

Administração intraperitoneal de metformina a filhotes durante a lactação altera parâmetros biométricos em ratos adultos aos 180 dias

Intraperitoneal administration of metformin to puppies during lactation alters biometric parameters in adult rats at 180 days

Administración intraperitoneal de metformina a crias durante la lactancia altera parámetros biométricos en ratas adultas a los 180 días

 **Willian do Nascimento de Souza Rodrigues¹**

 **Marcos Vinícius Martins¹**

 **Paulo Cezar de Freitas Mathias¹**

¹Universidade Estadual de Maringá,
Maringá, PR, Brasil.

Autor correspondente:

Willian do Nascimento de Souza
Rodrigues
willian_rodrigues7@hotmail.com

Submissão: 07 mai 2025

Aceite: 06 jun 2025

RESUMO. Introdução: redução de ninhada no terceiro dia pós-natal induz fenótipo de sobrepeso em ratos Wistar adultos machos. **Objetivo:** investigar se a administração intraperitoneal de metformina (100 mg/kg/dia) durante os primeiros doze dias de lactação pode alterar a composição corporal na vida adulta **Métodos:** neonatos receberam metformina desde o 1º dia de vida até o PN 12º, e as ninhadas foram ajustadas no PN3 para grupos normal (NL; 9 filhotes) e reduzido (SL; 3 filhotes), formando quatro grupos experimentais: NL-SAL, NL-MET, SL-SAL e SL-MET. Os animais foram eutanasiados aos 180 dias para coleta de fígado, tecido adiposo e sangue. **Resultados:** o grupo SL-SAL apresentou maior peso corporal, valores que foram reduzidos pela metformina. A massa hepática foi menor nos grupos NL-MET e SL-MET. Houve maior acúmulo de tecido adiposo branco e marrom em SL-SAL, e de adiposo branco e marrom em NL-MET **Conclusão:** metformina intraperitoneal na prole durante a lactação provoca alterações biométricas aos seis meses de idade.

Descritores: Metformina; Intolerância à glucose; Tecido adiposo branco; Tecido adiposo marrom.

ABSTRACT. Introduction: small litter size on postnatal day 3 induces an obese phenotype in adult male Wistar rats **Aims:** to investigate whether intraperitoneal administration of metformin (100 mg/kg/day) during the first twelve days of lactation can alter adult body composition **Methods:** neonates received metformin from postnatal day 1 to 12, and litters were divided into normal (NL; 9 pups) and reduced (SL; 3 pups) groups on postnatal day 3, forming four experimental groups: NL-SAL, NL-MET, SL-SAL and SL-MET. Animals were euthanised at 180 days for liver, adipose tissue and blood samples **Results:** SL-SAL group showed higher body weight, which were reduced by metformin treatment. Liver mass was lower in both NL-MET and SL-MET groups. There was greater accumulation of white and brown adipose tissue in SL-SAL, and of both white and brown adipose tissue in NL-MET **Conclusion:** intraperitoneal administration of metformin during lactation induces biometric changes in offspring at six months of age.

Descriptors: Metformin; Glucose intolerance; White adipose tissue; Brown adipose tissue.

RESUMEN. Introducción: la reducción de la prole en el tercer día postnatal induce un fenotipo de sobrepeso en ratas Wistar macho adultas. **Objetivo:** investigar si la administración intraperitoneal de metformina (100 mg/kg/día) durante los primeros doce días de lactancia puede alterar la composición corporal en la edad adulta. **Métodos:** los neonatos recibieron metformina desde el primer día de vida hasta el día 12 postnatal, y las camadas se ajustaron en el día 3 postnatal a grupos normales (NL; 9 crías) y reducidos (SL; 3 crías), formando cuatro grupos experimentales: NL-SAL, NL-MET, SL-SAL y SL-MET. Los animales fueron eutanasiados a los 180 días para recolectar hígado, tejido adiposo y sangre. **Resultados:** el grupo SL-SAL presentó un mayor peso corporal, que se redujo tras el tratamiento con metformina. La masa hepática fue menor en los grupos NL-MET y SL-MET. Se observó un mayor acúmulo de tejido adiposo blanco y marrón en el grupo SL-SAL, y de ambos tipos de tejido adiposo en el grupo NL-MET. **Conclusión:** la metformina intraperitoneal en la descendencia durante la lactancia provoca alteraciones biométricas a los seis meses de edad.

