



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BEATRIZ NEVES BRUNIERA

**ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DE NEURÔNIOS
ENTÉRICOS DO JEJUNO DE RATOS SUBMETIDOS A
ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS PÓS-NATAIS POR
MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA**

BEATRIZ NEVES BRUNIERA

**ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DE NEURÔNIOS
ENTÉRICOS DO JEJUNO DE RATOS SUBMETIDOS A
ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS PÓS-NATAIS POR
MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José de Almeida Araújo

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bruniera, Beatriz.

ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DE NEURÔNIOS ENTÉRICOS DO JEJUNO DE RATOS SUBMETIDOS A ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS PÓS-NATAIS POR MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA / Beatriz Bruniera. - Londrina, 2021.
63 f. : il.

Orientador: Eduardo José de Almeida Araújo.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Neurociência Entérica - Tese. 2. Neurônios entéricos - Tese. 3. Obesidade - Tese. 4. Desnutrição - Tese. I. de Almeida Araújo, Eduardo José. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

BEATRIZ NEVES BRUNIERA

**ANÁLISE MORFOQUANTITATIVA DE NEURÔNIOS
ENTÉRICOS DO JEJUNO DE RATOS SUBMETIDOS A
ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS PÓS-NATAIS POR
MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José de Almeida
Araújo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Estefania Gastaldello Moreira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr Carlos Alberto Miqueloto
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de agosto de 2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que, com toda sua maravilhosidade, deu-me oportunidade de chegar até aqui com muitas bênçãos.

Aos meus pais Ruth (que com Deus no céu está) e Claudinel por todo amparo e educação.

À minha família tias, tios, primos, primas, amigos por todo apoio e motivação e ao noivo Alan, por toda ajuda e apoio emocional importante para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, pela a oportunidade de estar realizando este curso de mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Araújo, muito querido e importante pra mim, a quem prezo e tenho todo carinho e admiração deste mundo como profissional e ser humano espetacular. Obrigada pela oportunidade. Cada segundo que você compartilha seu conhecimento admirável comigo vale mais que ouro pra mim. Obrigada pelas revisões, sugestões e correções desde o meu TCC. Suas palavras me fizeram e me fazem tanto uma aluna quanto uma pessoa melhor.

Aos meus amigos do Laboratório de Neurociência Entérica (Andreia, Beatriz K, Camila Cristina, Camila Basso, Giovanni, Joyce, Matheus, Larissa, Vinícius) e um agradecimento especial para a Camila Machado que além de ser uma amiga muito querida e importante pra mim, ajudou-me neste trabalho e compartilhando sua experiência na ciência comigo que sou mais nova, obrigada por sua amizade! E também aos meus amigos do mestrado David, Pâmela e Ketlem por todo apoio nas disciplinas e para o Silas pelas sessões psicológicas.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida para realização do meu mestrado

BRUNIERA, Beatriz Neves. **Análise morfoquantitativa de neurônios entéricos do jejuno de ratos submetidos a alterações nutricionais pós-natais por manipulação do tamanho da ninhada.** 2021. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2021.

RESUMO

O estresse causado por extremos nutricionais pode influenciar qualquer período do desenvolvimento de ratos. Restringindo-se ao controle nervoso gastrointestinal, estudos demonstram que estes extremos podem impactar neurônios entéricos. No entanto, a literatura é frágil quanto às consequências para neurônios de ratos expostos a extremos nutricionais durante a lactação e que chegam à fase adulta. Assim, este trabalho avaliou os efeitos da subnutrição e supernutrição, induzidas por modelo de programação de ninhadas, sobre aspectos morfoquantitativos dos plexos mientérico e submucoso do jejuno de ratos Wistar adultos. Dezoito ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos foram distribuídos em três grupos: ninhada normal (NN), formado por animais oriundos de prole com 5 filhotes/matriz; ninhada reduzida (NR), formado por animais oriundos de prole com 2 filhotes/matriz; e ninhada expandida (NE), formado por animais oriundos de prole com 8 filhotes/matriz. O jejuno foi coletado, pesado e teve seu comprimento e largura mensurados. Multiplicou-se comprimento e a largura para obter a área jejunal. Anéis de 1cm do jejuno foram microdissecados, visando obtenção de preparados totais contendo o plexo mientérico e a camada muscular e o plexo submucoso. Estes foram submetidos à técnica de imunofluorescência para marcação da população total de ambos plexos (HuC/D+) e as subpopulações nitrérgica (nNOS+) e colinérgica (HuC/D+/nNOS-) no plexo mientérico e, no plexo submucoso, as subpopulações foram marcadas com calretinina fortemente e fracamente (Calr+). Capturaram-se 32 imagens em fotomicroscópio de fluorescência na objetiva de 20x, resultando em uma área para análise de 0,0448 cm². Contou-se o número de neurônios da população total e subpopulações nesta área do jejuno e projetou-se esse número para toda a área do órgão, como fator de correção devido à variação nas dimensões provocada pelo experimento. Além disso, a área de 100 corpos celulares de neurônios da população total e subpopulações de ambos os plexos foi mensurada. Utilizou-se o teste Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade. O teste t de Student para amostras independentes foi utilizado para comparar dados com distribuição normal entre os grupos NRxNN e NExNN. Dados com distribuição livre, utilizou-se o teste Mann-Whitney. Para todos os testes o nível de significância considerado foi de 5%. Os resultados mostraram que ratos do grupo NR tinham massa corporal maior que a do controle. Não se observou diferença significativa na massa corporal entre os grupos NE e NN. A área do jejuno estava ampliada nos dois grupos experimentais quando comparados ao controle. Neurônios de ambos plexos entéricos não sofreram nenhuma alteração no número da população total e das subpopulações avaliadas. Quanto à morfometria, observou-se hipertrofia de neurônios mientéricos estimados como colinérgicos tanto no NR como no NE, quando comparados ao NN. Também houve hipertrofia de neurônios submucosos marcados fracamente em NR e NE e nos marcados fortemente com calretinina apenas em NE comparados a NN. Conclui-se que a subnutrição e supernutrição durante a lactação de ratos Wistar não provoca perda de neurônios entéricos no jejuno de animais adultos. No entanto, o estresse nutricional causa hipertrofia do corpo celular de neurônios mientéricos estimados como colinérgicos e também de neurônios submucosos marcados fracamente e fortemente com calretinina.

BRUNIERA, Beatriz Neves. **Morphoquantitative analysis of the jejunal enteric neurons of rats submitted to postnatal nutritional changes by manipulation of the litter size.** 2021. 64 p. Dissertation (Master in Health Sciences) - State University of Londrina, Londrina. 2021.

