

Perfil Fosfolipídico Pulmonar em Recém-nascidos de Ratas Diabéticas

Lung Phospholipid Profile in the Pups of Diabetic Rats

Marilza Vieira Cunha Rudge, Iracema de Mattos Paranhos Calderon, Maria Delgi Ramos
Ana Carolina Japur de Sá, Paulo Roberto Curi

RESUMO

Objetivo: avaliar as repercussões do diabetes materno sobre o perfil fosfolipídico pulmonar de fetos de ratas com diabetes moderado e grave pelas dosagens de lecitina (L), esfingomielina (E), fosfatidil-glicerol (PG), fosfatidil-inositol (PI) e relações L/E e PG/PI.

Métodos: foram utilizadas 54 ratas Wistar, em idade reprodutiva, introduzidas na seqüência experimental de diabetes e prenhez¹. O diabetes foi induzido por aloxana (42 mg/kg de peso, IV) e compostos três grupos: controle, diabetes moderado (DM, glicemia entre 120 e 200 mg/dL) e diabetes grave (DG, níveis superiores a 200 mg/dL). Realizou-se cesárea no 21º dia, os pulmões fetais foram macerados, reunidos em "pool" e os fosfolipídios dosados por cromatografia em camada delgada unidirecional.

Resultados: os pulmões dos filhotes das ratas com diabetes moderado tiveram maior peso (0,159 g) e menor concentração de PG (3,0 µg/mL) e PI (3,4 µg/mL) que o grupo controle (0,155 g; 6,8 e 6,7 µg/mL), e as mesmas relações L/E (2,2) e PG/PI (2,0); os pulmões dos filhotes das ratas com diabetes grave tiveram menor peso (0,145 g), os mesmos valores das relações L/E (1,9) e PG/PI (2,1) e menor valor de PI (5,1 µg/mL) que o grupo controle.

Conclusões: 1) o retardo do amadurecimento pulmonar dos recém-nascidos de ratas com diabetes moderado é explicado pelo maior peso pulmonar associado à menor concentração de PG e PI; 2) a aceleração do amadurecimento pulmonar dos recém-nascidos de ratas com diabetes grave é explicada pelo menor peso pulmonar associado à mesma concentração de PG e PI.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes. Maturidade pulmonar. Perfil fosfolipídico pulmonar.

Introdução

O diabetes materno altera a síntese e a secreção dos fosfolipídios pulmonares. Vários trabalhos mostram atraso na maturação bioquímica do pulmão fetal de gestantes diabéticas^{2,3}, fator responsável pela maior incidência de síndrome do desconforto respiratório (SDR) nesses recém-nascidos⁴. Entretanto, permanece sem explicação o fato de que uma patologia, que se caracteriza por hiperglicemia materna, possa atrasar a maturidade pulmonar nas diabéticas gestacionais e nas clínicas de curta duração, e acelerá-la nas diabéticas clínicas com vasculopatia²⁻⁶. Alguns especulam sobre a influência dos quadros hipertensi-

vos e da vasculopatia como fatores aceleradores da maturidade pulmonar fetal nessas gestantes diabéticas.

O perfil fosfolipídico pulmonar, que consiste na determinação da relação lecitina/esfingomielina (L/E) e de fosfatidil-inositol (PI) e fosfatidil-glicerol (PG) no líquido amniótico, aumenta a acurácia do diagnóstico de maturidade pulmonar em diabéticas⁷. O surfactante maduro, isto é, o que contém PG, tem melhor propriedade estabilizadora do alvéolo⁸, sendo a sua determinação o método preditivo acurado da maturidade pulmonar fetal.

Vários trabalhos experimentais *in vivo* e *in vitro* foram feitos para analisar o efeito do diabetes sobre a maturidade pulmonar fetal⁶, sendo que os *in vivo* trazem respostas mais adequadas. Os filhotes de macacas rhesus diabéticas têm menor habilidade em sintetizar, estocar e liberar a lecitina⁹ e os de coelhas diabéticas, menor quantidade de surfactante no lavado pulmonar¹⁰. O pulmão dos fetos de ratas diabéticas tem imatu-

Laboratório Experimental de Obstetrícia - Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP

Correspondência:
Marilza Vieira Cunha Rudge
Rua General Telles, 1396 - ap.81
18602-120 - Botucatu - SP
Trabalho financiado pela FAPESP

ridade morfológica no pulmão e atraso na produção do surfactante e da regulação do metabolismo de glicogênio fetal³. Recém-nascidos de ratas diabéticas apresentam tecido pulmonar imaturo, com células mesenquimais abundantes e espessamento do tecido conectivo pulmonar, o que pode contribuir para o aumento do risco de doença respiratória nestes recém-nascidos¹¹. O uso de modelos experimentais em ratas, com níveis glicêmicos variáveis, deve explicar essas diferenças na maturidade pulmonar em filhos de mães diabéticas.

