

PROGRAMAÇÃO METABÓLICA NA LACTAÇÃO ASSOCIADA À RESTRIÇÃO CALÓRICA MODERADA INTERFERE NOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS E MORFOMETRIA DO COLO DE RATOS ADULTOS

Monica dos Santos Mucio Loiola 
Universidade Estadual de Maringá
– UEM
mmucioloiola@gmail.com

Suellen Cristina dos Passos 
Universidade Estadual de Maringá
– UEM
sussinha_g@hotmail.com

Nayra Thais Delatorre Branquinho 
Centro Universitário Cesumar –
UNICESUMAR
nayrathaisdb@hotmail.com

Maria Raquel Marçal Natali 
Universidade Estadual de Maringá
– UEM
mrmnatali@uem.br

Resumo

O ambiente nutricional pós-natal pode contribuir significativamente para o excesso de peso, e em roedores a redução do número de filhotes durante a lactação é um modelo clássico de indução precoce de obesidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a programação metabólica e os efeitos da restrição calórica moderada (30%), seguida ou não por alimentação livre, sobre o colo proximal de ratos Wistar machos adultos oriundos de ninhadas reduzidas. Os grupos experimentais (n=05) foram assim distribuídos: controle (G9); controle de ninhada reduzida (G3L); ninhada reduzida e restrição calórica de 30% dos 60 aos 150 dias (G3R) e ninhada reduzida seguida de restrição calórica de 30% dos 60 aos 90 dias com alimentação livre dos 91 aos 150 dias (G3RL). Após 150 dias de idade os animais foram eutanasiados para avaliação do peso corporal, comprimento nasoanal, Índice de Lee, peso dos tecidos adiposos viscerais, parâmetros sanguíneos, tempo de trânsito gastrointestinal, morfometria do colo proximal e quantificação das células caliciformes e serotoninérgicas da mucosa colônica. A redução de ninhada durante a lactação foi efetiva na indução da obesidade em ratos adultos, sendo que a realimentação livre destes animais após período de 30 dias de restrição calórica moderada (30%) mostrou que a programação metabólica na lactação foi mantida nos animais adultos. Entretanto, ratos adultos provenientes de ninhada reduzida quando submetidos à restrição calórica de 30% por período de 90 dias obtiveram melhora nas condições metabólicas, redução da adiposidade visceral e do tempo de trânsito gastrointestinal, com readequação dos parâmetros morfométricos do colo proximal.

Palavras-chave: Intestino grosso. Mucosa. Ninhada reduzida. Obesidade.

METABOLIC PROGRAMMING IN LACTATION ASSOCIATED WITH MODERATE CALORIC RESTRICTION INTERFERES WITH BLOOD PARAMETERS AND COLO MORPHOMETRY OF ADULT RATS

Abstract

The postnatal nutritional environment can contribute significantly to overweight, and in rodents the reduction in offspring numbers during lactation is a classic model of early induction of obesity. The objective of this work was to evaluate the metabolic programming and the effects of moderate caloric restriction (30%), followed or not by free feeding, on the proximal colon of adult male Wistar rats from reduced litters. The experimental groups (n=05) were distributed as follows: control (G9); reduced litter control (G3L); reduced litter and 30% calorie restriction from 60 to 150 days (G3R) and reduced litter followed by 30% calorie restriction from 60 to 90 days with free feeding from 91 to 150 days (G3RL). After 150 days of age, the animals were euthanized to evaluate body weight, nasoanal length, Lee Index, visceral adipose tissue weight, blood parameters, gastrointestinal transit time, morphometry of the proximal colon and quantification of goblet and serotonergic cells in the colonic mucosa. Litter reduction during lactation was effective in inducing obesity in adult rats, and free refeeding of these animals after a period of 30 days of moderate caloric restriction (30%) showed that the metabolic programming during lactation was maintained in adult animals. However, adult rats from reduced litters when subjected to 30% caloric restriction for a period of 90 days achieved improvement in metabolic conditions, reduction in visceral adiposity and gastrointestinal transit time, with readjustment of morphometric parameters of the proximal colon.

Keywords: Large intestine. Mucosa. Reduced litter. Obesity.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a obesidade em 2021, atingiu cerca de 650 milhões de pessoas e dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), registram que a cada dez brasileiros, seis estão com sobrepeso, no Brasil. A obesidade pode causar uma série de doenças e condições de saúde, incluindo o diabetes tipo 2, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, apneia do sono, colesterol elevado, doenças articulares, esteatose hepática, síndrome metabólica, entre outras (Thomas Eapen, 2021).

Nos últimos anos, o excesso de ganho de peso na infância tornou-se uma grande preocupação mundial. A obesidade infantil é considerada um processo patológico com causas multifatoriais (Thomas Eapen, 2021). A dieta perinatal é um fator significativo que pode promover ou prevenir um ganho de peso excessivo. Estudos demonstram que quantidades inferiores aos ideais ao aleitamento materno aumentam a probabilidade de sobrepeso e obesidade em crianças, sendo que, o aleitamento materno tem um efeito protetor contra a obesidade (Vandyousefi et al., 2019).

Em roedores, a redução do tamanho da ninhada, promove maior indução à obesidade e seus distúrbios metabólicos ao longo da vida, pois assim, não há competição pela amamentação (Souza et al., 2022). A mudança na alimentação é essencial como forma de tratamento inicial para indivíduos com excesso de peso, sendo que o principal objetivo de qualquer alteração na dieta é reduzir a ingestão de calorias e, assim, promover a perda de peso (Stanek, 2022).

São apontados diversos benefícios da restrição calórica prolongada moderada (redução de 10-30% do consumo livre). A restrição de calorias é uma técnica eficaz para a diminuição do peso corporal e da adiposidade, melhorando o controle da glicemia, triglicerídeos e colesterol sérico, reduzindo as respostas inflamatórias e o estresse oxidativo, além de amenizar os sintomas associados ao envelhecimento (Cao, 2018). Como a restrição calórica moderada não implica em desnutrição e suas doenças associadas, ela tem sido defendida também como forma de combate à obesidade e suas comorbidades (Soares; Weiss; Pozzilli, 2014).

O trato gastrointestinal (TGI) é o responsável direto pela digestão e absorção dos nutrientes da dieta, por meio de processos complexos de secreção de enzimas digestivas e absorção de nutrientes (Greenwood, 2017). Funcionalmente o intestino grosso está envolvido em diversas atividades, tais como, absorção de água, fermentação, formação da massa fecal e produção de muco. Organiza-se morfologicamente em quatro túnicas características, mucosa, submucosa, muscular externa e serosa ou adventícia.

A túnica mucosa colônica é organizada em criptas longas, revestidas por epitélio simples cilíndrico constituído por enterócitos, abundantes células caliciformes e poucas células enteroendócrinas, entre outras células (Gartner; Hiatt, 2017).