ABSTRACT

Stress caused by nutritional extremes can influence any period of development in rats. Particularly inside gastrointestinal nervous control, studies show that these extremes can impact enteric neurons. However, the literature is fragile about the consequences for neurons in rats exposed to nutritional extremes during lactation and that reach adulthood. Therefore, this work aimed to evaluate the effects of malnutrition and overnutrition induced by a litter programming model on morphoquantitative aspects of the myenteric and submucosal plexuses of the jejunum of adult Wistar rats. Eighteen Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were divided into three groups: normal litter (NL), formed by animals from offspring with 5 offspring/mother, reduced litter (SL), formed by animals from offspring with 2 pups/mother and expanded litter (LL), formed by animals from offspring with 8 pups/mother. The jejunum was collected, weighed and had its length and width measured. Length and width were multiplied to obtain the jejunal area. Rings of 1 cm from jejunum were microdissected to obtain total preparations containing the myenteric plexus with muscular layer and submucosal plexus. These were subjected to the immunofluorescence technique to label the total population of both plexuses (HuC/D+) and the nitrergic (nNOS+) and cholinergic (HuC/D+/nNOS-) subpopulations in the myenteric plexus and in the submucosal plexus the subpopulations were marked with calretinin strongly and weakly (Calr+). Thirty-two images were captured in a fluorescence photomicroscope on a 20x objective, resulting in an area for analysis of 0.0448 cm². The number of neurons in the total population and subpopulations in this area of the jejunum and this number was projected for the entire area of the organ, as a correction factor due to the variation in dimensions caused by the experiment. In addition, the area of 100 cell bodies of neurons from the total population and subpopulations of both plexuses was measured. The Shapiro-Wilk test was used to assess normality. Student's t test for independent samples was used to compare normally distributed data between the SLxNL and LLxNL groups. Data with free distribution the Mann-Whitney test was used. For all tests, the significance level considered was 5%. The results showed that rats in the NR group had greater body mass than the control group. There was no significant difference in body mass between the LL and NL groups. The area of the jejunum was enlarged in both experimental groups when compared to the control. Neurons from both enteric plexuses did not suffer any change in the number of the total population and of the subpopulations evaluated. About the morphometry, hypertrophy of myenteric neurons estimated as cholinergic in both SL and LL when compared to NL was observed. There was also hypertrophy of submucosal neurons marked weakly in SL and LL and those marked strongly with calretinin only in LL compared to NL. However, nutritional stress causes hypertrophy of the cell body of myenteric neurons estimated as cholinergic and also of submucosal neurons marked weakly and strongly with calretinin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Parâmetros morfoquantitativos e fotomicrografias de neurônios mientéricos totais (HuC/D+) do jejuno.....	43
Figura 2 – Parâmetros morfoquantitativos e fotomicrografias de neurônios mientéricos nitrérgicos (nNOS+)	44
Figura 3 – Parâmetros morfoquantitativos de neurônios estimados como colinérgicos (HuC/D+/nNOS-) do jejuno.....	45
Figura 4 – Parâmetros morfoquantitativos e fotomicrografias de neurônios submucosos totais (HuC/D+) do jejuno	46
Figura 5 – Parâmetros morfoquantitativos e fotomicrografias de neurônios submucosos Calr+ fortemente marcados do jejuno	47
Figura 6 – Parâmetros morfoquantitativos e fotomicrografias de neurônios submucosos Calr+ fracamente marcados do jejuno	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais alterações no TGI em roedores desnutridos quando comparados ao grupo controle.....	18
Tabela 2 – Principais alterações no TGI em roedores obesos quando comparados ao grupo controle.....	21
ARTIGO	
Tabela 1 - Parâmetros biométricos de ratos adultos submetidos a alterações nutricionais, por manipulação do tamanho de ninhadas, durante lactação	42

LISTA DE ABREVIATURAS

5HT	Serotonina
ACh	Acetilcolina
BSA	Albumina de soro bovino
Calr	Calretinina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais CGRP- Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
ChAT	Enzima colina acetil transferase
Cm	Centímetros
Cm ²	Centímetros ao quadrado
CN	Crista neural
DPE	Desnutrição proteico-energética
GC	Grupo controle
GD	Grupo desnutrido
GDRN	Grupo desnutrido renutrido
GE	Grupo experimental
GOB	Grupo obesidade
Hand2	Gene derivado do coração e da crista neural 2
HIPK2	Homeodomínio de interação com proteína quinase 2
IMC	Índice de massa corpórea
IPAN	Neurônio intrínseco aferente primário
K ⁺	Potássio
M	Molar
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida NADPH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada
NE	Ninhada expandida NN – Ninhada normal nNOS- Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NR	Ninhada Reduzida
NM	Neurônio mientérico
NS	Neurônio submucoso
Mash1	Gene homólogo achaet-scute 1

MSG	Glutamato monossódico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
RA	Restrição alimentar
SCaF	Sedentário cafeteria fibra
SF	Sedentário fibra
SNE	Sistema nervoso entérico
SP	Substância P
SUS	Sistema Único de Saúde
TGI	Trato Gastrointestinal
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VIP	Peptídeo vasoativo intestinal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	MODELO DE PROGRAMAÇÃO DE NINHADAS	11
1.2	SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE) E TRATO GASTROINTESTINAL (TGI)	13
1.3	IMPACTO DA DESNUTRIÇÃO E DA OBESIDADE NO SNE	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	GRUPOS EXPERIMENTAIS	24
3.2	ANÁLISE DO FENÓTIPO DE PELLETS FECAIS	25
3.3	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	25
3.4	ANÁLISES QUANTITATIVA E MORFOMÉTRICA DOS PLEXOS MIENTÉRICO E SUBMUCOSO	25
3.5	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	26
4	ARTIGO CIENTÍFICO	27
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXOS	56

1. INTRODUÇÃO

A saúde pública do Brasil vive uma fase de transição nutricional crescente desde a deficiência de micronutrientes até o ganho de peso exagerado da população. Porém, mesmo com as políticas públicas e melhorias no Sistema Único de Saúde (SUS) os extremos de condições socioeconômicas, embora reduzidos, ainda permanecem contrastantes (COUTINHO, 2008).

Dados epidemiológicos demonstram que a obesidade no Brasil aumentou em 30% nas últimas décadas com prevalência maior entre as faixas etárias de 18 a 24 anos. Concomitantemente, a desnutrição permanece elevada em algumas regiões do país, sobretudo em municípios de pequeno porte e em grupos populacionais específicos, estando fortemente concentrada nas regiões norte e nordeste (BRASIL, 2011). De acordo com dados do DataSus, entre 2008 e 2017 (ano dos últimos dados consolidados) o Brasil registrou 63.712 óbitos por complicações decorrentes da desnutrição. Isso representa uma média de 6.371 mortes por ano e 17 mortes por dia (GARCIA, 2019). Tais problemas ocorrem por uma heterogeneidade de fatores que incluem genética, influência do ambiente, hábitos culturais e sedentarismo.

Por uma diversidade de questões socioeconômicas, ainda há famílias brasileiras numerosas que conseguem arcar com apenas uma refeição por dia, podendo este empecilho desenrolar-se em problemas de tipos de DPE como a desnutrição energético-calórica (*marasmo*) e/ou energético-protéico (*kwashiorkor*). Por outro lado, outra fração populacional, provida de melhor acesso ao alimento é, muitas vezes, inconscientemente mal nutrida por uma dieta desequilibrada com alimentos repletos de calorias vazias e alto valor energético, que não só podem contribuir para anemia, carência de vitaminas e outras doenças, mas também são responsáveis por induzir distúrbios metabólicos como diabetes e hipertensão ligados ao ganho de peso excessivo (FRAGA, 2012).

A desnutrição protéico-energética (DPE) denominada de Síndrome de *Kwashiorkor* ocorre quando há predominância na falta de proteína na dieta. Quando há menor aporte de todos os macronutrientes, ou seja, proteínas, carboidratos e lipídeos, classifica-se como outro tipo de DPE denominada *marasmo* ou desnutrição marasmática. Quando ambas ocorrem juntas recebem o nome de desnutrição mista. Logo, mesmo que um indivíduo esteja se alimentando diariamente, é possível que surja um quadro de desnutrição por falta total ou parcial, de um ou mais elementos da dieta (NHAMPOSSE, 2012; VOLTARELLI, 2008; ACEVEDO, 2018).

Esses efeitos nocivos à saúde associados com as desordens destes extremos nutricionais vêm instigando pesquisadores do mundo todo à melhor compreensão sobre a programação fetal e como as experiências nutricionais no início da vida podem contribuir com as desordens metabólicas na vida adulta (PLAGEMANN, 2006; LIU et al., 2013). Diante os impasses apresentados, este trabalho será mediador para respostas futuras sobre o que a alimentação no início da vida pode influenciar o componente do Sistema Nervoso Entérico (SNE) de mamíferos que está diretamente envolvido no controle da motilidade e secreção de íons do intestino delgado, respectivamente: o plexo mientérico e o plexo submucoso.

