WEINBERG, 1997).

O custo econômico em medicamentos e apoio aos indivíduos com FAS é considerável. A prevenção efetiva e/ou intervenção terapêutica de defeitos de nascimento requer um profundo entendimento de seu mecanismo patogênético (SMITH; COLES, 1991; SPAGNOLO, 1993). Apesar de numerosas investigações dos efeitos teratogênicos do álcool, não surgiram mecanismos

definitivos e não se conhece qual a quantidade de álcool consumida durante a gestação que começa a exercer efeito tóxico no feto humano (NULMAN et al., 2001).

No entanto, sabe-se que o desenvolvimento intrauterino em mamíferos é um período de proliferação celular ativa, migração e diferenciação e é muito sensível a danos por agentes químicos. Muitos efeitos, abrangendo mortalidade pré e pós-natal, atraso no crescimento, graves malformações de órgãos e anomalias funcionais, foram descritos como resultado de exposição química dos embriões (GARBER, 1989; SIEBER; ADAMSON, 1975).

A morte celular é uma característica comum vista em embriões após exposição a uma variedade de teratógenos que induzem malformações craniofaciais. Está bem estabelecido que os locais de morte celular variam dependendo do teratógeno (ou insulto genético) e o momento da exposição (estágio de desenvolvimento do embrião). No entanto, a questão do porquê algumas células morrem e outras não, em resposta a um agente citotóxico tem recebido pequena atenção (GUERRI, 1998; ÖZER; SARIOGLU; GÜRE, 2000).

Identificar a exposição ao álcool no recém-nascido é difícil. Em um estudo, a FAS não foi diagnosticada em todos os recém-nascidos analisados que desenvolveram a doença mais tarde na infância (LITTLE et al., 1990). A identificação precoce dos indivíduos afetados é necessária para minimizar deficiências secundárias, como problemas de saúde mental ou problemas com a lei (STREISSGUTH; BARR; KOGAN, 1996).

1.2 MARCADORES BIOLÓGICOS

Determinar o uso de álcool durante a gravidez é uma forma de identificar crianças com riscos para problemas relacionados ao álcool. Até recentemente, a única ferramenta disponível para essa identificação era o relato materno do seu uso. No entanto, sabe-se que a subjetividade inerente a estas informações

leva a que se subestime a verdadeira quantidade consumida (CHASNOFF; LANDRESS; BARRET, 1990), por isso métodos objetivos devem ser utilizados.

Relatos maternos podem não estar disponíveis em muitos casos quando crianças são dadas para adoção ou quando os diagnósticos são perdidos. A identificação de um marcador biológico é, portanto, de grande importância. Sendo uma molécula pequena e volátil, o etanol não é retido no cabelo ou mecônio em níveis detectáveis (KOREN et al., 2002).

O etanol é metabolizado por ambos ciclos oxidativo e não-oxidativo. O ciclo não-oxidativo conjuga o etanol a ácidos graxos livres formando ésteres etílicos dos ácidos graxos (FAEEs), que têm sido detectados em numerosos tecidos animais, incluindo fetos e placentas após administração materna de etanol. Comparado com o etanol e metabólitos oxidativos, os FAEEs possuem meia vida prolongada no tecido, com 16 horas no tecido adiposo de coelhos a 1 semana na placenta de camundongos (BEARER et al., 1992). Em humanos, eles já foram identificados em ambos cordão umbilical e mecônio (BEARER; EMERSON; HARM, 1992). Em adultos, os FAEEs têm sido testados como marcador biológico para fatalidades relacionadas ao álcool (BEARER et al., 1997; KLEIN; CHAN; KOREN, 2002).

Até mesmo baixa ingestão de etanol pode causar efeitos adversos nos recém-nascidos e mais tarde problemas na adolescência. Os FAEEs são formados no corpo pela esterificação do etanol com ácidos graxos livres e podem ser detectados no soro e sangue de usuários de etanol, assim como em seus descendentes. Em crianças que foram menos expostas ao etanol no útero, a concentração de FAEEs no mecônio é muito baixa, enquanto que em crianças mais expostas essa concentração é elevada, em alguns casos cerca

de 50 vezes mais alta (KLEIN; KOREN, 1999). No mecônio, os FAEEs são um potencial biomarcador da exposição fetal ao álcool e sua detecção pode servir como ferramenta diagnóstica dessa exposição (MOORE et al., 2003).

Koren et al. (2002) mostraram que FAEEs produzidos na mãe não atravessam a placenta humana, por isso seu aparecimento no mecônio provavelmente representa sua produção no organismo fetal. Isso significa que a medida de FAEEs no mecônio representa uma válida estimativa dos níveis de etanol circulante no feto e, portanto, pode ser um rigoroso marcador biológico para o risco fetal.

Como o mecônio está disponível somente durante o primeiro ao terceiro dias após o nascimento, os FAEEs, que estão disponíveis por dois ou três meses após o nascimento, foram mensurados no cabelo de recém-nascido (KLEIN; KOREN, 1999). No entanto, são necessários estudos baseados em grandes populações para estabelecer a correlação entre ingestão materna de álcool e a presença de ésteres etílicos dos ácidos graxos nesse local (KLEIN; CHAN; KOREN, 2002).

Os ésteres etílicos dos ácidos graxos podem ser detectados no soro e no sangue de usuários de álcool, assim como em órgãos humanos danificados pelo abuso de etanol, podendo ser usados como marcadores pós-morte de seu consumo. Além disso, acumulam-se no tecido adiposo após o etanol ser eliminado do corpo (MOORE et al., 2003).

1.3 EFEITOS NOCIVOS DO ETANOL SOBRE O FETO

Modelos animais de FAS têm investigado várias questões associadas com

os efeitos teratogênicos do álcool, tal como relação dose-resposta, susceptibilidade genética, períodos críticos e padrão da exposição ao álcool (BECKER; GRANADOS; RANDALL, 1996; UKITA; FURUI; SHIOTA, 1993).

Foi demonstrada disfunção imune em descendentes de camundongos expostos ao etanol no período pré-natal (GOTTESFELD; ABEL, 1991), que resultou, por exemplo, em redução do número de timócitos e redução na resposta de linfócitos T a mitógenos (EWALD; FROST, 1987).

Há um grande interesse particular no mecanismo patogênico do álcool na indução de defeitos de fechamento do tubo neural e malformações no esqueleto axial em modelo experimental em camundongo (PADMANABHAN; WASFI; CRAIGMYLE, 1992, 1994). Modelos animais mostraram que exencefalia e falha da fusão das pregas neurais craniais comumente resultam da exposição ao etanol durante a gestação e que na maioria dos grupos tratados com álcool houve um aumento de reabsorção, morte fetal e redução do peso materno (PADMANABHAN; HAMEED, 1988).

Os efeitos teratogênicos do etanol foram bem estabelecidos em embriões de roedores mantidos em cultura durante o período da neurulação, no qual o tubo neural é formado. Na gestação humana ocorre durante a terceira e quarta semanas da gestação (HUNTER et al., 1994). Os defeitos de fechamento do tubo neural e anomalias craniofaciais estão entre as malformações induzidas com exposição durante este período do desenvolvimento, ambas relatadas como consequência do consumo excessivo deste agente durante a gestação humana (KOTCH; SULIK, 1992). Como observado em modelos animais, uma notável característica patogênica associada aos efeitos teratogênicos do etanol é a excessiva morte celular observada em diferentes locais nos embriões afetados, como por exemplo, tubo neural, somitos

e neuroepitélio cranial, incluindo suas margens laterais, na região onde estão localizadas as células pré-migratórias da crista neural (SULIK; COOK; WEBSTER, 1988; KOTCH; CHEN; SULIK, 1995; ÖZER; SARIOGLU; GÜRE, 2000).

Estudos em animais demonstram que a exposição aguda ao etanol durante a gastrulação e/ou neurulação resulta em apoptose excessiva no neuroepitélio do rombencéfalo e de outras populações de células, incluindo células da crista neural e placa ectodérmica, mostrando que essas estruturas são alvos dos seus efeitos teratogênicos (CARTWRIGTH; SMITH, 1995; DUNTY et al., 2001).

1.4 DEFEITOS DE FECHAMENTO DO TUBO NEURAL

Os DFTN são malformações congênitas que resultam do não fechamento correto do tubo neural embrionário e estruturas suprajacentes no início do desenvolvimento. São classificados como anterior ou posterior, de acordo com a sua localização ao longo do tubo neural (BARBER et al., 1999).

A anencefalia é um DFTN anterior comum caracterizada pela ausência da abóbada craniana e acentuada malformação encefálica. Pode ser identificada pela exposição do encéfalo malformado e saliente no topo cranial fetal imprópriamente desenvolvido (SMITH; HUNTINGTON, 1981). Com a falha de fechamento do crânio e couro cabeludo há exposição do encéfalo, exencefalia, o que determina que o tecido neural humano em desenvolvimento exposto ao ambiente intrauterino rapidamente se degenere (WOOD; SMITH, 1984), resultando em anencefalia. Em geral o que resta é apenas uma massa tipicamente constituída de tecido de sustentação, vasos e tecido neural que se denomina área cérebro-vascular. Aproximadamente metade de todos os fetos anencefálicos morre antes de nascerem e os nascidos vivos raramente excedem 48 horas de vida (HUNTER, 1993).

Os DFTN posteriores, também chamados de disrafia ou *spina bifida aperta*,

compreendem a meningocele, meningomielocele e a raquisquise. Enquanto a meningocele é representada por protrusão de porção das meninges através de defeito vertebral revestida por pele, a meningomielocele apresenta, além disso, presença de nervos ou porções da medula espinhal. A raquisquise, por sua vez, corresponde à falta total de fechamento do tubo neural e estruturas ósseas e de partes moles suprajacentes, com exposição do tecido nervoso. Indivíduos afetados por essas condições podem sobreviver até a vida adulta, embora haja freqüentemente considerável deficiência. As conseqüências desses DFTN variam desde um fenótipo incompatível com a vida, como na raquisquise, até um muito próximo do normal, como nas meningoceles, dependendo da severidade, tipo e localização da lesão (BARBER et al., 1999).

Os DFTN são o segundo principal grupo dentre as anomalias congênitas humanas isoladas, superado apenas pelas cardiopatias congênitas (PERES, 2000). Embora em geral muito graves, os DFTN são bastante comuns e compatíveis com o desenvolvimento da gestação e mesmo o nascimento. Excetuando-se os anencéfalos, cuja mortalidade é de 100% no período neonatal precoce, cerca de um terço dos que nascem sobrevivem até os cinco anos (LECK, 1977). O diagnóstico pré-natal precoce dos DFTN é em geral possível através de exame ultrassonográfico (ISAKSEN et al, 1998).

A maior parte dos DFTN é multifatorial em sua patogênese, com ambos fatores genético e ambiental contribuindo para seu desenvolvimento. Há casos isolados e outros ligados a síndromes, associações e seqüências. São particularmente importantes os decorrentes da deficiência de ácido fólico materno, bem como aqueles associados à administração de ácido retinóico para o tratamento de afecções cutâneas em mulheres jovens (KHOGA;

OBATA, 1992). A maior parte dos casos humanos, hoje, se deve à deficiência de ácido fólico (CASTILLA et al., 2003; PERALTA, 2001; U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE, 2000), verificando-se que a sua suplementação tem levado à redução dos casos em humanos, principalmente as recorrências. Essa medida é eficiente quando são utilizadas doses diárias antes da fecundação e mantidas durante o primeiro trimestre (STEPANUK et al., 2002), o que impõem uma grande dificuldade e justifica o porquê de haver ainda tantos casos de DFTN, muitos dos quais relacionados a mães primigestas.

1.5 FOLATO E GESTAÇÃO

Estudos demonstraram que no primeiro trimestre 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 (HASENAU, 2002), por isso, é muito importante o estudo do papel da nutrição materna.

Vários fatores têm sugerido a influência do risco de DFTN, incluindo predisposição genética, obesidade materna e exposição materna a numerosos agentes exógenos durante o início da gravidez, incluindo drogas anticonvulsivantes (ELWOOD; LITTLE; ELWOOD, 1992). Entretanto, a suplementação periconcepcional materna com múltiplas vitaminas contendo ácido fólico é o único fator identificado como tendo uma significativa relação para a redução do risco de DFTN em larga escala (BARBER et al., 1999; HASENAU, 2002).

Resultados de ensaios prospectivos e controlados demonstraram que grandes quantidades de folato ingeridas antes da concepção e durante as primeiras seis semanas de gravidez, podem diminuir a incidência de malformação do tubo neural

em aproximadamente 50% a 80%. Apesar de tudo, ainda não se compreende como o folato atua com esse efeito altamente protetor (CASTILLA et al., 2003; DALY et al., 1995; HASENAU, 2002; MRC VITAMIN STUDY RESEARCH GROUP, 1991).

No Canadá, as primeiras recomendações de emprego do ácido fólico em mulheres planejando uma gestação, ou que tivessem chance de engravidar, foram feitas em 1993. Em 1998, a fortificação da farinha de trigo com ácido fólico tornou-se obrigatória, tendo como resultado surpreendente a redução de 32% dos DFTN após 1997 (RAY, 2004; U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE, 2000).

Na China, a incidência de DFTN mostra duas populações distintas, uma de alta incidência no Norte do país e outra de baixa incidência no Sul. Ambas as populações mostraram redução nas taxas de DFTN após a adoção da política de orientação maciça sobre uso de ácido fólico periconcepcional às mulheres em idade fértil (MOORE et al., 1997). Os Estados Unidos também adotaram a política de fortificação alimentar com ácido fólico e mostraram queda na incidência de DFTN de 19% (HONEIN et al., 2001).

Na América Latina, alguns países vêm adotando a mesma política com o objetivo de reduzir a incidência dos DFTN. Na Costa Rica, a fortificação da farinha de trigo teve início em 1997. Como os hábitos alimentares dessa população são heterogêneos, os costarriquenhos passaram a fortificar outros alimentos com o ácido fólico: farinha de milho, leite e açúcar (RAY, 2004), conseguindo uma diminuição de 35% na incidência dos DFTN. Mais recentemente, eles estão fortificando também o arroz, porém ainda não há dados sobre o impacto dessa última medida.

O Chile iniciou a fortificação da farinha de trigo com ácido fólico em 2000. Um grande projeto para avaliar o impacto dessa medida foi elaborado e em apenas 2

anos os resultados mostraram um aumento da folatemia das mulheres e uma redução de 31% na incidência dos DFTN. Os demais países latino-americanos a adotar políticas de saúde semelhantes foram Argentina e Brasil. Na Argentina, uma lei tornou obrigatória a fortificação das farinhas de trigo com 2,2mg/Kg de ácido fólico desde novembro de 2003. No Brasil, por meio de uma resolução do Ministério da Saúde (Resolução – RDC nº 344, de 13-12-2002 DOU de 18-12-2002), tornou-se obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com 1,5mg/Kg de ácido fólico, a partir de 1º de julho de 2004 (CASTILLA et al., 2003).

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 número substancial de gestações não planejadas. Dessa forma, a suplementação adequada de folato estará garantida no momento da concepção e imediatamente após, um período em que as mulheres não estão cientes da gravidez. No entanto, para aquelas que já tiveram filhos com o problema ou que usam medicações que interferem nos níveis de folato no organismo, como por exemplo, anticonvulsivantes, são recomendados 4mg diários (BAILEY; GREGORY, 1999; STEPANUK et al., 2002). Para mulheres lactantes e grávidas, recomenda-se um adicional diário de 0,1mg e 0,2mg de ácido fólico, respectivamente.

Durante seu metabolismo, o etanol é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) ou radicais livres de oxigênio (CEDERBERG; SIMAN; ERIKSSON, 2001; LOEKEN, 2005; WALKINSHAW, 2005) que podem danificar o DNA, aumentar a fosforilação oxidativa, gerar superóxido e danificar proteínas através da sua fragmentação, cross-linking e modificação dos aminoácidos (VOGT, 1995). Os ácidos nucleicos também são vulneráveis à ação dos radicais livres (CAI;

KOROPATNICK; CHERIAN, 1995). Esses efeitos nocivos podem finalmente levar à morte celular ou então resultar em várias formas de anomalia congênita, incluindo DFTN e anomalias geniturinárias (KANWAR et al., 2005). Estes agentes também podem causar apoptose (CHAN et al., 2002; DUNTY; ZUCKER; SULIK, 2002) e inibir a migração e diferenciação das células da crista neural (CHEN; SULIK, 2000; COHEN-KEREM; KOREN, 2003). Por outro lado, Cano et al. (2001, 2003) relataram que a suplementação materna de ácido fólico tem efeito protetor nos descendentes contra os danos causados pelo estresse oxidativo produzido em consequência do consumo de etanol durante a gestação e a lactação.

1.6 ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico é uma vitamina (B₁₁) do complexo B dita essencial, visto que o organismo deve obtê-la do meio ambiente para satisfazer suas necessidades. O termo ácido fólico é derivado do latim e significa folhas. Folato é o termo genérico para uma grande família de compostos quimicamente semelhantes. As características estruturais principais do ácido fólico incluem um grupo pteridina, um grupo ácido p-aminobenzóico (PABA) e uma cadeia de ácido glutâmico (glutamato) de pesos variáveis. A característica comum de todas folatos-coenzimas é a porção PABA da molécula (DROGUETTI; PENTEADO, 2003).

Humanos e outros mamíferos não podem sintetizar folato e dessa forma devem obter a vitamina de fontes exógenas via absorção intestinal. Por isso, o intestino desempenha um papel central no controle e regulação da homeostase de folato no organismo. O intestino está exposto a duas fontes de folato: pela dieta, na qual a vitamina é absorvida no intestino delgado, e pela ação de

bactérias da microflora normal no intestino grosso, no qual a vitamina é sintetizada e absorvida. O folato obtido pela dieta existe principalmente na forma de poliglutamato que deve ser hidrolisado a monoglutamato antes da absorção intestinal (CHANDLER et al., 1991), esse processo é acompanhado pela ação específica da enzima folato hidrolase.

Sua suplementação pode ser feita através de dieta com alimentos ricos em ácido fólico, através de comprimidos ou por enriquecimento de alimentos com esta vitamina (DEPARTMENT OF HEALTH, 1992). Alimentos como o feijão, ervilha, espinafre, brócolis, aspargo, frutas cítricas, grãos, leite, carne, fígado e verduras cruas possuem folato, porém a quantidade desejada pode não ser obtida somente com a dieta. A população ingere, em média, 0,2mg de folato por dia (o equivalente a 0,1mg de ácido fólico), assim, para aumentar os níveis de folato como recomendado, seria necessária uma mudança impraticável na dieta. Outra maneira seria a ingestão de comprimidos para as mulheres que desejam engravidar, porém a aderência ao tratamento é comprovadamente baixa, além do empecilho de uma gravidez não planejada. A maneira mais efetiva, então, seria a ingestão através de alimentos enriquecidos com ácido fólico, como a farinha de trigo, leite, pão, centeio e suco de laranja, que demonstraram boa biodisponibilidade e aumento real dos níveis da vitamina no plasma e eritrócitos, conseguindo chegar aos níveis preconizados pela OMS (HONEIN et al., 2001; STEPANUK et al., 2002).

A quantidade de folato absorvido por uma pessoa depende da biodisponibilidade do folato ingerido, da taxa de perda pela urina, pelas fezes e pelo catabolismo e pode ainda ser influenciada por condições patológicas, como má-absorção ou fisiológicas, como crescimento, gravidez e lactação (GREGORY, 1995; WAGNER, 1995).

O metabolismo do folato deve se adaptar durante a gravidez a várias influências fisiológicas fetais e maternas que mudam durante a gestação. A rápida divisão celular que ocorre durante o desenvolvimento do tubo neural requer uma grande quantidade de nucleotídeos para facilitar a replicação do DNA (CHANARIN et al., 1992; KAMEN; SMITH; ANDERSON, 1991). Quando as células neuroepiteliais esgotam seu suprimento interno de nucleotídeos, a divisão celular será mais lenta e o desenvolvimento das pregas neurais será retardado, resultando na formação de defeitos do tubo neural (VAN ALLEN et al., 1993). Assim, a ingestão adequada de folato é essencial durante a gestação para assegurar crescimento normal e desenvolvimento do feto. Evidências que associam baixos níveis de folato com o peso reduzido de recém-nascidos foram reportadas nos Estados Unidos (O'SCHOLL et al., 1996).

Clinicamente a deficiência acentuada de folato leva a um tipo específico de anemia, a anemia megaloblástica, na qual são gerados os megaloblastos, células grandes, anormais e nucleadas, precursoras dos eritrócitos. Na deficiência de folato, elas se acumulam e são encontradas na medula óssea, surgem como resultado da falha dos precursores das células vermelhas em se dividir normalmente (DROGUETTI; PENTEADO, 2003).

Os folatos apresentam-se nos tecidos em baixas concentrações em uma variedade de formas e sua função bioquímica é atuar como coenzimas em processos de transferência, redução e oxidação de unidades de carbono necessárias para o metabolismo normal (SCOTT, 1999; WAGNER, 1995).

O objetivo principal na definição das necessidades de folato envolve a identificação da quantidade que minimize os processos deletérios associados à

ingestão inadequada e à otimização das reações folato-dependentes. Essas reações, conhecidas como metabolismo do carbono, incluem aquelas envolvidas em fases do metabolismo de aminoácidos, em fases da biossíntese de purina e pirimidina e, assim, na síntese de DNA, em fases da divisão celular e em fases da formação de agentes de metilação, que fornecem grupos metil para que ocorra a metilação de diversas estruturas com diferentes funções, incluindo, hormônios, lípides e proteínas (DROGUETTI; PENTEADO, 2003; SCOTT, 1999; WAGNER, 1995).

O tetrahydrofolato (THF) atua na síntese de ácido nucléico, de metionina a partir de homocisteína e de oxitimidilato monofosfato, que é requerido para a síntese de DNA. O THF é convertido em 5,10-metileno-tetrahydrofolato (5,10-MTHF) e em seguida reduzido a 5-metil-tetrahydrofolato (5-MeTHF) pela ação da enzima metileno tetrahydrofolato redutase (MTHFR), dirigindo assim uma unidade de carbono para a síntese de homocisteína e um grupo metil para a formação da metionina, etapas catalisadas pela ação da enzima metionina sintase (DROGUETTI; PENTEADO, 2003).

A homocisteína possui dois papéis metabólicos: conversão a metionina, etapa que depende da vitamina B₁₂ e formação de cisteína através do seu catabolismo, etapa que depende da vitamina B₆ e da ação da enzima cistationina sintase. A metionina além da síntese protéica atua como importante doadora de grupos metil para a formação de S-adenosilmetionina, um agente de metilação envolvido em mais de 100 reações biológicas. A elevação das concentrações de homocisteína no plasma pode ser conseqüente à deficiência de vitamina B₆, que leva à inibição do seu catabolismo, ou à deficiência de folato e/ou de vitamina B₁₂, que leva à inibição da sua conversão a metionina. Assim, a hiper-homocistenemia não é específica para

determinar a deficiência de folato. Sendo assim, os processos metabólicos que necessitam de folato também são influenciados pela ingestão de outros nutrientes essenciais, incluindo as vitaminas B₆ e B₁₂ (DROGUETTI; PENTEADO, 2003).

Metabolismo do Carbono

1.7 RECEPTORES DE ÁCIDO FÓLICO

O ácido fólico entra nas células dos tecidos através de um processo mediado por receptor, presente em pelo menos duas formas, o receptor alfa de folato (FR- α) e o receptor beta de folato (FR- β) (WILLIS et al., 1992). Enquanto a placenta contém tanto o FR- α como o FR- β (PAGE et al., 1993), o FR- α está presente também no epitélio bronquiolar, epitélio bronquial, pneumócitos e na membrana dos túbulos proximais do rim (PRASAD et al., 1994).

O receptor alfa de folato é uma proteína de membrana com uma alta afinidade de ligação para o 5-metil-tetrahidrofolato, que imobiliza, seqüestra e efetua o transporte dessa molécula para o outro lado da membrana celular. Após ter sido levado pelo receptor, ocorre a dissociação entre o 5-MeTHF e o FR- α produzindo uma alta concentração de 5-MeTHF, que permite sua penetração na célula através de um gradiente de concentração sem consumo de energia. Deve ser notado que independentemente do mecanismo seguido (fagocitose ou endocitose), o papel do FR- α permanece inalterado e é essencial para a internalização intracelular do folato (KAMEN; SMITH; ANDERSON, 1991; RITTER et al., 1995).

Said, Chatterjee e Haq (2000) observaram uma expressão de receptor de folato significativamente aumentada no córtex renal de ratos com deficiência de folato quando comparados com animais controles. Esse achado mostra que na deficiência de folato os animais também tentam minimizar as perdas dessa vitamina na urina.

Como a ingestão adequada de folato é vital para a homeostase e divisão celular, na sua deficiência, seja por ingestão inadequada ou por problemas de má-absorção, todas as reações do metabolismo do carbono estarão

comprometidas em vários graus, dependendo das afinidades relativas das enzimas às respectivas moléculas envolvidas (MASON, 1995). Com isso, surgem mudanças bioquímicas que resultam em anormalidades e em conseqüências deletérias no metabolismo do carbono, pois as reações são afetadas e ocorre o acúmulo de vários substratos e intermediários metabólicos, como por exemplo, hiper-homocistenemia ou hiper-metilação do DNA (SCOTT; KIRKE; WEIR, 1995).

1.8 HOMOCISTEÍNA

Observações realizadas a partir de um modelo que utilizou embriões de galinhas indicam que a exposição fetal a níveis elevados de homocisteína pode induzir diretamente a malformação do tubo neural e do septo do coração. Embriologicamente, estas malformações estão relacionadas, já que as formações do septo cardíaco e do tubo neural são mediadas pelas células neurais (ROSENQUIST; RATASHAK; SELHUB, 1996). Além disso, níveis elevados de homocisteína plasmática estão associados ao aumento significativo do risco de inúmeros tipos de doenças cardiovasculares (RIMM et al., 1998).

Sabe-se há varias décadas que as crianças que nascem com homocistenúria congênita desenvolvem altos níveis de homocisteína no sangue e morrem de arteriosclerose, trombose ou embolia nos primeiros anos de vida. Existem hoje muitos estudos epidemiológicos que indicam que até mesmos pequenos aumentos da homocisteína, de 20 a 30% do normal, estão associados com o aumento do risco de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e problemas vasculares periféricos (BOUSHEY; BERESFORD; OMENN, 1995).