As células caliciformes sintetizam e secretam mucinas neutras e ácidas e compõem a barreira (linha de defesa) da mucosa colônica. Em condições fisiológicas normais, a secreção de mucinas é estável, porém em resposta a estímulos, como hormônios e mediadores inflamatórios pode ocorrer um aumento na secreção de mucinas (Cornick; Tawiah; Chadee, 2015; Dharmani et al., 2009).

Além dos enterócitos e células caliciformes, as células enteroendócrinas participam da regulação de diversas atividades intestinais e podem ser moduladas pela dieta, por exemplo, o consumo de dieta hiperlipídica por camundongos, gera aumento na proporção de células enteroendócrinas no íleo (Soares et al., 2015). As células enteroendócrinas serotoninérgicas estão presentes na mucosa intestinal e a serotonina (5-HT) atua na modulação da permeabilidade intestinal, modificando as características funcionais da barreira (Bischoff, 2009) e conseqüentemente a homeostase intestinal.

Diante do exposto, a justificativa deste trabalho é avaliar se em quadros de obesidade, a restrição calórica moderada (30%) tem a finalidade de controlar a adiposidade, o peso corporal, as funções metabólicas para faixas normais sem causar desnutrição, e as características morfofuncionais do colo proximal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar. As matrizes foram fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e junto com suas proles, foram mantidas no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas sob ciclos regulares de iluminação (12h claro: 12h escuro) e temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Todos os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Animais (UEM) - protocolo nº1720290116/2016.

As ninhadas recém-nascidas foram reorganizadas até o segundo dia, considerando o dia de nascimento como dia zero, de modo que cada matriz tivesse 9 filhotes (grupos controles, G9) ou 3 filhotes (grupos ninhadas reduzidas, G3), preferencialmente machos. A organização das ninhadas foi realizada obedecendo ao princípio de máximo aproveitamento dos filhotes nascidos. Os filhotes fêmeas foram preservados durante a lactação apenas quando necessário

para completar o tamanho da ninhada. As matrizes tiveram acesso livre à água e à ração (Nuvilab CR1®; Nuvital, Curitiba-PR, Brasil) durante a gestação e a lactação.

Depois do desmame, aos 22 dias de idade, os filhotes machos foram alojados em caixas plásticas em grupos de três animais por caixa. As matrizes e os filhotes fêmeas foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia (tiopental 120mg.kg de peso corporal-1 associado a lidocaína 10mg.mL-1, intraperitoneal). Foram estabelecidos os grupos experimentais (n=5): controle (G9); controle de ninhada reduzida (G3L); ninhada reduzida e restrição calórica de 30% dos 60 aos 150 dias (G3R) e ninhada reduzida seguida de restrição calórica de 30% dos 60 aos 90 dias com alimentação livre dos 91 aos 150 dias (G3RL).

O consumo alimentar relativo dos animais do G3L (g.10 g de peso corporal-1 por animal por dia) foi usado para calcular a quantidade de alimento a ser fornecida ao G3R (para o período de 60 a 150 dias) e ao G3RL (para o período de 60 a 90 dias).

O peso corporal foi aferido semanalmente. Aos 150 dias de idade, os ratos foram pesados e o comprimento nasoanal mensurado para cálculo do Índice de Lee [$(3\sqrt{\text{peso corporal}} / \text{comprimento nasoanal}) \times 1000$] (Bernardis; Patterson, 1968) e a relação peso-comprimento (peso/comprimento nasoanal, em g.cm-1) (Malta; Pedrosa-Furlan, 2010).

2.1 Trânsito Gastrointestinal

Setenta e duas horas antes da eutanásia, com início às oito horas, os ratos de 150 dias de idade receberam por gavagem 0,3mL de uma solução contendo 3% mL de corante Carmim hidro 52% e 0,5mL de etilcelulose líquido (Corantec®, São Paulo, Brasil). Foram acomodados em caixas separadas, sem cepilho, em local com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com fornecimento livre de alimento para os grupos G9, G3L e G3RL e controlado para o grupo G3R. O fornecimento de água foi livre para todos os grupos. Os animais foram mantidos nessas condições por um período máximo de 12h a partir da administração da solução e observados a cada 15 minutos. O horário da administração da solução e da eliminação do primeiro pellet fecal marcado com corante de cada animal foi registrado e a diferença entre esses horários foi expressa em minutos.

2.2 Coleta de Material Biológico

Aos 150 dias os animais foram eutanasiados após jejum noturno por aprofundamento de anestesia (tiopental 120 mg.kg de peso corporal-1 associado a lidocaína 10 mg.mL-1, intraperitoneal) para remoção de amostras de sangue, tecido adiposo e do colo proximal. As amostras de sangue foram centrifugadas para separação de soro e plasma e armazenadas em

freezer -80°C para análises bioquímicas posteriores. Amostras dos tecidos adiposos retroperitoneal, mesentérico e periepididimal foram pesadas e o colo proximal foi mensurado

2.3 Dosagens Bioquímicas

Amostras de 5mL de soro coletadas e centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm foram utilizadas para dosagem de colesterol total e frações, triglicerídeos e glicemia em jejum, por meio de kits comerciais (Gold Analisa®; Belo Horizonte-MG, Brasil) e a leitura dos resultados foi realizada em espectrofotômetro (BioPlus2000®, São Paulo, Brasil) conforme instruções do fabricante dos respectivos testes.

2.4 Colo Proximal

Após retirado e mensurado, o colo proximal foi lavado em tampão fosfato salino (PBS 0,1M pH 7,4), e amostras foram incluídas em parafina e destinadas a processamento histológico para análise morfológica e morfométrica da parede colônica, histoquímico para evidenciação e quantificação das células calciformes e imunohistoquímico para evidenciação e quantificação das células serotoninérgicas.

2.5 Análise Morfológica e Morfométrica do Colo Proximal

Amostras do colo proximal foram abertas na borda mesocólica, fixadas em paraformaldeído 4% durante 6h, desidratadas em série de concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para obtenção de cortes histológicos semi-seriados com 5 μm de espessura, em micrótomo Leica® RM2145. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) com objetivo de avaliar a morfologia e a espessura das túnicas mucosa, submucosa, muscular externa e parede intestinal total.

A análise morfométrica do colo proximal foi realizada por amostragem de imagens em regiões sem pregas capturadas em objetiva de 10X em microscópio óptico Olympus BX41® com câmera de alta resolução (Q Color 3 Olympus American INC), acoplado a um computador com programa computacional Q-Capture®. As avaliações foram realizadas em 10 pontos aleatórios/corte/animal (500 mensurações/grupo) por meio do Sistema de Análise de Imagens Image-Pro Plus®, (versão 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), com resultados expressos em μm .

