

VELOCIDADE DE CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO SEXUAL DE RATAS SUBMETIDAS A DESNUTRIÇÃO PROTÉICO-CALÓRICA

*Leda Ulson Mattos **
*Hisako Kajiyama ***
*Nelson Francisco Annunziato ****
*Marcia Regina Marques ****

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.

Os autores estudaram a época da maturação sexual de ratas submetidas a diferentes graus de desnutrição protéico-calórica.

INTRODUÇÃO

Populações malnutridas são, geralmente, consideradas mais férteis, embora GOPALAN & NAIDU¹⁵ admitam que o grupo populacional melhor nutrido deva ter maior fertilidade potencial, mascarada pelo uso de anticoncepcionais.

GOPALAN & NAIDU¹⁵, em estudos realizados na Índia com 2400 adolescentes de dois grupos sócio-econômicos diferentes, verificaram que a média de idade dos adolescentes, ao atingir a menarca, não era a mesma nos dois grupos. Esta ocorria em idade mais precoce nos grupos de adolescentes pertencentes à faixa econômica mais alta. Parece, todavia, que a época da menarca pouca influência exerce sobre a fertilidade da mulher, a não ser pelo fato de aumentar o período entre a menarca e a menopausa.

A idade da adolescente na época da menarca assim como a relação entre o seu crescimento somático e a maturação sexual tem sido objeto de muitas pesquisas. O maior impulso, porém, foi dado a este estudo a partir de 1970, quando FRISCH & REVELLE¹¹ constataram que a menarca ocorre a um peso constante — peso crítico — e é precedida por um período de crescimento intenso. As adolescentes que crescem mais rapidamente atingem o peso crítico mais cedo, alcançando, conseqüentemente, a menarca mais jovens, o que poderia explicar a antecipação da mesma nos países mais desenvolvidos ou nas classes mais favorecidas dos países em desenvolvimento.

Estes autores, baseados em um trabalho de KENNEDY & MITRA¹⁸, em ratos, sugeriram que, ao atingir o peso crítico, o organismo do adolescente sofre uma mudança no seu metabolismo, o que afeta a sensibilidade do hipotálamo ao estrógeno, alterando o *feedback* ovário-hipotálamo.

* Professor Adjunto da disciplina Nutrição e Dietética Aplicadas à Enfermagem da EEUSP.

** Professor Assistente das disciplinas Enfermagem Obstétrica e Neonatal e Enfermagem Ginecológica da EEUSP.

*** Aluno do Curso de Graduação da EEUSP.

FRISCH⁸ idealizou um método para prever a idade na menarca, baseado no teor total de água corporal, considerando que o teor de água como porcentagem do peso corporal, é mais constante do que o peso corporal. Mostrou, também, que o teor de gordura (20 a 25% do peso corporal) desempenha um papel importante na maturação sexual, quer por atuar sobre o metabolismo basal, quer por uma interação com o metabolismo do estrógeno, ou por ambos os fatores.

Recentemente, muitas críticas têm sido feitas às hipóteses de peso crítico (JOHNSTON et alii^{16,17}) e composição corporal constante (OSLER & CRAWFORD²⁵). Os últimos autores, estudando adolescentes mentalmente retardadas e acamadas, verificaram que estas apresentavam, na época da menarca, um teor de água e gordura bastante inferior ao encontrado em adolescentes normais, ocorrendo a menarca antes do peso crítico. Levantaram a hipótese de que o metabolismo nestas jovens estivesse diminuído e atingisse precocemente 28 cal/Kg/24h, parâmetro metabólico de jovens normais na época da menarca. Esta explicação está em concordância com FRISCH et alii^{7,11,12} que sugerem que, ao atingir um nível metabólico crítico, a sensibilidade do hipotálamo aos esteróides das gônadas cai resultando em menstruação.

GLASS et alii¹⁴ reexaminaram as hipóteses de FRISCH & REVELLE estudando a maturação sexual de ratas submetidas à restrição alimentar. Concluíram que a idade da abertura da vagina e do 1.º estro é uma função linear negativa da velocidade de crescimento e que o peso na época da puberdade não é constante, mas uma função quadrática da velocidade de crescimento. Considerou a velocidade de crescimento mais importante do que o peso a ser atingido. Em dois grupos com a mesma velocidade de crescimento, verificou que o grupo deficiente em valina tinha no dia da abertura da vagina e do 1.º estro um peso superior ao do grupo controle, tendo aberto a vagina mais tardiamente. Por outro lado, KENNEDY & MITRA¹⁹ e MANDL & ZUCKERMAN²³ haviam sugerido que outros fatores, que não os citados por FRISCH & REVELLE, afetam a maturação sexual.