Os níveis de folato de um indivíduo são muito importantes para a

determinação do nível de homocisteína no sangue. Pequenos níveis de folato causam a formação da molécula de homocisteína e sua eliminação celular ocorre por um processo folato-dependente. Deve-se reconhecer que as vitaminas B₆ e B₁₂ também são fundamentais na eliminação da homocisteína do corpo e que muitos estudos utilizam suplementos não apenas com folato, mas também com as vitaminas B₆ e B₁₂, a fim de diminuir o nível de homocisteína no sangue (SELHUB; MILLER, 1992).

No ser humano, o nível de folato no plasma ou no soro (refletindo a ingestão recente) e nos eritrócitos (refletindo a ingestão nos últimos 2-3 meses) são utilizados como indicadores dos níveis de folato. A variação normal para a concentração de folato no soro está entre 7nmol/L e 46nmol/L. Concentrações de folato nos eritrócitos abaixo de 230 nmol são consideradas sinais de deficiência acentuada, enquanto que concentrações entre 230nmol/L e 345nmol/L indicam níveis ótimos (FINCH; DOYLE, 1998).

No entanto, nenhum desses indicadores reflete a atividade funcional do folato. A homocisteína plasmática é o único indicador funcional que se encaixa nos critérios para avaliar os níveis de folato, pois é sensível a ele, reflete uma de suas funções, possui um efeito platô, é demonstrativo em uma população normal e em vários níveis de ingestão. A redução dos níveis de homocisteína plasmática oferece um indicativo funcional sensível que responde a níveis específicos de ácido fólico (DEPARTMENT OF HEALTH, 1992).

1.9 GENES E FOLATO

Dado que o mecanismo para a redução do risco de DFTN pela suplementação de ácido fólico permanece desconhecido, que a deficiência no

transporte ou metabolismo do ácido fólico coloca o feto em risco para uma anomalia congênita e que a suplementação periconcepcional de folato não é efetiva em reduzir o risco em todos os indivíduos, torna-se importante identificar genes candidatos que poderiam estar envolvidos na regulação dessa resposta. Genes selecionados envolvidos com transporte e metabolismo do folato têm sido apontados para estudo devido a evidências clínica e experimental convincentes de que a suplementação periconcepcional materna de folato reduz o risco de fetos afetados por DFTN (BARBER et al., 1999).

De todas as etapas envolvidas no transporte do folato, a ligação do 5-MeTHF ao receptor é a única etapa conhecida específica do folato (KAMEN; SMITH; ANDERSON, 1991), fazendo do receptor um excelente gene candidato para determinar a susceptibilidade a DFTN. Isso é especialmente verdadeiro devido à alta concentração desses receptores dentro da placenta materna (WEITMAN et al., 1992), bem como no sinciotrofoblasto e neuroepitélio fetal. Desde que a maioria das células embrionárias não possui receptores de folato (PAGE et al., 1993), a presença de receptores nas células neuroepiteliais é altamente sugestiva de um papel crítico do folato nos eventos morfogenéticos normais envolvidos no fechamento do tubo neural.

Anormalidades genéticas nos receptores de folato tornam menos eficientes a ligação e internalização do 5-MeTHF para o citoplasma de células alvo em períodos críticos do desenvolvimento. Tal afinidade diminuída pode comprometer a atuação do receptor no sinciotrofoblasto e neuroepitélio fetal, aumentando o risco da privação do folato embrionário. A suplementação periconcepcional com multivitaminas contendo ácido fólico pode superar essas deficiências pelo aumento dos níveis de folato no sangue materno. Isso poderia

explicar o porquê a suplementação de folato previne os defeitos de fechamento do tubo neural (BARBER et al., 1999).

Pelo menos três enzimas: metilenotetrahidrofolato redutase, cistationina sintase e metionina sintase, estão envolvidas na produção ou degradação de homocisteína e têm recebido atenção como possíveis candidatas na determinação da susceptibilidade a DFTN (COPP, 1998). Uma mutação genética (C677T) na MTHFR, enzima indiretamente envolvida na conversão de homocisteína a metionina, leva a uma redução de 50% da sua atividade enzimática e está relacionada ao nível elevado de homocisteína em indivíduos homozigotos. Essa mutação foi identificada como causa dos DFTN em 13% dos casos, estando associada a níveis baixos de folato no sangue e nos eritrócitos (PERALTA, 2001).

Indivíduos com atividade reduzida da metionina sintase, enzima ativamente envolvida na conversão da homocisteína a metionina, têm altos níveis de homocisteína no plasma, baixos níveis de metionina no plasma e implicações clínicas similares às causadas por uma deficiência da atividade da MTHFR (FROSST et al., 1995). Mills et al. (1995) examinaram os níveis plasmáticos de homocisteína de mulheres que tiveram gravidez previamente afetada por DFTN e compararam esses níveis aos observados em mães controles. Eles encontraram que as mães com gravidez afetada tiveram níveis de homocisteína significativamente mais altos, sugestivo de um possível defeito na metionina sintase ou na MTHFR.

1.10 AGENTES AMBIENTAIS

Além de genes, diversos fatores ambientais parecem também envolvidos na etiologia dos defeitos de fechamento do tubo neural. A deficiência de ácido fólico é o

fator de risco mais importante identificado até hoje. Outros agentes teratogênicos possivelmente envolvidos como fatores de risco são: diabetes melito materno, uso de ácido valpróico para tratamento de epilepsia durante a gestação, anticoncepcionais orais, obesidade materna, deficiência de zinco, hipertermia, elevado consumo periconcepcional de sacarose e ingestão de etanol durante a gestação (SHAW et al., 2003).

Sabe-se que a ingestão crônica de etanol reduz a quantidade de folato sérico e hepático (MCGUFFIN; GOFF; HOLMAN, 1975) e a ingestão aguda de etanol produz um aumento na excreção urinária de folato (TAMURA; HALSTED, 1983). Dessa forma, a exposição repetida ao etanol leva a uma perda substancial de folato que resulta na sua deficiência (MULDOON; MCMARTIN, 1994), aumentando o risco para a ocorrência de anomalias congênitas.

Assim, a prevenção das anomalias congênitas é de extrema importância, devido a sua gravidade e alta morbimortalidade (BARBER et al., 1999). Para as causas cromossômicas e gênicas o aconselhamento genético é necessário a fim de evitar consangüinidade e orientar casais que já tiveram a ocorrência dessas anomalias na família sobre os riscos de uma nova gestação. Para a prevenção das causas ambientais deve-se estar atento ao controle dos possíveis agentes teratogênicos envolvidos como fatores de risco. Por fim, pode-se prevenir a deficiência de ácido fólico, fator de comprovada importância na gênese de anomalias congênitas, com a sua suplementação dietética (MCNULTY; CUSKELLY; WARD, 2000; SHAW et al., 2003).

Compreender como o etanol isoladamente induz restrição do crescimento intra-uterino e anomalias congênitas e a sua interação com a deficiência dietética de

ácido fólico na gestação em modelo experimental de camundongo pode trazer subsídios para a elucidação de seus efeitos indesejados na população humana.

Justificativa

A dose total de 28g (0,4g/Kg) de álcool, que corresponde à cerca de duas latas de cerveja (MCANALLEY, 1996), já é suficiente para produzir efeitos nocivos durante a gestação. Como o hábito de ingerir bebidas alcoólicas é muito difundido em nosso meio e envolve grande parte da população jovem em fase reprodutiva, é possível que a grande frequência de anomalias congênitas observada, como por exemplo os defeitos de fechamento do tubo neural, esteja, pelo menos em parte, associada ao etanol. Por outro lado, o etanol interfere com o ácido fólico e, conseqüentemente, com a homocisteína, cujos transtornos estão claramente associados aos DFTN (FROSST et al., 1995; MILLS et al., 1995), o que provavelmente levaria a uma redução da eficiência dos programas de suplementação de ácido fólico nos alimentos como forma de reduzir esses defeitos.

Objetivo

Determinar os efeitos da administração de etanol, da deficiência do ácido fólico na dieta e da associação desses dois fatores durante a gestação de camundongos Swiss.

Material e Método

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo sob número 045/2003.

Foram utilizados 54 camundongos fêmeas e 18 machos, linhagem Swiss, originários da colônia do Biotério Central do *Campus* de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os animais, adultos jovens, com peso médio de 35g para as fêmeas e 45g para os machos foram ambientados durante alguns dias no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, receberam dieta apropriada e água corrente *ad libitum* durante todo o experimento e foram pesados diariamente.

O ambiente no qual os animais permaneceram durante todo o experimento foi equipado com proteção sonora, rigoroso controle automático de ciclos claro/escuro de 12 horas cada, luminosidade baixa, temperatura constante de 22°C e exaustão automática com várias trocas de ar ao longo do dia. Foram colocados em caixas de polipropileno trocadas diariamente.

Após o período de adaptação, as fêmeas foram colocadas em contato matinal diário com os machos para o acasalamento por um período de 2 horas, em uma proporção de três a quatro fêmeas para cada macho. A ocorrência de um possível acasalamento foi determinada pela presença de um tampão vaginal, caracterizando este momento como o dia 0 da gestação.

O estudo foi feito com dois experimentos, no primeiro examinou-se a influência do etanol em doses baixa e alta em animais alimentados com ração comercial e, no segundo, a influência do etanol nas mesmas doses em animais alimentados com dieta deficiente em folato. Em ambos os experimentos os animais foram divididos em 3 grupos com 6 animais em cada.

4.1 EXPERIMENTOS

4.1.1 EXPERIMENTO 1

Os animais receberam ração comercial (rc) e água corrente *ad libitum* durante todo o experimento. A ração comercial foi a Nutival® utilizada no Biotério Central e contém folato na dose de 6mg/Kg.

As fêmeas prenhes foram separadas em caixas de polipropileno individuais forradas com maravalha e divididas nos seguintes grupos com 6 animais em cada: Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea). A dose de etanol correspondente a 28g é 0,4g/Kg (MCANALLEY, 1996).

No 7°, 8° e 9° dia gestacional (dg) os animais do Grupo Eb receberam uma injeção intraperitoneal de etanol na dose de 0,4g/Kg (baixa dose) diluído em salina a 25% v/v, enquanto que os animais do Grupo Ea receberam uma injeção intraperitoneal de etanol na dose de 4,0g/Kg (alta dose) diluído em salina a 25% v/v. Os animais do Grupo C receberam mesmo volume de salina nos mesmos dias.

Resumo dos procedimentos nos diferentes grupos do Experimento 1:

<i>G</i> <i>RUPOS</i>	<i>n</i>	<i>TRATAMENTO (I.P.)</i>	<i>PERÍODO</i>
C	6	solução salina em volume equivalente a 10 x 0,4g de etanol por Kg de peso corporal	7° ao 9° dia da gestação
<i>Eb</i>	6	1 x 0,4g de etanol por Kg de peso corporal, diluídos em salina a 25% (v/v)	7° ao 9° dia da gestação
<i>Ea</i>	6	10 x 0,4g de etanol por Kg de peso corporal, diluídos em salina a 25% (v/v)	7° ao 9° dia da gestação

I.P.= injeção intraperitoneal; C= Controle; Eb= Etanol baixa dose (0,4g/Kg de peso corporal); Ea= Etanol alta dose (4,0g/Kg de peso corporal).

4.1.2 EXPERIMENTO 2

Do dia 0 ao 18º dia da gestação os animais receberam ração isenta de ácido fólico (rdf) e água corrente misturada com sulfatiazol a 1% (Anaperan®), que é um quimioterápico líquido utilizado para eliminar as bactérias da flora intestinal capazes de produzirem ácido fólico.

Até a definição da metodologia empregada, foram testados diferentes períodos de administração de dieta balanceada isenta de ácido fólico (28, 21, 14, e 7 dias), cujo resultado foi acentuada anemia, baixa fertilidade e grande mortalidade materna, motivo pelo qual optou-se por introduzir a dieta isenta de ácido fólico no dia 0 da gestação, garantindo assim o acasalamento e a manutenção da gestação até o final do experimento. Esse período gestacional foi previamente definido como suficiente para causar a deficiência de ácido fólico, confirmada por exames clínico, sorológico e hematológico.

A rdf foi produzida pela empresa Rhoster® - Indústria e Comércio LTDA, segundo normas internacionais (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) de necessidades dos animais, foi balanceada contendo todos os demais nutrientes em quantidade recomendada.

Para evitar a coprofagia, a maravalha foi substituída por uma grade no fundo da caixa na qual foram alojados, impedindo assim o contato direto com as fezes (BURGOON et al., 2002; CRACIUNESCU et al., 2004).

As fêmeas prenhes foram separadas em caixas de polipropileno individuais e divididas nos seguintes grupos com 6 animais em cada: controle da Deficiência de Folato (DF), Deficiência de Folato e Etanol baixa dose (DFEb) e Deficiência de Folato e Etanol alta dose (DFEa). A dose de etanol correspondente a 28g é 0,4g/Kg (MCANALLEY, 1996).

No 7°, 8° e 9° dia gestacional os animais do Grupo DFEB receberam uma injeção intraperitoneal de etanol na dose de 0,4g/Kg (baixa dose) diluído em salina a 25% v/v, enquanto que os animais do Grupo DFEa receberam uma injeção intraperitoneal de etanol na dose de 4,0g/Kg (alta dose) diluído em salina a 25% v/v. Os animais do Grupo DF receberam mesmo volume de salina nos mesmos dias.

Resumo dos procedimentos nos diferentes grupos do Experimento 2:

<i>G RUPOS</i>	<i>n</i>	<i>TRATAMENTO (I.P.)</i>	<i>PERÍO DO</i>
<i>DF</i>	6	solução salina em volume equivalente a 10 x 0,4g de etanol por Kg de peso corporal	7° ao 9° dia da gestação
<i>DF Eb</i>	6	1 x 0,4g de etanol por Kg de peso corporal, diluídos em salina a 25% (v/v)	7° ao 9° dia da gestação
<i>DF Ea</i>	6	10 x 0,4g de etanol por Kg de peso corporal, diluídos em salina a 25% (v/v)	7° ao 9° dia da gestação

I.P.= injeção intraperitoneal; DF= Controle da Deficiência de Folato; DFEB= Etanol baixa dose (0,4g/Kg de peso corporal); DFEa= Etanol alta dose (4,0g/Kg de peso corporal).

4.2 EXAME CLÍNICO

Identificado pela presença de alopecia, desde pequenas regiões até grandes áreas, em diversos locais do corpo (focinho, cabeça, nuca, dorso, abdômen, patas), mudanças no aspecto e na coloração da pelagem, alteração da coloração dos olhos, que se tornaram opacos, corpo muito frio e trêmulo, redução na movimentação física para a realização das atividades diárias e desequilíbrio corporal bem acentuado,

marcado por movimentos circulares, queda lateral do corpo e balanço acentuado da cabeça.

4.3 EXAME SOROLÓGICO

Realizado no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto pela quantificação de ácido fólico das fêmeas prenhes em amostras de soro tratado com ácido ascórbico com o analisador IMMULITE 2000 (PIL2KFO-11, 2004-04-20), cujo princípio do procedimento se baseia em um processo de imunoensaio competitivo (MCNEELY, 1984; NETTELAND; BAKKE, 1977). Essa análise foi feita em todas as fêmeas prenhes dos Experimentos 1 e 2.

Controle de Qualidade para o Processo de Imunoensaio:

- a) Valores dos coeficientes de variação intraensaio do ácido fólico: 6,9%; 4,1%; 2,4%
- b) Valores dos coeficientes de variação interensaio do ácido fólico: 8,8%; 5,7%; 5,2%
- c) Dose mínima detectável pelo aparelho: 3ng/ml

4.4 EXAME HEMATOLÓGICO

Realizado pela determinação do número de hemácias por mm^3 de sangue total em amostras de sangue das fêmeas prenhes, que foi diluído na proporção de 1/200 com líquido diluidor isotônico (3,8g de citrato de sódio, 2ml de formol a 40% e 100ml de água destilada) e analisado na câmara de Neubauer. No procedimento técnico foi necessário pipetar 4ml do líquido diluidor e 0,02ml de sangue, agitar suavemente, encher os retículos da câmara de Neubauer e fazer a contagem das

células. Para o cálculo final de hemácias por mm^3 de sangue, basta multiplicar o número de hemácias obtido por 10.000. Essa análise foi feita em todas as fêmeas prenhes dos Experimentos 1 e 2.

4.5 COLETA DOS FETOS

Para evitar a ocorrência do parto natural durante a noite, com a possibilidade de perda dos fetos com anomalias congênitas, todas as fêmeas prenhes dos Experimentos 1 e 2 foram mortas através da inalação de atmosfera saturada por dióxido de carbono (AGA®) no 18º dia da gestação, após o que foi feita incisão cirúrgica na linha média abdominal, com exposição da cavidade peritoneal. Ambos os cornos uterinos foram cuidadosamente retirados, colocados em placa de Petri limpa e então abertos longitudinalmente, expondo os sacos gestacionais para a retirada dos fetos, placentas, mortes fetais tardias e reabsorções, quando presentes. De todos os fetos foi registrado o peso corporal, avaliado em balança com precisão de duas casas decimais, o comprimento vértice-sacral, medido com paquímetro, e o gênero. Todo o material obtido foi examinado externamente e fixado em formalina tamponada a 10%.

Após o acasalamento, os machos foram destinados a outras finalidades no Biotério ou, então, mortos em câmara de CO_2 .

Durante todo o experimento foram registrados o número de fêmeas que desenvolveram prenhez e o número de implantes, representado pelo número de fetos vivos normais e com anomalias congênitas e pelo número de fetos com morte gestacional precoce (reabsorção) e tardia. O tipo de anomalia congênita também foi registrado.

Fotografias macroscópicas de todos os fetos de cada grupo e isoladamente

com a lupa dos que apresentavam anomalias congênitas, foram feitas com câmara digital (Olympus digital camera C-5060 Wide Zoom DC 6V Olympus Latin America, Miami, FL, USA).

4.6 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A assessoria estatística foi realizada pelo Professor Miguel Angel Sala Di Matteo, do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que é assessor estatístico do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A análise estatística para comparação do número de fetos vivos, de implantes e de mortalidade intrauterina foi feita utilizando-se o programa StatXact® 7 (Cytel, Inc.) para o teste de Fisher-Freeman-Halton, considerando $p < 0,05$.

A análise estatística para comparação dos índices de fetos vivos normais e com anomalias congênitas, do comprimento vértice-sacral fetal e do peso corpóreo fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos (machos e fêmeas), do diâmetro e do peso placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos (machos e fêmeas) e do ganho ponderal das fêmeas prenhes durante a gestação, foi feita utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.00, versão 4.0.0.255 (1994-2003 GraphPad Software, Inc) para o teste ANOVA, Kruskal-Wallis, considerando $p < 0,05$.

A análise estatística para comparação do comprimento vértice-sacral fetal e do peso corpóreo fetal entre machos e fêmeas, do diâmetro e do peso placentário entre fetos machos e fêmeas foi feita utilizando-se o programa GraphPad Prism

4.00, versão 4.0.0.255 (1994-2003 GraphPad Software, Inc) para o teste ANOVA, Mann Whitney, considerando $p < 0,05$.

Resultados

Das 54 fêmeas utilizadas, 36 (66,67%) foram aproveitadas para a realização do experimento e receberam a denominação de matrizes. As demais ($n = 18$; 33,33%) foram rejeitadas por falha na fecundação ($n = 10$; 18,52%), falha na identificação do dia 0 da gestação ($n = 6$; 11,11%) ou morte após desnutrição acentuada de causa indeterminada ($n = 2$; 3,70%).

5.1 EXPERIMENTO 1

5.1.1 EFEITO DA APLICAÇÃO DAS DOSES

Não foi observada nenhuma alteração comportamental nas matrizes dos Grupos C e Eb após receberem injeção de salina e etanol, respectivamente, durante o período em que as doses foram aplicadas. No entanto, as matrizes do Grupo Ea, após cada dose de etanol recebida, permaneceram agitadas por um curto período, pulando e correndo ao redor da caixa em que estavam, em seguida perderam totalmente o equilíbrio, ficaram adinâmicas, desmaiaram e permaneceram desacordadas durante aproximadamente quatro horas. Ao acordarem, seu comportamento havia se normalizado, ou seja, realizaram suas atividades como de costume, andando de forma equilibrada e consumindo água e ração em quantidades normais.

5.1.2 DOSAGEM DE ÁCIDO FÓLICO

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o valor da quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro das matrizes do Grupo Ea com as matrizes dos Grupos C e Eb. Essa diferença não foi observada entre as matrizes dos Grupos C e Eb (Tabela 1; Gráfico 1).

Tabela 1 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) nas amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Dosagem de Ácido Fólico no Soro (ng/ml)	Grupos			Valor de p
	C	Eb	Ea	
	24,00 ± 0,27	21,27 ± 0,25	15,78 ± 0,28*	$p < 0,05$

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,05$)

Gráfico 1 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea). *Significantemente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,05$).

5.1.3 QUANTIFICAÇÃO DE HEMÁCIAS

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) quando comparado o número de hemácias por mm^3 de sangue das matrizes do Grupo Ea com as matrizes dos Grupos C e Eb. Essa diferença não foi observada entre as matrizes dos Grupos C e Eb (Tabela 2; Gráfico 2).

Tabela 2 – Número de hemácias por mm^3 de sangue de camundongos prenhes dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Número de Hemácias por mm^3 de Sangue	Grupos			Valor de p
	C	Eb	Ea	
(Milhões/ mm^3)	4,55 $\pm$ 0,24	4,03 $\pm$ 0,17	3,64 $\pm$ 0,40*	$p < 0,01$

Valores apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

*Significantemente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,01$)

Gráfico 2 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).
*Significantemente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,01$).

5.1.4 DESEMPENHO REPRODUTIVO MATERNO

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando comparado o número de implantes, fetos vivos e reabsorção. O mesmo não aconteceu em relação à morte fetal tardia, que foi altamente significativa ($p < 0,01$) para o Grupo Ea quando comparado aos Grupos C e Eb (Tabela 3).

Tabela 3 – Número e média de implantes, fetos vivos, reabsorção e morte fetal tardia dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Achados	Grupos			Valor de p
	C n (%)	Eb n (%)	Ea n (%)	
Implantes	97 (100)	99 (100)	106 (100)	n.s.
Média por matriz	16,17	16,5	17,67	
Fetos vivos	96 (98,97)	97 (97,98)	93 (87,74)	n.s.
Média por matriz	16	16,17	15,5	

Reabsorção	1 (1,03)	2 (2,02)	2 (1,89)	n.s.
Média por matriz	0,17	0,33	0,33	
Morte fetal tardia	0	0	11 (10,38)*	p<0,01
Média por matriz	0	0	1,83	

n.s.= não significante; *Significantemente diferente dos Grupos C e Eb (p<0,01)

Não houve diferença estatística ao comparar o número de fetos vivos normais entre os grupos, mas foi observada diferença estatisticamente significativa (p<0,05) quando comparado o número de fetos vivos com anomalias congênicas do Grupo Ea com os Grupos C e Eb (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de fetos vivos normais e com anomalias congênicas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Fetos Vivos	Grupos			Valor de p
	C n (%)	Eb n (%)	Ea n (%)	
Normais	96 (100)	97 (100)	78 (83,87)	n.s.
Com Anomalias Congênicas	0	0	15 (16,13)*	p<0,05

n.s.= não significante; *Significantemente diferente dos Grupos C e Eb (p<0,05)

5.1.5 ANOMALIAS CONGÊNICAS

Todas as 6 matrizes do Grupo Ea apresentaram fetos com anomalias congênicas, com uma média de 2,5 fetos para cada fêmea. As anomalias encontradas em 15 (16,13%) fetos vivos do Grupo Ea foram: 6 (6,45%) fetos apresentaram DFTN isolado, 6 (6,45%) fetos apresentaram agenesia de membros e cauda, 2 (2,15%) fetos apresentaram DFTN associado com ausência de fusão dos

processos maxilares, mandibulares e frontonasal e 1 (1,08%) feto apresentou gastrosquise (Tabela 5; Figuras 1, 2, 3 e 4).

Tabela 5 – Achados macroscópicos em fetos de camundongos dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Fetos Vivos	Grupos			Valor de P
	C n (%)	Eb n (%)	Ea n (%)	
Normais	96 (100)	97 (100)	78 (83,87)	n.s.
Com DFTN isolado	0	0	6 (6,45)*	p<0,05
Com AMC	0	0	6 (6,45)*	p<0,05
Com DFTN + AFPMMF	0	0	2 (2,15)*	p<0,05
Com Gastrosquise	0	0	1 (1,08)*	p<0,05

n.s.= não significante; *Significantemente diferente dos Grupos C e Eb (p<0,05); DFTN= Defeito de Fechamento do Tubo Neural; AFPMMF= Ausência de Fusão dos Processos Maxilares, Mandibulares e Frontonasal; AMC= Agenesia de Membros e Cauda

Dos 6 fetos com DFTN isolado, 4 eram fêmeas e 2 eram machos. Os 2 fetos que apresentaram DFTN associado com ausência de fusão dos processos maxilares, mandibulares e frontonasal eram fêmeas, assim como o feto com gastrosquise. Já os 6 fetos com agenesia de membros e cauda não tiveram o sexo determinado em consequência da extrusa anomalia da região urogenital.

Figura 1 – Fotos macroscópicas dos fetos dos Grupos C (Controle - GC) e Ea (Etanol alta dose - GEa). A, B e C mostram vista superior do segmento cefálico, sendo A o aspecto normal; B, exencefalia; C, anencefalia.

Figura 2 – Fotos macroscópicas dos fetos dos Grupos C (Controle - GC) e Ea (Etanol alta dose - GEa). A e B mostram vista superior do segmento cefálico, sendo A o aspecto normal e B, anencefalia com ausência de fusão dos processos maxilares, mandibulares e frontonasal.

Figura 3 – Fotos macroscópicas dos fetos dos Grupos C (Controle - GC) e Ea (Etanol alta dose - GEa). A e B mostram vista lateral do corpo total, sendo A um feto normal e B, feto com agenesia de membros e cauda.

Figura 4 – Fotos macroscópicas dos fetos dos Grupos C (Controle - GC) e Ea (Etanol alta dose - GEa). A e B mostram vista lateral do corpo total, sendo A um feto

normal e B, feto com gastrosquise.

5.1.6 COMPRIMENTO VÉRTICE-SACRAL FETAL

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, do Grupo Ea com os Grupos C e Eb. Não houve diferença para esse parâmetro entre os Grupos C e Eb (Tabela 6; Gráficos 3, 4 e 5).

Tabela 6 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Comprimento Vértice-Sacral Fetal (cm)	Grupos			Valor de p
	C	Eb	Ea	
Machos	$2,6 \pm 0,18$	$2,5 \pm 0,12$	$2,4 \pm 0,18^*$	$p < 0,05$
Fêmeas	$2,5 \pm 0,17$	$2,5 \pm 0,16$	$2,3 \pm 0,22^*$	$p < 0,05$
Ambos	$2,5 \pm 0,18$	$2,5 \pm 0,16$	$2,4 \pm 0,23^*$	$p < 0,05$

Valores apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

*Significantemente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,05$)

Gráfico 3 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea). *Significantemente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,05$).

