

INFLUÊNCIA DO ESTADO NUTRICIONAL SOBRE A DURAÇÃO DO CICLO ESTRAL DE RATAS

Hisako Kajiyama *
Leda Ulson Mattos **
Ivan Fernandes da Silva ***
Nelson Francisco Annunziato ****
Márcia Regina Marques ****

KAJIYAMA, H.; MATTOS, L. U.; SILVA, I. F.; ANNUNCIATO, N. F.; MARQUES, M.R. Influência do estado nutricional sobre a duração do ciclo estral de ratas. *Rev. Esc. Enf. USP*, São Paulo, 16(1):27-35, 1982.

Os autores estudaram a duração do ciclo estral em dois grupos de ratas submetidas à desnutrição protéica provocada por uma dieta que continha 4% de proteína, ad libitum, ou por uma dieta que continha 20% de proteína em quantidade restrita, de maneira que os dois grupos tivessem em média o mesmo crescimento.

INTRODUÇÃO

As condições ou estímulos responsáveis pela aparição da menarca não são conhecidos, mas sabe-se que existem vários fatores que a afetam. Assim, qualquer condição ou desordem que provoque atraso na idade somática, retardará a menstruação. As meninas cuja idade somática está acima da idade cronológica, quer como resultado de precocidade sexual, quer simplesmente em consequência de sua maturidade precoce, menstruam mais cedo (BASTOS & TOURINHO, 1977).

A carência alimentar na infância e meninice poderá conduzir à insuficiência hipofisiária, acarretando uma série de problemas, que influem sobre o crescimento, maturação somática e sexual, prejudicando o eclodir normal da puberdade (BASTOS & TOURINHO, 1977).

Várias investigações têm demonstrado que, durante os últimos 70 anos, a menarca vem-se antecipando (BOAS, 1930; MICHELSON, 1944; FLUHMANN, 1956; TANNER, 1962) em decorrência de melhores condições alimentares.

A relação entre o peso corporal e a amenorréia primária e secundária tem sido abordada por vários autores. FRISH & McARTHUR

* Professor Assistente do Departamento de Enfermagem Materno-Infantil e Psiquiátrica da Escola de Enfermagem da USP — disciplina Enfermagem Ginecológica, Obstétrica e Neonatal. Mestre em Enfermagem. (Enfermeira e Obstetiz).

** Professor Titular do Departamento de Enfermagem Médico-Cirúrgica da Escola de Enfermagem da USP — disciplina Nutrição e Dietética Aplicada a Enfermagem. Vice-Diretor da Escola de Enfermagem da USP.

*** Médico Assistente da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, na época da elaboração do trabalho.

**** Estudante do Curso de Graduação em Enfermagem, na época da elaboração do trabalho.

(1974) sugeriram que há um peso específico a ser atingido para que ocorra a menarca e um peso abaixo do qual aparece a amenorréia secundária. No entanto, ainda não foi comprovado que o peso absoluto da mulher seja o fator determinante da amenorréia primária ou secundária.

Para alguns autores, como KNUTH et alii (1977), GRAHAM et alii (1979) e WENTZ (1980), mais importante do que o peso absoluto no aparecimento da amenorréia secundária é a perda de peso. KNUTH et alii (1977) diagnosticaram amenorréia secundária por perda de peso em 39 de 170 pacientes estudados.

WENTZ (1980) postula que o início e a manutenção de ciclos menstruais regulares depende da manutenção de um peso corporal específico em relação à altura, que aparentemente representa a gordura armazenada. Isto implica que uma determinada composição corporal pode ser importante na capacidade reprodutiva da mulher.

Não encontramos muitos trabalhos que correlacionem, em animais, dieta e duração do ciclo estral. EVANS & BISHOP (1922) mostraram que a desnutrição induzida pela restrição alimentar interfere na maturidade sexual e na ovulação de ratas, tendo observado que há parada de ovulação quando a restrição é protéica.

GUILBERT & GOSS (1932) verificaram que ratas alimentadas com dieta adequada até 55 dias de idade, tendo já apresentado 2 ou 3 estros, quando submetidas a uma dieta que continha 7% de proteína perdiam 1 a 3 períodos de estro e quando passavam a receber 3,5% de proteína, 50% das ratas tinham períodos longos de estro ou não o atingiam.