2.6 Histoquímica para Células Calciformes

Cortes semi-seriados de 5µm de espessura do colo proximal foram desparafinizados em xilol e hidratados em bateria decrescente de alcoóis, em seguida oxidados durante 10min em temperatura ambiente com Ácido Periódico 0,5%, lavados em água corrente. Após, os cortes foram corados em reativo de Schiff por 40min e passados diretamente em três banhos sucessivos em água sulfurosa (2min/banho). Na sequência, os cortes foram contracorados em Hematoxilina por 15seg, lavados em água corrente e desidratados em bateria crescente de alcoóis, diafanizados com xilol e montados sob lamínula com resina sintética Permout®.

Os cortes foram analisados em microscópio óptico Olympus BX41® com câmera de alta resolução (Q Color 3 Olympus American INC), acoplado a um computador com programa computacional Q-Capture® e com a objetiva de 40x foram capturadas 50 imagens/animal (250 imagens/grupo) em regiões sem pregas. Foram quantificadas 2500 células epiteliais/animal/grupo e utilizada a fórmula: Índice de Células Caliciformes = (número de células caliciformes/2500 células epiteliais) x 100 (Wright; Alison, 1984).

2.7 Imunohistoquímica para Células Enteroendócrinas Serotoninérgicas

Cortes semi-seriados de 5µm de espessura do colo proximal foram mantidos em lâminas com poli-L-lisina, desparafinizados e hidratados, em seguida foram tratados com H₂O₂ 3% em metanol por 20min, para eliminar a ação das peroxidases endógenas. Após duas lavagens com PBS 0,1M (pH 7,4) por 5min, os cortes foram bloqueados com solução contendo BSA 2% e soro de burro 20% (10min). Posteriormente os tecidos foram incubados com solução contendo anticorpo primário anti-serotonina produzido em coelho, diluído 1:300 em PBS por 3h. Após duas lavagens com PBS 0,1M (pH 7,4) por 5min, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado (anti-coelho) por 30min, lavados novamente e, em seguida, tratados com o conjugado estreptavidina-peroxidase (10min). Depois de novas lavagens com a reação imunohistoquímica foi revelada por diaminobenzidina (DAB) em PBS e H₂O₂ por 10min.

Após lavagem em água destilada, os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Meyer, desidratados em etanol, diafanizados com xilol e montados sob lamínula com resina sintética Permout®. Todos os procedimentos foram conduzidos à temperatura ambiente. Para a realização desta técnica foi utilizado o Kit Histostain® Plus (Invitrogen).

A quantificação das células serotoninérgicas imunorreativas na mucosa/criptas foi realizada sob microscópio de luz com objetiva de 40X, contando-se 2500 células/animal/grupo e gerando um índice de células marcadas no epitélio intestinal, através da fórmula: Índice de Células Serotoninérgicas = (número de 5HT-reativas/2500 células epiteliais) x 100 (Soares et al., 2015).

2.8 Análise Estatística

Os dados numéricos foram submetidos aos testes de normalidade, D'Agostino, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's. Dados paramétricos foram submetidos à Análise de Variância (One-way ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação de médias. Para estas análises foi utilizado o software Graph Pad Prism® 6.0 e os resultados expressos como média \pm desvio padrão (DP) com o nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros biométricos e bioquímicos

A evolução do peso corporal dos animais dos grupos G9, G3L, G3R e G3RL durante todo período experimental (21, 60, 90 e 150 dias), está apresentada na Figura 1. Comparando os grupos G9 e G3L aos 21 e 60 dias de idade observa-se um aumento de peso corporal para o grupo G3L ($p < 0,05$). Aos 90 dias de idade, o peso dos grupos G9 e G3L não diferiu significativamente, isso também ocorreu entre os grupos G3R e G3RL, que estavam em restrição calórica desde os 60 dias de idade. Entretanto, houve redução de peso corporal significativa quando comparado os grupos G3R e G3RL com os grupos G9 e G3L. Aos 150 dias somente o grupo G3R apresentou peso corporal menor em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) que não diferiram entre si.

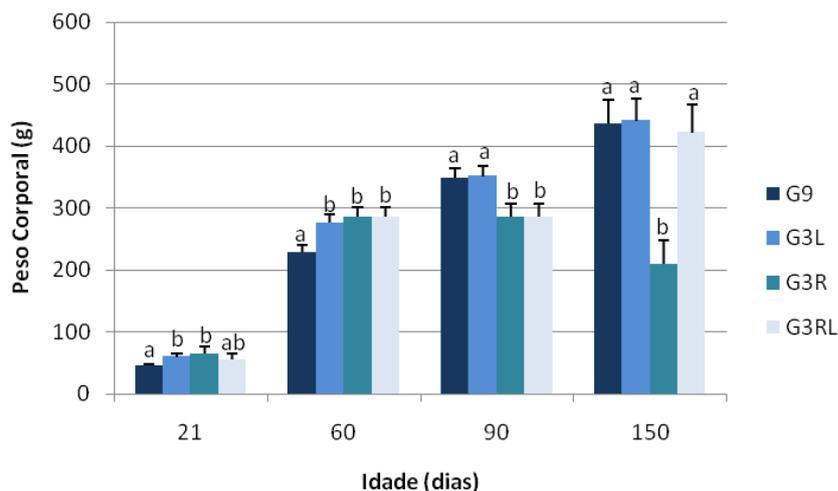


Figura 1 – Evolução do peso corporal em gramas ao longo dos 150 dias de idade de ratos dos grupos: controle (G9); controle de ninhada reduzida (G3L); ninhada reduzida com restrição alimentar de 30% dos 60 aos 150 dias (G3R) e ninhada reduzida com restrição alimentar de 30% dos 60 aos 90 dias e alimentação livre dos 91 aos 150 dias (G3RL). Resultados expressos

por média \pm desvio padrão (n=5). Análise de Variância One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Aos 150 dias de idade, a análise do peso corporal, da relação peso corporal/comprimento nasoanal, Índice de Lee e peso dos tecidos adiposos viscerais: retroperitoneal, periepididimal e mesentérico (Tabela 1) do grupo G3R foram significativamente menores em comparação aos grupos G9, G3L e G3RL ($p < 0,05$) que não diferiram entre si.

Tabela 1 – Peso corporal, relação peso corporal/comprimento nasoanal (PC/C.NA), Índice de Lee, peso dos tecidos adiposos viscerais (VIS): retroperitoneal (RET), periepididimal (PER), mesentérico (MES) aos 150 dias de ratos dos grupos: controle (G9); controle de ninhada reduzida (G3L); ninhada reduzida com restrição alimentar de 30% dos 60 aos 150 dias (G3R) ninhada reduzida com restrição alimentar de 30% dos 60 aos 90 dias e alimentação livre dos 91 aos 150 dias (G3RL).