Gráfico 4 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea). *Significantemente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,05$).

Gráfico 5 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea). *Significantemente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,05$).

O comprimento vértice-sacral (cm) fetal foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) entre machos e fêmeas em cada grupo respectivo (Tabela 7; Gráficos 6, 7 e 8).

Tabela 7 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos e fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Comprimento Vértice-Sacral Fetal (cm)			
Grupos	Machos	Fêmeas	Valor de p
C	2,6 ± 0,18	2,5 ± 0,17*	p<0,05
Eb	2,5 ± 0,12	2,5 ± 0,16*	p<0,05
Ea	2,4 ± 0,18	2,3 ± 0,22*	p<0,05

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente (p<0,05)

Gráfico 6 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos e fêmeas do Grupo C (Controle). *Significantemente diferente (p<0,05).

Gráfico 7 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos e fêmeas do Grupo Eb (Etanol baixa dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 8 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos e fêmeas do Grupo Ea (Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

5.1.7 PESO CORPÓREO FETAL

Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado o peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, do Grupo Ea com os Grupos C e Eb. Não houve diferença para esse parâmetro entre os Grupos C e Eb (Tabela 8; Gráficos 9, 10 e 11).

Tabela 8 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Peso Corpóreo Fetal (g)	Grupos			Valor de p
	C	Eb	Ea	
Machos	1,50 ± 0,11	1,49 ± 0,14	1,31 ± 0,15*	$p < 0,001$
Fêmeas	1,40 ± 0,14	1,40 ± 0,15	1,19 ± 0,22*	$p < 0,001$
Ambos	1,46 ± 0,14	1,45 ± 0,16	1,23 ± 0,19*	$p < 0,001$

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,001$)

Gráfico 9 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

*Significantemente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,001$).

Gráfico 10 – Peso corpóreo (g) fetal entre fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).
*Significamente diferente dos Grupos C e Eb ($p<0,001$).

Gráfico 11 – Peso corpóreo (g) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea). *Significamente diferente dos Grupos C e Eb ($p<0,001$).

O peso corpóreo (g) fetal foi estatisticamente diferente ($p<0,05$) entre machos e fêmeas em cada grupo respectivo (Tabela 9; Gráficos 12, 13 e 14).

Tabela 9 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos e fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Grupos	Peso Corpóreo Fetal (g)		Valor de p
	Machos	Fêmeas	
C	1,50 ± 0,11	1,40 ± 0,14*	p<0,05
Eb	1,49 ± 0,14	1,40 ± 0,15*	p<0,05
Ea	1,31 ± 0,15	1,19 ± 0,22*	p<0,05

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente (p<0,05)

Gráfico 12 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos e fêmeas do Grupo C (Controle).

*Significantemente diferente (p<0,05).

Gráfico 13 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos e fêmeas do Grupo Eb (Etanol baixa dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 14 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos e fêmeas do Grupo Ea (Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

5.1.8 DIÂMETRO PLACENTÁRIO

Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) quando comparado o diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, do Grupo Ea com os Grupos C e Eb. Não houve diferença para esse parâmetro entre os Grupos C e Eb (Tabela 10; Gráficos 15, 16 e 17).

Tabela 10 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Diâmetro Placentário (cm)	Grupos			Valor de p
	C	Eb	Ea	
Machos	$0,8 \pm 0,05$	$0,8 \pm 0,05$	$0,8 \pm 0,06^*$	$p < 0,01$
Fêmeas	$0,8 \pm 0,06$	$0,7 \pm 0,06$	$0,7 \pm 0,07^*$	$p < 0,01$
Ambos	$0,8 \pm 0,10$	$0,8 \pm 0,07$	$0,7 \pm 0,08^*$	$p < 0,01$

Valores apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

*Significativamente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,01$)

Gráfico 15 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea). *Significativamente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,01$).

Gráfico 16 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea). *Significativamente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,01$).

Gráfico 17 – Diâmetro (cm) placentário entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea). *Significativamente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,01$).

O diâmetro (cm) placentário não foi estatisticamente diferente entre fetos machos e fêmeas em cada grupo respectivo (Tabela 11).

Tabela 11 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Grupos	Diâmetro Placentário (cm)		Valor de p
	Machos	Fêmeas	
C	0,8 ± 0,05	0,8 ± 0,06	n.s.
Eb	0,8 ± 0,05	0,7 ± 0,06	n.s.
Ea	0,8 ± 0,06	0,7 ± 0,07	n.s.

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

n.s.= não significante

5.1.9 PESO PLACENTÁRIO

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado o peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, do Grupo Ea com os Grupos C e Eb. Não houve diferença para esse parâmetro entre os Grupos C e Eb (Tabela 12; Gráficos 18, 19 e 20).

Tabela 12 – Peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Peso Placentário (g)	Grupos			Valor de p
	C	Eb	Ea	
Machos	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,04*	$p < 0,001$
Fêmeas	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,03*	$p < 0,001$
Ambos	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,03*	$p < 0,001$

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significativamente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,001$)

Gráfico 18 – Peso (g) placentário entre fetos machos dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea). *Significativamente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,001$).

Gráfico 19 – Peso (g) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea). *Significantemente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,001$).

Gráfico 20 – Peso (g) placentário entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea). *Significantemente diferente dos Grupos C e Eb ($p < 0,001$).

O peso (g) placentário foi estatisticamente diferente ($p < 0,05$) entre fetos machos e fêmeas em cada grupo respectivo (Tabela 13; Gráficos 21, 22 e 23).

Tabela 13 – Peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Grupos	Peso Placentário (g)		
	Machos	Fêmeas	Valor de p
C	0,14 ± 0,02	0,12 ± 0,02*	p<0,05
Eb	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,01*	p<0,05
Ea	0,12 ± 0,04	0,10 ± 0,03*	p<0,05

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente (p<0,05)

Gráfico 21 – Peso (g) placentário entre fetos machos e fêmeas do Grupo C (Controle). *Significantemente diferente (p<0,05).

Gráfico 22 – Peso (g) placentário entre fetos machos e fêmeas do Grupo Eb (Etanol baixa dose). *Significantemente diferente ($p<0,05$).

Gráfico 23 – Peso (g) placentário entre fetos machos e fêmeas do Grupo Ea (Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p<0,05$).

5.1.10 NÚMERO DE FETOS MACHOS E FÊMEAS

Não houve diferença estatística ao comparar o número de fetos machos e o número de fetos fêmeas em cada grupo respectivo (Tabela 14).

Tabela 14 – Número de fetos machos e número de fetos fêmeas dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea).

Grupos	Número de Fetos Vivos		Valor de p
	Machos	Fêmeas	
C	51	45	n.s.
Eb	50	47	n.s.
Ea	46	53	n.s.

Valores apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

n.s.= não significante

5.1.11 GANHO PONDERAL DIÁRIO DAS MATRIZES

Em relação à média do ganho ponderal diário, em gramas, das matrizes durante a gestação, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre o 7º e 9º dia gestacional para o Grupo Ea quando comparado aos Grupos C e Eb. Essa diferença não foi observada entre os Grupos C e Eb (Tabela 15; Gráfico 24).

Tabela 15 – Média do ganho ponderal (g) diário de camundongos prenhes dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea) nos diferentes períodos gestacionais.

Período Gestacional (Dias)	Grupos			Valor de p
	C	Eb	Ea	
0 ao 18°	37,5 ± 7,68	33,8 ± 8,85	34,2 ± 13,49	n.s.
0 ao 6°	4,3 ± 1,04	3,6 ± 1,02	3,4 ± 1,91	n.s.
7° ao 9°	3,5 ± 1,30	1,7 ± 0,98	0,4 ± 0,97*	p<0,01
10° ao 18°	29,8 ± 6,07	28,5 ± 8,35	30,3 ± 12,98	n.s.

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

n.s.= não significativa; *Significativamente diferente dos Grupos C e Eb (p<0,01)

Gráfico 24 – Média do ganho ponderal (g) diário de camundongos prenhes dos Grupos Controle (C), Etanol baixa dose (Eb) e Etanol alta dose (Ea) durante o período gestacional (dias).

5.2 EXPERIMENTO 2

5.2.1 EFEITO DA APLICAÇÃO DAS DOSES

Não foi observada nenhuma alteração comportamental nas matrizes do Grupo DF após receberem injeção de salina durante o período em que as doses foram aplicadas. No entanto, as matrizes dos Grupos DFEb e DFEa após cada dose de etanol recebida, perderam totalmente o equilíbrio, desmaiaram e permaneceram desacordadas durante aproximadamente seis horas, para as matrizes do Grupo DFEb e cerca de 8 horas para as matrizes do Grupo DFEa. Ao acordarem, para ambos os grupos, as matrizes ainda apresentaram alteração no comportamento, ou seja, movimentavam-se com um certo grau de lentidão para realizar suas atividades rotineiras e consumiram água e ração em quantidades menores do que de costume.

5.2.2 EXAME CLÍNICO

Durante a realização do exame clínico os seguintes achados foram evidenciados em todas as matrizes dos Grupos DF, DFEb e DFEa, estando mais acentuados nos dois últimos grupos: presença de alopecia, desde pequenas regiões até grandes áreas, em diversos locais do corpo (focinho, cabeça, nuca, dorso, abdômen, patas), mudanças no aspecto e na coloração da pelagem, alteração da coloração dos olhos, que se tornaram opacos, corpo muito frio e trêmulo, redução na movimentação física para a realização das atividades diárias e desequilíbrio corporal bem acentuado, marcado por movimentos circulares, queda lateral do corpo e balanço acentuado da cabeça (Figura 5).

Figura 5 – Fotos macroscópicas de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato - GDF), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose - GDFEb) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose GDFEa), mostrando alguns dos achados observados durante o exame clínico.

5.2.3 DOSAGEM DE ÁCIDO FÓLICO

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado o valor da quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro das matrizes dos Grupos DFEb e DFEa com as matrizes do Grupo DF. Também foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre as matrizes dos Grupos DFEb e DFEa (Tabela 16; Gráfico 25).

Tabela 16 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Grupos

Dosagem de Ácido Fólico no Soro (ng/ml)	DF	DFEb	DFEa	Valor de p
	12,16 ± 0,21	8,38 ± 0,29*	4,06 ± 0,17*	p<0,001

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferentes do Grupo DF e entre si (p<0,001)

Gráfico 25 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEBa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$). **Significantemente diferentes entre si ($p < 0,001$).

5.2.4 QUANTIFICAÇÃO DE HEMÁCIAS

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado o número de hemácias por mm^3 de sangue das matrizes dos Grupos DFEB e DFEBa com as matrizes do Grupo DF. Também foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre as matrizes dos Grupos DFEB e DFEBa (Tabela 17; Gráfico 26).

Tabela 17 – Número de hemácias por mm^3 de sangue de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEBa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Grupos

Número de Hemácias por mm ³ de Sangue	DF	DFEb	DFEa	Valor de p
(Milhões/ mm ³)	2,38 ± 0,23	1,61 ± 0,34*	0,67 ± 0,20*	p<0,001

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferentes do Grupo DF e entre si (p<0,001)

Gráfico 26 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF (p<0,001). **Significantemente diferentes entre si (p<0,001).

5.2.5 DESEMPENHO REPRODUTIVO MATERNO

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando comparado o número de implantes, mas o mesmo não ocorreu para o número de fetos vivos, que apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para os Grupos DFEB e DF EA quando comparados ao Grupo DF. Em relação à reabsorção houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparados os Grupos DFEB e DF EA entre si e com o Grupo DF. Também houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação à morte fetal tardia quando comparados os Grupos DFEB e DF EA entre si e com o Grupo DF (Tabela 18; Gráficos 27, 28 e 29).

Tabela 18 – Número e média de implantes, fetos vivos, reabsorção e morte fetal tardia dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DF EA (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Achados	Grupos			Valor de p
	DF n (%)	DFEB n (%)	DF EA n (%)	
Implantes	99 (100)	90 (100)	101 (100)	n.s.
Média por matriz	16,5	15	16,83	
Fetos vivos	90 (90,91)	65 (72,22)*	62 (61,39)*	$p < 0,05$
Média por matriz	15	10,83	10,33	
Reabsorção	8 (8,08)	13 (14,44)**	19 (18,81)**	$p < 0,05$
Média por matriz	1,33	2,17	3,17	
Morte fetal tardia	1 (1,01)	12 (13,33)**	20 (19,80)**	$p < 0,05$
Média por matriz	0,33	2	3,33	

n.s.= não significativa; *Significantemente diferente do Grupo DF ($p < 0,05$);

**Significantemente diferentes do Grupo DF e entre si ($p < 0,05$)

Gráfico 27 – Média de fetos vivos dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,05$).

Gráfico 28 – Média de reabsorção dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,05$). **Significantemente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Gráfico 29 – Média de morte fetal tardia dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,05$). **Significantemente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Todos os 90 (100%) fetos vivos do Grupo DF, os 65 (100%) fetos vivos do Grupo DFEb e os 62 (100%) fetos vivos do Grupo DFEa eram normais (Tabela 19).

Tabela 19 – Número de fetos vivos normais e com anomalias congênitas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Fetos Vivos	Grupos			Valor de p
	DF n (%)	DFEb n (%)	DFEa n (%)	
Normais	90 (100)	65 (100)	62 (100)	n.s.
Com Anomalias Congênitas	0	0	0	n.s.

n.s.= não significante

5.2.6 COMPRIMENTO VÉRTICE-SACRAL FETAL

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado o comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DFEb e DFEa com o Grupo DF. Não houve diferença entre os Grupos DFEb e DFEa quando comparado o comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos e entre fêmeas, diferente do que ocorreu entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, que apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre esses dois grupos (Tabela 20; Gráficos 30, 31 e 32).

Tabela 20 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Comprimento Vértice-Sacral Fetal (cm)	Grupos			Valor de p
	DF	DFEb	DFEa	
Machos	2,4 ± 0,16	2,0 ± 0,22*	1,9 ± 0,14*	p<0,001
Fêmeas	2,3 ± 0,17	2,0 ± 0,22*	1,8 ± 0,15*	p<0,001
Ambos	2,4 ± 0,16	2,0 ± 0,22*	1,9 ± 0,15**	p<0,001

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente do Grupo DF ($p < 0,001$);

*Significantemente diferente dos Grupos DF ($p < 0,001$) e DFEb ($p < 0,05$)

Gráfico 30 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$).

Gráfico 31 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$).

($p < 0,001$).

Gráfico 32 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$). **Significantemente diferentes entre si ($p < 0,05$).

O comprimento vértice-sacral (cm) fetal não apresentou diferença estatística entre machos e fêmeas em cada grupo respectivo (Tabela 21).

Tabela 21 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos e fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Comprimento Vértice-Sacral Fetal (cm)			
Grupos	Machos	Fêmeas	Valor de p
DF	2,4 ± 0,16	2,3 ± 0,17	n.s.
DFEb	2,0 ± 0,22	2,0 ± 0,22	n.s.
DFEa	1,9 ± 0,14	1,8 ± 0,15	n.s.

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

n.s.= não significante

5.2.7 PESO CORPÓREO FETAL

Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado o peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DFEb e DFEa com o Grupo DF. Não houve diferença para esse parâmetro entre os Grupos DFEb e DFEa (Tabela 22; Gráficos 33, 34 e 35).

Tabela 22 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Peso Corpóreo Fetal (g)	Grupos			Valor de p
	DF	DFEb	DFEa	
Machos	1,28 ± 0,24	0,81 ± 0,19*	0,83 ± 0,16*	$p < 0,001$
Fêmeas	1,17 ± 0,21	0,82 ± 0,17*	0,73 ± 0,11*	$p < 0,001$
Ambos	1,23 ± 0,23	0,81 ± 0,18*	0,78 ± 0,14*	$p < 0,001$

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significativamente diferente do Grupo DF ($p < 0,001$)

Gráfico 33 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$).

Gráfico 34 – Peso corpóreo (g) fetal entre fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$).

Gráfico 35 – Peso corpóreo (g) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$).

O peso corpóreo (g) fetal não apresentou diferença estatística entre machos e fêmeas em cada grupo respectivo (Tabela 23).

Tabela 23 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos e fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Grupos	Peso Corpóreo Fetal (g)		
	Machos	Fêmeas	Valor de p
DF	1,28 ± 0,24	1,17 ± 0,21	n.s.
DFEb	0,81 ± 0,19	0,82 ± 0,17	n.s.
DFEa	0,83 ± 0,16	0,73 ± 0,11	n.s.

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

n.s.= não significante

5.2.8 DIÂMETRO PLACENTÁRIO

Foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado o diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DFEB e DFEd com o Grupo DF. Entre os Grupos DFEB e DFEd também ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a essa mesma análise (Tabela 24; Gráficos 36, 37 e 38).

Tabela 24 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEd (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Diâmetro Placentário (cm)	Grupos		
	DF	DFEB	DFEd
Machos	0,8 ± 0,06	0,8 ± 0,07*	0,7 ± 0,10*
Fêmeas	0,8 ± 0,07	0,8 ± 0,04*	0,7 ± 0,08*
Ambos	0,8 ± 0,06	0,8 ± 0,06*	0,7 ± 0,09*

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$) e entre si ($p < 0,05$)

Gráfico 36 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$). **Significantemente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Gráfico 37 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$). **Significantemente diferentes entre si ($p < 0,05$).

Gráfico 38 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$). **Significantemente diferentes entre si ($p < 0,05$).

O diâmetro (cm) placentário não foi estatisticamente diferente entre fetos machos e fêmeas em cada grupo respectivo (Tabela 25).

Tabela 25 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos e fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Grupos	Diâmetro Placentário (cm)		
	Machos	Fêmeas	Valor de p
DF	0,8 ± 0,06	0,8 ± 0,07	n.s.
DFEb	0,8 ± 0,07	0,8 ± 0,04	n.s.
DFEa	0,7 ± 0,10	0,7 ± 0,08	n.s.

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

n.s.= não significante

5.2.9 PESO PLACENTÁRIO

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) quando comparado o peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DFEB e DFEd com o Grupo DF. Não houve diferença para esse parâmetro entre os Grupos DFEB e DFEd (Tabela 26; Gráficos 39, 40 e 41).

Tabela 26 – Peso (g) placentário entre fetos machos e fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEd (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Peso Placentário (g)	Grupos			Valor de p
	DF	DFEB	DFEd	
Machos	0,13 ± 0,02	0,09 ± 0,02*	0,09 ± 0,01*	p<0,001
Fêmeas	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,02*	0,09 ± 0,02*	p<0,001
Ambos	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,02*	0,09 ± 0,02*	p<0,001

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significativamente diferente do Grupo DF ($p < 0,001$)

Gráfico 39 – Peso (g) placentário entre fetos machos dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$).

Gráfico 40 – Peso (g) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$).

Gráfico 41 – Peso (g) placentário entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferentes do Grupo DF ($p < 0,001$).

O peso (g) placentário não foi estatisticamente diferente entre fetos machos e fêmeas em cada grupo respectivo (Tabela 27).

Tabela 27 – Peso (g) placentário entre fetos machos e fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Grupos	Peso Placentário (g)		
	Machos	Fêmeas	Valor de p
DF	0,13 ± 0,02	0,11 ± 0,01	n.s.
DFEb	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	n.s.
DFEa	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02	n.s.

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

n.s.= não significante

5.2.10 NÚMERO DE FETOS MACHOS E FÊMEAS

Não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar o número de fetos machos e o número de fetos fêmeas em cada grupo respectivo (Tabela 28).

Tabela 28 – Número de fetos machos e número de fetos fêmeas dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Grupos	Número de Fetos Vivos		Valor de p
	Machos	Fêmeas	
DF	43	47	n.s.
DFEB	36	29	n.s.
DFEa	31	31	n.s.

n.s.= não significativa

5.2.11 GANHO PONDERAL DIÁRIO DAS MATRIZES

Em relação à média do ganho ponderal diário, em gramas, das matrizes durante a gestação, não houve diferença estatística entre os três grupos quando comparado isoladamente o período gestacional de 0 a 6 dias. Nos demais períodos gestacionais isolados (do 7° ao 9° dia gestacional e do 10° ao 18° dia gestacional) e também no período gestacional completo (do 0 ao 18° dia gestacional) foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) quando comparados os Grupos DFEB e DFEa com o Grupo DF. Todas as diferenças acima citadas não foram observadas entre os Grupos DFEB e DFEa (Tabela 29; Gráfico 42).

Tabela 29 – Média do ganho ponderal (g) diário de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose) nos diferentes períodos gestacionais.

Período Gestacional (Dias)	Grupos			Valor de p
	DF	DFEb	DFEa	
0 ao 18°	16,8 ± 2,58	5,3 ± 4,17*	3,8 ± 2,81*	p<0,01
0 ao 6°	1,0 ± 0,63	1,1 ± 0,74	1,3 ± 0,69	n.s.
7° ao 9°	2,0 ± 0,55	0,3 ± 0,55*	-0,4 ± 0,59*	p<0,01
10° ao 18°	13,8 ± 2,09	3,3 ± 3,66*	3,0 ± 3,07*	p<0,01

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

n.s.= não significante; *Significantemente diferente do Grupo DF (p<0,01)

Gráfico 42 – Média do ganho ponderal (g) diário de camundongos prenhes dos Grupos DF (Deficiência de Folato), DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose) durante o período gestacional (dias).

5.3 COMPARAÇÃO DOS EXPERIMENTOS 1 E 2

5.3.1 GRUPO C X GRUPO DF

A. DOSAGEM DE ÁCIDO FÓLICO

Houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) quando comparado o valor da quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro das matrizes do Grupo C com as do Grupo DF (Tabela 30; Gráfico 43).

Tabela 30 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato).

Dosagem de Ácido Fólico no Soro (ng/ml)	Grupos		Valor de p
	C	DF	
	24,00 ± 0,27	12,16 ± 0,21*	p<0,05

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente ($p<0,05$)

Gráfico 43 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato).

*Significantemente diferente ($p < 0,05$).

B. QUANTIFICAÇÃO DE HEMÁCIAS

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o número de hemácias por mm^3 de sangue das matrizes do Grupo C com as do Grupo DF (Tabela 31; Gráfico 44).

Tabela 31 – Número de hemácias por mm^3 de sangue de camundongos prenhes dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato).

Número de Hemácias por mm^3 de Sangue	Grupos		Valor de p
	C	DF	
(Milhões/ mm^3)	$4,55 \pm 0,24$	$2,38 \pm 0,23^*$	$p < 0,05$

Valores apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

*Significantemente diferente ($p < 0,05$)

Gráfico 44 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

C. DESEMPENHO REPRODUTIVO MATERNO

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os Grupos C e DF quando comparado o número de implantes, de fetos vivos e de morte fetal tardia, mas o mesmo não ocorreu quando comparado o número de reabsorção, que apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (Tabela 32; Gráfico 45).

Tabela 32 – Número e média de implantes, fetos vivos, reabsorção e morte fetal tardia dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato).

Achados	Grupos		Valor de p
	C n (%)	DF n (%)	
Implantes	97 (100)	99 (100)	n.s.
Média por matriz	16,17	16,5	
Fetos vivos	96 (98,97)	90 (90,91)	n.s.
Média por matriz	16	15	
Reabsorção	1 (1,03)	8 (8,08)*	p<0,05
Média por matriz	0,17	1,33	
Morte fetal tardia	0	1 (1,01)	n.s.
Média por matriz	0	0,33	

n.s.= não significante; *Significantemente diferente (p<0,05)

Gráfico 45 – Média de reabsorção de camundongos prenhes dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato). *Significantemente diferente (p<0,05).

Todos os 96 (100%) fetos vivos do Grupo C e os 90 (100%) fetos vivos do Grupo DF eram normais (Tabela 33).

Tabela 33 – Número de fetos vivos normais e com anomalias congênitas dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato).

Fetos Vivos	Grupos		Valor de p
	C n (%)	DF n (%)	
Normais	96 (100)	90 (100)	n.s.
Com Anomalias Congênitas	0	0	n.s.

n.s.= não significante

D. COMPRIMENTO VÉRTICE-SACRAL FETAL

Houve diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) quando comparado o comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, entre os Grupos C e DF (Tabela 34; Gráficos 46, 47 e 48).

Tabela 34 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato).

Comprimento Vértice-Sacral Fetal (cm)	Grupos		Valor de p
	C	DF	
Machos	2,6 ± 0,18	2,4 ± 0,16*	$p < 0,05$
Fêmeas	2,5 ± 0,17	2,3 ± 0,17*	$p < 0,05$
Ambos	2,5 ± 0,18	2,4 ± 0,16*	$p < 0,05$

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente ($p < 0,05$)

Gráfico 46 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 47 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre fêmeas dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 48 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato).
*Significantemente diferente ($p < 0,05$).

E. PESO CORPÓREO FETAL

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, entre os Grupos C e DF (Tabela 35; Gráficos 49, 50 e 51).

Tabela 35 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato).

Peso Corpóreo Fetal (g)	Grupos		Valor de p
	C	DF	
Machos	$1,50 \pm 0,11$	$1,28 \pm 0,24^*$	$p < 0,05$
Fêmeas	$1,40 \pm 0,14$	$1,17 \pm 0,21^*$	$p < 0,05$
Ambos	$1,46 \pm 0,14$	$1,23 \pm 0,23^*$	$p < 0,05$

Valores apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

*Significantemente diferente ($p < 0,05$)

Gráfico 49 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 50 – Peso corpóreo (g) fetal entre fêmeas dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 51 – Peso corpóreo (g) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

F. DIÂMETRO PLACENTÁRIO

Não foi observada diferença estatística quando comparado o diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, do Grupo C com o Grupo DF (Tabela 36).

Tabela 36 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato).

Diâmetro Placentário (cm)	Grupos		Valor de p
	C	DF	
Machos	0,8 ± 0,05	0,8 ± 0,06	n.s.
Fêmeas	0,8 ± 0,06	0,8 ± 0,07	n.s.
Ambos	0,8 ± 0,10	0,8 ± 0,06	n.s.

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

n.s.= não significante

G. PESO PLACENTÁRIO

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, do Grupo C com o Grupo DF (Tabela 37; Gráficos 52, 53 e 54).

Tabela 37 – Peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato).