A maioria dos trabalhos publicados referem-se ao desenvolvimento sexual de ratas recebendo dietas restritas em quantidade de alimento. Embora estes animais vivam mais tempo que os alimentados *ad libitum* com dieta controle, permanecem sexualmente imaturos (ASDELL & CROWELL, 1935; KENNEDY & MITRA, 1963). CARR et alii (1949), estudando a vida reprodutiva de camondongas em uma dieta restrita em calorias, verificaram que há um aumento de vida e do período reprodutivo; as fêmeas, normalmente estéreis com 11 ou 12 meses de idade, ainda eram férteis com a idade de 21 meses quando voltaram a receber dieta *ad libitum*, embora não conseguissem amamentar a prole.

MERRY & HOLEHAN (1979), mantendo ratas em dieta restrita após o desmame (21 dias), de maneira a manter o peso 50% abaixo do normal, aumentaram a longevidade das mesmas de 704 para 1090 dias. Os autores observaram, também, que a restrição alimentar atrasou a puberdade de aproximadamente 180 dias, havendo também um retardamento no declínio da capacidade reprodutiva. Das ratas assim tratadas, 80% foram capazes de procriar e amamentar a prole até 510 dias, idade na qual os animais do grupo controle não tinham mais capacidade reprodutiva.

A grande maioria dos estudos realizados são dirigidos no sentido de provocar a desnutrição por meio da restrição alimentar e verificar como esta afeta a maturidade sexual e a fertilidade dos animais. Continuando nossos trabalhos (MATOS et alii, 1979), nos propusemos a estudar a duração do ciclo estral de ratas submetidas a dietas hipoprotéicas, ministradas *ad libitum*, e de ratas com dietas que continham 20% de proteínas em quantidade restrita, de maneira que os 2 grupos cresçam com a mesma velocidade.

MATERIAL E MÉTODO

Material

Como animais de experiência foram utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), fêmeas recém-desmamadas com 21 dias, criadas no biotério da Escola de Enfermagem da USP.

A temperatura do biotério foi mantida entre 24 e 26° C e as luzes apagadas no período das 18 h às 7 h da manhã.

As dietas utilizadas foram calculadas a fornecerem 4%, 20% de proteína e 388, 381 calorias por 100 g de dieta, respectivamente.

A composição das dietas encontra-se no Quadro I.

QUADRO I

Composição percentual das dietas utilizadas.

Componentes	Dietas	
	4% de proteína	20% de proteína
Caseína *	5,3	26,8
Mistura de sais minerais **	3,2	3,2
Mistura de vitaminas ***	1,6	1,6
Óleo de algodão	6,0	6,0
Óleo de fígado de bacalhau	1,6	1,6
Amido	62,3	40,8
Açúcar	20,0	20,0

* teor da caseína 75,6%

** mistura de sais segundo Philips & Hart (1935)

*** mistura de vitaminas segundo Schaeffer et alii (1949)

Procedimentos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: grupo controle (A), grupo (B) e (C).

Os animais dos grupos A e B receberam dietas que continham 20% e 4% de proteína respectivamente, *ad libitum*, e os do modelo C, dieta que continha 20% de proteína em quantidade restrita, de maneira que os animais deste grupo mantivessem a mesma velocidade de crescimento que os do grupo B.

O peso dos animais e o alimento ingerido foram registrados diariamente.

O dia da abertura da vagina e o peso do animal nesse dia, foram anotados.

Para determinar o início do 1º estro e a duração dos ciclos estrais foi colhido material vaginal diariamente, desde o dia da abertura da vagina até o 5º estro.

Técnica de colheita de material

O material vaginal foi colhido introduzindo na vagina da rata uma "escovinha" fina, de pêlo de algodão, utilizado para limpeza de cachimbo. O material colhido foi estendido levemente na lâmina, anteriormente identificada com a letra do grupo, o número da rata, a data, e a lâmina colocada rapidamente no líquido fixador. O fixador é uma mistura de álcool etílico a 96% e éter, em partes iguais.

Para colorir as lâminas, utilizamos o método de SHORR (RODRIGUES, 1954). Para determinar os estros, fez-se a leitura das lâminas dos esfregaços vaginais corados, obedecendo ao esquema apresentado por NICHOLAS (1949), que considera que o estro é atingido quando forem encontrados nos esfregaços células corneificadas. O esfregaço apresenta um aspecto limpo, com células isoladas, poligonais e anucleadas, de coloração vermelho-alaranjada.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando os testes de Student no nível de significância de 1% e o de correlação simples (SOUNIS, 1972).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A abertura da vagina e o 1º estro foram observados em 100% das ratas do grupo controle entre 27 e 33 dias de idade, coincidindo a abertura da vagina com o 1º estro (tabela 1). Esta coincidência já havia sido verificada pelos mesmos autores em trabalhos anteriores (MATTOS et alii, 1979).