Em razão da grande controvérsia existente a respeito dos fatores que afetam o início da puberdade, resolvemos estudar, o efeito sobre a idade e o peso de ratas no dia da abertura da vagina e do 1.º estro, de dois tratamentos dietéticos que levam à desnutrição, e permitem que os animais cresçam com a mesma velocidade.

MATERIAL E MÉTODO

1. *Material*

Como animais de experiência foram utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) fêmeas, recém-desmamadas aos 21 dias, criadas no Biotério da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo. Manteve-se a temperatura ambiente entre 24 a 26°C, e as luzes apagadas no período de 18 h às 7 h da manhã.

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

A composição das dietas encontra-se no Quadro 1.

QUADRO 1

Composição percentual das dietas utilizadas,

Componentes	4% Proteína	20% Proteína
Caseína*	5,3	26,8
Misturas 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 protéico de caseína 75,6%

** mistura de sais segundo PHILIPS & HART²⁶

*** mistura de vitaminas segundo SCHAEFFER et alii²⁸

2. Procedimentos experimentais

Os animais foram distribuídos ao acaso em 3 grupos de 15 animais — grupo controle (C) e grupos (A) e (B) — sendo 40g o peso médio inicial dos animais de cada grupo.

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

Os pesos dos animais assim como o alimento consumido foram registrados diariamente.

O orifício vaginal foi observado todos os dias, o dia da abertura da vagina e o peso do animal, nesse dia, anotado.

Para determinar o início do 1.º estro, foi colhido, diariamente, após abertura da vagina, material vaginal.

3. Técnica da colheita do material

O material vaginal foi colhido introduzindo na vagina do animal uma escovinha de algodão, fina. O material colhido foi estendido, imediatamente após a colheita, sobre uma lâmina, colocada rapidamente no líquido fixador.

As lâminas foram coradas pelo método de Shorr (RODRIGUES²⁷) e a leitura feita seguiu o esquema de NICHOLAS²⁴. Considerou-se que o animal atingiu o estro quando, no esfregaço vaginal, havia somente células corneificadas.

4. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o teste de Student no nível de significância de 1%, e o de correlação simples (SOUNIS³⁰).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento dos animais

As retas de regressão do crescimento dos animais de cada grupo estão apresentadas na Figura 1. Podemos observar que os animais dos grupos A e B apresentaram o mesmo ganho de peso, significativamente menor ao nível de 1% que os do grupo controle.

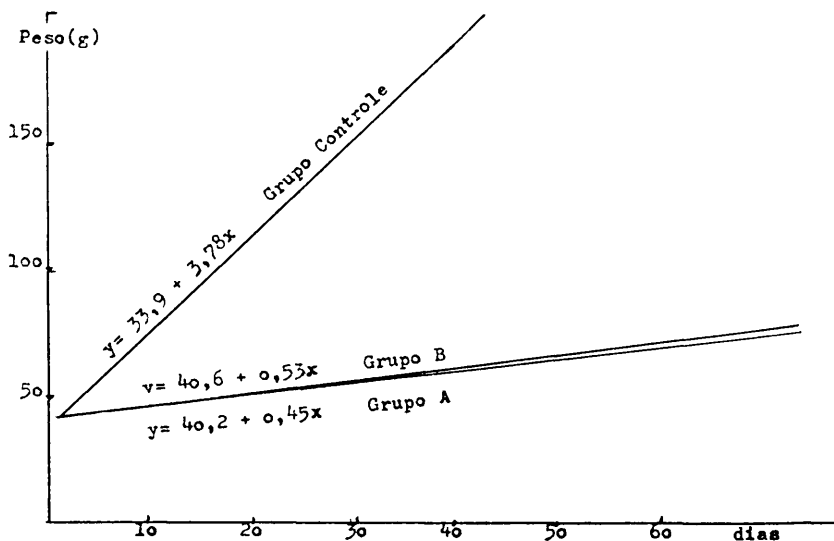


Figura 1 — Retas de regressão de crescimento de animais dos dois grupos experimentais e do controle.

Na Tabela 1 estão apresentados os valores relativos à variação ponderal dos animais, alimento, proteína e calorias consumidas, bem como o peso ganho por grama de proteína ingerida. Como podemos ver, os animais recebendo uma dieta com baixa porcentagem de proteína (4%) necessitam mais calorias (28,85 cal) para manter o mesmo peso corporal que os animais que recebem uma dieta adequada em composição, mas restrita em quantidade (14,18 cal).