Peso Placentário (g)	Grupos		Valor de p
	C	DF	
Machos	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,02*	$p < 0,05$
Fêmeas	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,01*	$p < 0,05$
Ambos	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02*	$p < 0,05$

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significativamente diferente ($p < 0,05$)

Gráfico 52 – Peso (g) placentário entre fetos machos dos Grupos C (Controle) e DF

(Deficiência de Folato). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 53 – Peso (g) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 54 – Peso (g) placentário entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

H. NÚMERO DE FETOS MACHOS E FÊMEAS

Não houve diferença estatística ao comparar entre os Grupos C e DF o número de fetos machos e o número de fetos fêmeas (Tabela 38).

Tabela 38 – Número de fetos machos e número de fetos fêmeas dos Grupos C (Controle) e DF (Deficiência de Folato).

Número de Fetos Vivos	Grupos		Valor de p
	C	DF	
Machos	51	43	n.s.
Fêmeas	45	47	n.s.

n.s.= não significante

5.3.2 GRUPO Eb X GRUPO DFEb

A. DOSAGEM DE ÁCIDO FÓLICO

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o valor da quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro das matrizes do Grupo Eb com as do Grupo DFEb (Tabela 39; Gráfico 55).

Tabela 39 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de

Folato e Etanol baixa dose).

Dosagem de Ácido Fólico no Soro (ng/ml)	Grupos		Valor de p
	Eb	DFEb	
	21,27 ± 0,25	8,38 ± 0,29 *	p<0,05

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente (p<0,05)

Gráfico 55 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose). *Significantemente diferente (p<0,05).

B. QUANTIFICAÇÃO DE HEMÁCIAS

Houve diferença estatisticamente significativa (p<0,05) quando comparado o número de hemácias por mm³ de sangue das matrizes do Grupo Eb com as do Grupo DFEb (Tabela 40; Gráfico 56).

Tabela 40 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).

Número de Hemácias por mm ³ de Sangue (Milhões/ mm ³)	Grupos		Valor de p
	Eb	DFEb	
	4,03 ± 0,17	1,61 ± 0,34*	p<0,05

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente (p<0,05)

Gráfico 56 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).

*Significantemente diferente (p<0,05).

C. DESEMPENHO REPRODUTIVO MATERNO

Não foi observada diferença estatística entre os Grupos Eb e DFEb quando comparado o número de implantes, mas houve diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre os grupos quando comparado o número de fetos vivos, de reabsorção e de morte fetal tardia (Tabela 41; Gráficos 57 e 58).

Tabela 41 – Número e média de implantes, fetos vivos, reabsorção e morte fetal tardia dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).

Achados	Grupos		Valor de p
	Eb n (%)	DFEb n (%)	
Implantes	99 (100)	90 (100)	n.s.
Média por matriz	16,5	15	
Fetos vivos	97 (97,98)	65 (72,22)*	p<0,05
Média por matriz	16,17	10,83	
Reabsorção	2 (2,02)	13 (14,44)*	p<0,05
Média por matriz	0,33	2,17	
Morte fetal tardia	0	12 (13,33)*	p<0,05
Média por matriz	0	2	

n.s.= não significante; * Significadamente diferente (p<0,05)

Gráfico 57 – Média de fetos vivos dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 58 – Média de reabsorção dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Todos os 97 (100%) fetos vivos do Grupo Eb e os 65 (100%) fetos vivos do Grupo DFEb eram normais (Tabela 42).

Tabela 42 – Número de fetos vivos normais e com anomalias congênitas dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).

.Fetos Vivos	Grupos		Valor de p
	Eb n (%)	DFEB n (%)	
Normais	97 (100)	65 (100)	n.s.
Com Anomalias Congênitas	0	0	n.s.

n.s.= não significante

D. COMPRIMENTO VÉRTICE-SACRAL FETAL

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, entre os Grupos Eb e DFEB (Tabela 43; Gráficos 59, 60 e 61).

Tabela 43 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).

Comprimento Vértice-Sacral Fetal (cm)	Grupos		Valor de p
	Eb	DFEB	
Machos	$2,5 \pm 0,12$	$2,0 \pm 0,22^*$	$p < 0,05$
Fêmeas	$2,5 \pm 0,16$	$2,0 \pm 0,22^*$	$p < 0,05$
Ambos	$2,5 \pm 0,16$	$2,0 \pm 0,22^*$	$p < 0,05$

Valores apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

*Significativamente diferente ($p < 0,05$)

Gráfico 59 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).
*Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 60 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre fêmeas dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).
*Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 61 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

E. PESO CORPÓREO FETAL

Houve diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) quando comparado o peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, entre os Grupos Eb e DFEB (Tabela 44; Gráficos 62, 63 e 64).

Tabela 44 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).

Peso Corpóreo Fetal (g)	Grupos		Valor de p
	Eb	DFEB	
Machos	1,49 ± 0,14	0,79 ± 0,19*	$p < 0,05$
Fêmeas	1,40 ± 0,15	0,82 ± 0,17*	$p < 0,05$
Ambos	1,45 ± 0,16	0,81 ± 0,18*	$p < 0,05$

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente ($p < 0,05$)

Gráfico 62 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 63 – Peso corpóreo (g) fetal entre fêmeas dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEB (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 64 – Peso corpóreo (g) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

F. DIÂMETRO PLACENTÁRIO

Não houve diferença estatística quando comparado o diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, entre os Grupos Eb e DFEb (Tabela 45).

Tabela 45 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).

Diâmetro Placentário (cm)	Grupos		Valor de p
	Eb	DFEb	
Machos	0,8 ± 0,05	0,8 ± 0,07	n.s.
Fêmeas	0,7 ± 0,06	0,8 ± 0,04	n.s.
Ambos	0,8 ± 0,07	0,8 ± 0,06	n.s.

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

n.s.= não significativa

G. PESO PLACENTÁRIO

Houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) quando comparado o peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, entre os Grupos Eb e DFEb (Tabela 46; Gráficos 65, 66 e 67).

Tabela 46 – Peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).

Peso Placentário (g)	Grupos		Valor de p
	Eb	DFEb	
Machos	0,14 ± 0,02	0,09 ± 0,02*	$p<0,05$
Fêmeas	0,11 ± 0,01	0,09 ± 0,02*	$p<0,05$
Ambos	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,02*	$p<0,05$

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente ($p<0,05$)

Gráfico 65 – Peso (g) placentário entre fetos machos dos Grupos Eb (Etanol baixa

dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 66 – Peso (g) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 67 – Peso (g) placentário entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).

*Significantemente diferente ($p < 0,05$).

H. NÚMERO DE FETOS MACHOS E FÊMEAS

Não houve diferença estatística ao comparar o número de fetos machos entre os Grupos Eb e DFEb, mas houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao comparar o número de fetos fêmeas entre esses dois grupos (Tabela 47; Gráfico 68).

Tabela 47 – Número de fetos machos e número de fetos fêmeas dos Grupos Eb (Etanol baixa dose) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa dose).

Número de Fetos Vivos	Grupos		Valor de p
	Eb	DFEb	
Machos	50	36	n.s.
Fêmeas	47	29*	$p < 0,05$

n.s.= não significante; *Significantemente diferente ($p < 0,05$)

Gráfico 68 – Média de fetos vivos fêmeas entre os Grupos Eb (Etanol baixa dose: Média= 7,8; Desvio Padrão= 2,48) e DFEb (Deficiência de Folato e Etanol baixa

dose: Média= 4,8; Desvio Padrão= 1,60). *Significantemente diferente ($p<0,05$).

5.3.3 GRUPO Ea X GRUPO DFEa

A. DOSAGEM DE ÁCIDO FÓLICO

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o valor da quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro das matrizes do Grupo Ea com as do Grupo DFEa (Tabela 48; Gráfico 69).

Tabela 48 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Dosagem de Ácido Fólico no Soro (ng/ml)	Grupos		Valor de p
	Ea	DFEa	
	15,78 ± 0,28	4,06 ± 0,17*	p<0,05

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente ($p < 0,05$)

Gráfico 69 – Quantificação de ácido fólico (ng/ml) em amostras de soro de camundongos prenhes dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

B. QUANTIFICAÇÃO DE HEMÁCIAS

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o número de hemácias por mm^3 de sangue das matrizes do Grupo Ea com as do Grupo DFEa (Tabela 49; Gráfico 60).

Tabela 49 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Número de Hemácias por mm ³ de Sangue (Milhões/ mm ³)	Grupos		Valor de p
	Ea	DFEa	
	3,64 ± 0,40	0,67 ± 0,20*	p<0,05

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente (p<0,05)

Gráfico 70 – Número de hemácias por mm³ de sangue de camundongos prenhes dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferente (p<0,05).

C. DESEMPENHO REPRODUTIVO MATERNO

Não foi observada diferença estatística entre os Grupos Ea e DFEa quando comparado o número de implantes, mas houve diferença estatisticamente significante (p<0,05) entre os grupos quando comparado o número de fetos vivos, de reabsorção e de morte fetal tardia (Tabela 50; Gráficos 71, 72 e 73).

Tabela 50 – Número e média de implantes, fetos vivos, reabsorção e morte fetal tardia dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Achados	Grupos		Valor de p
	Ea n (%)	DFEa n (%)	
Implantes	106 (100)	101 (100)	n.s.
Média por matriz	17,67	16,83	
Fetos vivos	93 (87,74)	62 (61,39)*	p<0,05
Média por matriz	15,5	10,33	
Reabsorção	2 (1,89)	19 (18,81)*	p<0,05
Média por matriz	0,33	3,17	
Morte fetal tardia	11 (10,38)	20 (19,80)*	p<0,05
Média por matriz	1,83	3,33	

n.s.= não significante; *Significantemente diferente (p<0,05)

Gráfico 71 – Média de fetos vivos dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 72 – Média de reabsorção dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 73 – Média de morte fetal tardia dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

D. ANOMALIAS CONGÊNITAS

Não houve diferença estatística ao comparar o número de fetos vivos normais entre os Grupos Ea e DFEa, mas foi observada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o número de fetos vivos com anomalias (Tabela 51).

Tabela 51 – Número de fetos vivos normais e com anomalias congênicas dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Fetos Vivos	Grupos		Valor de p
	Ea n (%)	DFEa n (%)	
Normais	78 (83,87)	62 (100)	n.s.
Com Anomalias Congênicas	15 (16,13)*	0	$p < 0,05$

n.s.= não significante; *Significantemente diferente ($p < 0,05$)

E. COMPRIMENTO VÉRTICE-SACRAL FETAL

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, entre os Grupos Ea e DFEa (Tabela 52; Gráficos 74, 75 e 76).

Tabela 52 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Comprimento Vértice-Sacral Fetal (cm)	Grupos		Valor de p
	Ea	DFEa	
Machos	2,4 ± 0,18	1,9 ± 0,14*	p<0,05
Fêmeas	2,3 ± 0,22	1,8 ± 0,15*	p<0,05
Ambos	2,4 ± 0,23	1,9 ± 0,15*	p<0,05

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente ($p < 0,05$)

Gráfico 74 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre machos dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).
*Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 75 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre fêmeas dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).
*Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 76 – Comprimento vértice-sacral (cm) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

F. PESO CORPÓREO FETAL

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, entre os Grupos Ea e DFEa (Tabela 53; Gráficos 77, 78 e 79).

Tabela 53 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos, entre fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Peso Corpóreo Fetal (g)	Grupos		Valor de p
	Ea	DFEa	
Machos	1,31 ± 0,15	0,82 ± 0,16*	$p < 0,05$
Fêmeas	1,19 ± 0,22	0,73 ± 0,12*	$p < 0,05$
Ambos	1,23 ± 0,19	0,78 ± 0,14*	$p < 0,05$

Valores apresentados como média ± desvio-padrão

*Significantemente diferente ($p < 0,05$)

Gráfico 77 – Peso corpóreo (g) fetal entre machos dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 78 – Peso corpóreo (g) fetal entre fêmeas dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 79 – Peso corpóreo (g) fetal entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).
*Significantemente diferente ($p < 0,05$).

G. DIÂMETRO PLACENTÁRIO

Não houve diferença estatística quando comparado o diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, entre os Grupos Ea e DFEa (Tabela 54).

Tabela 54 – Diâmetro (cm) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Diâmetro Placentário (cm)	Grupos		Valor de p
	Ea	DFEa	
Machos	0,8 ± 0,06	0,7 ± 0,10	n.s.
Fêmeas	0,7 ± 0,07	0,7 ± 0,08	n.s.
Ambos	0,7 ± 0,08	0,7 ± 0,09	n.s.

Valores apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

n.s.= não significante

H. PESO PLACENTÁRIO

Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado o peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, entre os Grupos Ea e DFEa (Tabela 55; Gráficos 80, 81 e 82).

Tabela 55 – Peso (g) placentário entre fetos machos, entre fetos fêmeas e entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Peso Placentário (g)	Grupos		Valor de p
	Ea	DFEa	
Machos	0,12 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,01*	$p < 0,05$
Fêmeas	0,10 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,02*	$p < 0,05$
Ambos	0,10 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,02*	$p < 0,05$

Valores apresentados como média $\pm$ desvio-padrão

*Significantemente diferente ($p < 0,05$)

Gráfico 80 – Peso (g) placentário entre fetos machos dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 81 – Peso (g) placentário entre fetos fêmeas dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Gráfico 82 – Peso (g) placentário entre todos os fetos vivos, machos e fêmeas, dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

I. NÚMERO DE FETOS MACHOS E FÊMEAS

Não houve diferença estatística ao comparar o número de fetos machos entre os Grupos Ea e DFEa, mas houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao comparar o número de fetos fêmeas entre esses dois grupos (Tabela 56; Gráfico 83).

Tabela 56 – Número de fetos machos e número de fetos fêmeas dos Grupos Ea (Etanol alta dose) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose).

Número de Fetos Vivos	Grupos		Valor de p
	Ea	DFEa	
Machos	46	31	n.s.
Fêmeas	53	31*	$p < 0,05$

n.s.= não significante; *Significantemente diferente ($p < 0,05$)

Gráfico 83 – Média de fetos vivos fêmeas entre os Grupos Ea (Etanol alta dose: Média= 8,83; Desvio Padrão= 3,06) e DFEa (Deficiência de Folato e Etanol alta dose: Média= 5,17; Desvio Padrão= 1,84). *Significantemente diferente ($p < 0,05$).

Discussão

As propriedades teratogênicas do etanol têm sido firmemente estabelecidas na literatura clínica e experimental (RANDALL, 1987; U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICE, 1990). Pesquisas com animais têm contribuído sensivelmente para o conhecimento atual sobre a extensa série dos efeitos deletérios do etanol no crescimento e desenvolvimento fetal. Em particular têm fornecido evidências claras do potencial teratogênico do etanol por controlar os numerosos fatores que normalmente estão associados ao seu uso, tais como desnutrição, condições ambientais precárias, doenças, fumo e outras drogas. Estudos conduzidos com animais de laboratório levam em conta o controle rigoroso de variáveis, tais como dose da exposição, padrão de consumo e duração do insulto farmacológico que têm relação com o estágio de desenvolvimento embrionário/fetal (BECKER, 1996; BECKER et al., 1994). Esse controle tem levado a um melhor entendimento da relação entre exposição fetal ao etanol e suas conseqüências teratogênicas.

A validade geral dos modelos animais é marcada pelo fato de que a maioria dos efeitos deletérios da exposição pré-natal ao etanol observados em animais, tem sido identificada em mulheres que consumiram álcool durante a gestação (DRISCOLL; STREISSGUTH; RILEY, 1990).

Este estudo mostrou adequação para os objetivos pretendidos na medida em que as matrizes de todos os grupos tiveram desenvolvimento esperado, apresentaram acasalamento com identificação do momento da fecundação e gestação 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 estatisticamente significativa entre os grupos que receberam ração comercial, o que era esperado, pois a separação dos animais nos Grupos C, Eb e

Ea, foi determinada apenas no 7º dia gestacional, quando as doses de etanol ou salina foram administradas.

Devido ao fato dos Grupos DF, DFEb e DFEa estarem em experimento desde o dia 0 da prenhez poderiam estar sujeitos a alterações na implantação embrionária, como ocorreu com 9 das 10 fêmeas rejeitadas por falha que foi considerada como sendo na fecundação. Essa falha pode muito bem ter sido no processo de implantação. No entanto, não foi observada diferença estatística em relação ao número de implantes entre os grupos que receberam dieta isenta de ácido fólico. Em adição, na literatura consultada não foram encontradas informações sobre uma possível interferência do quimioterápico sulfatiazol na fixação dos embriões na parede uterina.

No Experimento 1 do presente estudo, o Grupo Eb recebeu etanol equivalente a 28g/Kg de peso corpóreo no humano, uma dose que corresponde aproximadamente a duas latas de cerveja, enquanto que o Grupo Ea recebeu uma dose alta suficiente para os camundongos ficarem desacordados.

A ação deletéria do etanol utilizado por um curto período no início da gestação das matrizes do Experimento 1 pôde ainda ser demonstrada pela morte fetal tardia, cujos resultados mostraram que houve diferença estatística altamente significativa para o Grupo Ea quando comparado aos Grupos C e Eb. A morte fetal tardia é caracterizada pela presença de um feto, bem formado ou não, cuja morte ocorreu próxima do momento do nascimento. Sabe-se que esse tipo de morte perinatal é um evento comum mesmo na espécie humana (KIELY; PANETH; SUSSER, 1986; NAEYE, 1983), dependente de diversas condições, sejam maternas, placentárias ou fetais. Esse evento, portanto, é esperado em qualquer grupo. No presente estudo, pode-se assumir que a

morte perinatal observada nas matrizes que receberam ração comercial estava associada à dose alta de etanol, pois dose baixa de etanol não interferiu com a sobrevivência fetal.

De acordo com a literatura (DUNTY et al., 2001; KOTCH; SULIK, 1992; PADMANABHAN; HAMEED, 1988; PADMANABHAN; IBRAHIM; BENER, 2002; RIBEIRO et al., 2006), e também com os resultados obtidos no presente estudo, o etanol é capaz de induzir alterações no desenvolvimento fetal e placentário e produzir defeitos de fechamento do tubo neural isolado ou associado com ausência de fusão dos processos maxilares, mandibulares e frontonasal, gastrosquise e agenesia de membros e cauda mesmo com a utilização de ração comercial. Em nível celular o etanol perturba os processos básicos do desenvolvimento, incluindo interferência com a divisão e proliferação, crescimento celular e diferenciação e a migração de células em amadurecimento (LAEV et al., 1995). Além disso, esta exposição afeta o desenvolvimento de vários sistemas, incluindo o sistema músculo-esquelético, cardiovascular e sistema nervoso central e periférico (GUERRI, 1998).

Foi observada restrição do crescimento intra-uterino (RCIU) traduzida por menor comprimento vértice-sacral e menor peso corpóreo fetal apenas para o Grupo Ea, quando comparado ao Grupo C, apesar da administração de etanol ter sido feita em apenas três dias da gestação. Este efeito é também visto no ser humano, pois sabe-se que o etanol, um dos teratógenos humanos mais prevalentes, tem maior efeito no momento correspondente à terceira semana da gestação, período correspondente àquele em que foi administrado às matrizes neste estudo. Isto é particularmente preocupante, visto que muitas mulheres não estão cientes de sua gravidez. Aquelas que têm esse

conhecimento, muitas vezes não compreendem que beber socialmente em estágio tão precoce da gravidez pode ser tão deletério para o embrião quanto beber exagerada e constantemente (KOREN; KOREN; CLADSTONE, 1996; SULIK; JOHNSTON; WEBB, 1981).

Conforme observado no Grupo C, os fetos machos eram maiores e mais pesados do que os fetos fêmeas. Na presença de etanol, Grupos Eb e Ea, essa diferença continuou a existir, indicando que a ação deletéria desse teratígeno foi capaz de interferir de forma semelhante no desenvolvimento fetal dos dois sexos.

O diâmetro e o peso placentário no Grupo Ea também estavam reduzidos quando comparados aos Grupos Eb e C. Esse fato pode ser explicado pela ação do etanol que, como outros agentes químicos, é capaz de ocasionar danos estruturais na placenta e reduzir assim seu tamanho e seu peso (NOMURA; HATA; KUSAFUKA, 1990). Além disso, mais uma vez a ação do etanol mostrou ser dose-dependente, pois entre dose baixa e controle não ocorreu diferença para esses parâmetros.

A diminuição no tamanho e peso placentário pode ocorrer por uma necrose devido a embolia vascular, modificando a perfusão uterina e transferência placentária. A redução do fluxo sangüíneo útero-placentário afetaria primeiro a placenta, pois este é o primeiro órgão a ser exposto a insuficiente entrega de oxigênio e nutrientes. Além disso, é óbvia sua diminuição de tamanho para a sua adaptação. Esta diminuição no tamanho placentário pode reduzir a transferência de oxigênio e nutrientes e a produção de fatores de crescimento pela placenta (LANG et al., 2003).

Para o feto, o problema pode ser agravado pela interferência do álcool no transporte de nutrientes através da placenta (FISHER; KARL, 1988) e na

redução da atividade do saco gestacional dos roedores (WYNTER et al., 1983), que é análogo ao sinciotrofoblasto em humanos (WENDELL-SMITH; WILLIAMS, 1984). Certamente, o potencial para um bom nível nutritivo está comprometido no alcoolismo devido à redução da absorção e utilização de muitos nutrientes e também pela alta taxa de excreção e metabolismo (LIEBER, 1983), essas alterações podem afetar diretamente no bem estar do embrião em desenvolvimento (DEVGUN et al., 1981; MCLARDY, 1975), conforme demonstrado no presente estudo pelo menor peso dos fetos, caracterizando restrição do crescimento intra-uterino.

O período pré-organogênico do desenvolvimento embrionário no camundongo constitui os seis primeiros dias da gestação (da fertilização até a implantação). Esse período corresponde a aproximadamente às duas primeiras semanas da gravidez humana. Esse estágio da embriogênese é iniciado pela fertilização e a formação resultante de um zigoto. O conceito entra então em período de clivagem, marcada por uma sucessão rápida de divisões mitóticas na qual o tamanho do embrião não muda, mas o tamanho das células divididas (blastômeros) diminui em cada divisão. Pelo terceiro dia da gestação, o conceito aparece como uma mórula, ou massa esférica sólida de blastômeros. Pelo quarto dia do desenvolvimento, alguns blastômeros tornam-se internalizados enquanto outros formam uma camada ao redor dos primeiros. Isso marca o estágio da blastulação, ou a formação de um blastocisto (blástula). O blastocisto é caracterizado como um corpo esférico vazio, com uma camada exterior de células (blastoderme) circundando uma cavidade (blastocelo). As células envolvidas tornam-se a camada trofoblástica, que é fundamental para a fixação do embrião na parede uterina (nidação), que começa aproximadamente quatro dias após a fertilização. Como o embrião está sendo

implantado na parede uterina, o blastocisto sofre o processo de gastrulação, durante o qual três camadas germinativas são formadas: endoderma, mesoderma e ectoderma. A superfície da massa celular próxima à blastocèle divide-se para fora e forma o endoderma e as células restantes formam o ectoderma. O mesoderma é a última camada de células germinativas a ser formada no embrião de camundongo (BECKER; GRANADOS; RANDALL, 1996).

Os efeitos do etanol durante a fase de pré-implantação da gravidez não têm sido muito estudados. Padmanabhan e Hameed (1988) administraram etanol a camundongos durante essa fase, no dia 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 da gestação. Interessantemente, o etanol não influenciou no número de implantes, mas houve um aumento acentuado na mortalidade pré-natal (reabsorção). Além disso, a exposição ao etanol durante esse período da gestação produziu malformações em 80% a 100% dos fetos viáveis. Com esse aumento na incidência de anomalias estruturais, a exposição ao etanol em cada um dos seis primeiros dias da gestação foi associada com aumento no peso da placenta, diminuição do cordão umbilical e redução do peso fetal. Embora seja um pouco surpreendente que tal exposição precoce foi capaz de produzir malformações (craniofacial, olhos, urogenital e membros) na prole afetada, esses resultados sugerem que a exposição ao etanol durante o estágio de pré-implantação da gravidez pode ser teratogênica e letal.

O período organogênico do desenvolvimento no camundongo corresponde do sétimo ao décimo quarto dia gestacional, o qual corresponde de três a oito semanas da gravidez humana. Esse período é marcado pela subdivisão progressiva das camadas germinativas, resultando no princípio da diferenciação dos órgãos. Portanto esse estágio da gravidez pode representar um período particularmente sensível a qualquer insulto teratogênico (BECKER;

GRANADOS; RANDALL, 1996). Na maioria dos estudos, a administração de etanol durante essa fase da gravidez resultou em aumento dose-dependente na mortalidade pré-natal, diminuição do crescimento fetal e um aumento na incidência de malformações de uma forma geral (BECKER; GRANADOS; RANDALL, 1996). Essas alterações também foram evidenciadas no presente estudo, que encontrou maior número de mortes intra-uterinas, restrição de crescimento intra-uterino mais acentuada e malformações nos grupos que receberam uma quantidade mais alta de etanol quando comparados aos que receberam dose mais baixa dessa droga.

Seguinte ao período de organogênese, os órgãos principais formados entram em um período de crescimento e diferenciação histológica. Esse período pós-organogênico no camundongo abrange do décimo quinto ao décimo oitavo (ou nascimento) e corresponde a aproximadamente de nove a vinte e seis semanas da gravidez humana. Durante esse estágio de desenvolvimento, os órgãos crescem em tamanho e volume e tornam-se maduros, com capacidade para funcionar, além disso é intenso o desenvolvimento do sistema nervoso central. Por consequência, exposição ao etanol durante essa fase tipicamente não resulta em dano morfológico grosseiro, mas sim em retardo do crescimento e anomalias estruturais do encéfalo, que são manifestadas como anormalidades comportamentais. Infelizmente poucos estudos têm investigado os efeitos da exposição aguda ao etanol durante a última fase da prenhez em camundongos (BECKER; GRANADOS; RANDALL, 1996).

No Experimento 1, como foi alta a dose de etanol administrada ao Grupo Ea, mesmo com ração normal ela foi capaz de reduzir a quantidade de folato sérico e levar à anemia, como observado nos exames sorológicos e hematológicos realizados neste estudo, mostrando o efeito agudo do etanol. Esse fato pode

explicar o aparecimento de fetos com anomalias congênitas apenas nesse grupo quando comparado aos Grupos C e Eb (PADMANABHAN; IBRAHIM; BENER, 2002).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que o sistema nervoso central (SNC) em desenvolvimento é sensível e vulnerável aos efeitos nocivos da exposição aguda e/ou crônica ao etanol (SHETTY; PHILLIPS, 1992; WEST; GOODLETT, 1990). O estágio de desenvolvimento no qual ocorre a exposição e a formação genética fetal/materna parecem determinar o tipo resultante e a severidade das anormalidades do SNC (PADMANABHAN; WASFI; CRAIGMYLE, 1994). Por exemplo, exposição de camundongos prenhes a doses agudas de etanol em estágios de pré-fechamento do tubo neural resulta em exencefalia, cuja patogênese envolve o neuroepitélio e células pré-migratórias da crista neural (CARTWRIGHT; SMITH, 1995), enquanto o tratamento durante a segunda metade da gestação e durante o início do período pós-natal, prejudica a proliferação, a migração e a diferenciação neuronal no hipocampo e cerebelo (SHETTY; PHILLIPS, 1992).