1.1 MODELO DE PROGRAMAÇÃO DE NINHADAS

Tem-se sugerido que as primeiras experiências nutricionais do indivíduo podem afetar sua suscetibilidade para doenças crônicas na idade adulta, tais como obesidade, hipertensão, doença cardiovascular e diabetes tipo 2. O termo “*imprinting* metabólico” descreve um fenômeno através do qual uma experiência nutricional precoce, acontecendo durante um período crítico e específico do desenvolvimento (janela de oportunidade), acarretaria um efeito duradouro, persistente, ao longo da vida do indivíduo, podendo predispor o indivíduo a determinadas doenças caso o *imprinting* seja desfavorável à nutrição do organismo (BALABAN, 2004).

O hipotálamo, órgão que comanda a regulação do apetite, permanece amadurecendo ao longo das primeiras semanas de vida enquanto os filhotes estão sendo amamentados. Sendo assim, este período é suscetível a estímulos nutricionais, intervenções e tratamentos na fisiologia do organismo que podem influenciar, por meio da expressão gênica, no desequilíbrio da homeostase metabólica e no desenvolvimento (BOURET, 2012; PATEL; SRINIVASAN; LAYCHOCK, 2009; PATEL; SRINIVASAN, 2011; HABBOUT et al., 2013).

Em humanos, a formação do hipotálamo ocorre no período de desenvolvimento fetal, mais especificamente durante a etapa da organogênese que vai da 4ª a 8ª semana após a fecundação. Neste período, o diencéfalo se diferencia em hipotálamo, tálamo e epitálamo. O hipotálamo conterá núcleos que regularão funções viscerais, como o sono, a homeostasia, a temperatura corporal, a atividade cardíaca, ingestão alimentar e de líquidos, bem como o comportamento emocional e sexual (MOORE, 2012).

Os períodos mais prematuros e finais da gestação são caracterizados pelo amadurecimento do sistema do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e, portanto, estes também são os momentos de maior susceptibilidade do conceito a alterações

endócrinas. Enquanto que, o amadurecimento do metabolismo glicídico ocorre nos períodos finais da gestação, sendo este mais susceptível a alterações na sensibilidade à insulina e tolerância à glicose.

Existem três períodos críticos durante o desenvolvimento que irão determinar a formação do tecido adiposo em humanos. O primeiro ocorre durante o 3º trimestre da gravidez, no qual, a composição corporal do feto em desenvolvimento estará relacionada aos hábitos nutricionais maternos. O segundo acontece no primeiro ano de vida e recebe influência direta do aleitamento materno e o terceiro acontece durante o crescimento e adolescência, e está ligado aos hábitos alimentares e de atividade física. Esses são três períodos críticos relacionados à hiperplasia do tecido adiposo, o que dificulta a perda de peso, aumentando a tendência à obesidade em adultos (BALABAN, 2004). Ainda assim existe a obesidade hipertrófica, a qual está relacionada ao aumento do volume das células adiposas podendo se manifestar ao longo de qualquer fase da vida adulta (GABELA, 1971).

É válido considerar que o período crítico de desenvolvimento e amadurecimento do hipotálamo é diferente para roedores e humanos. Nestes, no terceiro trimestre da gestação é onde há formação e amadurecimento do sistema do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e, portanto, momentos de maior susceptibilidade do conceito a alterações endócrinas. Já em ratos e camundongos, o hipotálamo é relativamente imaturo no nascimento e continua a se desenvolver durante as primeiras 2 semanas de vida pós-natal. Logo, a importância considerável do desenvolvimento hipotalâmico pós-natal em roedores difere daquela em humanos, onde o hipotálamo se desenvolve quase inteiramente durante a vida fetal (BOURET, 2012; PATEL; SRINIVASAN; LAYCHOCK, 2009; PATEL; SRINIVASAN, 2011; HABBOUT et al., 2013)

Para melhor compreensão dos efeitos do excesso ou falta nutricional em recém-nascidos durante determinado período, utilizam-se modelos de programação de ninhadas (RODRIGUES et al., 2009; PLAGEMANN et al., 2009). Dentre os modelos existentes, destaca-se o de manipulação de tamanho de ninhadas, no qual a expansão consiste em alocar mais animais que o habitual para uma mesma matriz, enquanto que a redução implica em deixar menos filhotes em uma prole (PLAGEMANN, 2006; PLAGEMANN et al., 2012; HABBOUT et al., 2012, BOURET, 2012).

Com o modelo de manipulação de ninhadas, originaram-se os grupos controles, também denominados de Ninhadas Normais (NN) que contêm o número habitual de 10 a 12 filhotes por matriz (HABBOUT et al., 2012) e grupos experimentais denominados de

Ninhadas Reduzidas (NR), alocando-se de 2 a 4 filhotes a fim de que os nutrientes do aleitamento materno disponibilizem-se em demasia, e Ninhadas Expandidas (NE) com um número de 16 filhotes por matriz para que o aporte nutritivo seja escasso, resultando em uma prole subnutrida (CHERNOFF et al., 2009).

Nas NR a quantidade do leite materno é mais que suficiente para os recém-nascidos e por haver abundância de alimento ocasiona supernutrição com aumento do peso dos animais, da quantidade de massa magra e tecido adiposo acompanhada de retenção hídrica (GIACOMELLI, 1999). Nas NE a quantidade de leite produzido pela mãe não é condizente com o número de filhotes, em função desta menor disponibilidade de alimento por indivíduo é gerada uma subnutrição resultando em um desenvolvimento retardado dos filhotes, menor tamanho e peso corporal comparado ao grupo controle (NN) (BOURET, 2012).

No pós-desmame, em animais desnutridos observa-se um aumento de vias orexigênicas o que implica em aumento do consumo alimentar, puberdade precoce e infertilidade, além de afetar também projeções neuronais e a cognição. Os animais que eventualmente se tornaram obesos pós-desmame, apresentaram constipação e facilidade de ganhar gordura e peso (SOLIS et al., 2016).

1.2 TRATO GASTROINTESTINAL (TGI) E SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO (SNE)

1.2.1 Formação embrionária do intestino e do SNE

A formação do intestino em humanos inicia-se em meados da quarta semana após a fertilização, na qual como consequência dos dobramentos laterais e longitudinais forma-se o intestino primitivo. Este é formado por três segmentos: anterior, médio e posterior. O intestino anterior origina o início do tubo digestório (faringe e esôfago), estômago, a primeira porção do intestino delgado (duodeno) e também os órgãos anexos: pâncreas, fígado e vesícula biliar. Já o intestino médio deriva o resto do intestino delgado, jejuno e íleo, bem como parte do intestino grosso, ceco, apêndice, cólon ascendente e metade do cólon transversal. O intestino posterior, por sua vez, forma a última porção do intestino grosso, a outra parte do cólon transversal, cólon descendente, sigmoide, reto e a porção superior do canal anal (MOORE, 2010)

O tubo intestinal primitivo é formado por uma única camada de epitélio colunar circundado por uma fina camada de mesoderma esplâncnico. Conforme o mesoderma cresce e se diferencia em músculo liso, o tubo digestivo altera sua morfologia, resultando

em claras demarcações entre as porções anterior, média e posterior do intestino (ORÍÁ, 2016)

A gravidez de humanos consiste em três trimestres e logo no primeiro trimestre, durante a quarta e sétima semanas ocorre a colonização das células da crista neural (CN) por todo o TGI. Nas semanas 8 e 9 o plexo mioentérico se organiza e o submucoso, na semana 12. Marcadores neurais, primeiramente, NOS e depois colina acetiltransferase, 5-HT, CGRP, encefalinas, e VIP aparecem na vida fetal na transição do primeiro para o segundo trimestre (ORÍÁ, 2016; VRIES et al, 2010). Já o período entre a 10ª e 18ª semanas é de grande importância na maturação do SNE no qual foi observada a presença de neurônios diferenciados, neuroblastos e inervação noradrenérgica inibitória extrínseca e os contatos neuromusculares, ou seja, as funcionalidades do SNE (HITCHCOCK et al., 1992).