Descriptores: Metformina; Intolerancia a la glucosa; Tejido adiposo blanco; Tejido adiposo marrón.

INTRODUÇÃO

O excesso de peso corporal nos primeiros anos de vida é um grave problema de saúde pública global, com potencial para se prolongar até a vida adulta e gerar diversas complicações clínicas e metabólicas⁽¹⁾ que pode ser crônica debilitante e, estigmatizante que pode comprometer o equilíbrio psicofisiológico em qualquer faixa etária. Já se sabe, que o excesso de adiposidade corporal está fortemente associado ao desenvolvimento da síndrome metabólica (SM), caracterizada por distúrbios como dislipidemia, alterações no metabolismo da glicose e disfunções cardiometabólicas, frequentemente relacionadas à resistência à insulina^(2,3). Embora os mecanismos que desencadeiam a SM ainda não sejam totalmente compreendidos, o conceito DOHaD (Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença), também conhecido como hipótese de Barker, tem ganhado destaque nos últimos trinta anos. Essa hipótese propõe que exposições a insultos ambientais e nutricionais durante janelas críticas do desenvolvimento fenotípico, como durante a lactação de neonatos, podem predispor o indivíduo a fatores de risco para doenças metabólicas e crônicas quando atingem a vida adulta^(4,5).

Dentre os modelos experimentais de roedores que mimetizam a SM durante a fase de amamentação, destaca-se os oriundos de ninhadas reduzidas para três filhotes por mãe no terceiro dia de lactação (SL)⁽⁶⁻⁸⁾. Esses mamíferos SL por apresentarem menor competição pelo leite materno, têm maior disponibilidade de alimento, conseqüentemente acabam apresentando uma maior consumo calórico ao longo da amamentação, que resulta a partir do desmame em maior massa corporal, adiposidade visceral, dislipidemias, intolerância a glicose, esteatose hepática, disfunções neurais e endócrinas, como ansiedade e hipotireoidismo, além de distúrbios no metabolismo energético⁽⁸⁻¹²⁾

O fármaco cloridrato de metformina (MET) é uma biguanida, que apresenta baixo custo, sendo prescrita em vários países para o tratamento da Diabetes Mellitus tipo II (DM2), aprovado para uso desde 1994⁽¹³⁾, age como antihiperlipemizante oral, sendo consumido na forma de comprimido ou em pó, podendo ser indicada para indivíduos acima do peso, onde apresentam ações conhecidas como redutor da produção de glicose hepática, inibindo a gliconeogênese e glicogenólise, aumenta a utilização de glicose pelo tecido muscular esquelético (insulinodependente) e tecidos periféricos, e reduz a absorção de glicose a partir do trato gastrointestinal⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Outra ação importante da metformina é a inibição da cadeia respiratória mitocondrial no fígado, o que leva à ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) — um sensor metabólico fundamental na manutenção da homeostase energética celular, especialmente em condições de depleção energética em que ocorre a

maior captação de glicose pelos tecidos periféricos através do transportador de difusão facilitada GLUT4⁽¹⁷⁾.

Considerando que o período de amamentação é uma janela crítica e que o hipotálamo, especificamente o núcleo arqueado é essencial para o equilíbrio energético crônico e pode sofrer alterações epigenéticas em animais SL machos^(18,19) Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar se a administração intraperitoneal de metformina durante os primeiros doze dias de lactação é capaz de programar a redistribuição da gordura corporal em ratos Wistar machos adultos aos seis meses de idade.

MÉTODOS

Aprovação do comitê de Ética

Os procedimentos experimentais com animais foram realizados de acordo com as resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Maringá (CEUA- UEM) sob o processo 8450180620.