No grupo experimental B, a abertura da vagina ocorreu entre 71 e 126 dias ($96,6 \pm 23,4$ dias) e o 1º estro, entre 71 e 141 dias ($112,0 \pm 22,6$ dias), com uma diferença significativa, ao nível de 1%, de 15 dias entre os dois eventos (tabela 1).

Nas ratas do grupo C, de restrição alimentar, a abertura da vagina ocorreu em média com a idade de $45,7 \pm 13,5$ dias (variação entre 27 e 66 dias) e o 1º estro com $108,8 \pm 26,9$ dias (variação entre 54 e 142 dias). A diferença entre a abertura da vagina e o 1º estro foi de 63,1 dias. Apesar de uma rata deste grupo ter atingido o 1º estro com 54 dias, as restantes só o atingiram com mais de 100 dias.

Entre as ratas do grupo B, três (3) morreram após o 3º estro, duas (2) após o primeiro e uma não atingiu estro até o dia em que as restantes atingiram o 4º estro (150 dias). Figura 1. A duração do ciclo estral, das ratas que tiveram 4 estros, variou de 5 a 14 dias ($7,9 \pm 3,1$ dias), mais curtos e regulares do que as do grupo C de restrição alimentar, que variou de 7 a 22 dias ($18,0 \pm 8,4$ dias) tabela 1 e figura 1. A média de duração do ciclo estral dos animais do grupo C foi significativamente diferente ao nível de 1% das dos animais do grupo-controle e grupo B.

TABELA 1

Idade das ratas no dia da abertura da vagina e 1º estro, e duração (dias) do 1º, 2º, 3º e 4º ciclo estral.

GRUPO	Idade (dias)		Duração do ciclo (dias)				Média
	Abertura vagina	1º estro	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	
A	30,0 $\pm 2,6$	30,3 $\pm 2,2$	8,7 $\pm 2,7$	5,4 $\pm 1,2$	6,0 $\pm 1,5$	6,7 $\pm 2,4$	6,7 $\pm 1,9$
B	96,6* $\pm 23,4$	112,0* $\pm 22,6$	8,2 $\pm 3,4$	7,9 $\pm 2,1$	8,2 $\pm 3,8$	7,3 $\pm 3,1$	7,9 $\pm 3,1$
C	45,7*+ $\pm 13,5$	108,8* $\pm 26,6$	22,0*+ $\pm 11,5$	18,9*+ $\pm 4,4$	13,3*+ $\pm 7,0$	18,1*+ $\pm 10,5$	18,0*+ $\pm 8,4$

* $p < 0,01$ dos grupos B e C em relação ao grupo controle A
+ $p < 0,01$ do grupo C em relação ao B