	G9	G3L	G3R	G3RL
Peso Corporal (g)	436,80 \pm 38,60 ^a	441,00 \pm 35,25 ^a	210,20 \pm 38,04 ^b	422,00 \pm 45,03 ^a
PC/C.NA (g.cm ⁻¹)	17,32 \pm 1,12 ^a	17,65 \pm 0,98 ^a	9,58 \pm 1,64 ^b	17,16 \pm 1,89 ^a
Índice de Lee	300,90 \pm 4,29 ^a	304,80 \pm 4,22 ^a	270,40 \pm 18,34 ^b	304,70 \pm 12,74 ^a
Peso RET (g/100g)	1,52 \pm 0,30 ^a	1,64 \pm 0,40 ^a	0,04 \pm 0,03 ^b	1,79 \pm 0,59 ^a
Peso PER (g/100g)	1,42 \pm 0,26 ^a	1,53 \pm 0,16 ^a	0,16 \pm 0,08 ^b	1,64 \pm 0,31 ^a
Peso MES (g/100g)	0,78 \pm 0,21 ^a	0,94 \pm 0,24 ^a	0,15 \pm 0,02 ^b	1,14 \pm 0,49 ^a
Peso VIS (g/100g)	3,72 \pm 0,70 ^a	4,13 \pm 0,71 ^a	0,37 \pm 0,10 ^b	4,60 \pm 1,38 ^a

Resultados expressos por média \pm desvio padrão (n=5). Análise de Variância One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

A tabela 2 apresenta o perfil glicêmico com análise da glicemia em jejum e o perfil lipídico por meio das análises de colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL e triglicerídeos. A glicemia em jejum não apresentou diferença significativa quando comparado os grupos G9, G3L e G3R, assim como o grupo G3RL comparado com os grupos G9 e G3L. Contudo, foi estatisticamente maior no grupo G3RL em comparação com o grupo G3R ($p < 0,05$). Para o perfil lipídico, constatou-se que o nível de colesterol total foi maior no G3RL em relação aos grupos G9, G3L e G3R ($p < 0,05$), enquanto que os níveis de HDL e LDL foram mantidos entre os grupos. Os níveis de VLDL e triglicerídeos foram significativamente maiores nos grupos G3L e G3RL em relação aos grupos G9 e G3R ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Glicemia em jejum, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e triglicerídeos aos 150 dias de ratos dos grupos: controle (G9); controle de ninhada reduzida (G3L); ninhada reduzida com restrição alimentar de 30% dos 60 aos 150 dias (G3R) e ninhada

reduzida com restrição alimentar de 30% dos 60 aos 90 dias e alimentação livre dos 91 aos 150 dias (G3RL).

	G9	G3L	G3R	G3RL
Glicemia (mg.dL ⁻¹)	85,80 ± 6,53 ^a	85,60 ± 4,56 ^a	78,00 ± 5,70 ^a	94,00 ± 2,24 ^{a#}
Colesterol total (mg.dL ⁻¹)	74,30 ± 11,60 ^a	74,60 ± 20,84 ^a	68,30 ± 8,81 ^a	101,40 ± 10,79 ^b
HDL (mg.dL ⁻¹)	36,30 ± 8,42 ^a	29,30 ± 9,58 ^a	33,40 ± 6,54 ^a	38,60 ± 2,97 ^a
LDL (mg.dL ⁻¹)	32,50 ± 10,76 ^a	22,16 ± 16,07 ^a	30,70 ± 3,94 ^a	32,34 ± 6,29 ^a
VLDL (mg.dL ⁻¹)	5,50 ± 1,66 ^a	23,14 ± 15,82 ^b	4,20 ± 0,95 ^a	30,46 ± 10,18 ^b
Triglicérides (mg.dL ⁻¹)	27,50 ± 8,30 ^a	115,70 ± 79,08 ^b	21,00 ± 4,73 ^a	152,30 ± 50,90 ^b

Resultados expressos por média ± desvio padrão (n=5). Análise de Variância One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente (p < 0,05). # diferença restrita ao grupo G3RL em relação ao G3R.

3.2 Colo Proximal

O comprimento total e a largura do colo proximal de ratos aos 150 dias de idade, não diferiu significativamente entre os grupos (Tabela 3). Houve influência da restrição calórica (G3R e G3RL) sobre o tempo de trânsito gastrointestinal, com redução significativa em comparação aos grupos G9 e G3L.

Tabela 3 – Comprimento e largura do colo proximal e tempo de trânsito gastrointestinal (TTG) aos 150 dias de ratos dos grupos: controle (G9); controle de ninhada reduzida (G3L); ninhada reduzida com restrição alimentar de 30% dos 60 aos 150 dias (G3R) e ninhada reduzida com restrição alimentar de 30% dos 60 aos 90 dias e alimentação livre dos 91 aos 150 dias (G3RL).

	G9	G3L	G3R	G3RL
Comprimento (cm) ¹	6,20 ± 0,45 ^a	6,00 ± 0,35 ^a	5,50 ± 0,50 ^a	5,40 ± 1,19 ^a
Largura (cm) ²	1,24 ± 0,11 ^a	1,22 ± 0,08 ^a	1,42 ± 0,38 ^a	1,38 ± 0,15 ^a
TTG (min) ²	543,20 ± 151,40 ^a	634,00 ± 39,89 ^a	338,00 ± 45,86 ^b	348,20 ± 88,37 ^b

Resultados expressos por média ± desvio padrão (n=5). 1Análise de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's. 2Análise de Variância One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente (p < 0,05).

A morfologia do colo proximal no que se refere à organização de suas túnicas, mucosa, submucosa e muscular externa, foi mantida entre os grupos, entretanto comportamento morfométrico diferenciado na espessura dessas túnicas e também da parede total foram constatados (Tabela 4). A túnica mucosa, túnica muscular externa e a parede total foram estatisticamente diferentes em todos os grupos (Tabela 4). Na túnica submucosa, os grupos G9

e G3RL não apresentaram diferenças, porém, os grupos G3L e G3R diferiram estatisticamente entre si e entre os demais grupos ($p < 0,05$), sendo que o grupo G3R apresentou menor espessura da túnica submucosa em relação aos demais grupos (Tabela 4).

Tabela 4 – Morfometria das túnicas mucosa, submucosa, muscular externa e da parede total do colo proximal de ratos dos grupos: controle (G9); controle de ninhada reduzida (G3L); ninhada reduzida com restrição alimentar de 30% dos 60 aos 150 dias (G3R) e ninhada reduzida com restrição alimentar de 30% dos 60 aos 90 dias e alimentação livre dos 91 aos 150 dias (G3RL).