Os neurônios entéricos e glia já estão organizados em gânglios e presentes nos plexos na 14ª semana. Portanto, este período é equivalente com a formação das sinapses e portanto, crítico, não só pelo que a mãe consome, mas também por outros fatores exógenos. No terceiro trimestre, o SNE já está formado, mas continua sua maturação após o nascimento, sendo a lactação também um período impactante no futuro do lactente (BURTI, 2006; CAMPOS, 2017).

O SNE começa a se formar durante o período embriológico e continua sua formação após o nascimento. Isto é verdadeiro para humanos e para roedores. Estes sofrem modificações importantes na morfologia intestinal e funções, em particular a motilidade colônica. Estas alterações foram associadas a um aumento na proporção de neurônios mientéricos nNOS e ChAT e suas organizações em gânglios após o nascimento (KAPUR et al. 1992; YOUNG et al. 1998).

Em ratos, as células progenitoras levam de 3 a 6 dias para migrarem e chegam em seus respectivos destinos no 16º dia embrionário (FOONG, 2016). Na primeira semana pós-natal, tem-se um aumento populacional de nNOS enquanto os neurônios ChAT têm um aumento ao fim do período embrionário, mas estes já são presentes no nascimento (VRIES et al., 2010). Foi visto que os fatores de transcrição Hand2 e HIPK2 regulam esta diferenciação neuronal, mas especula-se que outros genes estejam também envolvidos como é o caso de Mash1 (ORÍÁ; BRITO, 2017).

Em humanos, as células derivadas da crista neural iniciam a colonização na semana 4 e a finalizam na semana 7 de gestação, sendo assim, após 14 semanas neurônios e glia estão presentes nos plexos (VRIES et al., 2010). Quando não há

colonização correta dos intestinos pelas células da CN, resulta-se em doenças congênitas como é o caso da doença de Hirschsprung (KAPUR, 2000). Também foi observado que os problemas de motilidade e constipação em recém-nascidos estão ligados à ausência de neurônios ChAT, portanto a terapia para a motilidade prejudicada de recém-nascidos visa a aumentar o fenótipo colinérgico e a microbiota por abordagens nutricionais, como por exemplo, a dietoterapia com butirato (BURNS, 2009).

1.2.2. Período crítico de plasticidade para o SNE

O intestino pós-natal ainda em formação sofre alterações fisiológicas, já explanadas no tópico anterior, que podem ser comprometidas facilmente por fatores exógenos, induzindo alterações neuroplásticas (GIARONI, 1999). Estresse e dieta oferecida são bons exemplos disso (STENKAMP-STRAHM, 2013; GIROTTI; MISAWA, 2007). A segunda e terceira semana de vida pós-natal de ratos, as quais antecedem o desmame, é o principal período em que as sinapses estão se estabelecendo e os estímulos recebidos fazem-nas preparadas para o que virá ao longo da vida (BURNS, 2009). Os neurônios ChAT são os mais afetados pelo estresse nutricional gerado na lactação porque o aumento e diferenciação destes neurônios ocorre principalmente neste período. A falta e o excesso de nutrientes pode ter impacto direto sobre suas sinapses e interferir em sua plasticidade (GIARONI, 1999).

Deve-se considerar então que o controle neural do funcionamento do intestino, exercido principalmente pelo Sistema Nervoso Entérico (SNE), não está totalmente amadurecido logo após o nascimento (DASGUPTA, 2016; NEU, 2007). Na verdade, os neurônios entéricos ainda passam por significativas mudanças durante as primeiras semanas de vida pós-natal de roedores (FRIESEN E BOLEY, 1956).

Ao final da gestação, e até mesmo após o desmame, ocorrem modificações importantes na estrutura do SNE. Estes processos refletem na organização dos padrões de motilidade, amadurecimento funcional dos neurônios e o aprimoramento das sinapses e dos neurotransmissores e formação dos plexos em gânglios (FOONG, 2016). Além dos fatores genéticos, o impacto de fatores ambientais, como a dieta, pode estar envolvido em alterações neuroplásticas durante o período pós-natal (LIM, 2014), mas esta influência é pouco explorada.

A literatura é deficiente de informações sobre o SNE de ratos adultos que ingeriram menor ou maior quantidade de leite durante a lactação. Logo, este trabalho explicita o que o estresse gerado pela falta e pelo excesso nutricional causam em ratos

neste período neuroplástico e portanto crítico, porque os animais podem levar estas consequências geradas para a vida adulta.

1.2.3. Intestino maduro

O TGI é composto pela boca, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e intestino grosso. Trata-se de um tubo oco com lúmen de diâmetro variado que apresenta quatro camadas em sua parede, denominadas de mucosa, submucosa, muscular e serosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). O TGI conta com uma grande quantidade de tecido nervoso presente intrinsecamente ao longo de sua parede denominado de Sistema Nervoso Entérico (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

As diversas células constituintes recebem suas respectivas funções e contribuem para o controle de músculo liso, do epitélio secretório e de vasos sanguíneos do TGI, além também de contribuírem para regular o funcionamento do sistema biliar e do pâncreas. Desta forma, ele comanda autonomicamente as funções involuntárias de digestão e absorção de nutrientes do organismo dos mamíferos. O SNE é composto por dois plexos ganglionados: o plexo mientérico também chamado plexo de Auerbach e o plexo submucoso ou plexo de Meissner (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O plexo mientérico está localizado entre os estratos circular e longitudinal da camada muscular seguindo contínuo por toda a parede do TGI. Ele apresenta gânglios maiores quando comparado ao plexo submucoso, e encontra-se dividido em plexo primário, secundário e terciário. Estes se diferem pela espessura, disposição e composição de suas fibras nervosas as quais são responsáveis pelo controle da motilidade realizada pelo músculo liso entérico (FURNESS, 2012).

O plexo submucoso está localizado na camada submucosa sendo caracterizado por gânglios menores cujos neurônios inervam principalmente a mucosa onde regulam a secreção de íons, iniciam vias sensoriais intrínsecas locais e medeiam o suprimento sanguíneo da mucosa (BREHMER et al. 1999; FURNESS, 2012).

Para a marcação e posterior discriminação de classes funcionais dos neurônios dos plexos mientérico e submucoso, utilizam-se as próprias estruturas celulares (receptores, enzimas e proteínas do citoesqueleto), como marcadores moleculares os quais compõem o chamado código químico de cada neurônio ¹. Mais de 20 tipos de neurotransmissores já foram identificados no SNE e muitos neurônios podem expressar mais de um deles. A proteína HuC/D⁺, por exemplo, está presente especificamente em neurônios e por este motivo é utilizada como marcador pan-neuronal (FURNESS, 2006).

Dentre os neurotransmissores identificados, no plexo mientérico os excitatórios, acetilcolina (ACh) e taquicininas, são os principais (FURNESS, 2006, SANDERS et al, 2012). Já o óxido nítrico e o peptídeo intestinal vasoativo têm função inibitória, sendo o primeiro mais proeminente. Eles reduzem a excitabilidade e contração da musculatura lisa, modulando os canais de K⁺ e diminuindo a sensibilidade ao cálcio (SANDERS *et al*, 2012) promovendo os reflexos de relaxamento na região distal da parede muscular visando facilitar propulsão do quimo em direção ao ânus (LECCI, SANTICIOLI e MAGGI, 2002).

Neurônios colinérgicos são classificados funcionalmente como neurônios motores excitatórios ou interneurônios, enquanto que os nitrérgicos, em sua grande maioria, são neurônios motores inibitórios. (BECK et al., 2009; BREHMER, et al., 2005). Danos no plexo mientérico resultam em perda da coordenação contrátil no trato gastrointestinal, levando a retenção do conteúdo luminal obstrução do órgão e distensão das fibras musculares com conseqüente hipertrofia ^{4,5} como também pode aumentar a velocidade do trânsito gastrointestinal, ocasionando diarreia (GOMEZ, 2009).