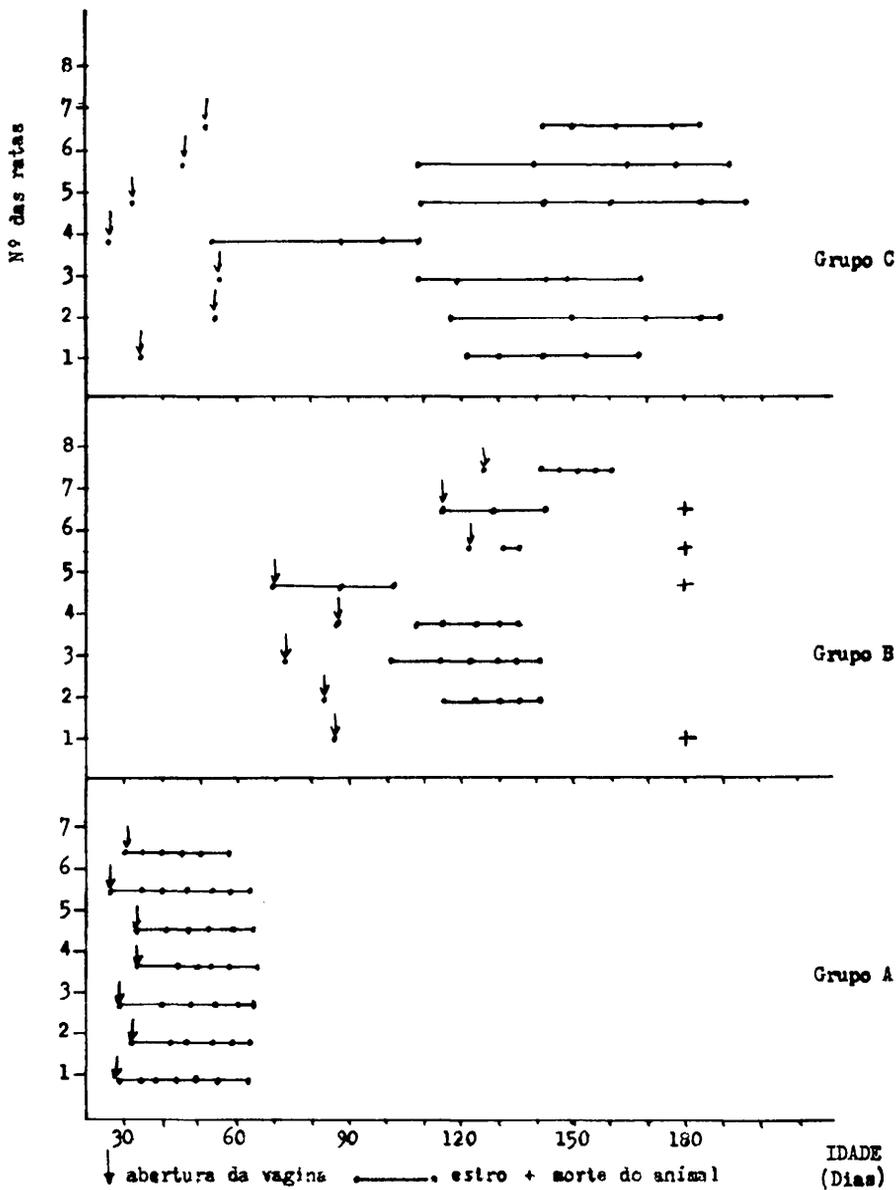


Fig. 1 - Idade dos animais na época da abertura da vagina e dos 5 primeiros estros.

Os animais do grupo controle e grupo B ingeriram dieta *ad libitum* e os do grupo C, em quantidade restrita. As ratas do grupo B ingeriram em média 7,4 gramas de alimento por dia e 0,3 g/dia de proteína e as do grupo C 4,2 g/dia de alimento e 0,85 g/dia de proteína, respectivamente 14 e 40% da proteína ingerida pelo grupo controle (2,1 g/dia).

TABELA 2

Alimento ingerido, proteína ingerida e calorias consumidas pelos animais dos 3 grupos.

GRUPO	Alimento ingerido g/dia/rato	Proteína ingerida g/dia/rato	Calorias consumidas cal./dia/rato
A	10,6 ± 1,6	2,1 ± 0,3	41,3 ± 6,4
B	7,4* ± 0,2	0,3* ± 0,03	28,8* ± 0,6
C	4,2*+ ± 0,3	0,8*+ ± 0,06	16,5*+ ± 1,2

* $p < 0,01$ dos grupos B e C em relação ao grupo controle A
+ $p < 0,01$ do grupo C em relação ao B

Os animais do grupo C, ingerindo pequena quantidade de alimento, ingeriram-no todo de uma só vez, ficando em jejum 24 horas. Este tipo de frequência alimentar impõe ao animal um "stress", que o obriga a adaptar-se para sobreviver e a alterar o seu procedimento metabólico. (LEVEILLE & HANSON, 1965; LEVEILLE & O'HEA, 1967; LEVEILLE, 1970).

Pode ser que a alteração no desenvolvimento sexual das ratas deste grupo, que apresentam ciclos estrais longos e irregulares, seja provocada não só pelo menor teor de proteína e caloria (60% restrita em relação ao controle) mas também pela frequência alimentar que acarreta um jejum prolongado.

CONCLUSÕES

- 1 — A abertura da vagina dos animais do grupo A (30 dias) e grupo C (45,7 dias) foi mais precoce do que a dos animais do grupo B (96,6 dias).

- 2 — A abertura da vagina e o 1º estro coincidiu nos animais do grupo controle (A), mas diferiu significativamente no grupo C, havendo ocorrido uma diferença de 63,1 dias entre os dois eventos. Já no grupo B a diferença foi de 15,4 dias, diferença não significativa ao nível de 1%.
- 3 — A duração dos ciclos estrais não diferiu significativamente entre as ratas dos grupos A e B, alimentadas *ad libitum*, embora com dietas com teores diferentes de proteína. A duração dos ciclos estrais das ratas do grupo C diferiu significativamente dos grupos A e B.

KAJIYAMA, H.; MATTOS, L. U.; SILVA, I. F.; ANNUNCIATO, N. F.; MARQUES, M. R. The influence of nutrition on variation in length of estrous cycle in female rats. *Rev. Esc. Enf. USP*, São Paulo, 16(1):27-35, 1982.