TABELA 1

Varição ponderal, alimento ingerido, proteína ingerida, calorias consumidas e ganho de peso corporal por grama de proteína ingerida

Grupo	Varição ponderal g/dia/rato	Alimento ingerido g/dia/rato	Proteína ingerida g/dia/rato	Calorias consumidas cal/dia/rato	Peso ganho por grama de proteína ingerida
C	5,55 (0,23)	13,3 (0,76)	2,66 (0,15)	52,00 (3,21)	2,08 (0,19)
A	0,52* (0,05)	7,38* (0,61)	0,29* (0,03)	28,85* (2,39)	1,79 (0,04)
B	0,51* (0,05)	3,64* (0,11)	0,73* (0,02)	14,18* (0,44)	0,70* (0,03)

* $p < 0,01$ em relação ao controle
: $p < 0,0$ em relação ao grupo A

Os animais do grupo de restrição alimentar, ingerindo em média 3,64 g de alimento por dia, ingerem-no todo de uma só vez ficando praticamente 24 horas em jejum. O trabalho de vários pesquisadores mostrou, claramente, que o metabolismo de ratos alimentados periodicamente é diferente do dos animais alimentados *ad libitum* (TEPPERMAN & TEPPERMAN³¹ e COHN et alii⁴).

Os estudos de COHN et alii⁴ demonstraram que ratos tendo acesso ao alimento por curto período de tempo depositam quantidades excessivas de gordura e tornam-se obesos.

Este tipo de alimentação impõe um *stress* ao animal, que precisa adaptar-se a ele para sobreviver. A limitação da ingestão de alimento a uma só vez ao dia provoca modificações adaptativas que permitem a conversão mais rápida de glicose em gordura, aumentando aparentemente a eficiência do metabolismo energético (LEVEILLE & HANSON²¹, LEVEILLE & O'HEA²², LEVEILLE²⁰). COHN & JOSEPH⁵ haviam sugerido que, como as enzimas não podendo atuar sobre quantidades excessivas de substrato, o organismo utiliza outras vias e entre elas a lipogênese, que se processa a custo de proteínas. Provavelmente esta é a razão por que os animais deste grupo, apesar de ingerirem menos alimento e terem maior déficit calórico em relação ao grupo hipoprotéico, apresentaram a mesma velocidade de crescimento. Isto confirma os resultados de ANTHONY & EDOZIEN¹ e de SHIMA et alii²⁹ e parece indicar que os animais com restrição alimentar utilizam parte da proteína para suprir a deficiência calórica.

Idade no início da puberdade

Na Tabela 2 colocamos a velocidade de crescimento e o n.º de dias após o desmame em que ocorreu a abertura da vagina e o 1.º estro.

TABELA 2

Velocidade de crescimento, n.º de dias após o desmame em que ocorreu a abertura da vagina e o primeiro estro

Grupos	Velocidade de crescimento (g/dia)	Abertura da vagina (dias)	1.º estro (dias)
C	3,23 (0,57)	6,8 (1,5)	7,1 (2,3)
A	0,51* (0,05)	75,8* (21,7)	86,9 (24,9)
B	0,49*· (0,05)	22,6**/ (10,3)	84,0* (25,4)

* p < 0,01 em relação ao grupo controle

· p < 0,01 abertura da vagina em relação ao 1.º estro

* p < 0,01 grupo B em relação ao grupo A

Considerando primeiro a idade no início da maturação sexual, verificamos que os animais dos 3 grupos abriram a vagina com idades diferentes (p < 0,01), havendo uma diferença de 69 dias e 16 dias, respectivamente, entre os grupos de restrição protéica — (A) e de restrição alimentar — (B) e o grupo controle — (C) (Tabela 2).

No que concerne à idade no 1.º estro, houve diferença significativa ($p < 0,01$) apenas entre os grupos com velocidade de crescimento diferentes (C e A, C e B) havendo uma correlação linear negativa, altamente significativa, entre a velocidade de crescimento e a idade no 1.º estro ($r = -0,86$ $p < 0,001$).

GLASS et alii¹⁴ já haviam encontrado uma correlação linear negativa, altamente significativa ($r = -0,80$ $p < 0,01$), entre a idade da abertura da vagina e do 1.º estro e a velocidade de crescimento em ratas submetidas a diversos graus de restrição alimentar. Nas condições da experiência consideraram o alimento ingerido e, portanto, a velocidade de crescimento como variável independente.

