



ARTIGO ORIGINAL

Cobre sérico e tecidual em rata gestante desnutrida e em sua prole

Tissue and serum copper concentration in malnourished pregnant rats and in their offspring

Fátima A.A. Sardinha¹ e Olga M.S. Amancio²

Resumo

Objetivo: Verificar o "status" do cobre em rata gestante desnutrida e na sua prole.

Método: Utilizou-se ratas Wistar com idade de 90 dias e peso corporal de 200±20g. Após confirmada a prenhez, esses animais, por randomização, deram origem aos grupos gestantes controle-GC, desnutridos-GD1 (desnutrição grave), e GD2-(desnutrição leve), e os filhotes, obtidos por cesárea, formaram os grupos de recém-nascidos RNC, RND1 e RND2 respectivamente. Os tecidos coletados (fígado, músculo, osso, placenta e carcaça) sofreram digestão líquida prévia e a determinação de cobre nesses e no soro foi feita por espectrofotometria de absorção atômica.

Resultados: as concentrações de cobre sérico, ósseo, placentário e hepático mostraram diferença significativa entre os grupos gestantes. No fígado essa diferença foi também significativa nos grupos recém-nascidos. Os valores de cobre na carcaça foram estatisticamente menores nos animais recém-nascidos controle.

Conclusões: há oferta adequada de cobre materno para o feto independentemente do estado nutricional da mãe, o que ocorre pela mobilização de cobre hepático na gestante controle e pela mobilização também do cobre ósseo na gestante desnutrida; porém, o aproveitamento pelo feto é inadequado na vigência de desnutrição intra-uterina.

J. pediatr. (Rio J.). 1997; 73(5):305-310: cobre, rato, desnutrição.

Introdução

Embora a presença do cobre em tecidos animais e vegetais tenha sido reconhecida durante o século XIX, nada foi publicado acerca de sua necessidade para animais até o início do século XX. A primeira evidência foi relatada em 1928, mostrando a importância desse elemento, além da do ferro, para a formação da hemoglobina em ratos¹. A sua essencialidade para o desenvolvimento de mamíferos foi demonstrada posteriormente, em 1942, em carneiros².

Abstract

Objective: To study copper status in malnourished pregnant rat and its offspring.

Methods: Female Wistar rats at age of 90 days and body weight of 200±20g were studied. These animals were randomly assigned to one of the 3 pregnant groups: control-PC, malnourished-MP1 (severe malnutrition) and MP2 (mild malnutrition), and their offspring, born by cesarean section, constituted the newborn groups: NBC, MNB1 and MNB2, respectively. The collected tissues (liver, muscle, bone, placenta and carcass) suffered previous liquid digestion, and the copper level, also in serum, was determined by atomic absorption spectrophotometry.

Results: the copper level in serum, bone, placenta and liver showed a significant difference between the pregnant groups; in the liver this difference was also significant between newborn groups. The values of the copper in the carcass were statistically lower in the newborn control animals.

Conclusions: there is appropriate offer of maternal copper to the fetus which does not depend on the nutritional state of the mother, because there is a mobilization of the hepatic copper in the pregnant control group and also a mobilization of bone copper in the malnourished pregnant groups; however the intrauterine malnutrition is the one that determines inappropriate utilization of this ion by the fetus.

J. pediatr. (Rio J.). 1997; 73(5):305-310: copper, rat, malnutrition.

Alguns estudos em humanos mostraram que o aumento do nível sérico de cobre é muito pequeno no início da gestação, aumentando significativamente no último trimestre, quando ocorre maior acúmulo do metal no fígado fetal³. Nesse período o feto acumula aproximadamente 90 mg de Cu/kg peso/dia^{4,5}, de tal forma que ao nascimento tem proporcionalmente maior concentração tecidual do que os adultos⁵, fato esse também verificado em ratos⁶.