O plexo submucoso contém neurônios vasodilatadores/secretomotores colinérgicos e não-colinérgicos, neurônios secretomotores (não-vasodilatador) colinérgico e IPANs (neurônios aferentes primários intrínsecos submucosos), os quais, em sua maioria, contêm calbindina (proteína ligante ao cálcio), comumente utilizada como código químico neuronal para imunomarcagem (FURNESS, 2006)

1.3 IMPACTO DA DESNUTRIÇÃO E DA OBESIDADE SOBRE O SISTEMA NERVOSO ENTÉRICO

Atualmente, os indivíduos se alimentam principalmente de carboidratos em detrimento às proteínas (MEZARROBA, 2015). Cada vez mais a geração atual é adepta a este tipo de dieta por inúmeros motivos, desde a preocupação com os animais e o meio ambiente até mesmo com os próprios efeitos que a proteína de origem animal causa ao organismo, o que também é muito comum nos últimos anos com a advinda do veganismo que quando não acompanhado e suplementado corretamente leva à desnutrição por falta de proteína (FERRIGNO, 2012).

A ingestão reduzida de proteínas resulta, conseqüentemente, em uma menor biodisponibilidade de aminoácidos, causando uma redução geral na síntese de compostos nitrogenados, sobretudo as proteínas. Considerando este quadro clínico de subnutrição proteica, contempla-se a diminuição de albumina plasmática, podendo evoluir a um edema. O fígado também diminui a produção de apolipoproteínas, as quais são necessárias para o trânsito de colesterol e outros lipídios no sangue; por esse motivo,

lipídios se acumulam no fígado causando esteatose hepática. A massa adiposa subcutânea é geralmente conservada, porém mascarada pelo edema. Tanto o marasmo como o kwashiorkor, no período crônico, alteraram gradualmente a estrutura e o funcionamento dos diversos órgãos, dentre esses, os que compõem o sistema digestório, o que pode agravar ainda mais estas doenças (MOLINA, 2009; VANUCCHI, 1996)

A DPE afeta o TGI em sua integridade causando um aumento no tamanho do estômago por consequência da hiperplasia de suas células, lesões ulceradas, diminuição na produção de ácido clorídrico e enfraquecimento da barreira gástrica. No intestino observa-se diminuição no tamanho das criptas, vilosidades e microvilosidades, e na área dos enterócitos. Além disso, também há lentificação do trânsito intestinal a causar constipação e repressão do sistema imunológico fazendo com que haja maior suscetibilidade a infecções e comprometimento da absorção de nutrientes (MOLINA, 2009). A nível celular, a carência nutricional faz com que o mecanismo de reparo das organelas seja ineficaz devido a falta de nutrientes, gerando inicialmente atrofia celular seguida de descompactamento do material genético e apoptose (FREITAS, 2014). No SNE, tais alterações podem resultar em mudanças no número de neurônios na morfologia do corpo neuronal. As principais alterações causadas pela desnutrição no SNE estão detalhadas na tabela 1.

Tabela 1. Principais alterações no TGI do grupo de roedores desnutridos em relação ao grupo controle (GC: grupo controle; GD: grupo desnutrido; TP: teor proteico; ↑: aumento; ↔: manutenção; ↓: redução).

Protocolo Experimental	Espécie/Segmentos	Alterações	Referência
GC: NN GD: NE	Ratos/Intestino Delgado	<u>DPE tipo Marasmática</u> ↓ Peso intestinal total; ↓ Comprimento e diâmetro total.	AMORIM, 1984.
GC: Ração TP normal 22% com vitaminas e minerais; GD: ração TP 8% e sem suplementação de vitaminas	Ratos/Duodeno	<u>DPE tipo Kwashiorkor</u> ↔ Número de NM; ↑ Área do corpo celular nos neurônios NADH-d positivos.	MELLO, 2008.
GC: Ração TP normal (22%) GD1: ração hipoprotéica (8%) na	Ratos/Duodeno	<u>DPE tipo Kwashiorkor</u> Neurônios pequenos, médios e grandes; ↔ Organização do plexo mientérico;	NATALI, 1996.

gestação e ração normal na lactação. GD2: dieta normal na gestação e hipoprotéica na lactação GD3: dieta hipoprotéica na gestação e lactação		DD: neurônios com citoplasma fortemente basofílico e maiores que o controle.	
GC: Ração comercial TP normal 26% GD: Ração teor proteico 4%	Ratos/Íleo	<u>DPE tipo Kwashiorkor</u> ↓ Área do pericário da população neuronal total e da subpopulação NADH-diaforase positiva.	MOREIRA, 2012
GC: Ração normal TP 22% GD: Ração TP 8%	Ratos /Cólon proximal	<u>DPE tipo Kwashiorkor</u> ↓ Número de neurônios corados por Giemsa.	SANT'ANA et al., 1997.
GC: Dieta com TP normal 22% em gestação e lactação; GD1: Dieta TP normal na gestação e hipoprotéica na lactação; GD2: Dieta hipoprotéica na gestação e normoprotéica na lactação. GD3: hipoprotéica na gestação e lactação.	Ratos/ jejuno	<u>DPE tipo Kwashiorkor</u> A desnutrição protéica materna; ↔ Número de neurônios mientéricos por área; - Acúmulo de material protéico no neurônios.	MIRANDA NETO, 1999.
GC: Ninhada Controle; GN: Ninhada com restrição alimentar (RA)	Ratos/ Cólon proximal	<u>DPE tipo marasmática</u> ↑ Densidade NM em RA; ↓ Área do perfil celular em RA.	SCHOFFEN, 2014.
GC: Dieta com TP normal 22% em gestação a lactação; GD1: Ração hipoprotéica na gestação e normal na lactação; GD2: Ração normal na gestação e	Ratos/ Cólon proximal	<u>DPE tipo Kwashiorkor</u> Desnutridos nos períodos de gestação e lactação; ↑ Neurônios mientericos totais.	LEITE-MELLO, 1997.

hipoprotéica na lactação; GD3: Ração hipoprotéica na gestação e lactação			
GC: Ração normal TP 22%; GD: ração TP 8% e sem complexo B	Ratos/ Cólon distal	<u>DPE tipo Kwashiorkor</u> ↓ Peso órgão; ↓ Área neurônios corados por Giemsa, dos NADH-diaforase positivos e dos neurônios NADPH diaforase.	ARAÚJO, E.J.A., 2002.
GC: Ração normal TP 22% GDRN: grupo desnutrido TP 4% e posteriormente renutrindo	Ratos / Cólon distal Plexo submucoso	<u>DPE tipo Kwashiorkor</u> ↑ densidade populacional NS 29 a 75% no GDRN ↓ área NS ChAT e Calr-ir 19% a 47%	GIROTTI, 2007
GC: Ração normal TP 22% GDRN: grupo desnutrido TP 4% e posteriormente renutrindo	Ratos / Íleo Plexo submucoso	<u>DPE tipo Kwashiorkor</u> ↑ densidade populacional de NS em 25% ChAT e Calr-ir ↓ área de Calr-ir	MISAWA, 2007
GC: filhos de grávidas com ração TP 22% GDRN: filhos de grávidas desnutridas TP 4% e posteriormente renutrindo	Ratos/ intestino grosso Plexo submucoso	<u>DPE tipo Kwashiorkor</u> ↑ densidade populacional de NS em GDRN ↓ área de NS em GDRN	GIROTTI, 2013

Disfunções na motilidade intestinal e alterações gastrointestinais importantes são presentes em indivíduos obesos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade acomete a população de todo o mundo influenciando diretamente na qualidade de vida dos indivíduos uma vez que, pode evoluir para uma síndrome metabólica, câncer e/ou até mesmo a morte. Um estudo de revisão destaca que sintomas gastrointestinais como constipação, diarreia, distensão, dor abdominal, doença do refluxo gastroesofágico, síndrome do intestino irritável, vômito, azia, inchaço, diarreia, aumento no volume das fezes e perda de água nas fezes predominam majoritariamente conforme o índice de massa corpórea (IMC) aumentava (ESLICK, 2010).