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as repercussões do diabetes materno sobre o perfil fosfolipídico pulmonar de fetos de ratas diabéticas, procurando explicar os desvios da maturidade pulmonar fetal. O objetivo específico foi a dosagem de L, E, relação L/E, PG, PI e relação PG/PI nos pulmões de filhotes de ratas com diabetes moderado e grave¹.

Material e Métodos

Material

Foram utilizadas 54 ratas da raça Wistar, fêmeas, virgens, em idade reprodutiva de três meses, pesando entre 180 e 250 g. Os animais foram introduzidos na seqüência experimental do modelo de diabetes e prenhez, proposto por Calderon et al.¹, e sorteados para comporem os grupos controle e diabéticos.

A droga diabetogênica foi a aloxana, na dose de 42 mg/kg de peso IV. A glicemia do 15º dia do período diabetogênico classificou as ratas como diabéticas moderadas (DM), com glicemia entre 120 e 200 mg/dL, e graves (DG) - (glicemia >200 mg/dL)¹.

A prenhez foi resolvida por cesárea, sob anestesia inalatória com éter, na manhã do 21º dia, quando foram estudados os seguintes parâmetros nos recém-nascidos: glicemia do "pool" da ninhada, peso corpóreo, peso pulmonar e classificação do peso dos filhotes em PIG (pequeno para a idade gestacional), AIP (adequado para a idade gestacional) e GIG (grande para a idade gestacional), a partir da média de peso do grupo controle mais ou menos um desvio padrão¹. Após a pesagem individual, os pulmões dos recém-nascidos foram reunidos num "pool" representativo de cada ninhada e, no macerado desses pulmões foram dosados os seguintes fosfolípidios: L, E, PG e PI. Foram calculadas as relações L/E e PG/PI. As mães foram sacrificadas por esgotamento da volemia, imediatamente após a retirada dos filhotes.

Métodos

A glicemia materna do "pool" dos recém-nascidos foi determinada por método enzimático (Kit-Celm-Barueri-SP). A dosagem dos fosfolípidios foi feita por cromatografia em camada delgada, seguindo o método de Gluck e Kulovich¹² para líquido amniótico. Foram pesados 200 mg de tecido pulmonar, previamente macerado em gral de porcelana, sob nitrogênio líquido; a seguir, foram homogenizados com 6 ml de mistura clorofórmio:metanol (2:1).

O macerado foi deixado em repouso por 12 horas e filtrado em papel. Transferiram-se 5 mL do filtrado para tubo de centrifuga e foram adicionados 1,5 mL de água deionizada; foram agitados e centrifugados por 20 minutos a 2000 rpm; foi desprezada a fase superior e lavada a fase inferior por três vezes, com 1,5 mL de solvente: 0,3 mL de clorofórmio, 48 mL de metanol, 47 mL de H₂O deionizada; após a terceira lavagem, foram pipetados 200 µL para tubo cônico e evaporados em banho-maria a 60°C; a parede do tubo foi lavada duas vezes, com 2,0 mL de clorofórmio. Foi evaporada após cada adição de clorofórmio, e o tubo seco foi colocado em banho de gelo e acrescentadas três gotas de acetona gelada. Deixado em repouso por 5 minutos; acrescentado 0,75 mL de acetona gelada, deixado em repouso por 15 minutos, centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm, desprezado o sobrenadante por inversão do tubo; o precipitado foi resuspenso em 10 µL de clorofórmio e foram aplicados 5 µL de amostras e padrões em placa de sílica-gel 60, ativada em estufa a 110°C.