A literatura é pobre no estudo do cobre na vigência de desnutrição intra-uterina. Sutton et al., apresentando alguns casos de recém-nascidos prematuros, com baixo peso, observaram sintomas como edema e crises de apnéia persistentes. A análise sanguínea demonstrou que a cupremia estava diminuída e, em alguns casos, foi observado também neutropenia e leucopenia. A administração de sulfato de

1. Mestre em Ciências Aplicadas à Pediatria - UNIFESP/EPM.

2. Profª Drª Adjunta do Departamento de Pediatria da UNIFESP/EPM.

Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo - EPM.

Fonte Financiadora: CNPq.

cobre resultou em melhora sensível do quadro e recuperação do peso das crianças⁷.

Dada a importância nutricional do cobre e pelas condições facilitadoras à desnutrição intra-uterina em nosso meio, justifica-se o estudo do "status" do cobre em rata gestante desnutrida e na sua prole.

Métodos

Para este trabalho experimental, foram utilizadas 30 ratas Wistar nulíparas que, para inclusão no estudo, apresentavam peso corporal entre 180 e 220g aos 90 dias de vida (adultas eutróficas). Todos os animais foram mantidos em biotério com controle de luz (12 horas de luz e 12 horas de escuro), de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), de renovação de ar e em caixas de polipropileno com cama de maravalha esterilizada.

Comprovando-se a cópula por esfregaço vaginal, considerou-se esse o dia zero da gestação. Por randomização formaram-se grupos com 10 animais cada: *Gestante Controle (GC)*; *Gestante Desnutrida-1 (GD1)* e *Gestante Desnutrida-2 (GD2)*. Foram controlados a ingestão diária de ração e o peso corporal de 3 em 3 dias. No 21º dia de gestação foram submetidas à cesariana, obtendo-se os animais dos grupos recém-nascidos RNC, RND1 e RND2, em concordância com as mães.

Foi utilizada ração purificada isocalórica com teor protéico de 15% para o grupo controle, de 3,8% para a obtenção do grupo desnutrido grave e 7,6% para a do grupo desnutrido leve, sendo que a fonte protéica foi a caseína. A ração e água foram oferecidos "ad libitum". A mistura de vitaminas foi a proposta por Lajolo et al.⁸, e a mistura salina, segundo Fox & Briggs⁹.

O sangue foi coletado por punção cardíaca nos animais adultos e por decapitação nos recém-nascidos.

O fígado, músculo (gastrocnêmio), osso (fêmur) e placenta dos grupos gestantes e o fígado e carcaça (considerando-se pele, osso e músculo) dos grupos recém-nascidos, após retirados, foram colocados em estufa a 120°C até manutenção de peso constante, obtido em 3 pesagens sucessivas¹⁰.

Todas as amostras foram conservadas a -18°C até o momento das dosagens. Todo o material que entrou em contato com as amostras foi tratado com ácido nítrico 5N para evitar a contaminação pelo cobre^{11,12}. As análises foram procedidas por técnicos especializados. A concentração sérica e nos tecidos estudados foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica-Perkin-Elmer, modelo 5100, nas seguintes condições: *comprimento de onda*: 324.8nm; *fonte*: lâmpada de cátodo oco; *chama*: ar/acetileno; *queimador*: 1 fenda. Para tanto, o soro foi diluído 1:10 com água desionizada, e os padrões utilizados para a curva tinham as seguintes concentrações: 0.05; 0.10 e 0.30 mgCu/l. Os tecidos sólidos sofreram digestão líquida prévia¹³.

Para a análise dos resultados, utilizou-se testes paramétricos e testes não paramétricos, dependendo da natureza das variáveis estudadas. Foi utilizado Teste "t" de Student para dados não pareados¹⁴, para comparar os pesos inicial e final do período gestacional. Foi feita Análise de Variância para grupos independentes¹⁴, para comparar o peso dos animais recém-nascidos; quando a estatística F mostrou-se significativa, foi complementada pelo Teste de Contraste de Scheffé¹⁴. Foi Feita Análise de Variância por Postos de Kruskal-Wallis¹⁵, para comparar a ingestão de ração no período gestacional e a concentração sérica e tecidual de cobre dos grupos estudados. Quando mostrou diferença significativa, esta análise foi complementada pelo Teste de Comparações Múltiplas¹⁶.