Em nosso experimento constatamos que os animais que recebem dieta a 20% *ad libitum*, alcançam o estro no mesmo dia em que abrem a vagina, sendo a diferença entre a abertura da vagina e o 1.º estro nas ratas que recebem dieta a 4% de 11,3 dias e nas de restrição alimentar de 61,4 dias.

KENNEY & MITRA¹⁹ já haviam verificado que, em ratas desnutridas no período de lactação, a abertura da vagina e o 1.º estro ocorrem com seis dias de diferença e nos com restrição alimentar com 31,7 dias.

Embora largamente utilizada como índice de atividade ovariana, a abertura da vagina parece não ser um bom índice. O *stress* da restrição alimentar (KENNEDY & MITRA¹⁹) ou outros tipos de *stress* (MANDL & ZUCKERMAN²³) podem provocar a sua abertura.

Peso no início da puberdade

Na Tabela 3 apresentamos o peso dos animais na época da abertura da vagina e do 1.º estro.

TABELA 3

Peso dos animais na época da abertura da vagina e do primeiro estro, nos 3 grupos

Peso animal (g) Grupos	Abertura da vagina	1.º estro
C	65,0 (7,0)	66,3 (6,5)
A	80,1 (8,9)	86,3** (10,6)
B	52,4**/ (6,2)	82,2** (10,4)

** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle

* $p < 0,01$ abertura da vagina em relação ao 1.º estro

*/ $p < 0,01$ grupo B em relação ao grupo A

Estudando o peso corporal (Tabela 3), também verificamos que a abertura da vagina não ocorre a um peso constante, sendo $65,0 \pm 7,0$; $80,1 \pm 8,9$ e $52,4 \pm 6,2$ os pesos médios das ratas dos grupos controle, hipoprotéico e de restrição alimentar no dia da abertura da vagina. Contudo, nos animais que se desenvolveram com a mesma velocidade de crescimento, o 1.º estro ocorreu com o mesmo peso. Há

uma correlação linear negativa, altamente significativa entre a velocidade de crescimento e o peso no dia do 1.º estro ($r = -0,85$ $p < 0,01$).

FRISCH & REVELLE¹¹ mostraram que a menarca em adolescentes normais estava relacionada com o peso corporal, que ele chamou "peso crítico". Para atingir este peso crítico, é necessário que o corpo atinja determinada composição corporal, principalmente no que se refere ao seu teor de gordura (FRISCH et alii¹³).

CRAWFORD & OSLER⁶, utilizando os dados dos trabalhos de FRISCH & REVELLE¹¹, FRISCH⁷ e FRISCH & REVELLE¹², também concluíram que há uma correlação entre a menarca e a composição corporal, devendo o depósito de gordura atingir 23,5% do peso corporal para que ocorra a menarca.

Uma interrelação entre composição corporal e a secreção de gonodotropina foi sugerida por BOYAR et alii³ em estudos em mulheres jovens com anorexia nervosa. Por outro lado, CRAWFORD & OSLER⁶ sugerem que a diminuição da água e o aumento da gordura não são fatores determinantes do aumento da gonodotropina.

WIDDOWSON & McCANCE³², em ratas, com graus diferentes de desnutrição no período de lactação, mas bem nutridos após o desmame, verificaram que não há constância na composição corporal dos animais na época da puberdade.

É nossa intenção verificar, em trabalho posterior se existe relação entre a idade e/ou peso do animal na época da ocorrência do 1.º estro e a composição corporal, supondo que o ganho de peso dos nossos animais com restrição alimentar possa ser o resultado do acúmulo de gordura.

Início da puberdade e ingestão protéica e calórica

Se nos detivermos nos 2 grupos que se desenvolveram com igual velocidade de crescimento, encontramos uma correlação linear negativa, altamente significativa entre a idade da abertura da vagina e a ingestão protéica ($r = -0,82$ $p < 0,001$), e uma correlação linear positiva e altamente significativa entre a abertura da vagina e a ingestão calórica ($r = 0,85$ $p < 0,001$). Assim, para animais com a mesma velocidade de crescimento, a idade da abertura da vagina é inversamente proporcional à ingestão protéica e diretamente proporcional à ingestão calórica, isto é, abrem mais cedo a vagina os que recebem mais calorias e menos proteínas, nas condições de nosso experimento.