Evidências experimentais têm demonstrado que ratos obesos por dieta hiperlipídica podem apresentar perda neuronal no plexo mientérico promovendo redução da espessura muscular e conseqüentemente reduzir a motilidade intestinal (KUNZ et al., 2019). Spangéus e El-Salhy (2001) verificaram que camundongos obesos diabéticos tiveram diminuição na população neuronal do plexo mientérico duodenal e colônico o que pode ter influência nas disfunções gastrointestinais de indivíduos obesos diabéticos.

Especulações sugerem que o controle da motilidade gastrointestinal pode ser alterado em obesos, afetando o controle da saciedade e a absorção de nutrientes no intestino delgado (PIERAMICO et al., 1992). Por fim, diversos autores apontaram modificações neuronais que possam estar atuando na motilidade do TGI e também podem ser fatores contribuintes para o desenvolvimento e manutenção da obesidade (KIELY et al., 2005a,b; XING e CHEN, 2004; SPANGÉUS e EL-SALHY, 2001; WISEN e JOHANSSON, 1992). As principais alterações causadas pela obesidade no SNE estão detalhadas na tabela 2.

Tabela 2. Principais alterações no TGI do grupo de roedores obesos em relação ao grupo controle (GC – grupo controle; GOB- grupo obeso; ↑: aumento; ↔: manutenção; ↓: redução).

Protocolo Experimental	Espécie/Segmento	Alterações	Referência
GC: ração padrão para roedores; GOB: dieta hiperlipídica.	Ratos/ Duodeno	↑ subpopulação nitrérgica; ↓ área e varicosidades do peptídeo intestinal vasoativo (VIP).	SOARES, 2015.
GC: ração padrão para roedores; GOB: dieta hiperlipídica.	Ratos/ Jejunó	↑ subpopulação nitrérgica; ↓ áreas neuronais da população geral, subpopulação nitrérgica e varicosidades (VIP).	SOARES, 2015.
GC: Grupos Sedentário (GS) e Exercício (GE); GOB: GS e GE com sobrecarga de frutose 10% ou 20%.	Ratos/ Jejunó	↓ Pericário dos NM em GS20, GE10 e GE20.	DA LUZ, 2013.

GC: Dieta de Cafeteria (hipercalórica, hipoproteica, hiperlipídica) com fibras hidrossolúveis; GOB: Sedentários (S) Sedentários Cafeteria (SCa) Sedentários Fibras (SF), Sedentários Cafeteria Fibras (SCaF).	Ratos/ Jejuno	↔ População NM HuC/D, nNOS e ChAT; ↑ Subpopulação nitrérgica nNOS, que apresentaram maior área nos grupos SF e SCaF; ↔ Área do corpo celular em todas populações neuronais exceto para nNOS.	CIRILO, 2015.
GC: ração padrão para roedores; GOB: dieta hiperlipídica.	Ratos/ Íleo	↑ população geral nitrérgica; ↓ áreas neuronais da geral da nitrérgica e varicosidades (VIP).	SOARES, 2015.
GC: Ração normal; GOB tratado com Glutamato Monossódico (MSG).	Ratos/ Íleo	↔ população mioentérica total ↑ a subpopulação NADH-diaforase-positiva; ↔ Função intestinal.	SOARES, 2006.
GC e GOB: Machos e fêmeas	Camundongos/ Íleo	↑ população de neurônios colinérgicos e nitrérgicos.	MIZUNO, 2010.
GC: Dieta purificada para roedores; GOB: Dieta hiperlipídica.	Camundongos/ Intestino grosso	↓ NM em todas as subpopulações; ↓ Motilidade colônica.	BERALDI et al., 2016
GC: Ração normal; GOB: Dieta hiperlipídica.	Ratos/ Cólon total	↓ Comprimento e diâmetro do CT; ↓ População total de NM no CT; ↓ Tempo de trânsito diminuído	BERALDI et al., 2016
GC e GOB: Machos e fêmeas GC: Ração normal; GOB: Dieta hiperlipídica.	Camundongos/ Íleo Plexo Submucoso	↓ neurônios Calr-ir e ↑ pop ChAT-ir em machos obesos ↑ morfometria Calr-ir e ChAT-ir de fêmeas obesas	MIZUNO, 2010

GC: Ração normal GOB: Dieta hiperlipídica	Camundongos / duodeno Plexo submucoso	↓ população de VIP ↔ população ChAT, substancia P, calbindina e CGRP.	STENKAMP- STRAHM, 2013
GC: ração normal GOB: Dieta hiperlipídica	Ratos/ Intestino delgado e cólon Plexo submucoso	↑ expressão populacional de: ChAT Substância P VIP NADPH-d	XIAO-YI Fu, 2014

Uma vez compreendidas as alterações celulares geradas pelos extremos nutricionais durante as primeiras semanas de vida são possíveis serem feitas intervenções a fim de tratamento e regressão destes distúrbios metabólicos. Ainda não há na literatura estudos realizados por modelo de manipulação de ninhadas, relacionando os extremos nutricionais e possíveis alterações no sistema nervoso entérico dos animais quando ficam adultos. Portanto, a importância deste trabalho está em demonstrar como a vulnerabilidade que ratos desnutridos e obesos estão submetidos pode afetar neurônios do plexo mientérico.

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar os efeitos da subnutrição e supernutrição durante o aleitamento, induzidas por modelo de programação de ninhadas, sobre parâmetros morfoquantitativos do plexo mientérico e submucoso do jejuno de ratos Wistar machos adultos.

Específicos

- Verificar parâmetros biométricos de ratos expostos a estresse nutricional.
- Analisar a densidade populacional e a morfometria do corpo celular de neuronios totais do plexo mientérico visando estabelecer as alterações causadas pela indução de estresse nutricional.
- Avaliar a densidade populacional e a morfometria do corpo celular de neurônios nitrérgicos do plexo mioenterico e submucoso buscando identificar as mudanças causadas pela indução de extremos nutricionais.

- Com base no número de neuronios totais e nitrérgicos, estimar o número de neuronios colinérgicos para identificar as possíveis alterações que a indução de extremos nutricionais podem causar no numero de neuronios desta subpopulação.
- Em neurônios calretinina positivos e totais do plexo submucoso, avaliar a densidade populacional e morfometria do corpo celular destes neurônios com o intuito de identificar alterações causada pelo estresse nutricional.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), conforme ofícios 164/2019 e 44/2020. Foram utilizados 18 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da UEL e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL. Durante e após o período de lactação, os animais foram mantidos em ambiente com controle de temperatura (21-24°C) e alternância de ciclos claro-escuros de 12 horas. Todos os animais receberam água e ração *ad libitum*, após o desmame.

3.1 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos em três grupos: ninhada normal (NN) - animais oriundos de prole com 10 filhotes/matriz; ninhada reduzida (NR) - animais oriundos de prole com 5 filhotes/matriz; e ninhada expandida (NE) – animais oriundos de prole com 16 filhotes/matriz. Os animais foram escolhidos aleatoriamente resultando em n de 6 ratos por grupo. Todos os filhotes foram desmamados com 21 dias de vida e passaram a ingerir ração comercial para roedores (Nuvilab ®).

No 120^o dia de vida, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e o jejuno foi coletado e pesado em uma balança digital com precisão de 0,005 gramas. Seu comprimento e largura foram mensurados, os quais foram multiplicados entre si visando cálculo da área jejunal. Cerca de 15 cm da parte proximal do jejuno foram fixados em paraformaldeído 4% por 4 horas e armazenado em PBS 0,1M pH 7,4 com azida sódica 0,08% a 4°C. As gorduras retroperitoneal e perigonadal foram retiradas e pesadas.

3.2 Análise de fenótipo de pellets fecais

Durante a última semana do experimento, os animais foram separados durante a noite individualmente, retornando a gaiolas coletivas durante o período diurno. Todos os

pellets fecais de uma mesma caixa eram pesados após secagem em estufa a 60 °C durante 24 horas, com o intuito de avaliar a massa seca dos pellets fecais.

