

Bases para estimar las necesidades de vitamina C en la gestación**

Esther Casanueva,^a María Eugenia Angulo,^b Sharon Goldberg,^b Frania Pfeffer,^a Carlos Meza-Camacho,^a Felipe Vadillo-Ortega,^a Stephen J. Rothenberg^c

^aInstituto Nacional de Perinatología, México, D.F.

^bDepartamento de Salud, Universidad Iberoamericana, México, D. F.

^cInstituto Nacional de Salud Pública, Drew University of Medicine and Science, Los Angeles, California, US

Recibido en su versión modificada: 4 de julio de 2004

— Aceptado: 10 de diciembre de 2004

RESUMEN

Objetivo: Establecer la dosis de vitamina C para mantener una concentración leucocitaria $\geq 18 \mu\text{g}/10^8$ células en mujeres embarazadas entre las semanas 28 y 32 de la gestación, con la finalidad de establecerla como base para la estimación de la ingestión diaria recomendada (IDR).

Metodología: Etapa 1: estudio agudo de suplementación. Se suplementó a 10 gestantes al inicio del segundo trimestre con dosis que fueron de 0 a 200 mg/día de vitamina C (sin contar con el aporte dietético), cada dosis se administró durante una semana. Etapa 2: estudio doble ciego aleatorizado (100 mg/día de vitamina C vs. Placebo) entre la semana 20 y el término de la gestación con 52 mujeres.

Resultados: Etapa 1. Con 100 mg/día de vitamina C se alcanzó la saturación leucocitaria sin incrementar significativamente la excreción urinaria. Etapa 2. Las mujeres que recibieron placebo disminuyeron significativamente su concentración leucocitaria de vitamina C a lo largo de la gestación mientras que las gestantes que recibieron el suplemento la incrementaron en forma significativa manteniéndola por arriba de $\geq 18 \mu\text{g}/10^8$ células.

Conclusión: Una dosis diaria de 100 mg de vitamina C durante la segunda mitad del embarazo ocasiona una reserva leucocitaria adecuada y puede ser considerada como referencia para establecer la IDR.

Palabras clave:

Vitamina C, embarazo, ingestión dietética recomendada (IDR)

SUMMARY

Objective: Determine the dose of Vitamin C able to maintain a leukocyte Vitamin C concentration of $\geq 18 \mu\text{g}/10^8$ cells, in pregnant women with 28 to 32 weeks of gestation, in order to compile a database to estimate the daily recommended intake (DRI) during pregnancy.

Methodology: Stage 1: acute supplementation study. A group of 10 healthy women in late first and early second trimester pregnancy were supplemented with 0 to 200 mg vitamin C/day during one week each. Stage 2: a randomized double blind study (placebo vs. vitamin C [100 mg/d]) was carried out with 52 women studied from week 20 to week 32 of pregnancy. Their plasma and leukocyte vitamin C concentrations were measured every 4 weeks to evaluate the previously established supplementation dose.

Results: Stage 1: with the 100 mg/day dose, leukocyte vitamin C saturation was reached without increasing urinary excretion. Stage 2: leukocyte concentration of vitamin C decreased throughout pregnancy in women receiving placebo, while supplemented women maintained their concentrations $\geq 18 \mu\text{g}/10^8$ cells.

Conclusion: A 100 mg/day dose of vitamin C during the second half of pregnancy keeps leukocyte storage and could be useful to establish the DRI of Vitamin C during pregnancy.

Key words:

Vitamina C, pregnancy, daily recommended intake (DRI)

Introducción

Idealmente los requerimientos nutricios se deben establecer con base en la cantidad mínima que el organismo necesita de un determinado nutrimento para llevar a cabo una o varias funciones. Desafortunadamente en la actualidad no se dispone de la información necesaria para establecer los requerimientos todos los nutrimentos en forma idónea.