Animais

Ratos Wistar adultos (*Rattus norvegicus*), fêmeas com 70 dias de idade (n=16 fêmeas) e machos com 80 dias de idade (n=8 machos), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM), foram alocados para acasalamento no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular da Secreção (LexDOHAD), na proporção de duas fêmeas para cada macho (2:1). O acompanhamento dos animais foi realizado de forma contínua. Após a confirmação da prenhez, as fêmeas foram mantidas individualmente em caixas de polipropileno (45 cm × 30 cm × 15 cm). Todos os grupos experimentais permaneceram com as mães até o PN 21 (desmame), a partir dos 21 dias de vida foram padronizados (3 ratos machos/ caixa/ por ninhada) que foram monitorados até o PN 180 dias de idade (vida adulta). Durante todo o período experimental os animais foram mantidos sob condições controladas de luz (12 horas claro/12 horas escuro, com mudança de ciclo às 7h e 19h), temperatura (22 ± 2°C), água e ração comercial à vontade.

Indução da redução de ninhada

Ao nascimento no período neonatal PN0, todas as ninhadas foram padronizadas para nove filhotes (n: 3 a 4 ninhadas/ grupo experimental), preferencialmente machos, metade dos grupos mantiveram com 9 animais por matrizes, formando o grupo ninhada padrão (ninhada normal- NL). Para induzir superalimentação no período neonatal, um outro lote teve suas ninhadas reduzidas para

três filhotes por mãe no terceiro dia de vida pós-natal (PN 3), compondo o grupo ninhada reduzida (redução de ninhada- SL), conforme descrito na década anterior^(6,20).

No primeiro dia de vida pós-natal PN1, os filhotes foram distribuídos em quatro grupos experimentais, conforme o tamanho da ninhada (NL e SL) e o tratamento administrado (metformina 100 mg/kg ou solução fisiológica a 0,9%). Os grupos foram organizados da seguinte forma: NL-SAL ninhada padrão que receberam injeções intraperitoneais (i.p.) diárias de solução fisiológica a 0,9% (solução salina) durante os doze primeiros dias de vida; NL-MET: ninhada padrão que receberam injeções intraperitoneais diárias de metformina na dose de 100 mg/kg i.p. durante os doze primeiros dias de vida; SL-SAL: Ninhadas reduzidas (PN3), com três filhotes que receberam solução fisiológica a 0,9% i.p. durante os doze primeiros dias de vida ; SL-MET: Ninhadas reduzidas, três filhotes que receberam metformina na concentração de 100 mg/kg por via i.p. durante os doze primeiros dias de vida.

Tratamento com cloridrato de metformina

Para avaliar o efeito do tratamento intraperitoneal com metformina em parâmetros biométricos e plasmático de ratos machos. Animais provenientes de quatro ninhadas dos grupos NL e SL receberam cloridrato de 1,1-dimetilbiguanida, (metformina SIGMA®, Alemanha) dissolvida em solução salina na dose de 100 mg/kg/dia durante os doze primeiros dias de vida, gerando mais dois grupos NL-MET e SL-MET, conforme previamente descrito⁽⁹⁾

Mensuração do peso corporal ao longo do desenvolvimento

O peso corporal de todos os roedores machos dos grupos experimentais NL-SAL, NL-MET, SL-SAL e SL-MET foi registrado nos dias pós-natal 14, 21 e 180. Cada grupo foi composto por 7 a 11 ratos, provenientes de 3 a 4 ninhadas diferentes por grupo experimental.

Avaliação dos parâmetros biométricos e glicemia no PN 180

Aos 180 dias de idade todos os animais (n=7-11 ratos provenientes de 3 a 4 ninhadas diferentes/ por grupo experimental) foram previamente anestesiados com agente altamente lipossolúvel Tiopental sódico (Thiopental, 45mg/kg de peso corporal, i.p.) e, posteriormente eutanasiados por decapitação, utilizando guilhotina afiada (Insight – Ribeirão Preto), para a coleta de amostras de sangue total. Em seguida, foi realizada laparotomia mediana para a retirada do fígado e dos estoques de tecido adiposo retroperitoneal, periepídidimo, mesentérico e do tecido adiposo marrom interescapular. O peso do fígado e da massa de gordura foi expresso em relação ao peso corporal de cada animal (gramas /100 g de peso corporal) A glicemia basal (jejum) foi avaliada pelo

método espectrofotométrico da glicose oxidase (BIO200FL, Bio Plus[®], São Paulo, SP, Brasil), utilizando um kit comercial (Gold Analisa[®], Belo Horizonte, MG, Brasil).

Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição normal dos dados e posteriormente submetidos a uma análise de variância bidirecional two-way ANOVA para determinar o efeito de diferentes fatores: Tamanho da ninhada (N), Tratamento com metformina (M), ou interação entre fatores tamanho da ninhada e tratamento com metformina (I) seguido pelo teste de múltiplas comparações (pós teste de Tukey). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram conduzidas com o auxílio do software GraphPad Prism, versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA)

RESULTADOS

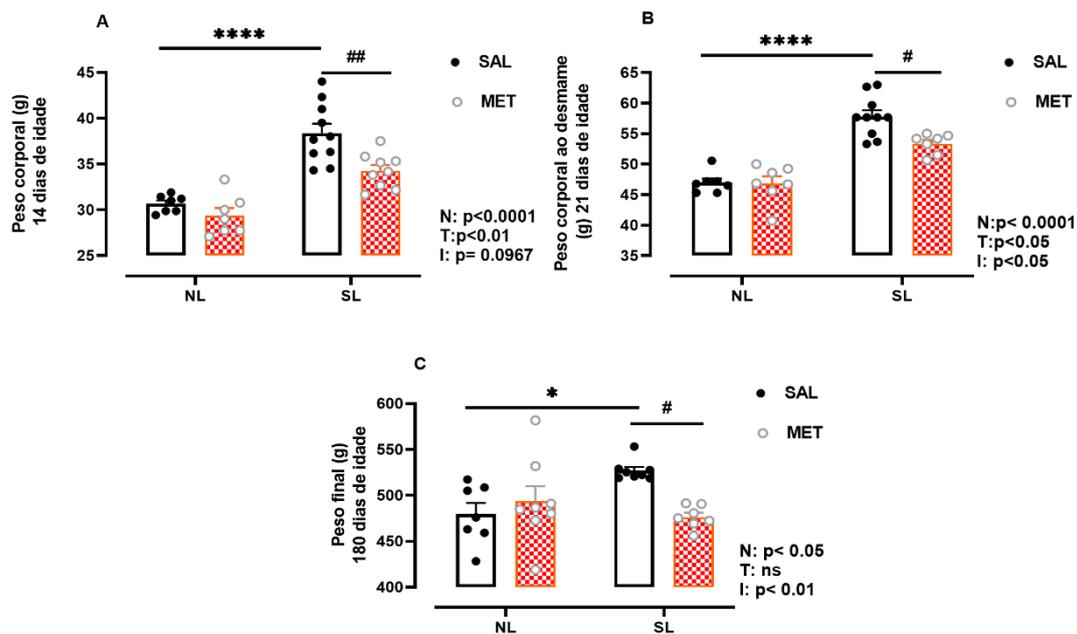


Figura 1. Peso corporal da prole macho de todos os grupos experimentais durante a lactação no PN14 (A), ao desmame no PN21 (B) e na vida adulta no PN180 (C). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), com $n=7-11$ animais provenientes de, no mínimo, três ninhadas diferentes. Considerou-se $*p < 0.05$ e $****p < 0.0001$ para comparações entre os grupos NL e SL; e $\# p < 0.05$ e $## p < 0.01$ para comparações entre os grupos SAL e MET nas mesmas condições, com base na análise post hoc de Tukey. A sigla N refere-se ao fator tamanho da ninhada; T, ao fator tratamento com metformina; e I, à interação entre os fatores tamanho da ninhada e tratamento com metformina, conforme análise de variância bidirecional (two-way ANOVA).

A redução do tamanho da ninhada ($pN < 0,0001$, Figura 1 A) e o tratamento com metformina ($pT < 0,01$, Figura 1 A) influenciaram significativamente o peso corporal dos ratos machos no 14º dia

pós-natal, com aumento do peso observado no grupo SL-SAL e diminuição no grupo SL-MET. Nos dias PN21 e PN180, foi identificada uma interação significativa entre os fatores tamanho da ninhada e tratamento com metformina ($pI < 0,05$ e $pI < 0,01$, respectivamente; Figura 1 B e 1C) sobre o peso corporal da prole SL-MET. Ratos do grupo SL-SAL apresentaram maior peso corporal em comparação aos demais grupos ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p < 0,05$, Figura 1A, 1B e 1C, respectivamente). O tratamento com metformina foi eficaz em reduzir o peso corporal apenas nos animais do grupo SL-MET nos momentos PN14, PN21 e PN180 ($p < 0,01$; $p < 0,05$; e $p < 0,05$, Figura 1A, 1B e 1C, respectivamente).