A ação nociva do etanol no desenvolvimento do SNC tem como resultado a interferência com a elevação das pregas neurais e sua subsequente fusão, que requerem crescimento ótimo do mesoderma paraxial. Estudos experimentais em estágio primitivo de embriões de galinha (SANDERS; CHEUNG; MAHMUD, 1987) e em estágio comparável de embriões de camundongo (NAKATSUJI; JOHNSON, 1984) indicam que o álcool pode diminuir a velocidade na taxa de migração das células do mesoderma. Adicionalmente, a elevação retardada das pregas neurais e aumento na morte celular no neuroepitélio, crista neural e mesênquima do arco branquial de embriões de camundongo tratados com

etanol têm sido relatado, sugerindo inibição dos movimentos morfogênicos como um significativo efeito teratogênico do etanol (PADMANABHAN; WASFI; CRAIGMYLE, 1994).

Os mecanismos moleculares dos efeitos teratogênicos do etanol, no entanto, são pouco compreendidos, com poucas publicações relacionadas com esta questão. Grande parte dos estudos apresentada foi realizada *in vitro* e, por isso, a extrapolação desses dados para situação *in vivo* é complicada (PADMANABHAN; IBRAHIM; BENER, 2002).

Entre os efeitos celulares considerados estão os efeitos diretos nas membranas resultando em passagem excessiva de fluidos (DANIEL; EVANS, 1982), atividade da peroxidase aumentada (DREOSTI, 1984), interferência com componentes do citoesqueleto (HASSLER; MORAN, 1986), taxa de divisão celular reduzida (WEBSTER, 1988), alterações na síntese do DNA, na síntese de proteínas, no transporte de aminoácidos, na sinalização celular (SHIBLY; PENNINGTON, 1997), nas propriedades físico-químicas da membrana plasmática e de muitos componentes celulares e neuroquímicos essenciais para o desenvolvimento do encéfalo (GUERRI, 1998). Alterações na síntese de DNA, redução na taxa de proliferação celular e diminuição na síntese de proteínas são propostos por serem os principais mecanismos teratogênicos. Isso poderia explicar o porquê no presente estudo a dose alta de etanol com ração comercial induziu RCIU e malformações congênitas (DFTN, gastrosquise, anomalias faciais, de membros e cauda), o oposto da baixa dose, que não interferiu com o desenvolvimento fetal.

A ocorrência de DFTN é mais comum no sexo feminino em seres humanos (ELWOOD; ELWOOD, 1980) e em fêmeas de camundongo (COPP et al., 1990;

HARRIS; JURILOFF, 1997). Esses achados são semelhantes aos dados encontrados no presente estudo, no qual dos seis casos de DFTN isolado dois eram machos e quatro eram fêmeas, assim como os dois fetos acometidos por DFTN associado com ausência de fusão dos processos maxilares, mandibulares e frontonasal.

Malformações das extremidades ou de parte delas são variadas em sua manifestação, desde a ausência de uma simples estrutura até a ausência parcial ou completa dos membros. Elas podem ocorrer como malformações primárias localizadas ou defeitos secundários, usualmente em associação com distúrbios de desenvolvimento de outros sistemas (SZABO, 1989a). Defeitos na cauda de camundongos são altamente variáveis, vão desde uma estrutura delgada torcida, ou duplicada, ou reduzida no comprimento até a ausência completa. Há evidências de influência genética na indução de defeitos na cauda e nos membros pela presença de um simples gene recessivo (SISKEN; GLUECKSOHN-WAELSCH, 1959). A agenesia de membros é caracterizada pela redução e curvatura dos ossos longos, principalmente do humero, fêmur, rádio e tíbia e pela ossificação retardada do esqueleto dos membros. Pode ocorrer também fusão femural, acompanhada de outras alterações, como por exemplo, anormalidades intestinal, ausência da adrenal, rins e órgãos genitais, conforme aconteceu nesse estudo, onde os fetos com agenesia de membro e cauda não puderam ter o sexo identificado devido ausência desses órgãos (HOORNBEEK, 1970).

A gastrosquise é o tipo mais acentuado de defeito abdominal, no qual o conteúdo visceral do abdômen está herniado devido ao fechamento incompleto da parede abdominal (SZABO, 1989b). Essa é uma má formação verdadeira,

que pode ser influenciada por alterações vasculares ou, no presente caso, mais provavelmente pela redução da proliferação celular ou aumento da apoptose. Pode ser acompanhada por atresia ou ectopia intestinal. A ocorrência espontânea da gastrosquise é rara (PASQUET, 1974) e por isso seu aparecimento em um feto do Grupo Ea provavelmente surgiu em decorrência da ação deletéria do etanol em associação com a deficiência de folato induzida por ele.

Em relação ao ganho ponderal diário das matrizes durante a gestação, nos grupos do Experimento 1 foi observada redução no peso das matrizes do Grupo Ea em relação as matrizes dos Grupos C e Eb, apenas durante os dias em que essas receberam as injeções de etanol, ou seja, entre o sétimo e nono dia gestacional. Essa diferença provavelmente ocorreu porque após a administração do etanol elas permaneceram um bom tempo desacordadas.

Além do fato acima citado, deve se levar em consideração que o etanol afeta sinais de transdução ativados por hormônios e neurotransmissores, levando a mudanças de curto prazo na regulação das funções celulares e a mudanças de longo prazo na expressão de genes. Quase todos os alvos patofisiológicos importantes para o etanol nas células neurais parecem ser proteínas específicas de membrana que mediam sinais de transdução (FRANKS; LIEB, 1994). Nem todas as proteínas de membranas são afetadas, mas alguns sinais de transdução em cascata são altamente sensíveis (DIAMOND; GORDON, 1997). Tais mudanças no encéfalo, provavelmente são responsáveis pelos eventos neurológicos alterados relacionados ao alcoolismo. Em adição, vulnerabilidade genética também desempenha um importante papel nos efeitos deletérios do etanol.

Observações experimentais indicam que os efeitos tóxicos do etanol não são

uniformes. Dependendo da concentração do álcool no sangue, algumas regiões do encéfalo, especialmente as zonas proliferativas ventricular e subventricular são mais afetadas do que outras e até mesmo dentro de uma determinada região algumas populações celulares são mais vulneráveis do que outras (GUERRI, 1998; MILLER, 1993).

Os efeitos nocivos do etanol sobre o desenvolvimento fetal têm recebido atenção crescente e ainda assim há um uso abusivo desta substância pelas jovens, muitas vezes desconhecendo que estão grávidas. A dose de etanol deve ser ainda mais crítica quando uma outra condição comum na população em geral, principalmente na fase reprodutiva, ocorre, tal como a deficiência de folato. Os resultados obtidos em experimentos animais podem indicar o quanto estas influências ambientais repercutem sobre a gestação e o desenvolvimento fetal.

O abuso de etanol freqüentemente leva ao desenvolvimento de deficiência de vitaminas, sendo que a deficiência de folato é uma das mais comuns (CARRERAS; VAZQUEZ; RUBIO, 1994; TAVARES et al., 1999), além disso, interfere com seu transporte, com sua absorção e com seu metabolismo (COLLINS; EISENGA; BHANDARI, 1992; REISENAUER et al., 1989). Dessa forma, a deficiência de folato é comum entre os indivíduos que consomem álcool (HALSTED et al., 1996), em especial durante a gestação, período durante o qual aumenta a necessidade dessa molécula, uma vez que as células estão em intensa divisão e multiplicação (CRANDALL et al, 1995; KEEN; ZIDENBERG-CHERR, 1994).

O ácido fólico é necessário para a síntese de purina e pirimidina, precursores dos ácidos nucléicos, para o metabolismo de vários aminoácidos,

incluindo homocisteína, e para o início da síntese protéica nas mitocôndrias (BLAKLEY; WHITEHEAD, 1986). Um suprimento adequado de folato é, portanto, necessário para a saúde e bem-estar. Isso é manifestado pela variedade de anormalidades clínicas resultantes da deficiência de folato que incluem anemia e restrição do crescimento intra-uterino e pelos efeitos protetores que resultam da suplementação com ácido fólico, como por exemplo, a prevenção de defeitos de fechamento do tubo neural (BIRD; SWENDSEID; WITTE, 1995; WERLER; SHAPIRO; MITCHELL, 1993). A deficiência de folato é altamente prevalente em todo o mundo (ZIMMERMAN, 1990) e no hemisfério ocidental freqüentemente ocorre como resultado de um dano no processo de absorção intestinal dessa vitamina (CORCINEO; REISENAUER; HALSTED, 1976; HALSTED; REISENAUER; ROMERO, 1977).

Modelos animais têm sido desenvolvidos para promover a deficiência de ácido fólico durante a gravidez (CHRISTENSEN; ROSENBLATT, 1995) e têm demonstrado que a diminuição dessa vitamina produz mortes intra-uterinas (NELSON; EVANS, 1947; TAGBO; HILL, 1976; THENEN, 1991), diminuição do peso fetal, retardo de crescimento (MILLER; PRATTEN; BECK, 1989; NELSON; ASLING; EVANS, 1952), anormalidades craniofaciais (NELSON et al., 1986), defeitos cardiovasculares, defeitos de fechamento do tubo neural (MOFFA; WHITE, 1983; NELSON et al., 1955) e muitas outras anormalidades congênitas.

Animais deficientes de folato apresentam redução da fertilidade (BURGOON et al., 2002; NELSON; EVANS, 1947), tornando difícil a condução de experimentos como este. Até a definição da metodologia empregada, testamos diferentes períodos de administração de dieta balanceada isenta de ácido fólico (28, 21, 14 e 7 dias), cujo resultado foi acentuada anemia, baixa fertilidade e grande mortalidade materna,

motivo pelo qual optou-se por introduzir a dieta isenta de ácido fólico no dia 0 da gestação, garantindo assim o acasalamento e a manutenção da gestação até o final do experimento. Esse período de administração da dieta foi suficiente para induzir deficiência de ácido fólico nos animais do Experimento 2, confirmada por exames clínico, sorológico e hematológico realizados ao longo do experimento, e adequada uma vez que a dieta depletada de folato foi produzida de forma balanceada e apresentou todos os demais nutrientes em quantidades recomendadas pelo Instituto Americano de Nutrição (AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION, 1977; REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). Além disso, a metodologia utilizada foi apropriada para evitar a coprofagia, que está aumentada durante a gestação (EBINO et al., 1988), e a produção de ácido fólico pela ação das bactérias da flora intestinal (BURGOON et al., 2002; CRACIUNESCU et al., 2004).

Nos grupos do Experimento 2, foram verificadas morte fetal tardia e reabsorção, decorrente da morte fetal precoce. Ambas apresentaram diferença estatística altamente significativa para os Grupos DFEB e DFEBa quando comparados ao Grupo DF e também quando comparados entre si, estando em maior número no grupo de alta dose. Além disso, os Grupos DFEB e DFEBa apresentaram um maior número dessas mortes quando comparados aos Grupos EB e Eba, respectivamente. Com relação ao número de reabsorção, também foi estatisticamente maior no Grupo DF em comparação ao Grupo C (BURGOON et al., 2002). Após a morte, o feto sofre autólise progressiva e, posteriormente, reabsorção, restando apenas a placenta. Essa, por ser irrigada pelo sangue materno, permanece viável após a morte fetal por um período, servindo para se determinar o número de implantes.

Foi observada RCIU, traduzida por menor comprimento vértice-sacral e

menor peso corpóreo, para os Grupos DFEB e DFEa quando comparados ao Grupo DF, mostrando que na deficiência de folato, novamente a ação do etanol tem um efeito deletério mais acentuado, uma vez que dose baixa também foi capaz de induzir RCIU. Além disso, a diferença de crescimento fetal foi maior nos Grupos DFEB e DFEa quando comparados aos Grupos Eb e Ea, respectivamente. Como a deficiência de folato leva a uma redução da síntese de ácidos nucleicos, se o embrião recebe um insulto teratogênico, como por exemplo a exposição ao etanol, ele pode não ser capaz de reparar os danos com sucesso e então sofre alterações em seu desenvolvimento (SHUM; SADLER, 1988). O atraso do desenvolvimento fetal nos Grupos DF, DFEB e DFEa, poderia também estar relacionado a insuficiência placentária. Por causa do rápido crescimento da placenta, essa é suscetível ao retardo de crescimento como resultado da deficiência de folato (INSTITUTE OF MEDICINE, 1990), como foi também demonstrado pelos nossos resultados.

Diferente do que ocorreu nos grupos do Experimento 1, nos quais os fetos machos eram maiores e mais pesados que os fetos fêmeas, nos grupos do Experimento 2 não houve diferença para esses parâmetros, indicando, portanto, que, de alguma forma, na deficiência de folato os machos foram mais afetados em relação ao seu comprimento vértice-sacral e peso corpóreo do que as fêmeas. Na literatura consultada não foram encontrados estudos experimentais que pudessem explicar esse achado.

Estudos mostraram que fêmeas adultas, cujas mães receberam etanol na gestação, são mais suscetíveis aos efeitos da exposição pré-natal ao etanol (NELSON et al., 1986; LAM et al., 2000; WEINBERG, 1988). Wilcoxon et al. (2003) descreveram um modelo que seguiu este mesmo padrão de dimorfismo sexual. As

fêmeas adultas de ratas que receberam etanol no período pré-natal mostraram hipertrofia do ventrículo esquerdo cardíaco enquanto os machos nas mesmas condições, não. Isso pode explicar porque o número de fetos fêmeas foi menor nos Grupos DFEB e DFEa quando comparados aos Grupos Eb e Ea, respectivamente. Além disso, nos Grupos DFEB e DFEa o número de reabsorção e morte fetal tardia foi muito maior do que nos Grupos Eb e Ea, respectivamente. Essas mortes intra-uterinas poderiam muito bem ser na sua maioria fetos fêmeas, que são mais vulneráveis aos efeitos tóxicos de teratógenos, como o etanol, do que os machos (WOLLSCHLAEGGER et al., 1999).

Em adição, no Experimento 2 o diâmetro e o peso placentário estavam reduzidos nos Grupos DFEB e DFEa quando comparados ao Grupo DF. Conforme ocorreu em relação ao desenvolvimento fetal (SHUM; SADLER, 1988), na deficiência de folato a ação do etanol teve um efeito deletério mais acentuado, uma vez que dose baixa também foi capaz de induzir restrição do desenvolvimento placentário. Além disso, o crescimento placentário foi menor nos Grupos DFEB e DFEa quando comparados aos Grupos Eb e Ea, respectivamente, assim como no Grupo DF em relação ao Grupo C.

Um estudo realizado por Iyengar e Rajalakshmi (1975) revelou que na Índia, mulheres que receberam suplementação com folato apresentaram placentas com maior quantidade de DNA e proteínas e com maior peso quando comparadas ao grupo não suplementado. Os descendentes das mulheres sem suplementação tiveram peso mais baixo, semelhante ao que aconteceu no presente trabalho. Em outro estudo, mulheres com baixo nível de folato no soro também tiveram placentas menores e mais leves e seus filhos apresentaram baixo peso ao nascer quando comparadas com aquelas que receberam

suplementação de folato (ROLSCHAU; DATE; KRISTOFFERSEN, 1979).

Sob a ação de teratógenos freqüentemente muitos fetos com anomalias morrem *in utero* (WILSON, 1973), por isso, embora nenhuma anomalia congênita tenha sido encontrada no Experimento 2, o fato de que 75,47% dos implantes dos Grupos DF, DFEb e DFEa, juntos, eram reabsorções (41,33%) e mortes fetais tardia (34,14%), indica que severas malformações estruturais estavam presentes nesses casos. Uma possível explicação para essa grande perda de embriões e fetos é o desenvolvimento cardiovascular anormal (TANG et al., 2004). Acredita-se que os Defeitos Cardíacos Congênitos (DCC) têm etiologia multifatorial (CARMICHAEL et al., 2003) com envolvimento de agentes ambientais, (como por exemplo, consumo de etanol durante a gestação, deficiência de ácido fólico, ou ambos) que interagem com fatores genéticos, resultando na expressão de fenótipos anormais.

Carmichael et al. (2003) observaram que o risco de defeito conotruncal nos descendentes estava moderadamente elevado entre mulheres que consumiram álcool durante o período periconcepcional e que o risco foi mais alto com um aumento da freqüência ou do número desse consumo.

A suplementação materna de ácido fólico é capaz de prevenir mais de 40% dos defeitos cardíacos em humanos (BOTTO et al., 1996; SHAW; WASSERMAN; LAMMER, 1995), demonstrando que essa vitamina é talvez o modulador ambiental mais importante do risco de DCC em humanos. Dado que o ácido fólico tem tal impacto no desenvolvimento, é um tanto surpreendente que o papel preciso da sua suplementação no desenvolvimento cardíaco permaneça não esclarecido (TANG et al., 2004).

O sistema cardiovascular está entre os primeiros maiores sistemas do organismo a funcionar durante o desenvolvimento dos mamíferos. O complexo

processo de desenvolvimento do coração começa com o mesoderma pré-cardiogênico, o qual é derivado de células da placa anterior lateral do mesoderma (PEREA-GOMES; RHINN; ANG, 2001). Durante a embriogênese normal, uma população distinta de células conhecidas como células cardíacas da crista neural é derivada das dobras neurais antes da fusão na região de desenvolvimento do rombencéfalo. Essas células migram ao longo de artérias do arco faríngeo caudal para chegar ao trato cardíaco e desenvolver as artérias do arco aórtico (BOOT; GROOT; VAN IPEREN, 2003; KIRBY; KUMISKI; MYERS, 1993). As células cardíacas da crista neural contribuem para a formação do tronco arterioso, o qual subsequente divide-se em artérias aorta e pulmonar. Essas células também desempenham um papel decisivo na formação da porção conotruncal do septo ventricular. Desde que o ápice conotruncal também participa na formação do septo interventricular, defeitos no fluxo do trato cardíaco são sempre acompanhados por um septo interventricular defeituoso (KIRBY; WALDO, 1995). No entanto, como os fetos foram recolhidos no final da gestação e já apresentavam-se autolizados não foi possível verificar se e quais anomalias estavam presentes. Para contornar esta dificuldade, outros estudos devem ser realizados promovendo-se a retirada dos fetos precocemente e submetendo-os a dissecação *in situ* ou inclusão prévia em parafina para obtenção de cortes histológicos.

Bioquimicamente, o ácido fólico atua como um cofator para muitas reações celulares importantes, incluindo a síntese de nucleotídeos e reações de transferência de grupos metil (MUDD; LEVY; SKOVBY, 1995). A deficiência de ácido fólico também é conhecida por inibir a taxa de proliferação de pró-eritroblastos, sugerindo que essa vitamina possa modular diretamente o ciclo celular (JACKSON et al., 1997). O desenvolvimento cardíaco correto requer interação precisa de vários

processos biológicos, incluindo indução, proliferação, migração e diferenciação dos cardiomiócitos (MARKWALD; FITZHARRIS; MANASEK, 1977; YA; VAN DEN HOFF; DE BOER, 1998). Portanto, uma alteração no transporte, na absorção ou na metabolização do folato leva a uma prematura morte celular e/ou inibição da proliferação celular dos precursores cardíacos, que resulta em produção insuficiente do número de células, gerando morfogênese anormal e conseqüentes defeitos cardiovasculares (BURGOON et al., 2002; TANG et al., 2004).

A observação de que alguns fetos na deficiência acentuada de ácido fólico têm um atraso no fechamento do septo conotruncal, também indica que o coração pode ser um órgão alvo para a deficiência dessa vitamina. Essa hipótese é suportada por estudos epidemiológicos que mostraram que a suplementação de folato, através de multivitaminas, reduz o risco de certas malformações cardíacas, incluindo os defeitos conotrunciais (BOTTO et al., 1996; SHAW et al., 1995). O atraso no desenvolvimento do coração sugere que as células da crista neural podem ser particularmente sensíveis à deficiência de ácido fólico.

O ácido fólico desempenha um papel essencial no desenvolvimento embrionário, incluindo o sistema nervoso central e o sistema cardiovascular (BURGOON et al., 2002), portanto, a diminuição do nível dessa vitamina no plasma está relacionada ao aumento de mortes intra-uterinas, diminuição do peso fetal e atraso no desenvolvimento, o que pôde ser observado no Grupo DF quando comparado ao Grupo C. Dessa forma, o crescimento e desenvolvimento normais dependem de uma quantidade adequada de ácido fólico para que ocorra uma seqüência ordenada e programada de diferenciação celular, organização e crescimento (TANG et al., 2004).

O ganho ponderal diário das matrizes durante a gestação nos grupos do

Experimento 2 foi reduzido nas matrizes dos Grupos DFEB e DFEa em relação às matrizes do Grupo DF, não apenas durante os dias em que essas receberam as injeções, mas também posteriormente e até o momento da eutanásia. A redução no ganho ponderal diário observada durante os dias em que as matrizes receberam as injeções de etanol provavelmente ocorreu porque após a sua administração os animais também permaneceram um bom tempo desacordados. A situação foi ainda agravada pelo estado de deficiência de ácido fólico, que normalmente por si só já é reponsável por um estado materno debilitado (SHAFFER, 1993). Dessa forma, dieta e nutrição materna estão entre os fatores ambientais que são apontados como possíveis teratógenos para a etiologia de alterações maternas e defeitos fetais para os quais a causa é desconhecida (CENTER FOR DISEASE CONTROL, 1989). Deficiência e excesso nutricional materno têm sido associados com certas malformações congênitas em vários estudos em animais e em seres humanos (SELLER, 1987; WORTHINGTON-ROBERTS; VERMEERCH; WILLIAMS, 1989).

A redução no ganho ponderal diário observada durante o período posterior a administração do etanol e até o momento da eutanásia pode ser explicado pela RCIU e pelo grande número de reabsorções e mortes fetais tardias nos Grupos DFEB e DFEa (PADMANABHAN; IBRAHIM; BENER, 2002). Além disso, as matrizes desses grupos não conseguem recuperar o ganho ponderal diário após o décimo dia, isso poderia ser explicado pelo fato de que o etanol interfere com o ácido fólico (COLLINS; EISENGA; BHANDARI, 1992; REISENAUER et al., 1989) e que durante a gestação aumenta a necessidade dessa molécula (CRANDALL et al, 1995; KEEN; ZIDENBERG-CHERR, 1994), com isso o folato

materno restante é desviado para o desenvolvimento fetal acarretando na incapacidade da matriz em recuperar seu peso e levando a anemia. No entanto, a anemia resultante não é a única manifestação da diminuição da divisão celular, há também número menor de plaquetas e células brancas. Ocorre um impedimento da divisão celular relacionado ao papel do folato na síntese do ácido nucléico, processo que é mais aparente em tecidos que se renovam rapidamente, tais como no sistema hematopoiético e nas células do trato digestivo (LINDENBAUM; ALLEN, 1995).

Em adição, a alteração da ingestão de folato possui efeito real na integridade de certos genes supressores de tumores que estão envolvidos no desenvolvimento do câncer colorretal. Por exemplo, sabe-se que uma dieta deficiente em folato para animais é suficiente para produzir espaços na cadeia de DNA que possui o código do gene p53, um gene supressor cuja perda de função implica em 80% dos casos de câncer colorretal (KIM; POGRIBNY; BASNAKIAN, 1997). Sob condições experimentais, tais espaços no DNA promovem a transformação de células em um fenótipo neoplástico. Também demonstrou-se que a deficiência de folato, que impede a síntese de timidina, resulta na incorporação inapropriada do seu precursor, a uridina, no DNA (BLOUNT; MACK; WEHR, 1997). Este é um outro meio pelo qual um DNA danificado surge pela falta de folato e pode explicar como um nível de folato inadequado pode promover a carcinogênese.

De acordo com resultados obtidos no presente trabalho, pode-se afirmar que o etanol, na deficiência de ácido fólico, reduz o número de fetos vivos e aumenta a quantidade de reabsorção e de morte fetal tardia e na dieta normal produz maior número de morte fetal tardia. Adicionalmente, em ambas as condições o efeito do

etanol é dose dependente (BOEHM et al., 1997), pois no Experimento 1 o Grupo Ea apresentou fetos com anomalias congênitas, morte fetal tardia, redução do folato sérico e anemia, diferente do Grupo Eb que foi semelhante ao Grupo C. Por sua vez, no Experimento 2 o Grupo DFEa apresentou maior número de reabsorção e de morte fetal tardia, maior redução do folato sérico e anemia mais acentuada quando comparado ao Grupo DFEb.

Além disso, o etanol é capaz de interferir com o metabolismo do ácido fólico pelo aumento de sua excreção urinária, podendo causar conseqüente deficiência (MULDOON; MCMARTIN, 1994) e aumentar dessa forma a possibilidade de se obter um maior número de fetos com alterações morfológicas e do desenvolvimento.

O etanol interferiu negativamente com o folato nos animais do Experimento 2, pois além de produzir alterações clínicas, como alopecia, mudanças no aspecto e na coloração da pelagem, alteração da coloração dos olhos (opacos), corpo muito frio e trêmulo, redução na movimentação física e desequilíbrio corporal, agrava a redução de folato sérico e acentua a anemia. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que na deficiência de ácido fólico a ingestão de etanol, mesmo em dose baixa, é suficiente para reduzir o folato sérico. Além disso, nessa mesma condição, dose baixa de etanol leva a anemia, provavelmente como reflexo da redução do folato, interferindo com a proliferação celular na medula óssea (LINDENBAUM; ALLEN, 1995).