Para el caso de la vitamina C, el Consejo de Alimentación y Nutrición del Instituto de Medicina de los Estados Unidos (CAN-EU)¹ establece la ingestión diaria recomendada (IDR) para varones, con base en estudios de agotamiento/saturación en 90 mg (511 mmol)/día; mientras que para la mujer en edad reproductiva este organismo estima la IDR ajusta los valores obtenidos en hombres con base en la masa corporal bajo el supuesto de que a menor tamaño corporal menor

*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Esther Casanueva Instituto Nacional de Perinatología. Montes Urales 800 Torre de Investigación 21 piso. 11000 México DF. Correo electrónico casanuev@servidor.unam.mx

**Este trabajo fue parcialmente financiado por CONACYT (0783-PM) y por los Laboratorios Roche quienes gentilmente donaron el suplemento de Vitamina C.

requerimiento. De esta manera según el CAN-EU la IDR para mujeres es de 75 mg (426 mmol)/día. Levine y colaboradores² cuestionan esta estrategia para establecer la IDR y realizan un estudio de agotamiento/saturación en mujeres. Con base en sus resultados proponen una recomendación de 90 mg/día de ácido ascórbico. De acuerdo con los autores esta cantidad es suficiente para saturar 80% la reserva de vitamina C de neutrófilos, monocitos y linfocitos sin que exista una pérdida importante de la vitamina por vía urinaria. Adicionalmente muestran que con 90 mg diarios los biomarcadores de estrés oxidativo endógeno (isoprostanos F2 en plasma y orina) se mantienen constantes.

Por otra parte el CAN-EU, calcula la IDR para la mujer gestante con base en las necesidades de la mujer no embarazada haciendo una corrección por peso corporal y agregado — como una forma de estimar las necesidades fetales— la cantidad de vitamina C que evita el desarrollo de escorbuto en lactantes (7 mg/día).³ Esta estrategia presenta al menos dos limitantes: primera, supone que la relación entre el requerimiento y la masa corporal es lineal, punto muy debatible,⁴ y segunda, estima que sólo el feto requiere cantidades adicionales de vitamina C dejando de lado las necesidades de la placenta y las membranas corioamnióticas.

Con respecto a las necesidades de vitamina C, se ha documentado que el ácido ascórbico participa activamente en la síntesis/degradación de colágenas y que éstas constituyen el principal componente de las membranas corioamnióticas, más aún la fuerza y elasticidad de las mismas depende de su contenido de colágenas.^{6,7} Por lo anterior, la ruptura prematura de las membranas corioamnióticas pudiera deberse, entre otros factores, a un inadecuado estado de nutrición en vitamina C. De hecho nuestro grupo de trabajo ha establecido que la presencia de ruptura prematura de membranas (RPM) puede ser considerada como una prueba funcional del estado de nutrición en vitamina C durante la gestación.^{5,8}

Considerando que las gestantes que cursan con una concentración de vitamina C leucocitaria $\geq 18 \mu\text{g}/10^8$ células ($\geq 103 \text{ nmol}/10^8$ células) entre la semana 28 y 32 de gestación presentan incidencia significativamente menor de RPM que aquellas gestantes con concentraciones inferiores,⁹ el objetivo del presente trabajo es establecer la cantidad de vitamina C que requiere ingerir una mujer gestante para mantener su concentración leucocitaria $\geq 18 \mu\text{g}/10^8$ ($\geq 103 \text{ nmol}/10^8$ células) entre las semanas 28 y 32 de gestación; a fin de utilizar esta dosis como base para la estimación de la IDR correspondiente.

Material y métodos

El estudio se realizó en el Instituto Nacional de Perinatología de la ciudad de México y fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del mismo. A las mujeres invitadas se les brindó la información necesaria a fin de que su incorporación en el mismo se diera de manera libre e informada.

Participantes

El estudio se realizó en dos fases en la primera se estableció la dosis idónea de suplementación mientras que en la segun-

da se evaluó la efectividad de la suplementación con vitamina C para mantener la reserva leucocitaria de vitamina C.