3.3 Imunofluorescência

O jejuno foi dividido em anéis de 1cm de comprimento, os quais foram microdissecados com o auxílio de microscópio estereoscópico e pinças de cirurgia oftálmica, para remoção das camadas mucosa e submucosa e obtenção de preparados totais contendo a camada muscular e os plexos mientérico e submucoso.

Os preparados totais foram lavados três vezes por 5 minutos, sob agitação, com PBS 0,1 M. Em seguida, foi realizado o bloqueio antigênico com solução contendo PBS 0,1M, 3% BSA e 0,5% de Triton X-100 por 1 hora. Após essa etapa, foram novamente lavados com PBS 0,1 M três vezes de 5 minutos, sob agitação, para incubar com dois anticorpos simultaneamente: anti-HuC/D (Invitrogen, A21271, 1:500) para marcar toda a população de neurônios, anti-nNOS (Santa Cruz, AB8189, 1:1000) para a marcação da subpopulação nitrérgica e anti-Calr (Merck Millipore AB1550, 1:1000) para a marcação de neurônios potencialmente vipérgicos e colinérgicos, segundo Furness (1988). Considerando que a literatura assume que o plexo mientérico contém basicamente duas subpopulações: nitrérgica e colinérgica (FURNESS, 2006), estimou-se os neurônios $\text{HuC/D}^+/\text{nNOS}^-$ como colinérgicos. Ainda segundo Furness (1988), para o plexo submucoso, é possível considerar neurônios marcados fortemente com calretinina como potencialmente colinérgicos e marcados fracamente com calretinina como potencialmente vipérgicos.

3.4 Análises quantitativa e morfométrica dos plexos mientérico e submucoso

Utilizando-se um fotomicroscópio (ZEISS AXIO IMAGER.A1), foram capturadas 32 imagens dos preparado totais obtidos de cada rato, com auxílio da objetiva de 20x, resultando numa área total para análise de 0,0448 cm². Nesta área, contou-se no plexo mientérico o número total de neurônios totais (HuC/D^+), nitrérgicos (nNOS^+) e colinérgicos ($\text{HuC/D}^+/\text{nNOS}^-$), e no plexo submucoso o número total de neurônios totais (HuC/D^+) e fortemente e fracamente marcados para calretinina (Calr^+). Além disso, foram mensuradas as áreas do corpo celular de 100 neurônios por animal considerando cada marcação (HuC/D^+ , nNOS^+ , $\text{HuC/D}^+/\text{nNOS}^-$ e Calr^+ forte e fracamente marcados).

O número de neurônios entéricos encontrado em ambos os plexos foram projetados para área total do jejuno, como fator de correção devido a possíveis variações nas dimensões do órgão em função da exposição aos extremos nutricionais.

3.5 Tratamento estatístico

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 4.0. A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. O teste t de Student para amostras independentes foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos de extremos nutricionais em relação ao controle, quando os dados apresentavam distribuição normal. O teste Mann-Whitney foi aplicado quando os dados apresentavam distribuição livre. Para todos os testes, o nível de significância considerado foi de 5%.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

This paper will be submitted as an ORIGINAL ARTICLE to the **Neurogastroenterology & Motility Journal** (Impact factor: 3.617)

Running Title: Premature nutritional stress and jejunal enteric neurons

NUTRITIONAL STRESS DURING LACTATION CAUSES MODIFICATIONS IN JEJUNAL ENTERIC NEURONS OF ADULT RATS

B. N. Bruniera¹ C. C. A. Machado¹ V.B.R Coronado¹ C.V.D da Rosa¹ A. L. Wunderlich² E. T. Uchôa² E.J.A. Araújo¹

1. Department of Histology, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

2. Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

Address for correspondence

Prof. Eduardo José de Almeida Araújo

Department of Histology, State University of Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid PR 445, Km 380, 86051-990, Londrina, PR, Brazil

Tel: +55 (43) 3371 4327

ejaaraujo@gmail.com

NUTRITIONAL EXTREMES DURING LACTATION CAUSE HYPERTROPHY OF ENTERIC NEURONS IN THE JEJUNUM OF ADULT RATS

Background: Litter size manipulation models have been used in order to understand the consequences of excess or lack of nutrients during lactation. Changes caused by these nutritional extremes can be evaluated soon after weaning or at any other time in the animal's development. Restricting itself to nervous control of the gastrointestinal tract, there are several studies showing that nutritional extremes can cause structural changes in enteric neurons. However, the literature is fragile as to the consequences for enteric neurons of rats exposed to nutritional extremes during lactation and when they reach adulthood. **Objective:** To evaluate the effects of undernutrition and overnutrition during lactation on morphoquantitative parameters of the submucosal and myenteric plexus of the jejunum of adult Wistar rats. **Methods:** Eighteen male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were assigned into three groups: normal litter (NL) - animals from offspring with 10 pups/mother; short litter (SL) - animals from offspring with 5 pups/mother; and large litter (LL) – animals from offspring with 16 pups/mother. The animals were randomly selected to obtain six rats per group. After euthanasia, the total jejunum was weighed and measured in its dimensions. Whole-mount preparations containing the myenteric plexus or submucosal plexus were subjected to the immunofluorescence technique to label the total population (HuC/D⁺) and the nitrergic (nNOS⁺) and estimated cholinergic (HuC/D⁺/nNOS⁻) subpopulations. The number of neurons present in an area of 0.0448 cm² of the jejunum was counted and this number was projected to the entire area of the organ. The area of a hundred neuron cell bodies of each rat labelled by each technique was measured. **Key results:** Rats in the SL group had greater body mass, especially fat mass. The jejunum area of the SL and LL rats was increased in relation to NL. No loss of myenteric neurons was observed due to nutritional stress during lactation. However, rats from SL and LL had hypertrophied cholinergic myenteric neurons. In the submucosal plexus, no neuronal loss was found either, but neurons from LL rats were hypertrophy in strongly and weakly immunoreactive calretinin neurons, while neuronal hypertrophy in LL rats was found only in weakly immunoreactive calretinin neurons. **Conclusion & inferences:** Undernutrition and overnutrition during lactation in Wistar rats does not cause loss of myenteric and submucosal neurons in the jejunum of adult animals. However, this nutritional stress causes cell body hypertrophy of cholinergic myenteric neurons as well as calretinin immunoreactive submucosal neurons.

Key words: Undernourishment, obesity, jejunum, enteric nervous system, myenteric plexus, submucous plexus;

1 INTRODUCTION

Metabolic programming or “metabolic imprinting”¹ is a mechanism that defines the possible physiological changes in fetal organs or structures, both in humans and rodents, during the period of intrauterine development and the first nutritional experiences after the birth, when the organs are still in formation, which can result in metabolic disorders in adult life, as is the case of obesity^{2,3}

Among the existing experimental models for evaluating “metabolic imprinting”, the litter size manipulation is largely used. In this case, the control group, also called Normal Litter (NL), consists of rats from litters sized as usual number of 10 to 12 pups per matrix. The extreme nutritional groups are constituted by: 1) Short litter (SL), which is formed by animals from litters sized by 2 to 4 pups, so that they have access to greater amounts of breast milk, resulting in an overnourished offspring; and 2) Large litter (LL), which consists of animals from litters sized by 16 pups per matrix so that the nutritive supply is scarce, resulting in an undernourished offspring⁴.

In SL, the amount of breast milk is beyond what is necessary for newborns, and due to that the food is abundant, causing overnutrition with an increase in the lean and fat mass of these animals, often accompanied by water retention⁵⁻⁸. In LL, the amount of milk produced by the mother does not meet the nutritional requirements of the puppies, a problem which generates malnutrition resulting in a delay in their development, reflecting in smaller size and body mass when compared to the control group (NL)⁹⁻¹¹.

The lack or excess availability of nutrients during postnatal development can lead to morphophysiological changes in several organs^{7,12-15}. When the small intestine is altered, changes can occur in the process of digestion and absorption of nutrients that have the potential to affect the individual's entire life¹⁴⁻¹⁶. It should also be considered that the neural control of the functioning of the small intestine, exercised mainly by the Enteric Nervous System (ENS), is not fully matured soon after birth¹⁷⁻¹⁹. Enteric neurons still undergo significant changes during the first weeks of postnatal life in rodents^{20,21}.