No presente estudo, o encontro de um grande número de reabsorções e mortes fetais tardias nos grupos que receberam ração sem ácido fólico e administração de etanol, portanto, indica a ocorrência de efeito nocivo decorrente da associação desses dois fatores. Dessa forma, a ação deletéria do etanol foi

gravemente intensificada pela deficiência de ácido fólico. Esse fato justifica a ausência de fetos com anomalias congênitas nesses grupos e explica porque houve um menor número de fetos vivos nos Grupos DFEB e DFEa quando comparados ao Grupo DF e aos Grupos Eb e Ea, respectivamente

Devido ao fato de que etanol e deficiência de ácido fólico, isoladamente, são capazes de produzir efeitos nocivos durante a gestação (CZEIZEL; DUDÁS, 1992; MRC VITAMIN STUDY RESEARCH GROUP, 1991; PADMANABHAN; IBRAHIM; BENER, 2002), a interferência no desenvolvimento fetal e placentário e a indução de um grande número de reabsorções e mortes fetais tardias nos Grupos DFEB e DFEa do Experimento 2, indica uma ação sinérgica de dois fatores isolados, etanol e deficiência de ácido fólico, e permite reforçar a noção do risco humano em condições semelhantes. Afinal, mulheres jovens tendem a apresentar mais deficiência de ácido fólico e estão mais expostas a comportamentos que levam ao consumo de etanol, sendo estas possíveis explicações para a alta frequência de anomalias congênitas, como por exemplo, DFTN, além das alterações no desenvolvimento fetal, traduzidas por tamanho e pés reduzidos, observadas em crianças afetadas por exposição pré-natal ao etanol e deficiência de ácido fólico simultaneamente.

DIETA COM ÁCIDO FÓLICO (EXPERIMENTO 1)

- 1- O efeito do etanol é dose-dependente;
- 2- Baixa dose de etanol não é capaz de interferir no desenvolvimento fetal e placentário, sendo semelhante ao controle;
- 3- Alta dose produz diversas alterações:
  - reduz a quantidade de folato sérico;
  - leva a anemia;
  - tem efeitos deletérios sobre fetos e placentas em ambos os gêneros, causando restrição do crescimento intra-uterino e placentário;
  - afeta fetos machos e fetos fêmeas de maneira semelhante, uma vez que a diferença entre eles permanece quando comparado o comprimento vértice-sacral e o peso corpóreo;
  - produz maior número de morte fetal tardia;
  - é capaz de induzir anomalias congênitas.
- 4- Todas as matrizes que recebem doses de etanol, baixa e alta, conseguem recuperar o ganho ponderal diário após o período de sua administração.

DIETA SEM ÁCIDO FÓLICO (EXPERIMENTO 2)

Deficiência de ácido fólico:

- 1- Leva a anemia;
- 2- Tem efeitos deletérios sobre fetos e placentas em ambos os gêneros, causando restrição do crescimento intra-uterino e placentário;
- 3- É mais nociva a fetos machos do que fêmeas, uma vez que não ocorre diferença entre eles quando comparado o comprimento vértice-sacral e o peso

corpóreo fetal e o peso placentário;

4- Produz maior número de reabsorção.

Associação da deficiência de ácido fólico e etanol:

1- Baixa dose é tão deletéria quanto alta dose;

2- Essa associação, tanto na baixa dose como na alta dose, apresenta-se mais nociva do que quando comparados esses dois fatores de forma isolada, indicando uma ação sinérgica:

- agrava a redução de folato;

- acentua a anemia;

- reduz o número de fetos vivos;

- os efeitos deletérios são bem mais acentuados sobre os fetos em ambos os gêneros e em suas placentas, causando restrição do crescimento intra-uterino e placentário;

- não induziu anomalias congênitas em função do número muito elevado de reabsorção e morte fetal tardia;

- ambos os gêneros sofrem os efeitos nocivos, sendo que para as fêmeas a associação parece ser mais prejudicial, já que o seu número é menor;

3- Todas as matrizes que recebem doses de etanol, baixa e alta, não conseguem recuperar o ganho ponderal diário após o décimo dia da gestação.

ABEL, E.L. An update on incidence of FAS: FAS is not equal opportunity birth defect. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.17, p.437-443, 1995.

ABEL, E.L.; SOKOL, R. A revised conservative estimate the incidence of FAS and its economic impact. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Hagenstown, v.14, n.4, p.514-524, 1991.

AMERICAN INSTITUTE OF NUTRITION (AIN). Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studeis. **J. Nutr.**, Bethesda, v.107, p.1340-1348, 1977.

BAILEY, L.B.; GREGORY, J.F. Folate metabolism and requirements. **J. Nutr.**, Bethesda, v.129, p.779-782, 1999.

BARBER, R.C.; LAMMER, E.J.; SHAW, G.M.; GBEER, K.A.; FINNELL, R.H. The role of folate transport and metabolism in neural tube defect risk. **Mol. Genet. Metab.**, v.66, p.1-9, 1999.

BEARER, C.F.; EMERSON, R.; HARM, L. Fatty acid ethyl esters in peripheral blood. **Pediatr. Res.**, v.31, p.68A, 1992.

BEARER, C.F.; GOUL, D.S.; EMERSON, R.; KINNUNEN, P.; COOK, C.S. Fetal alcohol syndrome and fatty-acid ethyl-esters. **Pediatr. Res.**, v.31, p.492-495, 1992.

*Este trabalho foi elaborado de acordo com as Diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses da USP de 2004.

BEARER, C.F.; YAMASHITA, T.; LEE, S.C.; MINNES, S.; SINGER, L.T. Meconium FAEE and maternal ethanol use. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Hagenstown, v.21, p.119A, 1997.

BECKER, H.C. Effects of ethanol on the central nervous system: fetal damage neuro behavioral effects. In: DIETRICH, R.A.; ERWIN, V.G. (eds). **Pharmacological effects of ethanol on the nervous system**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p.409-442.

BECKER, H.C.; GRANADOS, J.L.D.; RANDALL, C.L. Teratogenic actions of etanol in the mouse: a minireview. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, New York, v.55, n.4, p.501-513, 1996.

BECKER, H.C.; RANDALL, C.L.; SALO, A.L.; SAULNIER, J.L. Animal research: Charitng the course for FAS. **Alcohol Health Res. World**, v.18, p.10-16, 1994.

BIRD, C.L.; SWENDSEID, M.E.; WITTE, J.S. Red cell and plasma folate, folate consumption, and the risk of colorectal adenomatons polyps. **Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v.4, p.709-714, 1995.

BLAKLEY, R.L.; WHITEHEAD, V.A. **Folates and pterins**: nutritional, pharmacological and physiological aspects. New York: Wiley, 1986. v.3.

BLOUNT, B.C.; MACK, M.M.; WEHR, C.M. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.3290-3295, 1997.

- BOEHM, S.L.; LUNDAHL, K.R.; CALDWELL, J.; GILLIAM, D.M. Ethanol teratogenesis in the C57BL/6J, DBA/2J, and A/J inbred mouse strains. **Alcohol.**, v.14, n.4, p.389-395, jul/aug. 1997.
- BOOT, M.J.; GROOT, A.C.G.; VAN IPEREN, L. Spatiotemporally separated cardiac neural crest subpopulations that tagert the outflow tract septun na pharyngeal arch arteries. **Anat. Rec.**, Philadelphia, v.275A, p.1009-1018, 2003.
- BOTTO, L.D.; KHOURY, M.J.; MULINARE, J.; ERICKSON, J.D. Periconceptional multivitamin use and the occurrence of conotruncal heart defects: results from a population based, case-control study. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v.98, p.911-917, 1996.
- BOUSHEY, C.; BERESFORD, S.; OMENN, G. A quantitative assesment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.274, p.1049-1057, 1995.
- BURGOON, J.M.; SELHUB, J.; NADEAU, M.; SADLER, T.W. Investigation of theeffects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. **Teratology**, New York, v.65, p.219-227, 2002.
- CAI, L.; KOROPATNICK, J.; CHERIAN, M.G. Metallothionein protects DNA from copper-induced but not iron-induced cleavage in vitro. **Chem. Biol. Interact.**, v.96, p.143-155, 1995.

CANO, J.; AYALA, A.; MURILLO, M.L.; CARRERAS, O. Protective effect of folic acid against oxidative stress produced in 21 day postpartum rats by maternal-ethanol chronic consumption during pregnancy and lactation period. **Free Radic. Res.**, v.34, n.1, p.1-8, 2001.

CANO, J.; MURILLO, L.; DELGADO, J.; CARRERAS, O. Effects of ethanol and folic acid consumption during pregnancy and lactation on basal enzymatic secretion in the duodenal juice offspring rats. **Nutrition**, v.19, n.9, p.778-783, 2003.

CARMICHAEL, S.L.; SHAW, G.M.; YANG, W.; LAMMER, E.J. Maternal periconceptional alcohol consumption and risk for conotruncal heart defects. **Birth Defects Research (Part A)**, v.67, p.875-878, 2003.

CARRERAS, O.; VAZQUEZ, A.L.; RUBIO, J.M. Comparative effect of intestinal absorption of folic acid and methyltetrahydrofolic acid in chronic ethanol fed rats. **Ann. Nutr. Metabol.**, v.38, n.4, p.221-225, 1994.

CARTWRIGTH, M.M; SMITH, S.M. Increased cell death and reduced neural crest cell numbers in ethanol-exposed embryos: Partial basis for the fetal alcohol syndrome phenotype. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Hagenstown, v.19, p.378-86, 1995.

CASTILLA, E.E.; ORIOLI, I.M.; LOPEZ-CAMELO, J.S.; DUTRA, M.D.A.G.; NAZER-HERRERA, J. 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.**, New York, v.123, n.2, p.123-128, 2003.

[CEDERBERG, J.](#); [SIMAN, C.M.](#); [ERIKSSON, U.J.](#) Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. **Pediatr. Res.**, v.49, n.6, p.755-762, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Contribution of infant mortality to birth defects- United States, 1986. **Morbid. Mortal. Week. Rep.**, Atlanta, v.38, p.633-635, 1989.

[CHAN, B.W.](#); [CHAN, K.S.](#); [KOIDE, T.](#); [YEUNG, S.M.](#); [LEUNG, M.B.](#); [COPP, A.J.](#); [LOEKEN, M.R.](#); [SHIROISHI, T.](#); [SHUM, A.S.](#) Maternal diabetes increases the risk of caudal regression caused by retinoic acid. **Diabetes**, New York, v.51, n.9, p.2811-2816, 2002.

CHANARIN, I.; DEACON, R.; LUMB, M.; PERRY, J. Cobalamin and folate: recent developments. **J. Clin. Pathol.**, v.45, p.277-283, 1992.

CHANDLER, C.J.; HARRISON, D.A.; BUFFINGTON, C.A.; SANTIAGO, N.A.; HALSTED, C.H. Functional especificity of jejunal brush border pteroylpolyglutamate hydrolase in pig. **Am. J. Physio. Gastroin. Test Liver Physiol.**, v.260, p.G865-G872, 1991.

CHASNOFF, I.J.; LANDRESS, H.J.; BARRET, M.E. The prevalence of illicitdrug or alcohol use during pregnancy and discrepancies in mandatory reporting in Pinellas Country, Florida. **N. Engl. J. Med.**, Andover, v.322, p.1202-1206, 1990.

CHEN, S.Y.; SULIK, K.K. Iron-mediated free radical injury in ethanol-exposed mouse neural crest cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.294, p.134-140, 2000.

CHRISTENSEN, B.; ROSENBLATT, D.S. Effects of folate deficiency on embryonic development. **Baillière's Clin. Haematol.**, v.8, p.617-637, 1995.

CHUDLEY, A.E.; CONRY, J.; COOK, J.L.; LOOCK, C.; ROSALES, T.; LEBLANC, N. Fetal alcohol spectrum disorder: Canadian guidelines for diagnosis. **C.M.A.J.**, v.172, n.5, p.S1-S20, 2005.

COHEN-KEREM, R.; KOREN, G. Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity, I: Review of the experimental data and implication to humans. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.25, p.1-9, 2003.

COLLINS, T.D.; EISENGA, B.H.; BHANDARI, S.D. Effects of ethanol on tissue folate incorporation and recovery from folate deficiency in rats. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Hangenstown, v.16, n.4, p.757-763, 1992.

COPP, A.J. Prevention of neural tube defects: vitamins, enzymes and genes. **Curr. Opin. Neurol.**, v.11, p.97-102, 1998.

[COPP, A.J.; BROOK, F.A.; ESTIBEIRO, J.P.; SHUM, A.S.; COCKROFT, D.L.](#) The embryonic development of mammalian neural tube defects. **Prog. Neurobiol.**, New York, v.33, p.363-401, 1990.

CORCINEO, J.J.; REISENAUER, A.M.; HALSTED, C.H. Jejunal perfusion of simple and conjugated folates in tropical sprue. **J. Clin. Invest.**, v.58, p.298-305, 1976.

CRACIUNESCU, C.N.; BROWN, E.C.; MAR, M-H.; ALBRIGHT, C.D.; NADEAU, M.R.; ZEISEL, S.H. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. **J. Nutr.**, Bethesda, v.134, p.162-166, 2004.

CRANDALL, B.F.; CORSON, V.L.; GOLDBERG, J.D.; KNIGHT, G.; SALAFSKY, I.S.
Folic acid and pregnancy. **Am. J. Med. Genet.**, New York, v.55, n.2, p.134-135,
1995.

CZEIZEL, A.E.; DUDÁS, I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects
by periconceptional vitamin supplementation. **N. Engl. J. Med.**, Andover, v.327,
p.1832-35, 1992.

DALY, L.E.; KIRKE, P.N.; MOLLOY, A.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Folate levels and
neural tube defects. Implications for prevention. **JAMA**, v.274, p.1698–1702,
1995.

DANIEL, M.A.; EVANS, M.A. Quantitative comparison of maternal ethanol and
maternal tertiary butanol diet on postnatal development. **Pharmacol. Exp.
Ther.**, v.222, p.294-300, 1982.

DAY, N.L.; COTTREAU, C.M.; RICHARDSON, G.A. The epidemiology of alcohol,
marijuana, and cocaine use among women of childbearing age and pregnant
women. **Clin. Obstet. Gynecol.**, v.36, p.232-245, 1993.

DEPARTMENT OF HEALTH. London, Scottish Office Home and Health Department,
Welsh Office, Department of Health Social Services Northern Ireland. **Folic acid
and the prevention of neural tube defects**. Report from an Expert Advisory,
1992.

DEVGUN, M.S.; FIABANE, A.; PATERSON, C.R.; ZAREMBISKI, P.; GUTHRIE, A.
Vitamin and mineral nutrition in chronic alcoholics including patients with
Korsakoff's psychosis. **Br. J. Nutr.**, v.45, n.3, p.469-473, 1981.

DIAMOND, I.; GORDON, A.S. Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. **Physiol. Reviews**, Bethesda, v.77, n.1, p.1-20, 1997.

DREOSTI, I.E. Interactions between trace elements and alcohol in rat. **Ciba Fund. Sympos.**, v.105, p.103-123, 1984.

DRISCOLL, C.D.; STREISSGUTH, A.P.; RILEY, E.P. Prenatal alcohol exposure: Comparability of effects in humans and animal models. **Neurotoxicol. Teratol.**, v.12, p.231-237, 1990.

DROGUETTI, D.C.; PENTEADO, M.D.V.C. Ácido fólico. In: PENTEADO, M.D.V.C. (eds). **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. 1.ed. São Paulo: Manole. 2003. Capítulo 13, p.487-524.

DUNTY, W.C.J.R.; ZUCKER, R.M.; SULIK, K.K. Hindbrain and cranial nerve dysmorphogenesis result from acute maternal ethanol administration. **Dev. Neurosci.**, v.24, p.328-342, 2002.

DUNTY, W.C.Jr.; CHEN, S.Y.; ZUCKER, R.M.; DEHART, D.B.; SULIK, K.K. Selective vulnerability of embryonic cell populations to ethanol-induced apoptosis: Implications for alcohol-related birth defects and neurodevelopmental disorder. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Hagerstown, v.25, p.1523-1535, 2001.

EBINO, K.Y.; SUWA, T.; KUWABARA, Y.; SAITO, T.R. Coprophagy in female mice during pregnancy and lactation. **Jikken Dobutsu**, v.37, p.101-104, 1988.

ELWOOD, J.M.; ELWOOD, J.H. (eds). **Epidemiology of Anencephalus and Spina Bifida**. New York: Oxford University Press, 1980. p.159-166.

ELWOOD, J.M.; LITTLE, J.; ELWOOD, J.H. **Epidemiology and control of neural tube defects**. New York: Oxford University Press, 1992. p.137-144.

EWALD, S.J.; FROST, W.W. Effect of prenatal exposure to ethanol on development of the thymus. **Thymus**, v.9, p.211-215, 1987.

FINCH, S., DOYLE, L. **National Diet and Nutrition Survey: people aged 65 years and over, 1. Report of the diet and nutrition survey**, London, The Stationery Office, 1998.

FISHER, S.E.; KARL, P.I. **Rec. Dev. Alc.**, v.6, p.277-289, 1988.

FRANKS, N.P.; LIEB, W.R. Molecular and cellular mechanisms of general anesthesia. **Nat. Lond.**, London, v.367,p.607-614, 1994.

FROSST, P.; BLOM, H.J.; MILO, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATHEWS, R.G.; BOERS, G.J.H.; DEN HEIJER, M.; KLUIJTMANS, L.A.J.; VAN DEN HEUVEL, L.PL; ROZEN, R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat. Genet.**, London, v.10, p.111-113, 1995.

GARBER, J.E. Long-term follow-up of children exposed in utero to antineoplastic agents. **Semin. Oncol.**, v.16, p.437-444, 1989.

GOTTESFELD, Z.; ABEL, E.L. Maternal and paternal alcohol use: Effects of the immune system of the offspring. **Life Sci.**, v.48, p.1-8, 1991.

GREGORY, J.F. The bioavailability of folate. In: BAILEY, L.B. (ed). **Folate in Health and Disease**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.195-235.

GUERRI, C. Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure.

Alcohol. Clin. Exp. Res., Hagenstown, v.22, p.304-312, 1998.

HALSTED, C.H.; REISENAUER, A.M.; ROMERO, J.J. Jejunal perfusion os simple and conjugated folate in seriac sproe. **J. Clin. Invest.**, v.59, p.933-940, 1977.

HALSTED, CH.; VILLANUEVA, J.; CHANDLER, C.J.; STABLER, S.P; ALLEN, R.H.; MUSKHELISHVILLI, L.; JAMEL, S.J.; POIRIER, L. Ethanol feeding of micropigs alters methionine metabolism and increases hepatocellular apoptosis and proliferation. **Hepatology**, v.23, n.3, p.497-505, 1996.

HANNIGAN, J.H.; WELCH, R.A.; SOKOL, R.J.
Recognition of fetal alcohol syndrome and related birth defects. In: MENDELSON, J.H.; MELLO, N.K. (eds). Medical Diagnosis and Treatment of Alcoholism. New York: McGraw Hill, 1992. p.639-667.

HARRIS, M.J.; JURILOFF, D.M. Genetic landmarks for defects in mouse neural tube closure. **Teratology**, New York, v.56, n.3, p.177-187, 1997.

HASENAU, S.M. Neural Tube Defects: Prevention and folic acid. **Am. J. Maternal/Child Nursing**, v.27, n.2, p.87-91, 2002.

- HASSLER, J.A.; MORAN, D.J. Effects of ethanol on the cytoskeleton of migrating and differentiating neural crest cells: Possible role in teratogenesis. **J. Craniofac. Genet. Devel. Biol.**, p.129-136, suppl. 2. 1986.
- HONEIN, M.A.; PAULOZZI, L.J.; MATHEWS, T.J.; ERICKSON, J.D.; WONG, L.Y. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. **JAMA**, v.285, n.23, p.2981-2986, 2001.
- HOORNBECK, F.K. A gene producing symmelia in the mouse. **Teratology**, New York, v.3, p.7-10, 1970.
- HUNTER, A.G.W. Brain and spinal cord. In: STEVENSON, R.E.; HALL, J.G.; GOODMAN, R.M. (eds). **Human malformation and related anomalies**. New York: Oxford Univ., 1993. p.109-137.
- HUNTER, E.S.; TUGMAN, J.A.; SULIK, K.K.; SALDER, T.W. Effects of short-term exposure to ethanol on mouse embryos in vitro. **Toxicol. Vitro**, v.8, p.413-421, 1994.
- INSTITUTE OF MEDICINE. **Nutrition during pregnancy**. Washington, DC: National Academy Press, 1990. p.351-379.
- ISAKSEN, C.V.; EIK-NES, S.H.; BLAAS, H-G.; TORP, S. Comparison of prenatal ultrasound and postmortem findings in fetuses and infants with central nervous system anomalies. **Ultras. Obstet. Gynecol.**, v.11, p.246-53, 1998.
- IYENGAR, L.; RAJALAKSHMI, K. Effect of folic acid supplement on birth weights of infants. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.122, p.332-336, 1975.

JACKSON, C.D.; WEIS, C.; MILLER, B.J.; JAMES, S.J. Dietary nucleotides: effects on cell proliferation following partial hepatectomy in rats fed NIH-31, AIN-76A, or folate/methyl-deficient diets. **J. Nutr.**, Bethesda, v.127, p.834S-837S, 1997.

JONES, K.L.; SMITH, D.W.; ULLELAND, C.N.; STREISSGUTH, A.P. Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. **Lancet**, London, v.1, p.1267-1271, 1973.

JONES, R.T. Tobacco dependence. In: MELTZER, H.Y. (ed). **Physycopharmacology: The Third Generation of Progress**. New York: Raven Press, 1987. p.1589-1595.

KAMEN, B.A.; SMITH, A.K.; ANDERSON, R.G.W. The folate receptor works in tandem with a probenecid-sensitive carrier in MA104 cells in vitro. **J. Clin. Invest.**, v.87, p.1442-1449, 1991.

KANWAR, Y.S.; NAYAK, B.; LIN, S.; AKAGI, S.; XIE, P.; WADA, J.; CHUGH, S.S.; DANESH, F.R. Hyperglycemia: its imminent effects on mammalian nephrogenesis. **Pediatr. Nephrol.**, v.20, p.858-866, 2005.

KEEN, C.L.; ZIDENBERG-CHERR, S. Should vitamin mineral supplements be recommended for all women with childbearing potential? **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.59, p.532S, 1994.

KHOGA, H.; OBATA, K. Retinoic acid-induced neural tube defects with multiple canals in the chick: immunohistochemistry with monoclonal antibodies. **Neurosci. Res.**, v.13, p.175-187, 1992.

- KIELY, J.L.; PANETH, N.; SUSSER, M. An assessment of the effects of maternal age and parity in different components of perinatal mortality. **Am. J. Epidemiol.**, Baltimore, v.123, n.3, p.444-454, 1986.
- KIM, Y.I.; POGRIBNY, I.; BASNAKIAN, A. Folate deficiency in the rat induces DNA strand breaks and hypomethylation within the p53 tumor suppressor gene. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.65, p.46-52, 1997.
- KIRBY, M.L.; KUMISKI, D.H.; MYERS, T. Backtransplantation of chick cardiac neural crest cells cultured in LIF rescues heart development. **Dev. Dynam.**, Hoboken, v.198, p.296-311, 1993.
- KIRBY, M.L.; WALDO, K.L. Neural crest and cardiovascular patterning. **Circ. Res.**, v.77, p.211-215, 1995.
- KLEIN, J.; CHAN, D.; KOREN, G. Neonatal hair analysis as a biomarker for in utero alcohol exposure. **N. Engl. J. Med.**, Andover, v.347, n.25, p.2086, 2002.
- KLEIN, J.; KOREN, G. Testing for drugs of abuse in the pediatric population. In: MIECZKOWSKI, T. (ed). **Drug testing technology: assessment of field applications**. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1999. p.161-177.
- KOREN, G.; CHAN, D.; KLEIN, J.; KARASKOV, T. Estimation of fetal exposure to drugs of abuse, environmental tobacco smoke, and ethanol. **Therapeut. Drug Monitor.**, v.24, p.23-25, 2002.
- KOREN, G.; KOREN, T.; GLADSTONE, J. Mild maternal drinking and pregnancy outcome: perceived vs true risks. **Clin. Chim. Acta.**, v.246, p.155-162, 1996.

KOTCH, L.E.; SULIK, K.K. Patterns of ethanol-induced cell death in the developing nervous system of mice: neural fold stage through the time of anterior neural tube closure. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v.10, p.273-79, 1992.

LAEV, H.; KARPIAK, S.E.; GOKHALE, V.S.; HUNGUND, B.L. Ethanol, a developmental neurotoxin, alters plasma membranes' physicochemical properties affecting embryogenesis, cell migration, differentiation and synaptogenesis. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Hagerstown, v.19, p.1226-1233, 1995.

LAM, M.K.; HOMEWOOD, J.; TAYLOR, A.J.; MAZURSKI, E.J. Second generation effects of maternal alcohol consumption during pregnancy in rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, v.24, p.619-631, 2000.

LANG, U.; BAKER, R.S.; BRAEMS, G.; KUNZEL, W.; CLARK, K.E. Uterine blood flow a determinant of fetal growth. **Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.**, v.110, p.S55-S61, suppl 1. 2003.

LE FOLL, B.; GOLDBERG, S.R. Ethanol does not affect discriminative-stimulus effects of nicotine in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 5, n.519(1-2), p.96-102, 2005.

LECK, I. Congenital malformations and childhood neoplasms. **J. Med. Genet.**, London, v.14, p.321-26, 1977.

LEIBER, B. Alcohol--currently the most significant agent causing malformations. Severe multiple abnormalities in children of alcoholics are increasing at an alarming rate. **Med. Monatsschr. Pharm.**, v.1, n.1, p.25-26, 1978.

LEMOINE, P.; HAROUSSEAU, H.; BORTERYU, J.P.; MENUET, J.C.. Les enfants de parents alcooliques: anomalies observe a propos des 127 cas. **Quest Medicales**, v.21, p.476-82, 1968.

LIEBER, C.S. Interactions of alcohol and nutrition. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Hagenstown, v.7, n.1, p.2-4, 1983.

LINDENABAUM, J.; ALLEN, R.H. Folate in health and disease. In: BAILEY, L.B. (ed). **Clinical spectrum and diagnosis of folate deficiency**. New York, NY: Marcel Dekker, 1995.

LITTLE, B.B.; SNELL, L.M.; ROSENFELD, C.R.; GILSTRAP, L.C.; GANT, N.C. Failure to recognize fetal alcohol syndrome in newborn infants. **Am. J. Dis. Child.**, Chicago, v.144, p.1142-1146, 1990.

LOEKEN, M.R. Current Perspectives on the Causes of Neural Tube Defects Resulting from Diabetic Pregnancy. **Am. J. Med. Genet. (Part C - Sem. Med. Genet.)**, New York, v.135C, p.77-87, 2005.

MARKWALD, R.R.; FITZHARRIS, T.P.; MANASEK, F.J. Structural development of endocardial cushions. **Am. J. Anat.**, Little Rock, v.148, p.85-119, 1977.

MASON, J. Folate status: effects on carcinogenesis. In: BAILEY, L.B. (ed). **Folate in Health an Disease**. New York, NY: Marcel Dekker, 1995. p.329-361.

MCANALLEY, B.H. Chemistry of alcoholic develeags. In: GARRIOT, J.C. (ed). **Medicolegal aspects of alcohol**. 3.ed. Lawyers & Judges Publishing Company, Inc., 1996. p.1-33.