- **Fase A:** estudio abierto de suplementación aguda. Se invitó a participar a 10 gestantes —que cursaban con embarazos de bajo riesgo y se encontraban al inicio del segundo trimestre de gestación— a un estudio que consistió en darles dosis crecientes de vitamina C a lo largo de cinco semanas. Las dosis suministradas fueron de 0 (placebo), 50, 100, 150 y 200 mg/día de ácido ascórbico por períodos de una semana. Esta cantidad fue independiente de su consumo dietético de vitamina C y es importante señalar que por tratarse de mujeres gestantes no es ético restringir su consumo de nutrimentos. Al término de cada semana se evaluó la concentración plasmática y leucocitaria de vitamina C, así como la excreción urinaria de ácido ascórbico y se efectuó una encuesta de recordatorio de consumo de 24 horas para estimar la fuente y cantidad de vitamina C dietética (los valores fueron corregidos según la técnica de preparación de los alimentos considerando una pérdida de vitamina C de 50% cuando fueron hervidos y 25% cuando se prepararon al vapor).¹⁰ Durante todo el estudio se verificó que las mujeres no cursaran con procesos infecciosos (incluidas las infecciones cervicovaginales), ni consumieran suplementos vitamínicos.
- **Fase B:** estudio doble ciego aleatorizado. Se invitó a participar a embarazadas que cumplieron con los siguientes requisitos: cursar con menos de 20 semanas de gestación, presentar embarazo con producto único, no consumir suplementos vitamínicos y no presentar patología agregada. Las mujeres fueron asignadas al azar en dos grupos. El grupo A recibió un suplemento de 100 mg diarios de vitamina C y el grupo B consumió un placebo con la misma apariencia (tamaño, forma y color) que el del grupo A.

En la primera evaluación se registraron los antecedentes personales, la historia ginecoobstétrica, el peso y la estatura de cada mujer. A partir de la semana 20 se les evaluó cada cuatro semanas hasta la semana 36 de embarazo. En todas las evaluaciones fueron pesadas, se efectuó un registro de consumo de alimentos de 24 horas para estimar el consumo de vitamina C al igual que en la fase A los datos se corrigieron según técnica de preparación de los alimentos.

Considerando que las infecciones en general y las cervicovaginales en particular pueden disminuir la reserva leucocitaria de vitamina C,¹¹ de manera sistemática se registró la presencia de infecciones y realizaron cultivos de exudado cervicovaginal a lo largo de la gestación para detectar la presencia de infecciones particularmente las debidas a *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Estreptococo* del grupo B, *Eschetichia coli* y *Neiseria gonorrhoeae*. En caso de detectar la presencia de infecciones la mujer fue canalizada para su tratamiento.

El tamaño de muestra se calculó con base en la variabilidad de la concentración leucocitaria de vitamina C en mujeres con y sin RPM identificada en estudios previos⁷ y se estimó en 26 casos por grupo considerando una beta de 0.20 y una alfa de 0.05.

Estudios de laboratorio

En una y otra fases del estudio —con la mujer en ayuno y antes de que consumiera el suplemento asignado— en cada evaluación se tomaron 15 mL de sangre con anticoagulante (EDTA) a fin de determinar la concentración de vitamina C en plasma y leucocitos. Para determinar la concentración de vitamina C en plasma se separó el sobrenadante y se congeló a -70°C mientras que para cuantificar la concentración leucocitaria se separó el botón de glóbulos blancos utilizando dextrán T500 y se congeló a -70°C , en uno y otro caso se agregó ácido metafosfórico para evitar la oxidación. Las muestras se descongelaron y se procesaron por duplicado en un solo ensayo utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC- Perkin Elmer), de acuerdo con las técnicas descritas por Johnsen y Winnie.^{12,13} La cantidad de leucocitos se determinó con un contador automatizado de células (Coulter counter T890). El coeficiente de variación intraensayo fue menor a 5%. La determinación de vitamina C en orina también se realizó por cromatografía de líquidos utilizando la misma técnica.^{11,12}