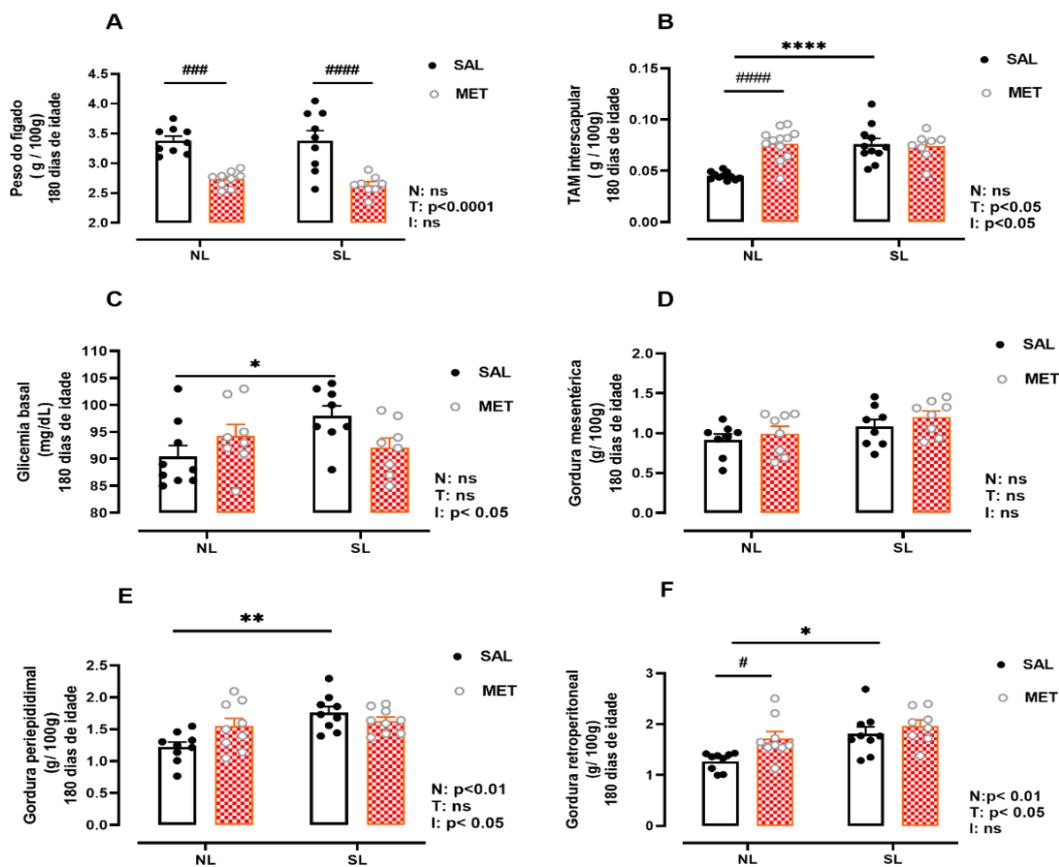


Figura 2. Efeito do tratamento com metformina durante os doze primeiros dias de lactação sobre parâmetros biométricos e bioquímicos da prole masculina aos 180 dias de idade. Peso do fígado (A); TAM interscapular (B); glicemia basal (C); gordura mesentérica (D); gordura periepídídima (E); e gordura retroperitoneal (F). Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), com n=7-11 animais provenientes de, no mínimo, três ninhadas diferentes. Consideraram-se * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para comparações entre os grupos NL e SL; e # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ para comparações entre os grupos SAL e MET nas mesmas condições, com base na análise post hoc de Tukey. As siglas N, T e I referem-se, respectivamente, ao fator tamanho da ninhada, ao fator tratamento com metformina e à interação entre esses fatores, conforme análise de variância bidirecional (two-way ANOVA).