	G9	G3L	G3R	G3RL
T. Mucosa	247,20 ± 62,01 ^a	228,50 ± 56,48 ^b	137,90 ± 64,36 ^c	197,20 ± 50,05 ^d
T. Submucosa	21,08 ± 7,25 ^a	19,82 ± 8,22 ^b	15,43 ± 7,71 ^c	23,51 ± 11,37 ^a
T. Muscular Externa	188,60 ± 29,27 ^a	168,3 ± 66,57 ^b	78,60 ± 46,88 ^c	181,3 ± 44,97 ^d
Parede Total	493,00 ± 78,56 ^a	437,60 ± 102,00 ^b	241,00 ± 64,83 ^c	461,30 ± 69,34 ^d

Resultados expressos por média ± desvio padrão (n=5). Análise de Kruskal-Wallis seguido de pós-teste de Dunn's. Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

A figura 2 apresenta o Índice de células caliciformes produtoras de mucinas neutras e células enteroendócrinas serotoninérgicas. Maior e menor percentual de células caliciformes foram obtidos nas criptas do colo proximal do grupo G9 e G3R, respectivamente, com relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Os grupos G3L e G3RL não diferiram entre si. O Índice de células serotoninérgicas imunorreativas (5-HT) não apresentou diferença estatística entre os grupos.

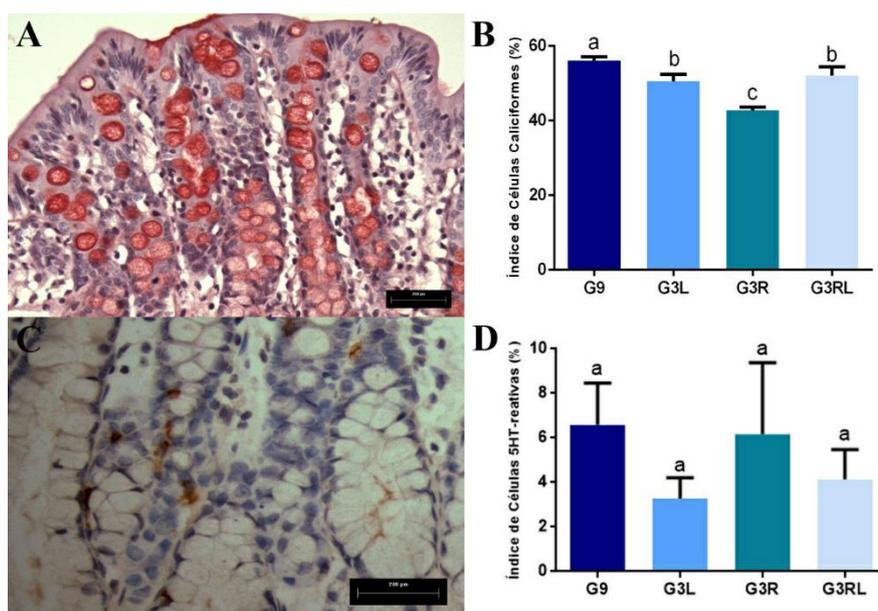


Figura 2 – Colo proximal de ratos dos grupos: controle (G9); controle de ninhada reduzida (G3L); ninhada reduzida com restrição alimentar de 30% dos 60 aos 150 dias (G3R) e ninhada reduzida com restrição alimentar de 30% dos 60 aos 90 dias e alimentação livre dos 91 aos 150 dias (G3RL). Em (A) Fotomicrografia de células caliciformes – Histoquímica PAS e (C) células enteroendócrinas serotoninérgicas imunorreativas (5HT-reativas) indicadas pela seta; em (B) Percentual de células caliciformes e (D) Percentual de células enteroendócrinas serotoninérgicas. Resultados expressos por média \pm desvio padrão (n=5). Análise de Variância One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey. Colunas com letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Imagens capturadas em 40X. Barra de 200 μ m.

3.3 Parâmetros biométricos e bioquímicos

O peso corporal do roedor adulto criado em ninhadas reduzidas não excede 30% dos controles, tornando este um bom modelo para estudar as consequências do sobrepeso moderado em juvenis e adultos de roedores (Habbout et al., 2013). Avaliações biométricas realizadas aos 21 dias de vida, indicam que o modelo de redução de ninhada em ratos machos é eficiente na indução do sobrepeso/obesidade logo após a lactação (Branquinho et al., 2017; Marques, 2014; Nery et al., 2011).

Também comprovamos essa indução de sobrepeso/obesidade por meio da análise do peso corporal realizada aos 21 e 60 dias de vida (Figura 1), em que houve um aumento significativo nos animais do grupo G3L, que sofreram redução de ninhada durante a lactação (3 filhotes por rata) em comparação com os animais do grupo controle G9, que não sofreram redução de ninhada (9 filhotes por rata). Entretanto, essa mesma avaliação realizada aos 90 e 150 dias de vida não mostrou diferença significativa entre os grupos G9 e G3L, demonstrando que a programação metabólica induzida por meio da redução de ninhada durante a lactação foi eficiente no início da vida, porém com o avanço da idade, o peso corporal dos ratos se normalizou. Nery et al. (2011), Wurtman e Miller (1976) também não detectaram diferenças no peso corporal de ratos machos Wistar que sofreram redução de ninhada em relação ao grupo controle aos 30-60 dias e aos 58 dias, respectivamente.

Em nosso estudo, os grupos G9, G3L e G3RL aos 150 dias de idade não diferiram estatisticamente entre si nos seguintes parâmetros: peso corporal, relação peso corporal/comprimento nasoanal, Índice de Lee, peso dos tecidos adiposos viscerais: retroperitoneal, periepídidimal e mesentérico (Tabela 1), mostrando que a realimentação após restrição calórica normaliza esses parâmetros e que os mesmos não são influenciados pelo tamanho da ninhada. Resultados semelhantes foram obtidos por Branquinho et al. (2017), com ratos Wistar aos 90 dias de idade submetidos à tratamento alimentar idêntico aos animais dos grupos G9 e G3L do nosso estudo. Ressalte-se que os animais do grupo G3R aos 150 de idade apresentaram uma diminuição significativa no peso corporal, na relação peso

corporal/comprimento nasoanal, no Índice de Lee, no peso dos tecidos adiposos avaliados em relação aos grupos G9, G3L e G3RL. Neste sentido, a restrição calórica de 30% submetida por período de 90 dias nos animais do grupo G3R foi suficiente para diminuir os parâmetros supracitados.

O Índice de Lee é utilizado para se obter informação sobre o fracionamento da massa corporal buscando inferir sobre questões relacionadas ao excesso de peso e adiposidade corporal (Araujo et al., 2009; Glaner, 2005), desta forma corrobora com a hipótese citada anteriormente, devido ao fato de que o grupo G3R apresentou menor Índice de Lee em relação ao G9, G3L e G3RL, demonstrando a eficácia da restrição calórica de 30% aplicada dos 60 aos 150 dias de idade em reduzir o desenvolvimento de obesidade.

A gordura visceral é a somatória (g/100g) dos pesos dos tecidos adiposos retroperitoneal, periepididimal e mesentérico e sugerida como um dos principais indicadores de Síndrome Metabólica (Muzumdar et al., 2008). Dessa forma, existe uma expectativa de programação metabólica que permanece na vida adulta devido à supernutrição durante a lactação (Branquinho et al., 2017). Isso pode ser observado no grupo G3RL, oriundo de ninhada reduzida, que foi realimentado livremente após o período de 30 dias de restrição calórica de 30% (60 aos 90 dias de idade), pois apresentou maior peso da gordura visceral (Tabela 1) quando comparado com o grupo G3R, que também foi proveniente de ninhada reduzida, mas com restrição calórica de 30% por período de 90 dias (60 aos 150 dias de idade), mostrando que a restrição calórica imposta ao G3RL não foi suficiente para manter o baixo peso da gordura.