Análisis de resultados

Para describir a la población se utilizaron terciles, centiles y medidas de tendencia central y dispersión según el número y tipo de distribución de los casos. Para la Fase A se realizó un análisis de varianza para medidas repetidas utilizando un modelo polinomial ortogonal (General Linear Models, GLM) para determinar el patrón de cada uno de los compartimentos (plasma, leucocitos y orina) buscando la dosis óptima de vitamina C que permitiera mantener saturada la reserva leucocitaria de vitamina C sin que se incrementara significativamente la excreción urinaria de la misma. Los datos de la fase B también fueron analizados con un modelo polinomial ortogonal para datos repetidos (GLM), analizando las diferencias intragrupos (evolución del embarazo) e intergrupos (suplementación con vitamina C vs placebo). En los modelos de valores repetidos se utilizó la prueba de Huynh-Feldt ajustando los grados de libertad cuando no se pudo confirmar esfericidad (Huynh-Feldt epsilon= 0.608, 0.826 y 0.393 para las determinaciones de plasma, leucocitos y orina de la fase A y 0.872 y 0.858 para las determinaciones de plasma y leucocitos de la fase B). Se informan únicamente los grados de libertad correspondientes a la prueba de F. Se verificó que se cumplieran todos los requisitos estadísticos antes de efectuar los análisis. Todos los análisis se realizaron con apoyo del paquete estadístico SPSS versión 10 (Chicago, IL).

Resultados

Fase A

Las mujeres que participaron en esta fase se encontraban entre los 20 y los 42 años de edad con una media de 26.6 años, su estatura era de 154 ± 6 cm en promedio y su índice de masa corporal pregestacional (el peso pregestacional se obtuvo por recordatorio) correspondió a 26.3 ± 3.7 . Su escolaridad correspondió a educación media (9 ± 3 años).

A lo largo de las cinco semanas su consumo dietético de vitamina C fue constante con promedio de 50 mg/día, sin embargo esta cifra debe ser tomada con precaución porque las encuestas de recordatorio poseen muy baja precisión para registrar el consumo de esta vitamina.¹⁴

En el cuadro I se presentan los terciles de las concentraciones de vitamina C en plasma, leucocitos y orina de los cinco periodos de estudio. Las concentraciones plasmáticas mostraron un incremento lineal progresivo ($F_{1,8}=18.427$; $p=0.003$), sin que fuera posible identificar un punto de saturación; mientras que la concentración leucocitaria alcanzó la saturación cuando las mujeres recibieron el suplemento de 100 mg de vitamina C (contraste lineal $F_{1,8}=0.056$; $p=0.81$; contraste cuadrático $F_{1,8}=17.164$; $p=0.003$). Por lo que toca a la excreción urinaria de la vitamina se observó que esta se incrementó

Cuadro I. Vitamina C en plasma, leucocitos y orina de acuerdo con la dosis de suplementación

Vitamina C	Tercil	Dosis de suplementación con vitamina C (mg/día)				
		0	50	100	150	200
Plasma $\mu\text{mol/l}$	1	31.8	32.4	46.6	89.1	101.5
	2	36.9	44.3	85.2	117.0	147.7
	3	47.7	54.5	116.5	128.9	161.9
Leucocitos $\text{nmol}/10^8$	1	67.8	82.4	100.5	82.7	80.7
	2	87.5	109.6	113.6	100.5	90.9
	3	99.4	125.0	139.0	129.7	99.4
Orina $\mu\text{mol/l}$	1	17.0	22.7	102.3	90.9	56.8
	2	22.7	56.8	204.5	318.1	124.9
	3	34.1	79.5	374.9	443.1	181.8

Diferencias intrasujetos, ANOVA para datos repetidos (GLM)
 Plasma contraste lineal $F_{1,8}=18.427$; $p=0.003$
 Leucocitos contraste lineal $F_{1,8}=0.056$; $p=0.81$, contraste cuadrático $F_{1,8}=17.164$; $p=0.003$
 Orina. Contraste lineal $F_{1,8}=13.839$; $p=0.006$; contraste cuadrático $F_{1,8}=10.239$; $p=0.013$

de manera significativa a partir de la suplementación con 100 mg de vitamina C (contraste lineal $F_{1,8}=13.839$; $p=0.006$; contraste cuadrático $F_{1,8}=10.239$; $p=0.013$). Con base en estos resultados se estableció que la dosis óptima de suplementación correspondía a 100 mg/día.