The present studies were performed to determine the variation in length of the estrous cycle of undernourished female rats. The two groups studied received 4% and 8% protein diets, the first one group ad libitum and the second one controlled in quantity, so that the animals of the two groups have the same growth rate.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASDELL, S. A. & CROWELL, M. F. The effect of retarded growth upon the sexual development of rats. *J. Nutr. Philadelphia* 10(1):13-24, 1935.
- BASTOS, A. C. & TOURINHO, C. R. Amenorréia IN: TOURINHO, C. R.; BASTOS, A. C.; MOREIRA, A. J. *Ginecologia da infância e adolescência*. São Paulo, Fundo Editorial BYK-Proceinx, 1977 cap. 15.
- BOAS, F. Observations on the growth of children. *Science*, Washington, 77:44, 1930.
- CARR, C. V.; KING, V. T.; VISSCHER, M. E. Delay of senescence infertility by dietary restriction. *Fed. Proc. Washington*, 8:22, 1949.
- EVANS, H. M. & BISHOP, K. S. On the relation between fertility and nutrition. The ovulation rhythm in rat on inadequate nutritional regime. *J. Metab. Res.*, Morrestown, 1:335, 1922.
- FLUHMAN, C. The management of menstrual disorders. Philadelphia, Saunders, 1956.
- FRISCH, R. E. & McARTHUR, J. W. Menstrual cycles: fatness determinant of minimum weight for height necessary for maintenance of onset. *Science*, Washington, 185:949-951, 1974.
- GRAHAM, R. L.; GRIMES, D. L.; GAMBRELL, R. D. Amenorrhea secondary to voluntary weight loss. *Sth. Med. J. Birmingham*, 72:1259-1268, 1979.
- GUILBERT, H. R. & GOSS, H. Some of restricted protein intake on the estrous cycle and gestation in the rat. *J. nutr. Philadelphia*, 5:251-264, 1963.
- KENNEDY, G. C. & MITRA, J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J. Physiol.*, London, 166:408-418, 1963.
- KNUTH, V. A.; HULL, M. G. R.; JACOBS, H. S. Amenorrhoea and loss of weight. *Brit. J. Obstet. gynecol.*, London 84(11):801-807, 1977.
- LEVEILLE, G. A. Adipose tissue metabolism: influence of periodicity of eating and diet composition. *Feder. Proc.*, Washington, 29(3):1294-1301, 1970.
- , & HANSON, R. W. Influence of periodicity of eating on adipose tissue metabolism in the rat. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, Ottawa, 43:857-868, 1965.
- , & O'HEA, E. K. Influence of periodicity on the energy metabolism in the rat. *J. Nutr. Philadelphia*, 93(4):541, Dec. 1967.
- MATTOS, L. U.; KAJIYAMA, H.; ANNUNCIATO, N. F.; MARQUES, M. R. Velocidade de crescimento e desenvolvimento sexual de ratas submetidas à desnutrição protéico-calórica. *Rev. Esc. Enf. USP*, São Paulo, 13(3):251-259, 1979.
- MERRY, B. J. & HOLEHAN, A. M. Onset of puberty and duration of fertility in rats fed restricted diets. *J. Reprod. Fertil.*, Oxford, 57:253-259, 1979.

- MICHELSON, N. Studies in physical development of negroes. IV-Onset of puberty. **Am. J. Phys. Anthropol.**, Philadelphia, 2:151, 1944.
- NICHOLAS, J. S. Experimental methods and rats embryos. IN: FARRIS, E. J. & GRIFFITH, J. Q. **The rat in the laboratory investigation**, 2. ed. New York, Hafner Press, 1949. cap. 4, p. 51-67.
- PHILIPS, P. H. & HART, E. B. The effect of organic dietary constituents upon charonic fluprine toxicoses in the rat. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, 109(1):657-663, 1935.
- RODRIGUES, D. C. Colpocitologia. IN: MEDINA, J. **Propedêutica ginecológica** São Paulo, Ed. Gujas Fiscal, 1954 cap. 26, p. 368-391.
- SCHAEFFER, A. E.; SALMON, W. D.; STRENGTH, D. R. Interrelationship of Vit. B₆ and choline. I-Effect on hemorrhagic Kidney syndrome in the rat. **Proc. Soc. Exp. Biol.** New York, 71:193, 1949.
- SOUNIS, E. **Bioestatística**. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1972. cap. 10, 14, p. 114-119, 153-162.
- TANNER, J. **Growth at adolescence**, 2 ed. Oxford, Blackwell Scientific, 1962.
- WENTZ, A. C. Body weight and amenorrhea. **Obstet. Gynec.**, New York, 56(4):482-487, 1980.