O fator tratamento durante a lactação reduziu o peso relativo do fígado na vida adulta ($pT < 0,0001$; Figura 2A) tanto em NL-MET quanto em SL-MET. Houve interação significativa entre os fatores ninhada e tratamento nos seguintes parâmetros mensurados: peso do tecido adiposo marrom

interescapular ($pI < 0,05$; Figura 2B), glicemia basal ($pI < 0,05$; Figura 2C) e gordura periepididimal ($pI < 0,05$; Figura 2E). Como esperado a gordura retroperitoneal foi aumentada pela redução da ninhada ($pN < 0,01$; Figura 2F) e curiosamente elevada pelo tratamento com metformina em animais de ninhadas normais ($pT < 0,05$). O tratamento não alterou essa gordura no grupo SL-MET (Figura 2F). Não houve diferença no peso da gordura mesentérica entre os grupos (Figura 2D). De acordo com a análise de múltiplas comparações pelo teste de Tukey, a metformina reduziu o peso relativo do fígado aos seis meses de idade em animais dos grupos NL-MET ($p < 0,001$; Figura 2A) e SL-MET ($p < 0,0001$; Figura 2A), em relação aos respectivos controles NL-SAL e SL-SAL. O peso relativo do tecido adiposo marrom interescapular foi maior nos grupos SL-SAL ($p < 0,0001$, Figura 2B) e NL-MET ($p < 0,0001$, Figura 2B), ambos comparados ao grupo NL-SAL (Figura 2B). A glicemia de jejum foi significativamente maior no grupo SL-SAL em comparação ao NL-SAL ($p < 0,0001$; Figura 2C). Não foram observadas diferenças no peso da gordura mesentérica entre os grupos experimentais (Figura 2D). A gordura periepididimal foi aumentada no grupo SL-SAL em relação ao NL-SAL ($p < 0,01$; Figura 2E), assim como a gordura retroperitoneal ($p < 0,05$; Figura 2F). Além disso, o grupo NL-MET apresentou maior peso de gordura retroperitoneal em comparação ao NL-SAL ($p < 0,05$; Figura 2F), enquanto a metformina não alterou esse parâmetro no grupo SL-MET.

DISCUSSÃO

Um dos principais achados deste estudo foi que o tratamento intraperitoneal com cloridrato de metformina, administrado durante os doze primeiros dias de vida, reduziu o peso hepático em roedores com histórico de programação metabólica por redução da ninhada durante a lactação, aos seis meses de idade. No entanto, apesar desse efeito no fígado, esses animais mantiveram níveis elevados de adiposidade até a fase adulta, sugerindo que a intervenção precoce não foi suficiente para reverter completamente as alterações programadas no tecido adiposo. Além disso, observou-se que os animais oriundos de ninhadas padrão apresentaram aumento do peso relativo do tecido adiposo marrom interescapular e da gordura retroperitoneal após o tratamento, o que levanta a hipótese de que a metformina, quando administrada em indivíduos saudáveis, pode interferir negativamente na homeostase energética e favorecer o acúmulo de gordura.

Estudo prévio mostrou que a administração de metformina durante a fase de amamentação foi eficaz em reduzir a hiperfagia, normalizar a homeostase glicose por melhorar a secreção de insulina em células β - pancreáticas em ratos SL aos 90 dias de idade⁽⁹⁾. No entanto, neste estudo, observou-se que os animais SL-MET não mantêm a menor adiposidade visceral até os seis meses de idade, indicando que o efeito da metformina pode ser transitório ou dependente da idade. Em camundongos com esteatose hepática induzida, o tratamento com metformina é associado à melhora da tolerância à

glicose e da sensibilidade à insulina, o que pode ter resultado na redução do peso hepático e da esteatose, além disso eles não observaram alterações na adiposidade nem no tamanho dos adipócitos⁽²¹⁾ esses achados reforçam a hipótese de uma maior afinidade ou seletividade da metformina para as células do tecido hepático, indicando que os animais tratados com metformina, apresentam um efeito mais pronunciado de programação neste órgão específico. Os dados mostram uma programação metabólica nos camundongos SL-SAL principalmente no fígado, independentemente do fenótipo obeso, uma vez que a redução do peso hepático causada pela metformina também foi observada em animais NL-MET.