Fase B

De las 52 mujeres invitadas 47 completaron el estudio sin que se encontraran diferencias en la deserción según el grupo de tratamiento, la edad o la concentración basal de vitamina C en plasma o en leucocitos. En el cuadro II se presentan las características generales de las mujeres estudiadas. Como se puede observar en general eran mujeres multigestas con un promedio de edad de 27 ± 6.7 años y su IMC pregestacional informado mostró una tendencia al sobrepeso (IMC 24.5 ± 4.5). Durante la gestación su porcentaje de adecuación de peso para la estatura y edad gestacional (PIT y EG) se ubicó entre los 107 y 111 % de acuerdo a las tablas de Arroyo.¹⁵

Cuadro II. Características generales del grupo estudiado en la fase B

Características generales	Vitamina C n = 21	Placebo n = 26	p ^a
Edad años	27.7 ± 6.7	26.0 ± 6.3	0.38
Gestaciones ^b	2 (1-6)	2 (1-5)	0.98 ^c
Estatura cm	155.4 ± 6.7	155.0 ± 6.9	0.85
IMC Pregestacional	24.8 ± 5.1	24.7 ± 4.2	0.91
% P/E y eg (semana 20) ^d	100 (77-158)	100 (89-147)	1.00

^a prueba de t para muestras independientes.

^b media (intervalo)

^c Koimogorov-Smimov

^d Peso esperado para la estatura y la edad gestacional

Con relación a la presencia de infecciones cervico-vaginales en la semana 20 de la gestación 18 mujeres las presentaron y fueron tratadas de tal manera que para las semanas 24 a 28 sólo dos de cada 10 estaban infectadas, no se encontraron diferencias en la incidencia de infecciones entre grupos.

De acuerdo con la encuesta de recordatorio de consumo de alimentos de 24 horas la mediana de consumo dietético de vitamina C fue de 65 mg/día (los percentiles 25 y 75 correspondieron a 42 y 120 mg/día), siendo las fuentes más importantes los cítricos, el jitomate y el chile. No se encontró diferencia en el consumo informado entre los grupos de estudio y el consumo de las mujeres a lo largo de la gestación fue relativamente constante, sin embargo estos datos deben ser considerados con precaución debido a las razones antes señaladas.

En la semana 20 de gestación el promedio de la concentración plasmática de vitamina C fue de $34.7 \pm 11.8 \mu\text{mol/L}$, lo cual es considerado como adecuado de acuerdo con el criterio propuesto por Jacob para adultos varones ($>23 \mu\text{mol/L}$).¹⁶ Al analizar los cambios a lo largo del seguimiento, se observó una disminución significativa a lo largo de la gestación en todas las mujeres (diferencia intrasujetos $F_{3,135} = 7.379$; $p < 0.005$) con un comportamiento lineal (contraste polinomial lineal $F_{1,45} = 17.670$; $p < 0.005$). Cabe mencionar que no fue posible establecer efecto de la suplementación entre los grupos ($F_{1,45} = 2.258$; $p = 0.140$) (Cuadro III).

Las concentraciones leucocitarias de vitamina C en el grupo completo se mostraron relativamente constantes a lo largo de la gestación ($F_{3,135} = 2.592$; $p = 0.065$). En contraste, las mujeres que recibieron suplementación con vitamina C presentaron un incremento significativo en la concentración leucocitaria de vitamina C mientras que las mujeres con placebo mostraron un decremento significativo en sus indicadores de reserva de ácido ascórbico (interacción intrasujetos $F_{3,135} = 5.296$; $p = 0.002$) (Cuadro III). Las diferencias entre los dos grupos incrementaron conforme prosperó la gestación (contraste polinomial lineal $F_{1,45} = 11.669$; $p = 0.001$). El promedio de la concentración de vitamina C leucocitaria en las semanas 28 y 32 de gestación fue de 123.7 y 129.7 nmol (21.49 y 22.66 mg)/ 10^8 células respectivamente, mientras que entre las mujeres que recibieron placebo en esas semanas las cifras correspondieron a 97.6 y 82.0 nmol (17.0 y 14.3mg)/ 10^8 células.