O solvente utilizado para a corrida cromatográfica foi composto de 12,8 mL clorofórmio, 4,0 mL de metanol, 1,92 mL de ácido acético glacial e 0,32 mL de água deionizada. Após a corrida, a placa foi corada com mistura de 325 mg de ácido fosfomolibdico e 5 ml de metanol. As leituras das amostras e dos padrões foram feitas em densitômetro marca Procyon. As placas para cromatografia eram de sílica-gel 60, sem indicador de fluorescência, marca Merck. Os padrões, da marca Sigma, foram lecitina-esfingomielina 1:1, em clorofórmio-metanol, na concentração de 1 µg/mL; fosfatidil-glicerol 2 µg/mL, em clorofórmio-metanol, e fosfatidil-inositol 2 µg/mL, em clorofórmio.

A proporção dentro das classes de recém-nascidos (PIG, AIP e GIG) foi avaliada pelo teste do χ^2 . Para as variáveis glicemia, peso corpóreo, peso e dosagem de fosfolípidios (L, E, PG e PI) dos pulmões dos recém-nascidos utilizou-se a análise de variância para fatorial inteiramente aleatória, sorteando-se seis ratas por grupo. Para a glicemia materna, medida ao longo do tempo, foi utilizada análise de perfil e, para correlação entre

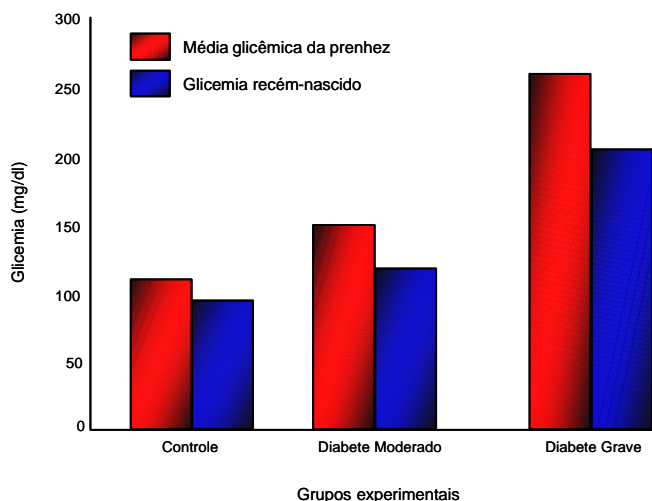
as variáveis, a análise de correlação, adotando-se 5% como limite de significância ($p < 0,05$)^{13,14}.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Resultados

As médias glicêmicas maternas foram normais no grupo controle (110 mg/dL) e elevadas nos grupos diabéticos (150 mg/dL no DM e 260 mg/dL no DG), e refletiram-se sobre os filhotes, que apresentaram normoglicemia nos grupos controle (94 mg/dL) e diabetes moderado (DM - 120 mg/dL) e hiperglicemia no diabetes grave (DG - 208 mg/dL) (Figura 1).

Os filhotes de ratas com DM tiveram maior peso (5,2 g) e elevada proporção de recém-nascidos GIG (19,4%). Os filhotes de ratas com DG tiveram menor peso (4,7 g) e predomínio de PIG (73,0%) (Tabela 1).



Estatística:

Média glicêmica da prenhez: $DG > DM > C$. Teste $F = 101,49$; valor crítico = 3,52; $p < 0,001$.
Glicemia de filhotes: $DG > (C = DM)$ Glicemia do recém-nascido. Teste $F = 47,63$; $p < 0,001$.

Figura 1 – Média glicêmica da prenhez e glicemia do "pool" de recém-nascidos de ratas nos três grupos experimentais

Tabela 1 – Média e desvio-padrão dos pesos corporal e pulmonar e classificação dos recém-nascidos (RN) em PIG, AIP e GIG nos três grupos experimentais

Grupos	Peso (g) ^(*)		Classificação RN (%) ^(*)		
	Corporal	Pulmonar	PIG	AIP	GIG
Controle	5,1 ± 0,2 ab	0,155 ± 0,011 a ₁	26,8 a ₂	61,4 a ₃	11,7 a ₄
Diabete moderado	5,2 ± 0,4 a	0,159 ± 0,012 a ₁	22,9 a ₂	57,6 a ₃	19,4 a ₄
Diabete grave	4,7 ± 0,2 b	0,145 ± 0,010 a ₁	73,0 b ₂	20,9 b ₃	6,1 b ₄
Estatística	F = 3,63	F = 1,926	$\chi^2 = 115,5$	$\chi^2 = 75,2$	$\chi^2 = 8,4$
Valor p	$p < 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

(*) médias seguidas de mesma letra e índice não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade

Estatística: valor crítico de $r(0,01) = 0,35$; valor observado = 0,70 \ a correlação é significativa

O peso pulmonar dos filhotes foi semelhante nos três grupos (0,155 g no controle; 0,159 g no DM e 0,145 g no DG), mas houve correlação significativa entre os pesos corporal e pulmonar em 70% dos casos ($r = 0,7$) (Tabela 1).