Os roedores nascidos em ninhadas reduzidas mantiveram intolerância à glicose aos seis meses de idade, pois em estudo anterior foi mostrado que ao PN 90 roedores SL mostravam aumentos de glicose no plasma, insulina e corticosterona⁽²²⁾, indicando que estes animais podem apresentar resistência à insulina e distúrbios na regulação do estresse. Embora o tratamento com metformina durante a lactação não tenha causado hipoglicemia no PN 180, os dados mostram um efeito de interação entre a redução da ninhada e o tratamento na regulação da homeostase glicêmica, sugerindo que a programação neonatal com metformina pode influenciar as concentrações de glicose circulantes. É importante destacar que a ausência de hipoglicemia no grupo tratado indica que a metformina não promoveu efeitos adversos sobre o controle glicêmico basal em roedores SL-MET, reafirmando seus papéis como um antihiper-glicemiante seguro e eficaz.

Observou-se que roedores provenientes de redução de ninhada apresentam uma maior massa de TAM interescapular no PN 180, conforme previamente observado neste mesmo modelo experimental, roedores no PN 90 apresentaram maior massa de TAM interescapular, redução da temperatura tecidual, em que sugerem menor termorregulação tecido específico⁽²²⁾. Essas características teciduais são compatíveis com a hipoatividade simpática e menor expressão de receptores β_3 -adrenérgicos em roedores com obesidade hipotalâmica⁽²³⁾. No entanto, no grupo SL-MET, não foram observadas alterações no peso do TAM interescapular, sugerindo que a metformina precoce não agravou o acúmulo de lipídico em adipócitos. Em contraste, animais NL-MET apresentaram aumento do peso do TAM interescapular, sugerindo que roedores provenientes de ninhadas normais podem ser programados pela metformina administrada em janelas críticas, provocando anormalidades na massa de TAM interescapular aos seis meses de idade.

Os dados confirmaram o maior acúmulo de tecido adiposo branco em roedores SL-SAL, corrobora com relatos anteriores de hipertrofia e hiperplasia de adipócitos, associadas a maior conteúdo de citocinas pró-inflamatórias em animais de ninhadas reduzidas⁽²⁴⁾, isso infere um possível foco inflamatório em adipócitos de roedores ao PN180. Observou-se maior acúmulo de gordura

retroperitoneal em animais NL-MET, indicando que o uso precoce e inadequado da metformina pode gerar consequências fisiopatológicas na distribuição do tecido adiposo corporal.

Este estudo apresenta algumas limitações, como a ausência de análises histológicas e moleculares que poderiam elucidar as anormalidades observadas no tecido adiposo, bem como os mecanismos fisiológicos subjacentes aos efeitos detectados na massa do fígado e dos adipócitos brancos e marrons. Estudos futuros são necessários para aprofundar a compreensão dessas alterações microestruturais.

CONCLUSÃO

O tratamento neonatal com metformina reduz o peso do fígado e promove uma distribuição heterogênea da gordura corporal entre os diferentes adipócitos em ratos aos 180 dias de idade.

REFERÊNCIAS

1. Kelsey MM, Zaepfel A, Bjornstad P, Nadeau KJ. Age-Related Consequences of Childhood Obesity. *Gerontology*. 2014;60(3):222–8.
2. Chung ST, Onuzuruike AU, Magge SN. Cardiometabolic risk in obese children. *Ann N Y Acad Sci*. 29 de janeiro de 2018;1411(1):166–83.
3. Palomo Atance E, Caballero Mora FJ, Espadas Maciá D, Marbán Calzón M, Sevilla Ramos P, García Villaescusa L, et al. Índice de masa triponderal y marcadores de riesgo metabólico en niños y adolescentes con obesidad. *Med Clin (Barc)*. maio de 2023;160(9):379–84.
4. Barker D. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr*. 2 de novembro de 2004;93(s446):26–33.
5. Hoffman DJ, Powell TL, Barrett ES, Hardy DB. Developmental origins of metabolic diseases. *Physiol Rev*. 1o de julho de 2021;101(3):739–95.
6. Almeida DL, Simões FS, Saavedra LPJ, Praxedes Moraes AM, Matusso CCI, Malta A, et al. Maternal low-protein diet during lactation combined with early overfeeding impair male offspring's long-term glucose homeostasis. *Endocrine*. 20 de janeiro de 2019;63(1):62–9.
7. Almeida DL, Fabricio GS, Tófolo LP, Ribeiro TA, Matusso CCI, Ribeiro MVG, et al. Early postnatal overnutrition impairs VO₂max gains with moderate exercise and increase post-exercise muscle damage in adult male rats. *J Dev Orig Health Dis*. 21 de junho de 2022;13(3):406–10.
8. Souza LL, Moura EG, Lisboa PC. Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring. *Nutrients*. 13 de maio de 2022;14(10):2045.