MCGUFFIN, R.; GOFF, P.; HOLMAN, R.S. Effect of diet and alcohol on the development of folate deficiency in the rat. **Br. J. Haematol.**, v.31, n.2, p.185-192, 1975.

MCLARDY, T. **Ortomol. Physchiat.**, v.4, p.32-36, 1975.

MCNEELY, M.D.D. Folic acid assay. In: KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. (eds). **Clinical Chemistry**. Saint Louis: CV Mosby, 1984. p.1402-1406.

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.**, Bethesda, v.71, p.13085-13115, may, suppl 5. 2000.

MIDNIAK, L.R.; CLARK, W.B. The demographic distribution os US drinking patterns in 1990: Description and trends from 1984. **Am. J. Public Health**, v.84, p.1218-1222, 1994.

MILLER, J.R.R.; HECKEL, C.D.; KOSS, W.J.; MONTAGUE, S.L.; GREENMAN, A.L. Ethanol and nicotine induced membrane changes in embryonic and neonatal chick brains. **Comp. Biochem. Physiol. (Part C)**, v.130, p.163-178, 2001.

MILLER, M.W. Migration of cortical neurons is altered by gestational exposure to ethanol. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Hagenstown, v.17, p.304-314, 1993.

MILLER, P.N.; PRATTEN, M.K.; BECK, F. Growth of 9.5-day rat embryosin folic-acid-deficient serum. **Teratology**, New York, v.39, p.375-385, 1989.

- MILLS, J.L.; MCPARTIN, J.M.; KIRKE, P.N.; LEE, Y.J.; CONLEY, M.R.; WEIR, D.G.; SCOTT, J.M. Homocysteine metabolism in pregnancies complicated by neural-tube defects. **Lancet**, London, v.345, p.149-151, 1995.
- MOFFA, A.M.; WHITE, J.A. The effect os pericocnceptional supplementation of folic acid on the incidence of open neural tube defects in Golden hamster embryos. **Teratology**, New York, v.27, p.64A, 1983.
- MOORE, C.; JONES, J.; LEWIS, D. BUCHI, K. Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. **Clin. Chem.**, v.49, n.1, p.133-136, 2003.
- MOORE, C.A; LI, S.; LI, Z.; HONG, S.X.; GU, H.Q.; BERRY, R.J.; Mulinare, J.; Erickson, J.D. Elevated rates of severe neural tube defects in a high-prevalence area in northern China. **Am. J. Med. Genet.**, New York, v.73, n.2, p.113-118, 1997.
- MRC Vitamin Study Research Group. Prevention of neural tube defects: results of the MRC vitamin study. **Lancet**, London, v.338, p.131-137, 1991.
- MUDD, S.H.; LEVY, H.I.; SKOVBY, F. The metabolic and molecular basis of inherited disease. In: SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. (eds). **Disordes of transsulfuration**. New York: McGraw-Hill, 1995. p.1279-1327.
- MULDOON, R.T.; MCMARTIN, K.E. Ethanol acutely impairs the renal conservation of 5-methyltetrahydrofolate in the isolated perfused rat kidney. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Hagenstown, v.18, p.333-339, 1994.

NAEYE, R.L. The investigation of perinatal deaths. **N. Eng. J. Med.**, Andover, v.309, n.10, p.611-612, 1983.

NAKATSUJI, N.; JOHNSON, K.E. Effects of ethanol on the primitive streak stage mouse embryos. **Teratology**, New York, v.29, p.369-375, 1984.

NELSON, L.R.; TAYLOR, A.N.; LEWIS, J.W.; POLAND, R.E.; REDEI, E.; BRANCH, B.J. Pituitary adrenal responses to morphine and footshock stress- are enhanced following prenatal alcohol exposure. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Hagenstown, v.10, p.243-247, 1986.

NELSON, M.M.; EVANS, H.M. Reproduction in the rat on purified diets containing succinylsulfathiazole. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.66, p.289-291, 1947.

NELSON, M.M.; WRIGTH, H.V.; ASLING, C.W.; EVANS, H.M. Multiple congenital abnormalities resulting from transitory deficiency of pteroylglutamic acid during gestation in the rat. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 56, p.349-370, 1955.

NELSON, M.M; ASLING, C.W.; EVANS, H.M. Production of multiple congenital abnormalities in young by maternal pteroylglutamic acid deficiency during gestation. **J. Nutr.**, Bethesda, v.48, p.61-80, 1952.

NETTELAND, B.; BAKKE, O.M. Inadequate sample preparation as a source of error in determination of erythrocyte folate by competitive binding radioassay. **Clin. Chem.**, v.23, p.1505-1506, 1977.

NOMURA, T.; HATA, S.; KUSAFUKA, T. Suppression of developmental anomalies by maternal macrophages in mice. **J. Exp. Med.**, v.172, p.1325-1330, 1990.

NULMAN, I.; GLADSTONE, J.; O'HAYDEN, B.; KOREN, G. FAS: the CNS tragedy.

In: **Maternal-fetal toxicology; a clinician's guide**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 2001. p.467-494.

O'SCHOLL, T.O.; HEDIGER, M.L.; SCHALL, J.I.; KHOO, C.S.; FISCHER, R.I.

Dietary and serum folate: their influence on the outcome of pregnancy. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.63, p.520-525, 1996.

ÖZER, E.; SARIOGLU, S.; GÜRE, A. Effects of prenatal ethanol exposure on neuronal migration, neuronogenesis and brain myelination in the mice brain.

Clin. Neuropathol., Elmont, v.19, n.1, p.21-25, 2000.

PADMANABHAN, R.; HAMEED, M.S. Effects of acute doses of ethanol administered at pre-implantation stages on fetal development in the mouse. **Drug Alcohol.**

Depend., v.22, n.1-2, p.91-100, 1988.

PADMANABHAN, R.; IBRAHIM, A.; BENER, A. Effect of maternal methionine pre-treatment on alcohol-induced exencephaly and axial skeletal dysmorphogenesis in mouse fetuses. **Drug Alcohol. Depend.**, v.65, p. 263-281, 2002.

PADMANABHAN, R.; SHAFIULLAH, M. Effect of maternal diabetes and ethanol interactions on embryo development in the mouse. **Mol. Cell. Biochem.**, v.261, p.43-56, 2004.

PADMANABHAN, R.; WASFI, I.A.; CRAIGMYLE, M.B. Effect of pre-treatment with aspirin on the neural tube defects induced by maternal exposure to alcohol in the TO mouse fetuses. **Drug Alcohol. Depend.**, v.36, p.175-186, 1994.

- PADMANABHAN, R.; WASFI, I.A.; CRAIGMYLE, M.B. Neural tube and axial skeletal defects in TO mouse fetuses: effect of maternal exposure to ethanol and aspirin. **Teratology**, New York, v.46, p.27, [abstract]. 1992.
- PAGE, S.T.; OWEN, W.C.; PRICE, K.; ELWOOD, P.C. Expression of the human folate receptor transcript is regulated in human tissues. **J. Mol. Biol.**, v.229, p.1175-1183, 1993.
- PASQUET, J. Le lapin Fauve de Bourgogne en tératologie. Malformations spontanées et malformations provoquées par le thalidomide. **Biol. Med.**, Paris, v.3, p.149-178, 1974.
- PERALTA, C.F.A. Prevenção de defeitos do fechamento do tubo neural. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.47, n.4, p.276-277, Dec. 2001.
- PEREA-GOMEZ, A.; RHINN, M.; ANG, S.L. Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo. **Int. J. Dev. Biol.**, v.45, p.311-320, 2001.
- PERES, L.C. **Criação de um banco de dados de necropsias pediátricas realizadas no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo no período de abril de 1993 a abril de 1999**. 2000. Tese de Livre-Docência. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2000.
- PRASAD, P.D.; RAMAMOORTHY, S.; MOE, A.J.; SMITH, C.H.; LEIBACH, F.H., GANAPATHY, V. Selective expression of the high-affinity isoform of the folate receptor (FR-alpha) in the human placental syncytiotrophoblast and choriocarcinoma cells. **Biochim. Biophys Acta**, v.1223, p.71-75, 1994.

RANDALL, C.L. Alcohol as a teratogen: a decade of research in review. **Alcohol. Alcohol.**, v.1, p.125-132, suppl. 1987.

RAY, J.G. Folic acid food fortification in Canada. **Nutrit. Rev.**, v.62, p.535-539, jun. 2004.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr, 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.**, Bethesda, v.123, p.1939-1951, 1993.

REISENAUER, A.M.; BUFFINGTON, T.; VILLANUEVA, J.A.; HALSTED, C.H. Folate absorption in alcoholic pigs: in vivo intestinal perfusion studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.50, n.6, p.1429-1435, 1989.

RIBEIRO, C.N.M.; GUTIERREZ, C.M.; FOSS, M.C.; PERES, L.C. Effect of alloxan-induced diabetes mellitus and ethanol on pregnancy outcome in mice, no prelo.

RIMM, E.B.; WILLET, W.C.; HU, F.B.; SAMPSON, L.; MANSON, J.E.; HENNEKENS, C.; STAMPFER, M.J. Folate and vitamin B-6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v.279, p.359-364, 1998.

RITTER, T.E.; FAJARDO, O.; MATSUE, H.; ANDERSON, R.G.; LACEY, S.W. Folate receptors targeted to clathrin-coated pits cannot regulate vitamin uptake. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v.92, p.3824-3828, 1995.

ROLSCHAU, J.; DATE, J.; KRISTOFFERSEN, K. Folic acid supplement and intrauterine growth. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v.58, p.343-346, 1979.

- ROSENQUIST, T.; RATASHAK, S.; SELHUB, J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. **Proc. Nat. Acad. Scien. USA**, v.93, p.15227-15232, 1996.
- SAID, H.M.; CHATTERJEE, N.; HAQ, R.U. Adaptive regulation of intestinal folate uptake: effect of dietary folate deficiency. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v.279, p.C1889-C1895, 2000.
- SANDERS, E.J.; CHEUNG, E.; MAHMUD, E. Ethanol treatment inhibits mesoderm cell spreading in the gastrulating chick embryo. **Teratology**, New York, v.36, p.209-216, 1987.
- SCOTT, J.M. Folate and vitamin B₁₂, **Proc. Nutr. Soc.**, v.58, p.441-448, 1999.
- SCOTT, J.M.; KIRKE, P.N.; WEIR, D.G. Folate and neural tube defects. In: BAILEY, L.B. (ed). **Folate in Health and Disease**. New York: Marcel Dekker, 1995. p.329-360.
- SELHUB, J.; MILLER, J. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.55, p.131-138, 1992.
- SELLER, M.J. Nutritionally induced congenital defects. **Proc. Nutr. Soc. U.K.**, v.46, n.2, p.227-235, 1987.
- SHAFFER, D.M. Maternal nutritional factors and congenital anomalies: A guide for epidemiological investigation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.678, p.205-214, 1993.

- SHAW, G.M.; O'MALLEY, C.D.; WASSERMAN, C.R.; TALAROVA, M.M.; LAMMER, E.J. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. **Am. J. Med. Genet.**, New York, v.59, p.536-545, 1995.
- SHAW, G.M.; QUACH, T.; NELSON, V.; CARMICHAEL, S.L.; SCHAFFER, D.M.; SELVIN, S.; YANG, W. Neural tube defects associated with maternal periconceptional dietary intake of simple sugars and glycemic index. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.78, p.972-978, 2003.
- SHAW, G.M.; WASSERMAN, C.R.; LAMMER, E.J. Risks of orofacial clefts children born to women using multivitamins containing folic acid periconceptionally. **Lancet**, London, v.346, p.393-396, 1995.
- SHETTY, A.K.; PHILLIPS, D.E. Effects of prenatal ethanol exposure on the development of Bergmann glia and astrocytes in the cerebellum: an immunohistochemical study. **J. Comp. Neurol.**, v.321, p.19-32, 1992.
- SHIBLY, I.A.; PENNINGTON, S.N. Metabolic and mitotic changes associated with fetal alcohol syndrome. **Alcohol. Alcohol.**, v.31, n.4, p.423-434, 1997.
- SHUM, L.; SADLER, T.W. Embryonic catch-up growth after exposure to the ketone body D,L,- β -hydroxybutyrate in vitro. **Teratology**, New York, v.38, p. 369-379, 1988.
- SIEBER, S.M.; ADAMSON, R.H. Toxicity of antineoplastic agents in man, chromosomal aberrations antifertility effects, congenital malformations, and carcinogenic potential. **Adv. Cancer Res.**, v.22, p.57-155, 1975.

- SISKEN, B.F.; GLUECKSOHN-WAELSCH, S. A developmental study of mutation "phocomelia" in the mouse. **J. Exp. Zool.**, v.142, p.623-642, 1959.
- SMITH, I.E.; COLES, C.D. Multilevel intervention for prevention of fetal alcohol syndrome and effects of prenatal alcohol exposure. **Recent. Dev. Alcohol.**, v.9, p.165-180, 1991.
- SMITH, M.T.; HUNTINGTON, H.W. Morphogenesis of experimental anencephaly. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, Baltimore, v.40, p.20-31, 1981.
- SPAGNOLO, A. Teratogenesis of alcohol. **Ann. Ist Super. Sanita.**, v.29, n.1, p.89-96, 1993.
- STEPANUK, K.M.; TOLOSA, J.E.; LEWIS, D.; MYERS, V.; ROYDS, C.; SABOTGAL, J.C.; LIBRIZZI, R. Folic acid supplementation use among women who contact a teratology information service. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.187, p.964-967, 2002.
- STRATTON, K.; HOWE, C.; BATTAGLIA, F. **Fetal alcohol syndrome: diagnosis, epidemiology, prevention, and treatment.** Washington, D.C.: National Academy Press, 1996. p.1-57.
- STREISSGUTH, A.P.; BARR, H.M.; KOGAN, J. **Understanding the occurrence of secondary disabilities in clients with Fetal Alcohol Syndrome (FAS) and Fetal Alcohol Effects (FAE).** Final Report. University of Washington School of Medicine, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Seattle, W.A., 1996.

- STRÖMLAND, K.; PINAZO-DURÁN, M.D. Ophtalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: Clinical and animal model studies. **Alcohol. Alcohol.**, v.37, n.1, p.2-8, 2002.
- SULIK, K.K.; JOHNSTON, M.C.; WEBB, M.A. Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. **Science**, v.214, p.936-938, 1981.
- SZABO, K.T. **Congenital malformations in laboratory and farm animals**. San Diego, California: Academic Press. Chapter 9: Skeletal system, 1989a. p.144-183.
- SZABO, K.T. **Congenital malformations in laboratory and farm animals**. San Diego, California: Academic Press. Chapter 11: Alimentary and digestive systems, 1989b. p.192-213.
- TAGBO, I.F.; HILL, D.C. Effect of folic acid deficiency on pregnant rats and their offspring. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v.55, p.427-433, 1976.
- TAMURA, T.; HALSTED, C.H. Folate turnover in chronically alcoholic monkeys. **J. Lab. Clin. Med.**, v.101, p.623-628, 1983.
- TANG, L.S.; WLODARCZYK, B.J.; SANTILLANO, D.R.; MIRANDA, R.C.; FINNELL, R.H. Developmental consequences of abnormal folate transport during murine heart morphogenesis. **Birth Defects Research (Part A)**, v.70, p.449-458, 2004.
- TAVARES, E.; GOMEZ-TUBIO, A.; MURILLO, M.L.; CARRERAS, O. Folic acid intestinal absorption in newborn rats at 21 day postpartum: effects of maternal ethanol consumption. **Life Sci.**, v.64, n.22, p.2001-2010, 1999.

THENEN, S.W. Gestational and neonatal folate deficiency in rats. **Nutrit. Res.**, v.11, p.105-116, 1991.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **Seventh special report to the U.S. Congress on alcohol an health.** DH SS Publication (ADM) 90-1656. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office, 1990.

U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE – Departament 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. Rep.**, Atlanta, v.27, n.42, p.962-965, 2000.

UKITA, K.; FURUI, Y.; SHIOTA, K. Effects of prenatal alcohol exposure in mice: influence of na ADH inhibitor and a chronic inhalation study. **Reprod. Toxicolog.**, v.7, p.273-281, 1993.

VAN ALLEN, M.I.; KALOUSEK, D.K.; CHERNOFF, G.F.; JURIOFF, D.; HARRIS, M.; MCGILLIVRAY, B.C.; YONG, S-I.; LANGLOIS, S.; MACLEOD, P.M.; CHITAYAT, D.; FRIEDMAN, J.M.; WILSON, D.; MACFADDEN, D.; PANTZAR, J.; RITCHIE, S.; HALL, J.D. Evidence for multi-site closure of the neural tube in humans. **Am. J. Med. Genet.**, New York, v.47, p.723-743, 1993.

VOGT, W. Oxidation of methionyl residues in proteins tools target and reversal. **Free Radic. Biol. Med.**, v.18, p.93-105, 1995.

WAGNER, C. Biochemical role of folate. In: BAILEY, L.B. (ed). **Cellular metabolism. Folate in Health an Disease.** New York: Marcel Dekker, 1995. p.23-42.

- WALKINSHAW, S. Pregnancy in women with pré-existing diabetes: Management issues. **Sem. Fetal Neonat. Med.**, v.10, p.307-315, 2005.
- WEBSTER, W.S. Alcohol as a teratogen: a teratological perspective of the fetal alcohol syndrome. In: BATT, R.D.; CROW, K. (eds). **Human metabolism of alcohol**. Boca Raton: CRC Press, 1988. v.1, p.133-155.
- WEINBERG, J. Differential effects of prenatal ethanol on males and females. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Hagenstown, v.12, p.647-652, 1988.
- WEINBERG, N.Z. Cognitive and behavioral deficits associated with parental alcohol use. **J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.**, v.36, p.1177-1186, 1997.
- WEITMAN, S.D.; LARK, R.H.; CONEY, L.R.; FORT, D.W.; FRASCA, V.; ZURAWASKI, V.R.; KAMEN, B.A. Distribution of the folate receptor (gp 38) in normal and malignant cell lines and tissues. **Cancer Res.**, v.52, p.3396-3401, 1992.
- WENDELL-SMITH, C.P.; WILLIAMS, P.L. **Basic Human Embryology**. London: Pitman, 1984. p.58-60.
- WERLER, M.N.; SHAPIRO, S.; MITCHELL, A.A. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurent neural tube defect. **JAMA**, v.269, p.1257-1261, 1993.
- WEST, J.R.; GOODLETT, C.R. Teratogenic effects og alcohol on brain development. **Ann. Med.**, v.22, p.319-325, 1990.
- WILCOXON, J.L.; SCHWARTZ, J.; AIRD, F.; REDEI, E.E. Sexually dimorphic effects of maternal alcohol intake and adrenalectomy on left ventricular hypertrophy in rat offspring. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.285, p.E31-E39, 2003.

WILLIS, S.A.; LACEY, S.W.; WEITMAN, S.D.; KAMEN, B.A.; NISEN, P.D. Folate receptor gene expression is tissue-specific and temporally-regulated. **Cancer Ther. Control**, v.2, p.223-230, 1992.

WILSON, J.G. **Environment and Birth Defects**. New York: Academic Press, 1973.

[WOLLSCHLAEGER, K.; NIEDER, J.; KOPPE, I.; HARTLEIN, K.](#) A study of fetal macrosomia. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v.263, n.1-2, p.51-55, nov. 1999.

WOOD, L.R.; SMITH, M.T. Generation of anencephaly: 1.Aberrant neurulation and 2.Conversion of exencephaly to anencephaly. **J. Neuropathol. Exp. Neurol**, Baltimore, v.43, p.620-633, 1984.

WORTHINGTON-ROBERTS, B.S.; VERMEERCH, J.; WILLIAMS, S.R. **Nutrition in pregnancy and lactation**. 4.ed. Saint Louis: Times Mirror/Mosby, p.47-107, 1989.

WYNTER, J.M.; WALSH, D.A.; WEBSTER, W.S.; MCEWAN, S.E.; LIPSON, A.H. **Terat. Carcin. Muta.**, New York, v.3, p.421-428, 1983.

YA, J.; VAN DEN HOFF, M.J.; DE BOER, P.A. Normal development of the outflow tract in the rat. **Cir. Res.**, v.82, p.464-472, 1998.

ZIMMERMAN, J. Folic acid transport in organ cultured mucosa of human intestine. **Gastroenterology**, v.99, p.964-972, 1990.

An experimental study on the effects of ethanol and folic acid deficiency, alone or in combination, on pregnant Swiss mice
Ethanol, folate and experimental pregnancy

Cristiane Minot Gutierrez¹, Camila Nunes de Moraes Ribeiro¹, Giovanna Arcaro de

Lima², Maira Yuli Yanaguita² and Luiz Cesar Peres³.

¹Post-Graduate Student, Department of Pathology, Laboratory of Pediatric Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

²Scientific Initiation Student, Department of Pathology, Laboratory of Pediatric Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

³Associate Professor, Department of Pathology, Laboratory of Pediatric Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Research carried out in the Department of Pathology, Laboratory of Pediatric Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Research supported by CAPES, FAEPA and FAPESP

Correspondence to:

L.C. Peres

Departamento de Patologia

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

14049-900 Ribeirão Preto – SP – Brasil

phone: (+55 16) 3602 3123 fax: (+55 16) 3633 1068

e-mail: lcperes@fmrp.usp.br

ABSTRACT

Introduction: Ethanol is teratogenic, interferes with folic acid and is extensively used by young women. Our objective was to determine the effects of ethanol and/or folate deficiency on mouse fetuses. **Method:** Experiment I: pregnant mice receiving a commercial diet (CD) were divided into three groups: control (C), low ethanol dose (LE, 0.4 g/kg), and high ethanol dose (HE, 4.0 g/kg). Experiment II: pregnant mice receiving a folate-free diet (FFD) were divided into three groups: folate deficiency (FD), folate deficiency plus a low ethanol dose (FDLE), and folate deficiency plus a high ethanol dose (FDHE). Groups C and FD received saline and the remaining groups received ethanol administered i.p. from the 7th to the 9th gestational day (GD) and were sacrificed on the 18th GD. **Results:** Group HE presented congenital anomalies, late fetal death (LFD), lower fetal length and weight and placental weight and diameter than Groups C and LE. In experiment II there was a smaller number of live fetuses, a larger number of reabsorptions and LFD, a smaller length and lower fetal weight and placental weight and diameter in Groups FDLE and FDHE than in Group FD. **Conclusion:** A high ethanol dose is deleterious to the pregnancy of animals with CD, inducing congenital anomalies, intrauterine growth restriction, reduction of the placenta and increased LFD, events that did not occur with the low dose. However, with folate FFD a low ethanol dose is as deleterious as a high dose.

Key words: ethanol, folic acid deficiency, congenital anomalies, pregnancy, mice

INTRODUCTION

The influence of environmental and dietary agents during pregnancy may result in several problems for the fetus such as congenital anomalies and intrauterine growth restriction (IUGR). Among these agents, ethanol has received attention because of its diffuse and abusive use in modern society, justifying experimental studies for a better understanding of its effects during pregnancy.

Although the clinical and experimental teratogenic effects of alcohol are well known, women of reproductive age still consume it extensively¹. Studies on experimental animals have demonstrated its involvement in the pathogenesis of cardiac anomalies, limb anomalies and neural tube defects (NTD) when administered during pregnancy².

It is also known that dietary folic acid deficiency in young women is associated with IUGR, congenital anomalies and increased rates of intrauterine death³, since this vitamin plays an essential role in embryo development and is necessary for nucleic acid synthesis, amino acid metabolism and protein synthesis⁴. These findings have justified the implementation of programs of folic acid supplementation of different types of food in several countries, resulting in a reduction of NTD and congenital anomalies in general⁴⁻⁶.

Ethanol abuse is known to lead to folic acid deficiency since it interferes with the transport, absorption and metabolism of this vitamin^{7,8} especially during pregnancy, a period during which the need for this molecule increases. The acute use of alcohol also seems to have a negative effect on fetal development and on folic acid.

Another relevant question is the ethanol dose that can induce congenital anomalies and/or IUGR. Several animal studies^{2,9,10} have

demonstrated that two doses of 2.9 g/kg or one dose of 5.8 g/kg body weight can induce congenital anomalies and/or IUGR. Despite the large number of investigations on the teratogenic effects of alcohol, we do not know which amount of alcohol consumed during pregnancy starts to have a toxic effect on the human fetus¹¹. However, studies on pregnant women^{1,12,13} have demonstrated that occasional or social ethanol consumption compromises the embryo and, depending on its developmental stage, may result in the induction of congenital anomalies and/or IUGR.

A total dose of 28 g (0.4 g/kg) of alcohol, which corresponds to approximately two cans of beer¹⁴, is sufficient to produce harmful effects when administered at the beginning of pregnancy in the presence of folic acid deficiency. In addition, it is important to know the consequences of excess alcohol intake for pregnancy, even of occasional binge drinking, as well as the effect of this drug at high or low doses in the presence of folate deficiency. Since habitual intake of alcoholic drinks is widely diffuse in the young population of reproductive age, it is possible that the high frequency of congenital anomalies and of alterations of embryo development observed is associated, at least in part, with ethanol.

Thus, the objective of the present experimental study on mice was to determine whether high or low doses of ethanol alone or in combination with dietary folic acid deficiency during pregnancy induces IUGR and congenital anomalies.

MATERIAL AND METHOD

The study was approved by the Ethics Committee for Animal

Experimentation of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (no. 045/2003).

Thirty-six young adult pregnant female Swiss mice weighing on average 35 g were kept in appropriate individual cages in an environment protected from sound and with a rigorous automatic control of light/dark cycles of 12 hours each, low luminosity, an automatic exhaust system with several air changes per day, and a constant temperature of 22°C. The study consisted of two experiments: in the first, the influence of ethanol at low and high doses was studied in animals fed a commercial diet (CD) and in the second the influence of ethanol at the same doses as in the first experiment was studied in animals fed a folate-free diet (FFD). In both experiments the animals were divided into 6 groups of 6 animals each.

Experiment 1

Control (C) animals, animals receiving a low ethanol (LE) dose and animals receiving a high ethanol dose (HE) received a commercial diet and running water *ad libitum* throughout the experiment.

On the 7th, 8th and 9th gestational day (GD) Group LE animals received an intraperitoneal injection of ethanol at the dose of 0.4 g/kg diluted in 25% saline (v/v), while Group HE animals received an intraperitoneal injection of ethanol at the dose of 4.0 g/kg diluted in 25% saline (v/v). Group C animals received the same volume of saline alone.