Fixou-se $\alpha \leq 0.05$ ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade, assinalando-se com asterisco os valores significantes.

Resultados

Observa-se na Figura 1-A que o peso corporal do grupo GD1 foi significativamente menor que os dos grupos GC e GD2, enquanto que esses últimos não mostraram diferença entre si, ($\text{GD1} < \text{GC}, \text{GD2}$). Esse fato pode ser explicado ao ser verificada a ingestão de ração (Figura 1-B). No grupo GD2 houve crescente ingestão, principalmente nos 8 primeiros dias, o que poderia estar indicando uma tentativa do organismo de se recuperar, persistindo até por volta do 15º dia, quando então houve uma queda acentuada da ingestão, provavelmente pela instalação de anorexia, decorrente do baixo teor protéico da ração. Esse fato ocorreu mais precocemente nos animais do grupo GD1, cuja ingestão foi sempre inferior a dos outros 2 grupos, possivelmente justificada pelo teor protéico da ração ainda menor^{17,18}.

A Tabela 1 mostra que houve diferença significativa entre os 3 grupos de recém-nascidos quanto ao peso ao nascimento, sendo $\text{RNC} > \text{RND2} > \text{RND1}$, ou seja, quanto maior a desnutrição imposta à gestante, menor o peso corporal dos seus recém-nascidos. Para o cálculo da média do peso corporal nesses grupos, utilizou-se todos os ani-

Tabela 1 - Peso corporal ao nascimento dos animais recém-nascidos dos sexos masculino e feminino[†]

Grupo	Peso Corporal (g)	
	Masculino	Feminino
RNC	4,97 ± 0,7* (57)	4,64 ± 0,6* (63)
RND1	3,09 ± 0,5* (65)	3,07 ± 0,6* (55)
RND2	3,91 ± 0,6* (81)	3,87 ± 0,6* (51)

* $p \leq 0.05$

† Média, desvio padrão e número da amostra ().

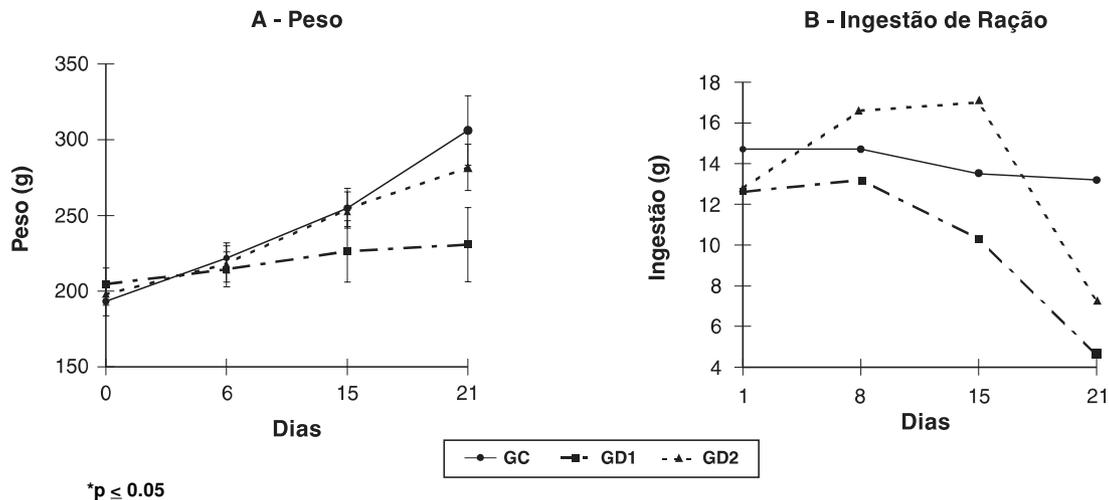


Figura 1 - Peso corporal (g) e ingestão de ração (g) dos animais gestantes nos dias 0, 6, 15 e 21 e 1, 8, 15 e 21 respectivamente. Média e desvio padrão

mais provenientes das cesáreas de cada grupo gestante.