9. Previatte C, Malta A, Miranda RA, Martins IP, Pavanello A, de Oliveira JC, et al. Early metformin treatment improves pancreatic function and prevents metabolic dysfunction in early overfeeding male rats at adulthood. *Exp Physiol*. 3 de dezembro de 2020;105(12):2051–60.
10. Almeida DL, Moreira VM, Cardoso LE, Junior MDF, Pavanelo A, Ribeiro TA, et al. Lean in one way, in obesity another: effects of moderate exercise in brown adipose tissue of early overfed male Wistar rats. *Int J Obes*. 22 de janeiro de 2022;46(1):137–43.
11. Amaro A, Sousa D, Sá-Rocha M, Ferreira-Junior MD, Rosendo-Silva D, Saavedra LPJ, et al. Postnatal Overfeeding in Rodents Induces a Neurodevelopment Delay and Anxious-like Behaviour Accompanied by Sex- and Brain-Region-Specific Synaptic and Metabolic Changes. *Nutrients*. 15 de agosto de 2023;15(16):3581.
12. Ferreira LA, Ferreira-Junior MD, Amaral K de JV, Cavalcante KVN, Pontes CNR, Ribeiro LC dos S, et al. Maternal postnatal early overfeeding induces sex-related cardiac dysfunction and alters sexually hormones levels in young offspring. *J Nutr Biochem*. maio de 2022;103:108969.
13. Corcoran C, Jacobs TF. Metformin. 2025.
14. Drzewoski J, Hanefeld M. The Current and Potential Therapeutic Use of Metformin—The Good Old Drug. *Pharmaceuticals*. 5 de fevereiro de 2021;14(2):122.
15. Apostolova N, Iannantuoni F, Gruevska A, Muntane J, Rocha M, Victor VM. Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions. *Redox Biol*. julho de 2020;34:101517.
16. Wu T, Xie C, Wu H, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK. Metformin reduces the rate of small intestinal glucose absorption in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 21 de fevereiro de 2017;19(2):290–3.
17. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, et al. Metformin Increases AMP-Activated Protein Kinase Activity in Skeletal Muscle of Subjects With Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 1o de julho de 2002;51(7):2074–81.
18. Lisboa PC, Miranda RA, Souza LL, Moura EG. Can breastfeeding affect the rest of our life? *Neuropharmacology*. dezembro de 2021;200:108821.
19. Schumacher R, Rossetti MF, Lazzarino GP, Canesini G, García AP, Stoker C, et al. Temporary effects of neonatal overfeeding on homeostatic control of food intake involve alterations in POMC promoter methylation in male rats. *Mol Cell Endocrinol*. fevereiro de 2021;522:111123.
20. Plagemann A, Harder T, Schellong K, Schulz S, Stupin JH. Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. outubro de 2012;26(5):641–53.
21. Woo SL, Xu H, Li H, Zhao Y, Hu X, Zhao J, et al. Metformin Ameliorates Hepatic Steatosis and Inflammation without Altering Adipose Phenotype in Diet-Induced Obesity. *PLoS One*. 17 de março de 2014;9(3):e91111.
22. de Almeida DL, Fabrício GS, Trombini AB, Pavanello A, Tófolo LP, da Silva Ribeiro TA, et al. Early Overfeed-Induced Obesity Leads to Brown Adipose Tissue Hypoactivity in Rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2013;32(6):1621–30.

23. Rodrigues WN de S, Malta A, Lucredi NC, Lisboa PC, Miranda RA, Vargas R, et al. Adrenalectomy improves MSG-induced obesity in rats by increasing UCP-1 levels in interscapular brown adipose tissue. *Acta Sci Biol Sci.* 22 de janeiro de 2025;46:e72713.
24. Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. *J Nutr.* maio de 2013;143(5):553–62.