Discusión

Antes de iniciar la discusión de los resultados encontrados se deben señalar dos puntos. Primero la fase A se trató de un experimento agudo lo que no necesariamente refleja las condiciones reales de respuesta y más aún si se considera que las mujeres estudiadas se encuentran en una condición fisiológica que demanda cantidades importantes de diversos nutrimentos. Segundo por tratarse de mujeres gestantes no es ético realizar un estudio del tipo agotamiento/saturación como los que se han realizado en varones y mujeres en edad reproductiva, lo que obliga a partir del consumo habitual de vitamina C con todas las limitantes que esto implica.

De los resultados presentados se puede concluir que la dosis de 100 mg/día de vitamina C es una cantidad que permite alcanzar un punto de saturación leucocitaria sin incrementar significativamente la cantidad excretada por vía urinaria (fase A). Es importante resaltar el hecho de que ni con la dosis más alta ensayada (200 mg + dieta) no se logró alcanzar el punto de saturación plasmática lo cual apoya la idea de que la IDR del CAN-EU esta por debajo de las necesidades reales de las mujeres gestantes. De hecho en una revisión reciente de Levine y colaboradores, plantean — al estudiar adultos varones sanos— que las IDR del CAN-EU subestiman las necesidades reales de este nutrimento.¹⁷ En este mismo sentido, la Agencia Francesa para la Seguridad Alimentaria (AFSA) establece la IDR de vitamina C para mujeres en edad reproductiva con base en la cantidad de ácido ascórbico requerido para saturar el plasma, suponiendo que esta cantidad provee la máxima protección ante los procesos oxidativos.¹⁸ La IDR de la AFSA para mujeres en edad reproductiva es de 10 mg/día y de 120 mg/día para las gestantes. Cabe señalar que esta última recomendación se basa realizó con base en ajuste por peso corporal y no se deriva de estudios experimentales.

Al analizar las concentraciones de vitamina C a lo largo de la gestación (Fase B) se observa que a pesar de la suplementación la concentración de vitamina C plasmática disminuyó conforme prosperaba el embarazo, probablemente esto pudiera ser el resultado de la hemodilución, tal y como se informa en la literaturas así como a la transferencia activa de vitamina C hacia el feto.^{19,20} Es importante mencionar que las concentraciones disminuyeron más en el grupo placebo que el grupo suplementado.

Cuadro III. Concentración de vitamina C en plasma y leucocitos según tipo de suplementación y semana de gestación

Semana de embarazo	Vitamina C n = 21	Placebo n = 26	t	p*
Plasma $\mu\text{mol/l}$				
20	34.6 \pm 12.9	34.8 \pm 11.2	0.06	0.95
24	33.8 \pm 11.1	29.8 \pm 10.6	1.27	0.21
28	31.5 \pm 7.1	28.2 \pm 10.3	1.23	0.22
32	29.1 \pm 6.9	24.0 \pm 9.0	2.12	0.04
Leucocitos nmol/10⁸ células				
20	92.7 \pm 20.7	92.6 \pm 26.9	0.01	0.99
24	104.8 \pm 29.9	99.8 \pm 41.3	0.47	0.64
28	123.7 \pm 30.7	97.6 \pm 37.1	2.58	0.01
32	129.7 \pm 42.3	82.05 \pm 37.0	4.13	<0.005

*t para muestras independientes

ANOVA para datos repetidos (General Lineal Models)

Plasma

Diferencias intrasujetos $F_{3,135}=7.379$; $p<0.005$, contraste lineal $F_{1,45}= 17.670$; $p<0.005$

Diferencia intersujetos $F_{1,45}= 2.258$; $p=0.140$.

Leucocitos

Diferencias intrasujetos $F_{3,135}= 2.592$; $p=0.65$, interacción intrasujetos $F_{3,135}= 5.296$; $p= 0.002$

Diferencia intersujetos $F_{1,45}= 11.669$; $p=0.001$.