Já no que se refere ao 1.º estro, não encontramos correlação entre a ingestão protéica e/ou calórica e a idade da ocorrência do 1.º estro ($r = 0,01$ $p < 0,01$ e $r = 0,1$ $p < 0,01$) respectivamente, tendo os dois grupos B e C atingido o 1.º estro com o mesmo peso e a mesma idade.

BALL et alii², estudando a fertilidade de ratas submetidas à restrição alimentar, verificaram que ratas com restrição alimentar acasaladas com 4 meses, apresentavam um índice de fertilidade, calculado entre a idade do acasalamento e 8 meses de idade, de 0,08 filhotes/rata/mês. O grupo que, após 8 meses passou a receber a mesma dieta *ad libitum*, teve um aumento no seu índice de fertilidade, que atingiu os valores das ratas alimentadas com a mesma dieta *ad libitum* desde o desmame (0,65 filhotes/ratas/mês). O que continuou, após o desmame, a receber

dieta em quantidade restrita teve seu índice diminuído para 0,04 filhotes/rata/mês. O que deve também ser observado no trabalho de BALL et alii² é que, quando os animais passam a receber dieta *ad libitum* rapidamente atingem o peso dos animais do grupo controle, passando a crescer com igual velocidade de crescimento. Não seria, pois, o fato destas ratas terem alcançado o peso das ratas do grupo controle que aumentou a sua fertilidade e as igualou às do grupo controle?

CONCLUSÕES

Ratas de grupos que crescem com a mesma velocidade de crescimento, embora recebendo tratamentos dietéticos diferentes — dieta hipoprotéica (4% de proteína) e restrita em quantidades de alimento (75% de restrição de uma dieta a 20% de proteína) — atingem o 1.º estro com a mesma idade (85 dias) e o mesmo peso (84g).

A idade com que o animal atinge o 1.º estro é inversamente proporcional à sua velocidade de crescimento.

Nas ratas com restrição alimentar há um lapso de tempo bastante grande (61,4 dias) entre a idade na abertura da vagina e o 1.º estro.

Nos animais recebendo dieta a 20% *ad libitum* a abertura da vagina e o 1.º estro ocorrem no mesmo dia ou com um dia de diferença.

MATTOS, L. U.; KAJIYAMA, H.; ANNUNCIATO, N. F.; MARQUES, M. R. Growth rate and sexual development in rats with protein calorie malnutrition. *Rev. Esc. Enf. USP*, São Paulo, 13(3):251-259, 1979.

The authors studied the effect of two dietetics treatments, that allow the animals to have the same growth rate, upon the time of onset of puberty.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ANTHONY, L. E. & EDOZIEN, J. C. Experimental protein and energy deficiencies in rat. *J. Nutr.*, Philadelphia, 105: 631-48, Jun. 1975.
2. BALL, Z. B.; BARNES, R. H.; VISSCHER, M. B. The effects of dietary caloric restriction on maturity and senescence with particular reference to fertility and longevity. *Amer. J. Physiol.* Washington, 150: 511-9, 1947.
3. BOYAR, R. M.; KATZ, J.; FINKELSTEIN, J. W.; KAPEN, S.; WEINER, H.; WEITZMEN, E. D.; HELLMAN, L. Anorexia nervosa: immaturity of the 24-hour luteinizing hormone secretory pattern. *New Engl. J. Med.*, Boston, 291: 861, 1974.
4. COHN, C. & JOSEPH, D. Changes in body composition attendant on forced feeding. *Amer. J. Physiol.*, 196: 965, 1959.
5. ———. Role of rate of ingestion of diet on regulation of intermediary metabolism (meal eating vs nibbling). *Metabol. Clin. Exp.*, New York, 9: 492, 1960.
6. CRAWFORD, J. D. & OSLER, D. C. Body composition at menarche: the Frich-Revelle hypothesis revisited. *Pediatrics*, Springfield, Illinois, 56: 449-58, 1975.
7. FRISCH, R. E. Weight at menarche: similarity for well nourished and undernourished girls at differing ages, and evidence for historical constancy. *Pediatrics*, Springfield Illinois, 50(3): 445-50, Sept. 1972.
8. FRISH, R. E. A method of prediction of age of menarche from height and weight at ages through 13 years. *Pediatrics*, Springfield, Illinois, 53(3): 384-90, 1974.
9. ———. Demographic implications of the biological determinants of female fecundity. *Social Biology*, Baltimore, 22(1): 17-22, 1975.
10. ——— & REVELLE, R. The height and weight of adolescent boys and girls at the time of peak velocity of growth in height and weight: longitudinal data. *Hum. Biol.*, Detroit, 41: 546-59, 1969.
11. ———. Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weight and adolescent events. *Science*, Washington, 169: 397-9, July, 1970.
12. ———. The height and weight of girls and boys at time of initiation of the adolescent growth spurt in height and weight and the relationship to menarche. *Hum. Biol.*, Detroit, 43: 140, 1971.1.