Com os resultados obtidos nos grupos gestantes e recém-nascidos, fica evidente que a metodologia empregada para obtenção de desnutrição intra-uterina foi eficiente.

Com referência à concentração de cobre nos animais gestantes (Tabela 2) foram observadas diferenças significantes no soro, sendo GC > GD1, enquanto que GD2 apresentou valor maior que o grupo desnutrido grave e menor que o controle. Por outro lado, no fígado, os animais com desnutrição leve (GD2) apresentaram valores significativamente menores aos dos outros 2 grupos, e os desnutridos graves não foram diferentes estatisticamente aos controles: GD2 < GC, GD1. No músculo, não houve diferenças entre os 3 grupos. Já no osso e placenta, os resultados obtidos mostraram GC > GD1 > GD2 e GC < GD1, GD2 respectivamente, não sendo observada diferença estatística entre os animais desnutridos quanto às concentrações de cobre placentário (Tabela 2).

Nos animais recém-nascidos (Tabela 3), as diferenças estatísticas observadas ocorreram apenas no fígado, sendo RNC > RND2, e na carcaça, RNC < RND1, RND2.

Tabela 3 - Concentração de cobre sérico e tecidual nos animais recém-nascidos[†]

Grupo	Soro (µgCu/dl)	Fígado (µgCu/gTec.seco)	Carcaça
RNC (10)	50,0	66,0*	14,0*
RND1 (10)	30,0	40,0	28,0*
RND2 (10)	50,0	30,0*	28,0*

* p ≤ 0.05 † Mediana e número da amostra ().

Tabela 2 - Concentração de cobre sérico e tecidual nos animais gestantes[†]

Grupo	Soro (µgCu/dl)	Fígado (µgCu/gTec.seco)	Músculo (µgCu/gTec.seco)	Osso	Placenta
GC (10)	220,0*	27,0*	12,0	36,5*	8,0*
GD1 (10)	140,0*	24,0*	15,0	14,0*	20,0*
GD2 (10)	180,0	11,0*	12,0	8,0*	18,0*

* p ≤ 0.05 † Mediana e número da amostra ().

Discussão

Concentração de Cobre Sérico e Tecidual

Animais Gestantes

A cupremia significativamente menor no grupo GD1 em relação ao GC pode ser devido à associação do aumento do volume sanguíneo, característico da gestação¹⁹, com a diminuição da síntese protéica e portanto de ceruloplasmina, que ocorre na vigência de desnutrição grave, uma vez que o aumento de cobre no soro, nesse período, é atribuído quase que totalmente à maior síntese de ceruloplasmina pelo fígado²⁰. Além da expansão do volume líquido extracelular característico²¹, a literatura registra, em ratas eutróficas, aumento significativo no peso hepático⁶, com aumento real de massa metabolicamente ativa²², e que as mudanças nos depósitos de cobre, provavelmente, para a placenta e glândulas mamárias, não são refletidas por qualquer diferença biologicamente significativa na concentração desse oligoelemento no fígado, evidenciando que, apesar do aumento de massa observada, há incorporação de cobre de maneira adequada, mantendo assim concentração normal⁶. Na desnutrição há aumento significativo de água e diminuição de massa, sugerindo que no fígado desses animais ocorre a somatória dos efeitos decorrentes da gestação e desnutrição²². Assim é que no grupo GD1, que sofreu desnutrição mais intensa, o fato da concentração de cobre no fígado não ter sido diferente estatisticamente da do grupo GC, na presença de provável diminuição de massa hepática, pode ser devido à retenção deste íon na célula. Isso porque é descrita alteração na distribuição subcelular do íon, dependente da sua quantidade no fígado, indicando a presença de mecanismos homeostáticos protetores neste órgão²³ o que impossibilitou a sua mobilização a partir deste depósito. Esta hipótese foi comprovada pela diminuição significativa nos seus níveis séricos, enquanto que no grupo GD2, com provável maior massa hepática em relação ao grupo GD1, não deve ter sido necessária a retenção do cobre, podendo dessa forma ocorrer mobilização, comprovada por níveis séricos estatisticamente maiores em relação aos do grupo GD1 (Tabela 2).