Além disso, este estudo mostrou que o grupo G3RL não superou o segundo desafio metabólico, ou seja, a realimentação livre após o período de restrição calórica de 30%, pois os resultados de peso corporal, relação peso corporal/comprimento nasoanal, Índice de Lee, peso dos tecidos adiposos viscerais foram semelhantes aos do grupo G3L, o qual também passou por redução de ninhada, entretanto não foi submetido à restrição calórica.

Estudo realizado por Ye e Keller (2010) mostrou que a restrição calórica diminui a adiposidade, particularmente a gordura visceral. A redução da gordura visceral através da restrição calórica está associada a um aumento no tempo de vida média e máxima (Muzumdar et al., 2008). Nesta perspectiva, a redução significativa no peso da gordura visceral do grupo G3R em comparação com os demais grupos demonstra que a restrição calórica foi importante para evitar a instalação da síndrome metabólica.

As dosagens bioquímicas avaliadas apresentam o perfil glicêmico e lipídico dos animais aos 150 dias de idade (Tabela 2). Aumento nesses parâmetros pode ser associado ao

aparecimento de doenças crônicas degenerativas, tais como aterosclerose (Bertges et al., 2010; Cirilo et al., 2013), que pode ser causada por dislipidemias (colesterol LDL - lipoproteína de baixa densidade, colesterol HDL - lipoproteína de alta densidade e triglicerídeos elevados no sangue), pressão arterial elevada, diabetes mellitus e tabagismo (Bales; Kraus, 2013).

Segundo Bales e Kraus (2013), o risco cardiovascular efetivo tem sido associado à presença de um complexo de prejuízos cardiometabólicos que constituem a síndrome metabólica: uma combinação dos elementos da dislipidemia aterogênica, maior circunferência da cintura (reflexo do excesso de tecido adiposo abdominal visceral e subcutâneo), pré-hipertensão para hipertensão efetiva e glicemia elevada.

Nesse sentido, a glicemia em jejum apresentou níveis maiores para G3RL em relação ao G3R. Entretanto, os valores de referência para a glicemia em ratos adultos situam-se na faixa de 84,7 a 131,9 mg/dL, indicando que os valores obtidos neste estudo (G3RL = 94,00 mg/dL) estavam dentro dos limites normais (Cirilo et al., 2013) e, portanto, não influenciou a homeostase da glicose nesses ratos. Branquinho et al. (2017) obtiveram redução da glicemia em jejum aos 90 dias no grupo de ratos oriundos de ninhada reduzida durante a lactação (3 filhotes/rata) e submetidos à restrição calórica de 30% imposta logo após o desmame (22 aos 90 dias de idade) em comparação com outros dois grupos, os quais foram submetidos ao mesmo tratamento alimentar que os grupos G9 e G3L do presente estudo.

O colesterol total dos animais do grupo G3RL foi significativamente maior em relação aos grupos G9, G3L e G3R (Tabela 2). Contudo, os níveis de LDL e HDL não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Com relação aos triglicerídeos e ao VLDL, os grupos G3L e G3RL apresentaram níveis elevados, correlacionando com a programação metabólica causada pela superalimentação na lactação, pois os animais provenientes de ninhada normal (G9) e os provenientes de ninhada reduzida e que foram submetidos à restrição calórica moderada (G3R) apresentaram menores níveis. Branquinho et al. (2017) não obtiveram diferença estatística do colesterol total e de triglicerídeos entre os grupos aos 90 dias de idade, sendo que dois grupos foram submetidos ao mesmo tratamento alimentar que os grupos G9 e G3L do presente estudo, divergindo apenas o terceiro grupo que foi oriundo de ninhada reduzida durante a lactação (3 filhotes/rata), porém a restrição calórica de 30% foi imposta logo após o desmame e no nosso estudo a restrição foi imposta a partir dos 60 dias de idade.

Os resultados dos parâmetros bioquímicos demonstram que os animais submetidos à realimentação livre após a restrição calórica de 30% por período de 30 dias (G3RL) apresentaram maior perfil glicêmico e lipídico, confirmando novamente que esses animais, mesmo com um período de restrição calórica não conseguiram superar o segundo desafio

metabólico, que foi a realimentação livre, pois continuaram suscetíveis às alterações causadas pelas fases iniciais do desenvolvimento (lactação e início da idade adulta).

3.4 Colo Proximal

As dimensões do colo proximal (comprimento e largura) mostraram ausência de diferenças significantes entre os grupos (Tabela 3), indicando possível adaptação desse órgão ao protocolo experimental utilizado. Respostas diferenciadas relacionando dimensões do intestino grosso e manipulações dietéticas distintas na forma e na composição são presentes na literatura.

Utilizando dieta hiperlipídica durante 86 dias, Beraldi et al. (2015) obtiveram menor área do colo proximal de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica em comparação a camundongos alimentados com dieta padrão. Hermes et al. (2008), também obtiveram redução no comprimento e largura do colo proximal de ratos Wistar adultos alimentados com dieta hipoproteica (4% de proteína) em relação a ratos que receberam dieta padrão (24% de proteína). Schoffen et al. (2014), verificaram redução no comprimento do intestino grosso de ratos com restrição calórica de 50%. Isto demonstra que as dimensões do intestino grosso se adaptam a diferentes formas e composição de dietas.

O tempo do trânsito gastrointestinal foi significativamente menor no G3R e G3RL em comparação aos grupos G9 e G3L, decorrente possivelmente do menor volume de alimento ingerido, uma vez que os nutrientes seriam quase totalmente absorvidos pelo intestino delgado, restando menor volume para passar pelo intestino grosso, facilitando assim o esvaziamento intestinal. O aspecto das fezes foi semelhante entre os grupos.

Resultado semelhante foi obtido por Campos (2017) com redução no tempo de trânsito gastrointestinal em ratos Wistar adultos submetidos à restrição calórica de 50%. A obesidade decorrente da redução de ninhada (G3L) não interferiu no tempo do trânsito gastrointestinal em relação ao controle (G9) concordando com os resultados de Fu et al. (2014) para ratos tornados obesos devido a ingestão de dieta hiperlipídica.

A morfologia do colo proximal dos ratos independente do grupo experimental foi mantida e assemelha-se a organização morfológica intestinal padrão (Gartner; Hiatt, 2017). No entanto, a análise morfométrica das túnicas e parede total revelou efeito da redução de ninhada (G3L) e da restrição calórica (G3R) resultando em menor espessura das túnicas avaliadas e conseqüentemente da parede total quando comparado ao grupo G9 (Tabela 4).