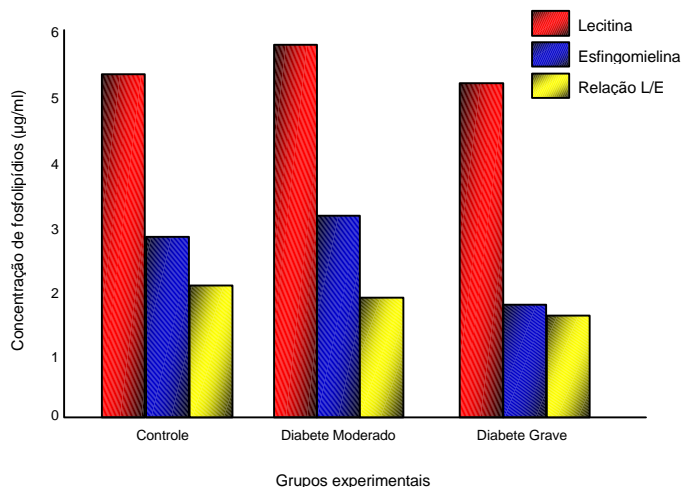
A composição fosfolipídica do pulmão foi semelhante entre os grupos controle e diabéticos nas concentrações de L (5,20 $\mu\text{g/mL}$ no controle, 5,90 $\mu\text{g/mL}$ no DM e 5,10 $\mu\text{g/mL}$ no DG), E (2,80 $\mu\text{g/mL}$ no controle, 3,20 $\mu\text{g/mL}$ no DM e 1,80 $\mu\text{g/mL}$ no DG) e na relação L/E (2,10 no controle, 1,90 no DM e 1,60 no DG); a correlação entre lecitina e esfingomielina foi significativa em 97% dos casos ($r = 0,97$) (Figura 2). Os filhotes do grupo com DM apresentaram concentração menor de PG (2,95 $\mu\text{g/mL}$) e PI (3,55 $\mu\text{g/mL}$) que os filhotes do grupo controle (6,90 $\mu\text{g/mL}$ de PG

e 6,80 $\mu\text{g/mL}$ de PI) e, no grupo com DG (5,0 $\mu\text{g/mL}$ de PG e 2,95 $\mu\text{g/mL}$ de PI), esta concentração não se diferenciou dos demais. A relação PG/PI foi semelhante entre os grupos (2,10 no controle, 1,0 no DM e 2,10 no DG), e a correlação entre PG e PI foi significativa em 52% dos casos (Figura 3).

Discussão

No esquema fisiopatológico proposto por Oh¹⁵, todas as repercussões sobre os conceitos de mães diabéticas decorrem da hiperglicemia materna. Existe consenso na literatura sobre a relação entre peso do recém-nascido de ratas dia-

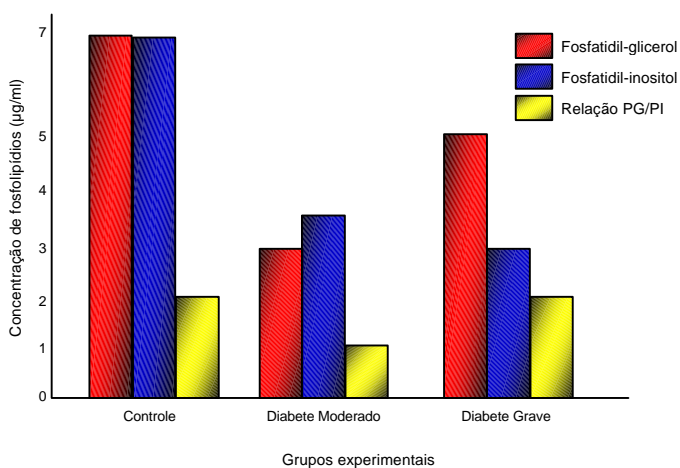
béticas e intensidade da hiperglicemia materna^{1,16}. Entretanto, esta relação não é direta, sendo o diabetes moderado considerado modelo de macrossomia fetal e o diabetes grave de retardo de crescimento intra-uterino^{1,15}, dados confirmados neste trabalho.