No músculo, em ratas, é descrito aumento real de massa muscular sem alteração da hidratação^{22,24}, mesmo quando à gestação soma-se a desnutrição²⁵. É possível que haja necessidade de maior tempo de deficiência para que esse tecido se altere significativamente. Como dado indireto, em favor dessa observação, ressalta-se que alterações anátomo-patológicas no músculo só aparecem 8 a 10 semanas após o início da desnutrição em macacos²⁶. Há registro de que nos tecidos moles o cobre estaria associado a enzimas²⁷. Considerando a literatura, pode-se supor que também não tenha ocorrido alteração de massa muscular nos 3 grupos (GC, GD1 e GD2), e, como também não houve diferença na concentração de cobre neste tecido, pressupõe-se que ou o músculo não se constitui em depósito importante para esse mineral, ou a utilização a partir dele é mais difícil em função da sua ligação a enzimas. Os resultados do cobre ósseo sugerem que esse tecido seja impor-

tante para a mobilização de cobre durante a gestação normal, fato também verificado por outros autores estudando o mesmo tipo de osso^{6,22}. Por outro lado, na desnutrição da gestante, efetivamente ocorre diminuição do conteúdo de cobre ósseo, sugerindo mobilização desse elemento. O mecanismo de mobilização de cobre dos tecidos maternos, especialmente do fígado, é lembrado para explicar o aumento de cobre observado durante a gestação normal. Neste trabalho observou-se que nos grupos gestantes desnutridos esse fato ocorreu objetivando não só o fornecimento de cobre ao feto, mas também para manter níveis normais de cupremia maternos, como no caso do grupo GD2. Esta hipótese é reforçada pelos resultados do grupo GD1, ou seja, não houve mobilização de cobre hepático e a cupremia mostrou-se significativamente menor do que a do grupo GC. Para explicar os valores de cobre ósseo menores nos grupos gestantes desnutridos, pode-se imaginar que o mecanismo de mobilização tenha ocorrido também a partir do osso, devido provavelmente à maior facilidade em fazê-lo a partir deste tecido, onde o cobre estaria somente adsorvido aos cristais²².

Foi demonstrado por alguns autores que a placenta, bem como o fígado fetal, são capazes de produzir e sintetizar ceruloplasmina devido à presença de mRNA para essa proteína no retículo endoplasmático rugoso desses órgãos²⁸. No período gestacional os valores placentários de cobre estão aumentados²⁹, reforçando o conceito de que a placenta seja importante para a transferência do cobre da mãe para o feto.

A maior concentração de cobre placentário dos animais desnutridos (GD1 e GD2) em relação aos controles (GC) denota suprimento adequado desse mineral aos filhotes, às custas de mobilização hepática e óssea no grupo GD2 e de mobilização óssea e diminuição da cupremia no grupo GD1, como discutido anteriormente. Entretanto, a sua utilização, adequada ou não, fica na dependência da capacidade fetal de sintetizar proteínas, principalmente a ceruloplasmina. Assim é que a menor concentração de cobre placentário nos animais controle indica melhor utilização deste íon pelo organismo fetal.

Animais recém-nascidos

Lee et al.²⁸ verificaram, em ratos, que o cobre transferido pela mãe ao feto entra na circulação deste último na forma iônica, ligando-se principalmente a transcupreína e em menor proporção à albumina, para depois ligarem-se à ceruloplasmina fetal. Em vista desse fato, pode-se supor que o cobre no soro dos animais RND1 apresentou tendência a valores menores em decorrência de seu estado nutricional mais grave, dificultando um melhor aproveitamento do íon transferido pela mãe. Essa dificuldade não ter ocorrido nos animais do grupo RND2 é coerente com o seu estado nutricional menos grave, o que permitiu valor de cobre sérico sem diferença do controle (Tabela 2).