Estudos que envolvem manipulação de dietas em roedores, seja pela composição, quantidade ou período de ingestão, são frequentes na literatura e exibem diferentes respostas

com relação à morfologia e ou morfometria intestinal. Schoffen et al. (2014) obtiveram maior espessura da túnica mucosa e redução da túnica muscular externa do colo proximal de ratos provenientes de ninhadas com 12 ratos/mãe durante a lactação e que sofreram restrição alimentar de 50% dos 22 aos 90 dias de idade em comparação com o grupo proveniente de ninhada com 6 ratos/mãe durante a lactação e alimentação livre por igual período.

Possivelmente a redução da túnica muscular externa em nosso estudo justifica-se pelo menor suprimento de nutrientes devido à restrição calórica moderada imposta ao grupo G3R pelo período de 90 dias (60 a 150 dias de idade), pois a menor disponibilidade de aminoácidos pode afetar a síntese proteica nos músculos intestinais e ocasionar atrofia muscular. Apesar de não avaliado neste trabalho a relação entre inervação intrínseca intestinal e a espessura de túnica muscular deve ser considerada. Segundo Gabella (1987), alterações no número e tamanho dos neurônios do plexo mioentérico estão associadas a variações na espessura da túnica muscular, tecido alvo responsável pela manutenção e plasticidade destes neurônios.

A mucosa do intestino grosso é recoberta por muco com função lubrificante que facilita a progressão do conteúdo fecal e fornece proteção contra a invasão de microrganismos, toxinas e enzimas digestivas presentes no lúmen colônico (Corfield et al., 2000; Gaudier et al., 2009; Mello et al.; 2012).

De acordo com Gaudier et al. (2009), o efeito protetor do muco está relacionado à presença de mucinas neutras e ácidas que são glicoproteínas sintetizadas e secretadas por células caliciformes. A eficiência da barreira protetora pode ser afetada por qualquer alteração qualitativa ou quantitativa na secreção ou padrões de expressão das mucinas, desencadeando importantes consequências fisiológicas e patológicas (Corfield et al., 2000). Notavelmente, as mucinas neutras representam aproximadamente 80% do conteúdo total de mucinas dentro das células caliciformes no trato gastrointestinal - TGI (Gold; Shochat; Miller, 1981). Segundo Hermes et al. (2008), variações nutricionais podem levar a uma redução da barreira intestinal formada por muco no intestino grosso de ratos.

As células caliciformes produtoras de mucinas neutras apresentaram percentual maior e menor nas criptas do colo proximal dos grupos G9 e G3R, respectivamente, com relação aos demais grupos ($p < 0,05$), os grupos G3L e G3RL não diferiram entre si, mas diferiram dos grupos G9 e G3R. Neste sentido, todos os grupos submetidos à redução de ninhada (G3L, G3R e G3RL) apresentaram menor porcentagem das células caliciformes em relação ao controle (G9), comprovando a influência do estado nutricional sobre a dinâmica dessas células. Outra observação é a menor porcentagem dessas células no grupo G3R, em contraponto a aumento

de enterócitos, o que pode ser relacionado com uma absorção maior de água e nutrientes nesses animais que sofreram restrição calórica moderada por 90 dias.

As células enteroendócrinas serotoninérgicas secretam serotonina (5-HT) e participam de importantes funções intestinais, incluindo secreção, percepção visceral e motilidade (Schoffen et al. 2014). Entre os estímulos que podem desencadear a secreção de 5-HT encontra-se o estímulo nutricional, o qual não foi efetivo para provocar variação no Índice de células enteroendócrinas serotoninérgicas imunorreativas (células 5HT-reativas) deste estudo, pois não diferiu entre os grupos. Nossos resultados divergem do obtido por Schoffen et al. (2014) que obtiveram aumento no número de células 5HT-reativas no grupo de ninhada com 12 ratos/mãe durante a lactação e que sofreram restrição alimentar de 50% dos 22 aos 90 dias de idade.

4. CONCLUSÃO

A redução de ninhada durante a lactação foi efetiva na indução da obesidade em ratos adultos, conforme evidenciada pelo peso dos tecidos adiposos e triglicerídeos plasmáticos. A restrição calórica moderada (30%) por 90 dias para ratos adultos provenientes de ninhada reduzida promoveu melhora nos parâmetros sanguíneos, reduziu a adiposidade visceral e o tempo de trânsito gastrointestinal, com readequação dos parâmetros morfométricos do colo proximal. A realimentação livre após restrição calórica moderada (30%) em ratos oriundos de ninhada reduzida mostrou que a programação metabólica induzida pela superalimentação na lactação permanece na idade adulta.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, G. G.; ARAUJO, M. B.; DANGELO, R. A.; MACHADO, F. B.; MOTA, C. S. A.; RIBEIRO, C.; MELLO, M. A. R. Máxima fase estável de lactato em ratos obesos de ambos os gêneros. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 15, n. 1, 2009.

BALES, C. W.; KRAUS, W. E. Caloric restriction: implications for human cardiometabolic health. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention**, v. 33, p. 201-208, 2013.

BERALDI, E. J.; SOARES, A.; BORGES, S. C.; SOUZA, A. C. S.; NATALI, M. R. M.; BAZOTTE, R. B.; BUTTOW, N. C. High-Fat diet promotes neuronal loss in the myenteric plexus of the large intestine in mice. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 60, p. 841-849, 2015.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between Lee index and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.

BERTGES, L. C.; MOURÃO, C. A. JR.; SOUZA, J. B.; CARDOSO, V. A. C. Hiperlipidemia induzida por Triton WR-1339 (Tyloxapol) em Ratos Wistar. **Revista Brasileira de Ciências Médicas e da Saúde**, v. 1, p. 37-9, 2010.

BISCHOFF, S. C. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. **Semin Immunopathol**, v. 31, p. 185-205, 2009.

BRANQUINHO, N. T. D.; CRUZ, G. H. P.; BORRASCA, C. L.; ALVES, L. P. S.; GOMES, C. R. G.; GODOI, V. A. F.; PEDROSA, M. M. D. Early-onset obesity and food restriction alter hepatocyte metabolism in adult Wistar rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 13, p. 1-9, 2017.

CAMPOS, J. M. **Efeitos da restrição alimentar em ratos diabéticos**: parâmetros fisiológicos, bioquímicos e morfológicos do intestino grosso, 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2017.

CAO J.J. Caloric restriction combined with exercise is effective in reducing adiposity and mitigating bone structural deterioration in obese rats. **Ann N Y Acad Sci**. 1433(1):41-52. doi: 10.1111/nyas.13936. Epub 2018 Jul 31. PMID: 30063080, 2018.