Las concentraciones de vitamina C en el grupo suplementado tendieron a incrementarse de tal forma que en la semana 32 fueron significativamente más altas que el grupo placebo (Cuadro III), y se encontraron por arriba del punto de corte identificado como protección para $\text{RPM} \geq 18 \mu\text{g}/10^8$ ($\geq 103 \text{ nmol}/10^8 \text{ células}$).⁴ Por otra parte, el grupo placebo tendió a mostrar un decremento significativo en las concentraciones de vitamina C leucocitaria que probablemente se asocie con una mayor incidencia de RPM.

En conclusión, con base en los resultados presentados en este estudio se puede plantear que la IDR para la mujer gestante se puede establecer en al menos en 100 mg/día, cantidad que se puede cubrir a través del consumo de una dieta correcta.

Referencias

- Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids. Washington, National Academy Press 2000. p. 95-185.
- Levine M, Wang Y, Padayatty SJ, Morrow J. A new recommended dietary allowance of vitamin C for healthy young women. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:9842-9846.
- Goldsmith GA. Human requirements in Vitamin C and its use in clinical medicine. *Ann NY Acad Sci* 1961;92:230-245.
- Rucker R, Storms D. Interspecies comparison of micronutrient requirements: metabolic vs. absolute body weight *J Nutr* 2002;132:2999-3000.
- Pfeffer F, Casanueva E, Kamar J, Guerra A, Perichart O, Vadillo-Ortega F. Modulation of 72-Kilodalton Type IV Collagenase (matrix Metalloproteinase-2) by Ascorbic Acid in cultured human amnion-derived cells. *Biol Reprod* 1998;59:326-329.
- Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *N Engl J Med* 1986;314:892-902.
- Maymon E, Romero R, Pacora P, Gómez R, Athayde N, Edwin S, Yoo K. Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition premature rupture of membranes and intrauterine infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:94-99.
- Casanueva E, Vadillo-Ortega F, Pfeffer F, Tejero E. Vitamin C and premature rupture of chorioamniotic membranes. *Nut Res* 1998;18:241-245.
- Casanueva E, Polo E, Tejero E, Meza C. Premature rupture of amniotic membranes as functional assessment of vitamin C status during pregnancy. *Ann NY Acad Sci* 1993;6778:369-370.
- Combs GF Jr. Vitamin C. En: The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health. San Diego, Academic Press 1992;223-251.
- Casanueva E, Reyes L, Luna A, Tejero E, Pfeffer F, Meza C. Vitamin C and Cervicovaginal infections in pregnant women. *Nutr Res* 1998;18:939-944.
- Johnsen H, Ringvold A, Blinka S. Ascorbic acid determination in serum and aqueous humor by high performance liquid chromatography. *Acta Ophthalmologica* 1985;63:31-34.
- Winnie L, Peggy H, Hutchinson M. Ascorbic acid in lymphocytes: cell preparation and liquid-chromatographic assay. *Clin Chem* 1982;28:2165-169.
- Palaniappan U, Cue RI, Payette H, Gray-Donald KG. Implications of day-to day variability on measurements of usual food and nutrient intakes. *J Nutr* 2003. p. 232-235.
- Arroyo P, Casanueva E, Reynoso M. Peso para la talla y edad gestacional. Tablas de referencia. *Gin Obst Mex* 1985;53:227-231.
- Jacob RA. Vitamin C in Modern Nutrition. En: Health and Disease, Shilts ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, eds 9th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins 1999. p. 476.
- Levine M, Rumsey S, Daruwala R, Park JB, Wang Y. Criteria and recommendations for vitamin C intake. *JAMA* 1999;1281:1415-1423.
- French Food Safety Agency Nutritional recommendations for the French population. *Sciences des Aliments* 2001;21:402-407.
- Morse EH, Clark RP, Keyser DE, Merrow SB, Bee DE. Comparison of the nutritional status of pregnant adolescents with adult pregnant women. 1 Biochemistry findings. *Am J Clin Nutr* 1975;28:1000-1013.
- Choi JL, Rose RC. Transport and metabolism of ascorbic acid in human placenta. *Am J Physiol* 1989;257:C110-C113.