Estadística:

Concentração de lecitina: C = DM = DG. Teste F = 0,457; valor crítico = 3,17 $p > 0,05$
 Concentração de esfingomiéline: C = DM = DG. Teste F = 0,231; valor crítico = 3,17 $p > 0,05$
 Relação L/E: C = DM = DG. Teste F = 0,874; $p > 0,10$. Valor crítico de $r(0,01) = 0,35$. Valor observado = 0,97 \therefore a correlação é significativa.

Figura 2 – Média da concentração de lecitina, esfingomiéline e a relação L/E, nos três grupos experimentais



Estadística:

Concentração de fosfatidil-glicerol: DM < C; DG é intermediário. Teste F = 6,232; valor crítico = 3,17 $p < 0,01$.
 Concentração de fosfatidil-inositol: DM = DG < C. Teste F = 6,159; valor crítico = 3,17 $p < 0,01$.
 Relação PG/PI: C = DM = DG. Teste F = 1,306; valor crítico = 3,17 $p > 0,10$. Valor crítico de $r(0,01) = 0,35$. Valor observado = 0,52 \therefore a correlação é significativa.

Figura 3 – Média das concentrações de fosfatidil-glicerol (PG) e fosfatidil-inositol (PI) e a relação PG/PI, nos três grupos experimentais

O peso pulmonar dos filhotes foi semelhante entre os três grupos, porém a correlação entre

os pesos corporal e pulmonar fetal foi significativa em 70% dos casos, mostrando que os maiores pulmões foram encontrados entre os filhotes de ratas com diabetes moderado.

A composição dos fosfolipídios, semelhante nos pulmões de recém-nascidos a termo de ratas dos grupos controle, diabetes moderado e diabetes grave, confirma resultados de trabalhos clínicos anteriores, demonstrando que a determinação da relação L/E não é bom parâmetro para analisar a maturidade pulmonar de filhos de mães diabéticas^{2,17}.

Hallman e Teramo¹⁸ salientam que a presença de PG associado com relação L/E $\geq 2,0$ identifica o pulmão fetal maduro. Os nossos resultados demonstram que os filhotes de ratas com diabetes moderado têm relação L/E > 2 e menor dosagem de PG e PI que o grupo controle. Como esses filhotes têm maior peso corpóreo e, em 70% dos casos ($r = 0,7$) maior peso pulmonar, deveria ser esperada também maior concentração de PG e PI nos seus pulmões, porém isto não ocorreu. A maior concentração de insulina no meio interno dos fetos de ratas com diabetes moderado deve ter sido o fator etiológico para explicar o aumento do peso pulmonar e a diminuição dos fosfolipídios, confirmando o trabalho experimental de Smith et al.⁵. Os fetos de ratas com diabetes moderado têm ilhotas pancreáticas aumentadas de tamanho e com maior produção de insulina, confirmada por técnica de imunohistoquímica¹⁶. A análise conjunta da atividade pancreática fetal com o perfil fosfolipídico pulmonar evidencia que nos animais com diabetes moderado, a hiperinsulinemia fetal deve ser o fator responsável pelo atraso na produção do surfactante pulmonar. Os resultados obtidos neste trabalho permitem a compreensão dos achados clínicos de Gluck e Kulovich¹² de que os recém-nascidos de mães diabéticas das classes A, B e C de White⁴ têm atraso na maturidade pulmonar. A associação dos achados clínicos de maior incidência de SDR nos recém-nascidos de mães diabéticas^{17,19} com os resultados deste experimento sugere que pulmões grandes e com baixa concentração de PG e PI sejam a causa da maior incidência desta patologia nesse grupo de recém-nascidos. Os animais com diabetes moderado simulam o diabetes gestacional humano e o diabetes clínico de curta duração, que se associam à macrossomia fetal, à menor produção de surfactante pulmonar e à maior incidência de SDR.