No fígado, as concentrações de cobre foram cerca de 2 vezes maiores que as de suas respectivas mães. Esses dados

estão de acordo com os encontrados na literatura, uma vez que as concentrações hepáticas de cobre no recém-nascido são superiores às de suas mães, tanto em ratos²² quanto em humanos³⁰. Essa alta concentração é causada pela limitada remoção de cobre do fígado imaturo, ficando os sítios de ligação no citosol saturados, e o excesso de cobre no fígado de recém-nascidos é ligado por lisossomos ou incorporados a proteínas da mitocôndria e núcleo. À medida que o animal matura e a capacidade para remoção de cobre aumenta, o acúmulo de cobre na célula hepática diminui, eliminando assim a necessidade de ligação de cobre pelas organelas celulares. Quando a remoção de cobre hepático atinge sua capacidade máxima, a maior porção do cobre, nesse órgão, está ligada à metalotioneína no citosol²³. O cobre assim depositado assegura quantidade adequada para a síntese de ceruloplasmina e outras cuproproteínas, garantindo a hematopoiese e desenvolvimento de outras funções necessárias ao período de rápido crescimento, que ocorre na vida pós-natal³¹. A menor concentração de cobre hepático nos animais desnutridos (RND1 e RND2) pode ser explicada pela própria incapacidade fetal, determinada pela desnutrição, em utilizar adequadamente o cobre transferido pela mãe, via placenta, diferentemente do que ocorreu nos recém-nascidos controle (RNC). Essa hipótese é corroborada pela maior concentração placentária de cobre nas mães desnutridas em relação às controle, como anteriormente discutido. Resumindo, nos animais desnutridos, a capacidade fetal de utilização do cobre transferido pela mãe limita-se a manter cupremia normal e não a depositá-lo no fígado. Já na carcaça, considerando a redução de massa corporal total e evidenciada pelo peso ao nascimento^{22,32} associada a não-mobilização do cobre, é possível entender como esse elemento apresenta-se em concentração aumentada. A ausência, na literatura, de estudos sobre o cobre na carcaça de animais recém-nascidos impossibilita maiores discussões.

Tais resultados permitem concluir que há oferta adequada de cobre materno para o feto, independentemente do estado nutricional da mãe, o que ocorre pela mobilização de cobre hepático na gestante controle e pela mobilização também do cobre ósseo nas gestantes desnutridas; porém, o aproveitamento pelo feto é inadequado na vigência de desnutrição intra-uterina.