13. ——— & COOK, S. Components of weight at menarche and the initiation of the adolescent growth spurt in girls: estimated total water, lean body weight and fat. *Hum. Biol.*, Detroit, 45: 469-83, 1973.
14. GLASS, A. R.; HARRISON, R.; SWERDLOFF, R. S. Effect of undernutrition and amino acid deficiency on the timing of puberty in rats. *Pediat. Res.*, Basel, 10: 951-5, 1976.
15. GOPALAN, C. & NAIDU, A. N. Nutrition and fertility. *Lancet*, London, 2: 1077-9, Nov. 1972.
16. JOHNSTON, F. E.; MALINA, R. M.; GALBRAITH, M. A. Height, weight and age at menarche and the "critical weight" hypothesis. *Science*, Washington, 174: 1148, Dec. 1971.
17. JOHNSTON, F. E.; ROCHE, A. F.; SCHELL, L. M.; WETTENHALL, N. B. Critical weight at menarche. *Amer. J. Dis. Child.*, Chicago, 129: 19-23, 1975.
18. KENNEDY, G. C. & MITRA, J. Hypothalamic control of energy balance and the reproductive cycle in the rat. *J. Physiol.*, London, 166: 395-406, Sept. 1963a.
19. ——— Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J. Physiol.*, London, 166: 408-18, Sept. 1963b.
20. LEVEILLE, G. A. Adipose tissue metabolism: influence of periodicity of eating and diet composition. *Feder. Proc.*, Washington, 29(3): 1294-301, May/June, 1970.
21. ——— & HANSON, R. W. Influence of periodicity of eating on adipose tissue metabolism in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, Canada, 43: 857-68, 1965.
22. LEVEILLE, G. A. & O'HEA, E. K. Influence of periodicity of eating on the energy metabolism in the rat. *J. Nutr.*, Philadelphia, 93(4): 541-45, Dec. 1967.
23. MANDL, A. M. & ZUCKERMAN, S. Factors influencing the onset of puberty in albino rats. *J. Endocr.*, London, 8: 357, 1952.
24. NICHOLAS, J. S. Experimental methods and rat embryos. In: FARRIS, E. J. & GRIFFITH, J. Q. *The rat in laboratory investigation*. 2.^a ed. New York, Hafner press, 1949. cap. 4, p. 51-67.
25. OSLER, D. C. & CRAWFORD, J. D. Examination of the hypothesis of a critical weight at menarche in ambulatory and bedridden mentally retarded girls. *Pediatrics*, Springfield, Illinois, 51(4): 675-9, 1973.
26. PHILIPS, P. H. & HART, E. B. The effect of organic dietary constituent upon chronic fluorine toxicoses in the rat. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, 109(1): 657-63, 1935.
27. RODRIGUES, D. C. Colpocitologia. In: MEDINA, J. *Propedêutica ginecológica*. São Paulo, Guia Fiscal, 1954. cap. 26, p. 368-91.
28. SCHAEFFER, A. E.; SALMON, W. D.; STRENGTH, D. R. Interrelationship of vitamin B₁₂ and choline. I: effect on hemorrhagic kidney syndrome in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, New York, 71: 193, 1949.
29. SHIMA, H.; MATTOS, L. U.; SALUM, M. J. L.; MARGARIDO, S. A. Nitrogênio pancreático de ratos albinos submetidos a diferentes graus de restrição alimentar. *Rev. Bras. Pesq. Med. e Biol.*, São Paulo, (no prelo).
30. SOUNIS, E. *Bioestatística: princípios fundamentais, metodologia estatística, aplicação às ciências biológicas*. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1972, 230 p.
31. TEPPERMAN, V. & TEPPERMAN, H. M. Effects of antecedent food intake pattern on hepatic lipogenesis. *Amer. J. Physiol.*, Washington, 193: 55-64, 1958.
32. WIDDOWSON, E. M. & McCANCE, R. A. — Some effects of accelerating growth. I — General somatic development. *Proc. Royal Soc. Med.*, London, 152: 188-206, 1960.