Os recém-nascidos das ratas com diabetes grave, que em sua maioria são FIG, têm a mesma dosagem de PG e PI que o grupo controle.

Esses recém-nascidos apresentam menor peso pulmonar em 70% dos casos e a mesma concentração de PG e PI que o grupo controle, ou seja, têm na realidade aceleração da maturidade pulmonar. Isto mostra que o diabete grave é fator estimulante do processo de amadurecimento pulmonar. A causa desse amadurecimento pulmonar acelerado deve ser a hipoinsulinemia fetal, pois os pâncreas dos fetos com diabete grave têm ilhotas aumentadas de tamanho mas não têm células insulino-positivas, evidenciando falência funcional do pâncreas¹⁵. Os resultados deste trabalho corroboram a afirmação de Tyralla¹⁹ de que as diabéticas das classes F e R de White⁴ têm aceleração da maturidade pulmonar fetal e menor incidência de SDR.

A insulina, em maior ou menor quantidade, deve modular a produção de surfactante pulmonar e explicar as disparidades de que uma mesma patologia materna possa atrasar e acelerar a maturidade pulmonar fetal. A relação PG/PI não mostrou diferença entre os três grupos, apesar do menor valor no grupo diabete moderado. O cálculo da relação PG/PI, usando as médias de cada grupo, demonstra que no controle esta relação é de 1,0, no grupo diabete moderado ela é menor que 1,0 e no diabete grave é maior que 1,0. Estes achados estão em consonância com os dados de exame do líquido amniótico de fetos de mulheres diabéticas, com e sem maturidade pulmonar²⁰. Em vista dos resultados deste trabalho e dos conhecimentos da literatura, a explicação fisiopatológica para os desvios opostos no amadurecimento pulmonar entre os filhos de ratas com diabete moderado e grave deve estar relacionada com a insulinemia fetal.

Este trabalho experimental confirma os conhecimentos clínicos, explicando os resultados conflitantes da maturidade pulmonar em diabéticas, encontrados em vários trabalhos clínicos e experimentais da literatura. Ratifica, ainda, a necessidade de realização do perfil fosfolipídico pulmonar no líquido amniótico de gestantes diabéticas, visto que o amadurecimento pulmonar é dependente da função pancreática fetal, inacessível à avaliação clínica.

Assim concluímos que o retardo do amadurecimento pulmonar dos recém-nascidos de ratas com diabete moderado é explicado pelo maior peso pulmonar associado à menor concentração de PG e PI; a aceleração do amadurecimento pulmonar dos recém-nascidos de ratas com diabete grave é explicada pelo menor peso pulmonar associado à mesma concentração de PG e PI.

SUMMARY

Purpose: to evaluate the effects of maternal diabetes on the fetal lung phospholipid profiles of rats with moderate and severe diabetes measuring lecithin (L), sphingomyelin (S), phosphatidyl-glycerol (PG), phosphatidyl-inositol (PI), and the relationships between L/S and PG/PI.

Methods: fifty-four mature Wistar rats were submitted to experimental diabetes and pregnancy¹. Diabetes was induced by alloxan (42 mg/kg of weight, IV) and three groups were formed: control; moderate diabetes (MD), with glycemia levels between 120 and 200 mg/dL, and severe diabetes (SD), with glycemia levels higher than 200 mg/dL. On the 21st day, cesarian section was performed, and the fetal lungs were macerated and pooled. The phospholipids were measured by unidirectional thin-layer chromatography.

Results: 1) the fetal lungs of the rats with moderate diabetes showed higher weight (0.159 g) and lower concentration of PG (3.0 µg/mL) and PI (3.4 µg/mL) than the controls, and the same relationship between L/S (2.2) and PG/PI (2.0). The fetal lungs of the rats with severe diabetes showed lower weight (0.145 g), the same values of L/S (1.9) and PG/PI (2.1), and lower PI (5.1 µg/mL) value than the controls.

Conclusions: 1) the pulmonary maturity retardation in the pups of rats with moderate diabetes is explained by the higher pulmonary weight associated with lower concentration of PG and PI; 2) the pulmonary maturity acceleration in the pups of rats with severe diabetes is explained by the lower pulmonary weight associated with the same concentration of PG and PI.