Experiment 2

All animals received a folate-free diet balanced produced by Rhoster® -

Indústria and Comércio Ltda. according to international norms for animal requirements, and running water mixed with 1% sulfathiazole (Anaperan®), a liquid chemotherapeutic agent used to eliminate bacteria of the intestinal flora capable of producing folic acid, starting on day 0 of pregnancy. To prevent coprophagia, a grid was placed on the bottom of the cage to prevent direct contact of the animals with their feces.

The animals were divided into the following groups: control of folate deficiency (FD), folate-deficient animals receiving a low dose of ethanol (FDLE) and folate-deficient animals receiving a high ethanol dose (FDHE). On the 7th, 8th and 9th GD the animals of the FDLE Group received an intraperitoneal injection of ethanol at the dose of 0.4 g/kg diluted in 25% saline (v/v), while the animals of the FDHE group received an intraperitoneal injection of ethanol at the dose of 4.0 g/kg diluted in 25% saline (v/v). The animals of the FD group received the same volume of saline alone. The daily weight gain of the dams was recorded throughout the experiment.

The animals used in both experiments were euthanized in a CO₂ chamber on the 18th GD, and immediately submitted to a xyphopubic surgical incision through all planes to expose the uterine horns, which were opened lengthwise for the removal of all implants consisting of reabsorptions, live fetuses and late fetal deaths. The live fetuses were analyzed exteriorly under a stereoscopic microscope, photographed, weighed and measured for crown-rump length. The placentas were weighed and their diameter was measured. Data regarding the numbers and types of congenital anomalies were recorded. Maternal blood was collected on the day of euthanasia for the determination of

folate in serum samples treated with ascorbic acid using an IMMULITE 2000 (PIL2KFO-11, 2004-04-20) analyzer. The functioning principle of the instrument is based on a process of competitive immunoassay, a procedure carried out in the Laboratory of Gynecology and Obstetrics of the University Hospital of Ribeirão Preto. The number of red blood cells/mm³ of whole blood diluted 1/200 with isotonic diluting liquid (3.8 g sodium citrate, 2 ml 40% formol and 100 ml distilled water) was counted in a Neubauer chamber.

Data were analyzed statistically by the Fisher-Freeman-Halton tests using the StatXact® 7 (Cytel, Inc.) software, and by ANOVA and the Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests using the GraphPad Prism 4.00 software, version 4.0.0.255 (1994-2003 GraphPad Software, Inc), with the level of significance set at $p < 0.05$.

RESULTS

Experiment 1

No behavioral changes were observed in the dams of Groups C and LE after the injection of saline or ethanol, respectively, during the period of administration of the doses. However, after each ethanol dose, Group HE dams became agitated for a short period of time and then remained unconscious for about four hours. When they awoke their behavior returned to normal and they consumed normal amounts of water and ration.

The quantity of folate ($p < 0.05$) in serum and the number of red cells ($p < 0.01$) in the blood of Group HE dams were significantly reduced compared to Groups C and LE (Figures 1 and 2).

Congenital anomalies were observed in 15 animals born to the 6 dams of Group HE (16.13%), represented by isolated NTD (6.45%) and limb and tail agenesis (6.45%), NTD associated with absence of fusion of maxillary, mandibular and frontonasal processes (2.15%), and gastroschisis (1.08%) (Figures 3, 4, 5 and 6).

There was no statistically significant difference between groups in number of implants, of live fetuses or reabsorptions. A difference was observed only regarding late fetal death ($p < 0.01$), which occurred only in Group HE ($n = 11$; mean = 1.83; 10.38%).

Fetal length ($p < 0.05$) and weight ($p < 0.001$), as well as placental diameter ($p < 0.01$) and weight ($p < 0.001$) were significantly lower in Group HE than in Groups C and LE (Tables 1, 2, 3 and 4).

Mean daily weight gain by the dams, in grams, between the 7th and 9th gestational day differed significantly ($p < 0.01$) between Group HE and Groups C and LE, whereas no difference was observed between Groups C and LE (Figure 7).

Experiment 2

The following clinical findings were observed in all dams of Groups FD, FDLE and FDHE, being more marked in the last two groups: alopecia at different body sites, changes in coat aspect and color, paler eyes, a very cold and tremulous body, reduction of physical movement, and considerable body disequilibrium.

No behavioral changes were observed in Group FD dams throughout the period of saline administration. However, dams of Groups FDLE and FDHE fainted and remained unconscious for about six and eight hours, respectively, after each ethanol dose. When they awoke, the dams of both groups still moved in a slow manner and consumed smaller than usual amounts of water and ration.

The quantity of folate in serum and the number of red cells in blood of the dams of Groups FDLE and FDHE were significantly lower ($p < 0.001$) compared to Group FD (Figures 8 and 9).

No congenital anomalies occurred in these groups. There was no difference in number of implants but there was a significant difference in number of live fetuses, reabsorptions and late fetal deaths between groups. The number of live fetuses was significantly ($p < 0.05$) smaller in Groups FDLE ($n = 65$, mean = 10.83; 72.22%) and FDHE ($n = 62$, mean = 10.33; 61.39%) than in Group FD ($n = 90$, mean = 15; 90.91%). Groups FDLE and FDHE presented a larger

number of reabsorptions ($n = 13$, mean = 2,17; 14.44%; $n = 19$, mean = 3.17; 18.81%, respectively) and of late fetal deaths ($n = 12$, mean = 2; 13.33%, $n = 20$, mean = 333; 1980%, respectively) than Group FD ($n = 8$, mean = 1,13; 8.08%; $n = 1$, mean = 0.33; 1.01%).

Fetal length and weight, as well as placental diameter and weight were significantly lower ($p < 0.001$) in Groups FDLE and FDHE than in Group FD (Tables 5, 6, 7 and 8).

Mean daily weight gain by the dams, in grams, was significantly different ($p < 0.01$) between the 7th and 9th gestational day and between the 10th and 18th gestational day for Groups FDLE and FDHE compared to Group FD. This difference was not observed between Groups FDLE and FDHE (Figure 10).

DISCUSSION

Although the harmful effects of ethanol on fetal development have attracted increasing attention, this substance is still consumed in an abusive manner by young women, who often do not know that they are pregnant. The ethanol dose must have an even more critical effect in the presence of folate deficiency, a condition commonly occurring in the population in general, especially during the reproductive phase. The results obtained in animal experiments may indicate to what extent these environmental influences affect pregnancy and fetal development.

The results of the present study show that ethanol has a dose-dependent effect even when acutely administered at the beginning of gestation. The fetuses of dams receiving a commercial diet and a high ethanol dose presented IUGR and an increased number of late fetal deaths and congenital anomalies which were not observed in fetuses whose mothers had received a low ethanol

dose. Experimental studies^{2,9,10} have demonstrated that ethanol is damaging and can lead to congenital anomalies and IUGR by its direct effects on the cell membranes resulting in excessive fluid passage, increased peroxidase activity, interference with cytoskeleton components, reduction of cell division, and changes in DNA and protein synthesis, in amino acid transport, in cell signaling, in the physicochemical properties of the plasma membrane and of many cell and neurochemical components that are essential for development¹⁵. Changes in DNA synthesis, a reduced cell proliferation rate and a decrease protein synthesis are proposed as the main teratogenic mechanisms¹⁶, with more marked effects on tissues, organs and even organisms in the accelerated growth phase, as is the case for embryos and fetuses.

In addition, in mice the organogenic period of development represents a pregnancy stage particularly sensitive to a teratogenic insult, since it is marked by progressive subdivision of the germinative layers, resulting in the principle of organ differentiation¹⁷.

Ethanol, like other chemical agents, can cause structural damage to the placenta and reduce its size and weight¹⁸, as observed here in Group HE compared to Groups C and LE. The study also showed that the action of ethanol is dose dependent since no difference in these parameters was observed between the LE group and the control. These placental changes can lead to a reduced transfer of oxygen and nutrients and to a reduced production of growth factors by the placenta¹⁹. The reduction of uteroplacental blood flow first affects the placenta since this is the first organ to be exposed to an insufficient delivery of oxygen and nutrients, resulting in a reduction of size and weight for adaptation.

In humans, ethanol has a stronger effect during the third week of pregnancy, which was also the period during which ethanol was administered to the dams in the present study. This fact is a source of major concern since at this time many women do not know that they are pregnant. Those who are aware of being pregnant often do not understand that social drinking during such an early period of pregnancy can be as deleterious for the embryo as an exaggerate and constant alcohol intake^{1,9}.

Ethanol abuse frequently leads to the development of vitamin deficiency, with folate deficiency being one of the most common^{7,20}. This may explain the occurrence of congenital anomalies in Group HE. Since the dose of ethanol administered to this group was high, it was able to reduce serum folate levels even with the ingestion of a normal diet, thus leading to the anemia observed in the serologic and hematologic exams performed in the present study, showing the acute effect of ethanol.

For the groups that received commercial diet a reduction in mean daily weight gain during pregnancy was observed in the dams of Group HE compared to the dams of Groups C and LE only on the days of ethanol injection, with the dams recovering the lost weight after this period. This difference probably occurred because the dams remained unconscious for a long period of time after ethanol administration, without eating or drinking water. For the fetus the problem can be aggravated by the interference of alcohol with nutrient transport through the placenta and with the reduction of gestational sac activity in rodents, changes that can directly affect the well-being of the developing embryo²¹, as demonstrated in the present study.

Folate-deficient animals presented reduced fertility^{22,23} which created difficulties for the execution of experiments such as the present one. In order to define the methodology to be employed

we tested different periods of administration of a folate-free balanced diet (28, 21, 14, and 7 days), which resulted in marked anemia, low fertility and high maternal mortality. For this reason, we opted to introduce the folate-free diet on day 0 of pregnancy, thus guaranteeing mating and the maintenance of pregnancy until the end of the experiment. This period of diet administration was sufficient to induce folic acid deficiency, as confirmed by serologic and hematologic exams^{23,24}.

Although the harmful effects of ethanol on the fetuses of dams with no folate deficiency occurred only when the ethanol dose was high, in folate-deficient dams even low ethanol doses were sufficient to reduce the number of live fetuses, to produce high rates of fetal death and reabsorption, to induce IUGR and to reduce placental diameter and weight. This was possibly due to the fact that folate deficiency leads to a reduction of nuclei acid synthesis and if the embryo receives a teratogenic insult such as exposure to ethanol, it may not be able to successfully repair the damage, thus undergoing developmental changes²⁵. These changes may also be related to placental insufficiency; due to its rapid growth, this organ is susceptible to retarded growth as a result of folate deficiency²⁶, as demonstrated by the present findings.

In the present study, the detection of a large number of reabsorptions and late fetal deaths in the groups receiving the folate-free diet and ethanol indicates the occurrence of a harmful effect of the combination of these two factors. Thus, the deleterious action of ethanol was severely intensified by folic acid deficiency. This fact justifies the absence of fetuses with congenital anomalies in these groups and explains why there was a smaller number of live fetuses in Groups FDLE and FDHE than in Group FD.

The daily weight gain throughout pregnancy of the dams that received the folate-free diet was reduced in Groups FDLE and FDHE compared to Group FD during the days of ethanol administration and thereafter up to the day of

euthanasia, and therefore the dams were unable to regain the lost weight. This difference was probably due to the fact that after ethanol administration the animals were unconscious for a considerable length of time and the situation was aggravated by the status of folic acid deficiency, which, of itself, is usually responsible for a debilitated maternal status²⁷. In addition, IUGR and a large number of reabsorptions and late fetal deaths occurred in the FDLE and FDHE Groups, also possibly justifying this weight reduction.

It should also be taken into account that ethanol interferes with folic acid^{28,29} and that during pregnancy there is an increased requirement of this molecule^{30,31}. Thus, the remaining maternal folate is deviated for fetal development, causing the mother to be unable to recover her weight and leading to anemia. However, the resulting anemia is not the only manifestation of reduced cell division, but there is also a decrease of platelet and white cell numbers. There is an impediment of cell division related to the role of folate in nucleic acid synthesis, a process that is more apparent in rapidly renewing tissues such as the hematopoietic system and cells of the digestive tract³².

Folic acid deficiency, a factor of proven importance in the genesis of congenital anomalies, can be prevented by dietary folate supplementation^{33,34}, as reported in experimental^{35,36} and human^{5,37} studies which showed an overall 50 to 80% reduction in the incidence of these anomalies when dietary folate supplementation was performed. Thus, the prevention of congenital malformations is of extreme importance in view of their severity and high morbidity and mortality³⁸.

Chronic ethanol intake is known to reduce the amount of serum and hepatic folate and acute ethanol intake increases the urinary excretion of folate³⁹. Thus, repeated exposure to ethanol leads to a substantial loss of this

vitamin which results in its deficiency⁴⁰, increasing the risk of the occurrence of congenital anomalies.

Understanding how ethanol alone induces IUGR and congenital anomalies and its interaction with dietary folic acid deficiency in pregnancy in an experimental mouse model may contribute to the elucidation of the undesirable effects of the drug in the human population.

REFERENCES

1. Koren G, Koren T, Gladstone J. Mild maternal drinking and pregnancy outcome: perceived vs true risks. *Clin Chim Acta* 1996; 246: 155-62.
2. Padmanabhan R, Ibrahim A, Bener A. Effect of maternal methionine pre-treatment on alcohol-induced exencephaly and axial skeletal dysmorphogenesis in mouse fetuses. *Drug Alcohol Depend* 2002; 65: 263-81.
3. Bird CL, Swendseid ME, Witte JS. Red cell and plasma folate, folate consumption, and the risk of colorectal adenomatous polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4: 709-14.
4. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ, Erickson JD, Wong LY. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA* 2001; 285(23): 2981-86.
5. Castilla EE, Orioli IM, Lopez-Camelo JS, Dutra MDAG, Nazer-Herrera J. 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* 2003; 123(2): 123-28.

6. Ray JG. Folic acid food fortification in Canada. *Nutrition Review* 2004; 62: 535-39.
7. Tavares E, Gomez-Tubio A, Murillo ML, Carreras O. Folic acid intestinal absorption in newborn rats at 21 day postpartum: effects of maternal ethanol consumption. *Life Sci* 1999; 64(22): 2001-2010.
8. Halsted CH, Villanueva J, Chandler CJ, Stabler SP, Allen RH, Muskhelishvili L, Jamel SJ, Poirier L. Ethanol feeding of micropigs alters methionine metabolism and increases hepatocellular apoptosis and proliferation. *Hepatology* 1996; 23(3): 497-505.
9. Sulik KK, Johnston MC, Webb MA. Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. *Science* 1981; 214: 936-38.
10. Dunty WCJR, Zucker RM, Sulik KK. Hindbrain and cranial nerve dysmorphogenesis result from acute maternal ethanol administration. *Dev Neurosci* 2002; 24: 328-42.
11. Nulman I, Gladstone J, O'Hayden B, Koren G. FAS: the CNS tragedy. In: *Maternal-Fetal Toxicology; A Clinician's Guide*. 3th ed. New York: MaCRel Dekker, 2001; 467-94.
12. Abel EL, Sokol R. A revised conservative estimate of the incidence of FAS and its economic impact. *Alcohol Clin Exp Res* 1991; 14(4): 514-24.
13. Midniak LR, Clark WB. The demographic distribution of US drinking patterns in 1990: Description and trends from 1984. *Am J Public Health* 1994; 84: 1218-22.
14. McAnalley BH. Chemistry of alcoholic beverages. In: Garriot JC editor. *Medicolegal aspects of alcohol*. 3rd edn. Lawyers & JuGDes Publishing

Company, Inc, 1996; 1-33.

15. Shibly IA, Pennington SN. Metabolic and mitotic changes associated with fetal alcohol syndrome. *Alcohol Alcohol* 1997; 31(4): 423-34.
16. Guerri C. Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 304-12.
17. Becker HC. Effects of ethanol on the central nervous system: fetal damage neuro behavioral effects. In: Dietrich RA, Erwin VG, editors. *Pharmacological Effects of Ethanol on the Nervous System*. Boca Raton: CRC Press, 1996; 409-42.
18. Nomura T, Hata S, Kusafuka T. Suppression of developmental anomalies by maternal macrophages in mice. *J Exp Med* 1990; 172: 1325–30.
19. Lang U, Baker RS, Braems G, Kunzel W, Clark KE. Uterine blood flow a determinant of fetal growth. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* 2003; 110(suppl 1): S55-S61.
20. Carreras O, Vazquez AL, Rubio JM. Comparative effect of intestinal absorption of folic acid and methyltetrahydrofolic acid in chronic ethanol fed rats. *Ann Nutr Metabol* 1994; 38(4): 221-225.
21. Devgun MS, Fiabane A, Paterson CR, Zarembiski P, Guthrie A. Vitamin and mineral nutrition in chronic alcoholics including patients with Korsakoff's psychosis. *Br J Nutr* 1981; 45(3): 469-73.
22. Nelson MM, Evans HM. Failure of ovarian hormones to maintain pregnancy in rats deficient in pantothenic or pteroylglutamic. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;

91(4): 614-17.

23. Burgoon JM, Selhub J, Nadeau M, Sadler TW. Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. *Teratology* 2002; 65: 219-27.
24. Craciunescu CN, Brown EC, Mar M-H, Albright CD, Nadeau MR, Zeisel SH. Folic acid deficiency during late gestation decreases progenitor cell proliferation and increases apoptosis in fetal mouse brain. *J Nutr* 2004; 134: 162-66.
25. Shum L, Sadler TW. Embryonic catch-up growth after exposure to the ketone body D,L,- β -hydroxybutyrate in vitro. *Teratology* 1998; 38: 369-79.
26. Institute of Medicine. *Nutrition during pregnancy*. Washington, DC: National Academy Press, 1990; 351-79.
27. Schaffer DM. Maternal nutritional factors and congenital anomalies: A guide for epidemiological investigation. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 678: 205-14.
28. Reisenauer AM, Buffington T, Villanueva JA, Halsted CH Folate absorption in alcoholic pigs: in vivo intestinal perfusion studies. *A J Clin Nutr* 1989; 50(6): 1429-1435.
29. Collins TD, Eisenga BH, Bhandari SD. Effects of ethanol on tissue folate incorporation and recovery from folate deficiency in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1992; 16(4): 757-763.
30. Keen CL, Zidenberg-Cherr S. Should vitamin mineral supplements be recommended for all women with childbearing potential? *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 532S.

31. Crandall BF, Corson VL, Goldberger JD, Knight G, Salafsky IS. Folic acid and pregnancy. *Am J Med Genet* 1995; 55(2): 134-135.
32. Lindenbaum J, Allen RH. Folate in health and disease. In: Bailey LB, editor. *Clinical spectrum and diagnosis of folate deficiency*. New York: MacRel Dekker, 1995.
33. McNulty H, Cuskelly GJ, 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* 2000; 71(suppl 5): 13085-115.
34. Shaw GM, Quach T, Nelson V, Carmichael SL, Schaffer DM, Selvin S, Yang W. Neural tube defects associated with maternal periconceptional dietary intake of simple sugars and glycemic index. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 972-78.
35. Thenen SW. Gestational and neonatal folate deficiency in rats. *Nutr Res* 1991; 11: 105-16.
36. Christensen B, Rosenblatt DS. Effects of folate deficiency on embryonic development. *Baillière's Clin Haematol* 1995; 8: 617-37.
37. Peralta CFA. Prevenção de defeitos do fechamento do tubo neural. *Rev Assoc Med Bras* 2001; São Paulo, 47(4): 276-277.
38. Barber RC, Lammer EJ, Shaw GM, Gbeer KA, Finnell RH. The role of folate transport and metabolism in neural tube defect risk. *Mol Genet Metab* 1999; 66: 1-9.
39. Tamura T, Halsted CH. Folate turnover in chronically alcoholic monkeys. *J Lab Clin Med* 1983; 101: 623-28.

40. Muldoon RT, McMartin KE. Ethanol acutely impairs the renal conservation of 5-methyltetrahydrofolate in the isolated perfused rat kidney. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 333–39.

Figure 1 – Comparison of the quantification of serum folic acid (ng/ml) between the dams of the different groups. *Significantly different from Groups C and LE ($p<0.05$).

Figure 2 – Comparison of number of red blood cells/mm³ blood between the dams of the different groups. *Significantly different from Groups C and LE (p<0.01).

Figure 3 – Macroscopic photographs of the fetuses of Groups C (GC) and HE (GHE). A, B and C show an upper view of the head, with A showing a normal aspect, B showing exencephaly and C showing anencephaly.

Figure 4 – Macroscopic photographs of the fetuses of Groups C (GC) and HE (GHE). A and B show an upper view of the head, with A showing a normal aspect and B showing anencephaly with absence of fusion of the maxillary, mandibular and frontonasal processes.

Figure 5 – Macroscopic photographs of the fetuses of Groups C (GC) and HE (GHE). A and B show a lateral view of the total body, with A being a normal fetus and B a fetus with agenesia of the limbs and tail.

Figure 6 – Macroscopic photographs of the fetuses of Groups C (GC) and HE (GHE). A and B show a lateral view of the total body, with A being a normal fetus and B a fetus with gastroschisis.

Figure 7 – Mean daily weight gain (g) of the dams of Groups C, LE and HE during the gestational period (days).

Figure 8 – Comparison of the quantification of serum folic acid (ng/ml) between the dams of the different Groups. *Significantly different from Group FD ($p < 0.001$). **Significantly different from one another ($p < 0.001$).

Figure 9 – Comparison of the number of red blood cells/mm³ blood between the dams of the different Groups. *Significantly different from Group FD ($p < 0.001$). **Significantly different from one another ($p < 0.001$).

Figure 10 – Mean daily weight gain (g) of the dams of Groups FD, FDLE and FDHE during the gestational period (days).

Table 1 – Comparison of fetal crown-rump length (cm) between male, between female and between all male and female live fetuses in the different groups (Data are reported as mean $\pm$ SD).

Fetal Crown-Rump Length (cm)	Groups			p value
	C	LE	HE	
Males	2.6 $\pm$ 0.181	2.5 $\pm$ 0.117	2.4 $\pm$ 0.178*	p<0.05
Females	2.5 $\pm$ 0.173	2.5 $\pm$ 0.162	2.3 $\pm$ 0.221*	p<0.05
Both Genders	2.5 $\pm$ 0.184	2.5 $\pm$ 0.163	2.4 $\pm$ 0.225*	p<0.05

*Significantly different from Groups C and LE (p<0.05)

Table 2 – Comparison of fetal body weight (g) between male, between female and between all male and female live fetuses in the different groups (Data are reported as mean $\pm$ SD).

Fetal Body Weight (g)	Groups			p value
	C	LE	HE	
Males	1.50 ± 0.112	1.49 ± 0.138	1.31 ± 0.152*	p<0.001
Females	1.40 ± 0.140	1.40 ± 0.151	1.19 ± 0.221*	p<0.001
Both Genders	1.46 ± 0.139	1.45 ± 0.157	1.23 ± 0.187*	p<0.001

*Significantly different from Groups C and LE (p<0.001)

Table 3 – Comparison of placental diameter (cm) between male, between female and between all male and female live fetuses in the different groups (Data are reported as mean ± SD).

Placental Diameter (cm)	Groups			p value
	C	LE	HE	
Males	0.8 ± 0.051	0.8 ± 0.054	0.8 ± 0.062*	p<0.01
Females	0.8 ± 0.058	0.7 ± 0.064	0.7 ± 0.073*	p<0.01
Both Genders	0.8 ± 0.095	0.8 ± 0.074	0.7 ± 0.079*	p<0.01

*Significantly different from Groups C and LE (p<0.01)

Table 4 – Comparison of placental weight (g) between male, between female and between all male and female live fetuses in the different groups (Data are reported as mean ± SD).

Groups

Placental weight (g)	C	LE	HE	p value
Males	0.14 ± 0.021	0.14 ± 0.018	0.12 ± 0.035*	p<0.001
Females	0.12 ± 0.022	0.11 ± 0.013	0.10 ± 0.034*	p<0.001
Both Genders	0.13 ± 0.024	0.12 ± 0.020	0.10 ± 0.025*	p<0.001

*Significantly different from Groups C and LE (p<0.001)

Table 5 – Comparison of fetal crown-rump length between male, between female and between all male and female live fetuses in the different groups (Data are reported as mean $\pm$ SD).

Fetal Crown-Rump Length Fetal (cm)	Groups			p value
	FD	FDLE	FDHE	
Males	2.4 $\pm$ 0.157	2.0 $\pm$ 0.220*	1.9 $\pm$ 0.136*	p<0.001
Females	2.3 $\pm$ 0.165	2.0 $\pm$ 0.215*	1.8 $\pm$ 0.149*	p<0.001
Both Genders	2.4 $\pm$ 0.161	2.0 $\pm$ 0.216*	1.9 $\pm$ 0.145*	p<0.001

*Significantly different from Group FD (p<0.001)

Table 6 – Comparison of fetal body weight (g) between male, between female and between all male and female live fetuses in the different groups (Data are reported as mean $\pm$ SD).

Fetal Body Weight (g)	Groups			p value
	FD	FDLE	FDHE	
Males	1,28 $\pm$ 0.242	0.81 $\pm$ 0.190*	0.83 $\pm$ 0.156*	p<0.001
Females	1,17 $\pm$ 0.213	0.82 $\pm$ 0.174*	0.73 $\pm$ 0.108*	p<0.001
Both Genders	1,23 $\pm$ 0.232	0.81 $\pm$ 0.182*	0.78 $\pm$ 0.143*	p<0.001

* Significantly different from Group FD (p<0.001)

Table 7 – Comparison of placental diameter (cm) between male fetuses, between female fetuses and between all male and female live fetuses in the different groups (Data are reported as mean $\pm$ SD).

Placental Diameter (cm)	Groups		
	FD	FDLE	FDHE
Males	0.8 $\pm$ 0.059	0.8 $\pm$ 0.065*	0.7 $\pm$ 0.102*
Females	0.8 $\pm$ 0.071	0.8 $\pm$ 0.038*	0.7 $\pm$ 0.077*
Both Genders	0.8 $\pm$ 0.064	0.8 $\pm$ 0.059*	0.7 $\pm$ 0.090*

*Significantly different from Group FD ($p < 0.001$) and from one another ($p < 0.05$)

Table 8 – Comparison of placental weight (g) between male and female fetuses in the different groups (Data are reported as mean $\pm$ SD).

Placental Weight (g)	Groups			p value
	FD	FDLE	FDHE	
Males	0.13 $\pm$ 0.023	0.09 $\pm$ 0.021*	0.09 $\pm$ 0.013*	$p < 0.001$
Females	0.11 $\pm$ 0.011	0.09 $\pm$ 0.020*	0.09 $\pm$ 0.023*	$p < 0.001$
Both Genders	0.12 $\pm$ 0.018	0.09 $\pm$ 0.019*	0.09 $\pm$ 0.015*	$p < 0.001$

*Significantly different from Group FD ($p < 0.001$)