Referências bibliográficas

- Hart EB, Steenbock H, Waddell J, Elvehjem CA. Iron in nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. *J Biol Chem* 1928; 77:797-812.
- Bennetts HW, Harley R, Evans ST. Studies on copper deficiency of cattle; the fatal termination of "falling disease". *Aust Vet J* 1942;18:50-63.
- Kundu N, Parke P, Petersen LP, Palmer IS, Olson O. Distribution of serum selenium, copper and zinc in normal human pregnancy. *Arch Environ Health* 1985; 40(5):268-73.
- Hambidge KM. Trace elements in pediatric nutrition. *Adv Pediatr* 1977; 24:191-203.
- Castillo Durán C, Fisberg M, Uauy R. El cobre como mineral esencial para la nutrición humana. *Rev Chil Pediatr* 1982; 53:262-8.
- Williams RB, Davies NT, Mc Donald I. The effects of pregnancy and lactation on copper and zinc retention in the rat. *Br J Nutr* 1977; 38:407-16.
- Sutton AM, Harvie A, Cockburn F, Farquharson J, Logan RW. Copper deficiency in the preterm infant of very low birthweight. *Arch Dis Child* 1985; 60(7):644-51.
- Lajolo FM, França MHC, Zucas SM. Importância da cor da raça no consumo da mesma por ratos. *Rev. Fac. Farm. Bioquim. Univ S Paulo* 1969; 7:95-103.
- Fox MRS & Briggs GM. Salt mixtures for purified type diets: III. An improved salt mixtures for chicks. *J Nutr* 1960; 242:50-1.
- Bastos HD. Comportamento do magnésio plasmático e tecidual na uremia aguda e no jejum. Estudo experimental no rato. Tese Doutorado, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 1973, Botucatu (São Paulo).
- Peaston RT. Determination of copper and zinc in plasma and urine by atomic absorption spectrophotometry. *Med Lab Technol* 1973;30:249-53.
- Rosenthal RW & Blackburn A. Higher copper concentrations in serum than in plasma. *Clin Chem* 1974; 20:1233-4.
- Marks GE, Moore CE, Kanabrocki E, Oester YT, Kaplan E. Determination of trace elements in human tissue. I. Cd, Fe, Zn, Mg and Ca. *Appl. Spectrosc* 1971; 26:523-7.
- Sokal RR & Rohlf FJ. *Biometry*. W.H. Freeman and Company: San Francisco, 1969:776p.
- Siegel S. *Estadística no Paramétrica*. Ed. Trillas: México, 1975:346p.
- Hollander MR & Wolfe DA. *Nonparametric statistical methods*. New York, John Wiley & Sons, 1973. 503p.
- Frenk S. Protein-energy malnutrition. In: Arneil GC & Metcalf J, ed. *Pediatric Nutrition*. London: Butterworth International Medical Reviews, 1985:153-93.
- Carrazza FR. Desnutrição energético-protéica. In: ___ & Marcondes E. *Nutrição clínica em pediatria*. São Paulo: Sarvier, 1991:265-78.
- Dieckmann WJ & Wegner CR. The blood in normal pregnancy. I. Blood and plasma volumes. *Arch Intern Med* 1934;53:71-86.
- Henkin RI, Marshall JR, Meret S. Maternal-fetal metabolism of copper and zinc at term. *Am J Obst Gynecol* 1971;110:131-4.
- Kanto U & Clawson AJ. Effect of energy intake during pregnancy and lactation on body composition in rats. *J Nutr* 1980;110:1829-39.
- Amancio OMS, Nóbrega FJ, Ancona Lopez F, Gerardi V, Ceragioli F. Comportamento do cobre na desnutrição da gestante e no produto da concepção. Estudo experimental em rato. *Rev Paul Pediatr* 1983; 4:52-63.
- Evans GW. Copper homeostasis in the mammalian system. *Physiol Rev* 1973; 53:535-70.
- Chesley LC. Water, electrolyte and acid-base disorders in pregnancy. In: Maxwell MH & Kleeman CR, *Clinical disorders of fluid and electrolyte metabolism*. 2a. ed. New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1972:995-1022.

25. Ancona Lopez F & Nóbrega FJ. Comportamento do magnésio plasmático e tecidual em desnutrição protéico-calórica experimental. *J Pediatr (Rio J.)* 1978;44:83-8.
26. Deo MG, Sood SK, Ramalingawami U. Experimental protein deficiency. *Arch Pathol* 1965; 80:14-23.
27. Raisz LG. Calcium, phosphate, magnesium and trace elements. In: Maxwell MH, Kleeman CR. *Clinical disorders of fluid and electrolyte metabolism*. 2ª ed. New York: Mc Graw Hill Book co., 1972: 347-400.
28. Lee SH, Lancey R, Montaser A, Madani N, Linder MC. Ceruloplasmin and copper transport during the latter part of gestation in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993;203:428-39.
29. Poczekaj J, Hejduk J, Chodera A. Behaviour of copper in trophoblast and in placenta at term. *Gynaecologia* 1963; 155: 155-9.
30. Mason K. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. *J Nutr* 1979; 109:1979-2066.

31. Shaw JCL. Trace elements in the fetus and young infant: copper, manganese, selenium and chromium. *Am. J Dis Child* 1980;134:74-81.
32. Ancona Lopez F. Repercussões da desnutrição da gestante no comportamento das proteínas plasmáticas e do cálcio, fósforo e magnésio plasmático e ósseo. Estudo em ratos recém-nascidos, jovens e adultos. Tese Livre-Docência - Faculdade de Medicina de Botucatu 1979; Botucatu (São Paulo).

Endereço para correspondência:

Dra. Fátima Aparecida Arantes Sardinha
Rua Botucatu, 703 - CEP 04023-062 - São Paulo / SP
Fone/Fax: (011) 549.8993