KEY WORDS: *Diabetes. Lung maturity. Fetal lung phospholipid profile.*

Referências

1. Calderon IMP, Rudge MVC, Brasil MAM, Henry MACA. Diabete e gravidez experimental em ratas. I - Indução do diabete, obtenção e evolução da prenhez. *Acta Cir Bras* 1991; 7:142-6.
2. Kulovich MV, Hallman MB, Gluck L. The lung profile. I. Normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135:57-63.
3. Pignol B, Bourlon J, Rieutort M. Diminution du phosphatidilglycerol pulmonaire chez les foetus de rattes rendus diabétiques par la streptozotocine. *C R Séances Acad Sci III* 1983; 297:339-42.
4. White P. Symposium on diabetes mellitus. Pregnancy complicating diabetes. *Am J Med* 1949; 7:609-16.

5. Smith BT, Giroud CJP, Robert M, Avery ME. Insulin antagonism of cortisol action on lecithin synthesis by cultured fetal lung cells. *J Pediatr* 1975; 87:953-5.
6. Mason RJ, Dobbs LG, Greenleaf RD, Williams MC. Alveolar type II cells. *Fed Proc* 1977; 36:2697-702.
7. Mueller-Heubach E, Caritis SN, Edelman DI, Turner JH. Lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid and its value for the prediction of neonatal respiratory distress syndrome in pregnant diabetic women. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 130: 28-34.
8. Guttenlag SH, Ballard RA. Fetal lung development. In: Reece EA, Constan DR, editors. *Diabetes mellitus in pregnancy*. 2nd ed. New York: Churchill-Livingstone; 1995. p.93-106.
9. Epstein MF, Farrell PM, Chez RA. Fetal lung lecithin metabolism in the glucose - intolerant rhesus monkey pregnancy. *Pediatrics* 1976; 57:722-8.
10. Sosenko IR, Lawson EE, Demottaz V, Frantz ID 3rd. Functional delay in lung maturation in fetuses of diabetic rabbits. *J Appl Physiol* 1980; 48:643-7.
11. Pinter E, Peyman JA, Snow K, Jamieson JD, Warshaw JB. Effects of maternal diabetes on fetal rat lung ion transport. Contribution of alveolar and bronchiolar epithelial cells to Na⁺, K⁺, ATPase expression. *J Clin Invest* 1991; 87:821-30.
12. Gluck L, Kulovich MV. Lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 115:539-46.
13. Morrison DF. *Multivariate statistical methods*. 1st ed. New York: McGraw-Hill; 1967. p.338.
14. Zar JH. *Biostatistical analysis*. 2nd ed. Englewood Cliffs: Prentice- Hall; 1984. p.718.
15. Oh W. Neonatal care and long-term outcome on infants of diabetic mothers. In: Merkatz IR, Adam PAJ, editors. *The Diabetic Pregnancy: a perinatal perspective*. New York: Grune & Stratton; 1979. p.267.
16. Calderon IMP. *Influência do binômio diabete e gravidez na atividade endócrina do pâncreas materno e fetal [tese]*. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu; 1994.
17. Kjos SL, Walther FJ, Montoro M, Paul RH, Diaz F, Stabler M. Prevalence and etiology of respiratory distress in infants of diabetic mothers: predictive value of fetal lung maturation tests. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163:898-903.
18. Hallman M, Teramo K. Amniotic fluid phospholipid profile as a predictor of fetal maturity in diabetic pregnancies. *Obstet Gynecol* 1979; 54:703-7.
19. Tyralla EE. The infant of the diabetic mother. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996; 23:221-41.
20. Rudge MVC, Calderon IMP, Ramos MD, Peraçoli JC, Souza LMS, Bossolan G. Perfil fosfolipídico do líquido amniótico de gestantes diabéticas. *Rev Bras Ginecol Obstet* 1996; 18:785-98.

AVISO

COMUNICAMOS NOVO ENDEREÇO DA SECRETARIA EXECUTIVA DA FEBRASGO

Av. das Américas, 8445 sala 711 - Barra da Tijuca

Rio de Janeiro – RJ – CEP 22793-081

e-mail: publicacoes@febrasgo.org.br

febrasgo@domain.com.br

secretaria_executiva@febrasgo.org.br

Home Page: <http://www.febrasgo.org.br>

Tel: (21) 487-6336 Fax: (21) 429-5133