CIRILO, C. P.; SCHOFFEN, J. P. F.; SANTI-RAMPAZZO, A. P.; ZAPATER, M. C. V. U.; VICENTINI, F. A.; COMAR, J. F.; NATALI, M, R. M. Dietary restriction interferes with oxidative status and intrinsic intestinal innervation in aging rats. **Nutrition**, v. 29, p. 673-680, 2013.

CORFIELD, A. P.; MYERSCOUGH, N.; LONGMAN, R.; SYLVESTER, P.; ARUL, S.; PIGNATELLI, M. Mucins and mucosal protection in the gastrointestinal tract: new prospects for mucins in the pathology of gastrointestinal disease. **Gut**, v. 47, p. 589-594, 2000.

CORNICK, S.; TAWIAH, A.; CHADEE, K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. **Tissue Barriers**, v. 3, ed. 1-2, e982426, 2015.

DHARMANI, P.; SRIVASTAVA, V.; KISSOON-SINGH, V.; CHADEE, K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. **J Innate Immun**, v. 1, ed. 2, p. 123-135, 2009.

FU, X. Y.; LI, Z.; ZHANG, N.; YU, H. T.; WANG, S. R.; LIU, J. R. Effects of gastrointestinal motility on obesity. **Nutrition & Metabolism**, v. 11, n. 3, p. 1-12, 2014.

GABELLA, G. Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In: JOHNSON, L.R. (ED.). **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. 2 ed. New York: Raven Press, 1987. p. 335-381.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 4. ed. Elsevier, 2017, p. 592.

GAUDIER, E.; RIVAL, M.; BUISINE, M. P.; ROBINEAU, I.; HOEBLER, C. Butyrate enemas upregulate Muc genes expression but decrease adherent mucus thickness in mice colon. **Physiol Res**, v. 58, p. 111-119, 2009.

GLANER, M. F. Índice de massa corporal como indicativo da gordura corporal comparado às dobras cutâneas. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 11, n. 4, 2005.

GOLD, D. V.; SHOCHAT, D.; MILLER, F. Protease digestion of colonic mucin. Evidence for the existence of two immunochemically distinct mucins. **J Biol Chem**, v. 25, p. 6354-6358, 1981.

GREENWOOD-Van Meerveld B, JOHNSON AC, GRUNDY D. Gastrointestinal Physiology and Function. **Handb Exp Pharmacol**. v.239:1-16. doi: 10.1007/164_2016_118. PMID: 28176047, 2017.

HABBOU, A.; LI, N.; ROCHETTE, L. VERGELY, C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 5, p. 553-562, 2013.

HERMES, C.; AZEVEDO, J. F.; ARAÚJO, E. J. A.; SANT'ANA, D. M. G. Intestinal ascending colon morphometrics in rats submitted to severe protein malnutrition. **Int J Morphol**, v. 26, p. 5-11, 2008.

MALTA, A.; PEDROSA-FURLAN, M. M. Desenvolvimento corporal e adiposidade de ratos Wistar submetidos a diferentes regimes alimentares. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 14, n. 1, p. 55-61, 2010.

MARQUES, S. E. **Influência da redução de ninhada sobre o comportamento materno e respostas comportamentais e endócrinas da prole na fase adulta**. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) Programa multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Alfenas, MG, p. 93, 2014.

MELLO, R. O.; SILVA, C. M. G.; FONTE, F. P.; SILVA, D. L. F.; PEREIRA, J. A.; MARGARIDO, N. F.; MARTINEZ, C. A. R. Avaliação do número de células caliciformes nas criptas da mucosa colônica com e sem trânsito intestinal. **Rev Col Bras Cir**, v. 39, p. 139-145, 2012.

MUZUMDAR, R.; ALLISON, D. B.; HUFFMAN, D. M.; MA, X.; ATZMON, G; EINSTEIN, F. H.; FISHMAN, S.; PODUVAL, A. D.; MCVEI, T.; KEITH, S. W.; BARZILAI, N. Visceral adipose tissue modulates mammalian longevity. **Aging Cell**, v. 7, p. 438-440, 2008.

NERY, C. S; PINHEIRO, I. L.; MUNIZ, G. S.; VASCONCELOS, D. A. A.; FRANÇA, S. P.; NASCIMENTO, E. Murinometric evaluations and feed efficiency in rats from reduced litter during lactation and submitted or not to swimming exercise. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, p. 49-55, 2011.

SCHOFFEN, J. P. F.; VICENTINI, F. A; MARCELINO, C. G.; ARAÚJO, E. J. A.; PEDROSA, M. M. D.; NATALI, M. R. M. Food restriction beginning at lactation interferes with the cellular dynamics of the mucosa and colonic myenteric innervation in adult rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 4, p. 1833-1847, 2014.

SOARES, A.; BERARDI, E. J.; FERREIRA, P. E. B.; BAZOTTE, R. B.; BUTTOW, N. C. Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice. **BioMed Central Gastroenterology**, v. 15, n. 3, p. 1-9, 2015.

SOARES, A.; WEISS, E. P.; POZZILLI, P. Benefits of caloric restriction for cardiometabolic health, including type 2 diabetes mellitus risk. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, v. 1, p. 41-47, 2014.

SOUZA L.L.; MOURA E.G.; LISBOA P.C.; Litter size reduction as a model of overfeeding during lactation and its consequences for the development of metabolic diseases in the offspring. **Nutrients**. 13;14(10):2045. doi: 10.3390/nu14102045. PMID: 35631188; PMCID: PMC9145223, 2022.

STANEK, A.; BROZYNA-TKACZYK, K.; ZOLGHADRI, S.; CHOLEWKA, A.; MYSLINSKI, W. The role of intermittent energy restriction diet on metabolic profile and weight loss among obese adults. **Nutrients**. v.5;14(7):1509. doi: 10.3390/nu14071509. PMID: 35406122; PMCID: PMC9002823, 2022.

THOMAS-EAPEN, N. Childhood Obesity. **Prim Care**. v.48(3):505-515. doi: 10.1016/j.pop.2021.04.002. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34311854, 2021.

VANDYOUSEFI, S.; WHALEY, S.E.; WIDEN, E.M.; ASIGBEE, F.M.; LANDRY, M.J.; GHADDAR, R.; DAVIS, J.N. Association of breastfeeding and early exposure to sugar-sweetened beverages with obesity prevalence in offspring born to mothers with and without gestational diabetes mellitus. **Pediatr Obes**. v.14(12):e12569. doi: 10.1111/ijpo.12569. Epub 2019 Aug 6. PMID: 31389196; PMCID: PMC10409597, 2019.

WRIGHT, N.; ALISON, M. The biology of epithelial cell populations. 2ed. **New York: Clarendon Press Oxford**, 1984.

WURTMAN, J. J.; MILLER, S. A. Effect of litter size on weight gain in rats. **J Nutr**, v. 106, p. 697-701, 1976.

YE, J.; KELLER, J. N.N. Regulation of energy metabolism by inflammation: a feedback response in obesity and calorie restriction. **Aging**, v. 2, n. 6, p. 361–368, 2010.