After birth and even after weaning, important changes in the structure of the ENS occur. These changes reflect in the motility patterns, functional maturation of neurons, and the improvement of synapses and neurotransmitters, and the formation of plexuses in ganglia¹⁹. In this sense, it is natural to observe an increase in the number of enteric nitrergic neurons in the first week after the birth of the rat, while a progressive increase in the number of cholinergic neurons is observed after the 14th day after birth¹⁷. In addition

to genetic factors, the impact of environmental factors, such as diet, may be involved in neuroplasticity alterations during the postnatal period²², but this influence is little explored in the scientific literature.

Several studies evaluated the structural organization of the ENS of offspring whose mother was subjected to nutritionally modified diets, especially low-protein ones. In the jejunum, it has been observing maintenance of the number of myenteric neurons per area and accumulation of protein material in their cytoplasm²³⁻²⁵.

Despite the existence of these investigations, the literature lacks information about the ENS of adult rats that ingested less or more milk during lactation. Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of undernutrition and overnutrition during lactation, induced by a litter programming model, on morphoquantitative parameters of enteric neurons in the jejunum of adult Wistar rats.

2 MATERIAL AND METHODS

All procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the State University of Londrina (CEUA/UEL) documented by 164/2019 and 44/2020 protocols. Eighteen male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Central Animal Facility of the Center for Biological Sciences of UEL were kept in the Sector Animal Facility of the Department of Physiological Sciences of UEL. During and after the lactation period, the animals were kept in an environment with temperature control (21-24°C) and alternating light-dark cycles of 12 hours. All animals received water and feed *ad libitum*.

2.1 Experimental Groups

The animals were assigned into three groups: normal litter (NL) - animals from offspring with 10 pups/mother; short litter (SL) - animals from offspring with 5 pups/mother; and large litter (LL) – animals from offspring with 16 pups/mother. Animals were randomly chosen resulting in *n* of 6 rats per group. All puppies were weaned at 21 days old, when they were feed with commercial rodent chow (Nuvilab ®).

On the 120th day of age, the animals were euthanized by decapitation, and the total jejunum was collected and weighed. Besides its length and width were measured, which were multiplied by each other to calculate the jejunal area. About 15 cm from the proximal part was fixed in 4% paraformaldehyde for 4 hours and stored in 0.1M PBS pH 7.4 with 0.08% sodium azide at 4°C. The retroperitoneal and perigonadal fats were removed and weighed. The total preparations were washed three times for 5 minutes,

under agitation, with PBS 0.1 M. Then, antigen blocking was performed with a solution containing PBS 0.1M, 3% BSA and 0.5% Triton X-100 for 1 hour. After this step, they were again washed with PBS 0.1 M three times for 5 minutes, under agitation, to incubate with two antibodies simultaneously: anti-HuC/D (Invitrogen, A21271, 1:500) to mark the entire population of neurons, anti-nNOS (Santa Cruz, AB8189, 1:1000) for marking the nitrenergic subpopulation and anti-Calr (Merck Millipore AB1550, 1:1000) for marking potentially viperegenic and cholinergic neurons, according to Furness²⁶ Considering that the literature assumes that the myenteric plexus basically contains two subpopulations: nitrenergic and cholinergic, the HuC/D+/nNOS- neurons were estimated as cholinergic. Also according to Furness²⁶ or the submucosal plexus, it is possible to consider neurons strongly labeled with calretinin as potentially cholinergic and weakly labeled with calretinin as potentially VIPergic.

2.2 Statistical treatment

The results obtained were analyzed using the GraphPad Prism 4.0 software. Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. Student's t test for independent samples was used to assess differences between groups of extreme nutritional values in relation to the control when data were normally distributed. The Mann-Whitney test was applied when data were freely distributed. For all tests, the significance level considered was 5%.

3 RESULTS

3.1 The litter manipulation model caused an increase in body mass and jejunum area.

When investigated whether rats belonging to LL and SL would present alterations in biometric parameters in relation to the NL group (Table 1), it was observed that rats from SL had a significant increase in their body mass in relation to NL ($p < 0.05$). These same animals accumulated more retroperitoneal and perigonadal fats ($p < 0.05$). As for the absolute and relative mass of the jejunum, no significant changes were observed in the LL and SL groups when compared to the control (NL) ($p > 0.05$). Although an increase in the dimensions of the jejunum was observed in the two nutritionally altered groups, a significant increase was observed only in the width of the jejunum of the animals in the LL ($p < 0.05$). The jejunal area was larger in the SL and LL groups compared to the NL group ($p < 0.05$). Changes in the dry mass of fecal pellets were not observed ($p > 0.05$).

3.2 Nutritional changes during lactation caused hypertrophy of estimated cholinergic myenteric neurons

When the number of myenteric neurons in the area of 0.0448 cm² of the jejunum (population density) was evaluated, there was no significant difference between the experimental groups for the total population (HuC/D⁺; $p > 0.05$; Fig.1A), as for the nitrergic subpopulations (nNOS⁺; $p > 0.05$; Fig.2A) and estimated cholinergic (HuC/D⁺/nNOS⁻; $p > 0.05$; Fig.3A). However, when the number of neurons was projected to the total area of the jejunum, it was observed more myenteric neurons in both groups exposed to nutritional stress in relation no NL ($p < 0.05$), except for the estimated number of cholinergic neurons from the LL group (Figs. 1B, 2B and 3C). The area of the cell bodies of myenteric neurons from the total population and the nitrergic subpopulation did not differ significantly when the SL and LL groups were compared to the control ($p > 0.05$; Fig. 2B and 3B), while the estimated cholinergic cell body area was increased in both groups submitted to nutritional changes (SL and LL) when compared to the control group (NL) ($p < 0.05$; Fig.3B).

3.3 Nutritional extremes during lactation caused hypertrophy of submucosal plexus calretinin strongly labelled neurons.

No significant difference was observed when evaluating the number of submucosal plexus neurons in the 0.0448 cm² area of the jejunum (population density) of rats from SL and LL groups in relation to NL, both for the total population (HuC/D⁺; $p > 0.05$; Fig.4A) and for the subpopulations strongly labeled for calretinin ($p > 0.05$; Fig. 5A) and weakly labeled for calretinin ($p > 0.05$; Fig. 6A). No alteration was found in the number of submucosal neurons when it was projected to the total area of the jejunum in both nutritionally altered groups ($p > 0.05$; Figs. 4B, 5B e 6B). The cell body area of neurons strongly labelled for calretinin was increased in rats from the LL ($p > 0.05$; Fig. 5C) group, and they weakly marked hypertrophied in rats from the SL and LL groups when compared to the control group (NL) ($p < 0.05$; Fig.6C).

4 DISCUSSION

At the end of the 80's, the world population reached its peak of growth with more than 90 million people born each year and remained high until recently²⁷. During this period, several researchers have indicated that the amount of food produced in the world is not enough to support this population growth²⁸. Furthermore, the distribution of wealth is not equitable between different regions of the planet and even within the same country. This economic scenario, together with the different cultures that exist in the world,

contributes to a great variable of the nutritional intake between different individuals. This can be harmful since both under and overnutrition can lead to developmental disorders and various types of diseases²⁹⁻³⁰.

All animals need to ingest food containing an adequate amount of macro and micronutrients in relation to their metabolic needs. Even among individuals of the same species, nutritional requirements vary according to body structure, sex, and age³¹. There are periods of animal life that are extremely critical for development, which, therefore, are phases of great dependence on an adequate nutritional intake, such as the lactation period^{6,8,10,11}.

The postnatal period is particularly sensitive to various environmental factors. This is true both for rodents²¹ and for humans³². It is a period characterized by the maturation of various organs, especially the intestine. Animals that receive more or less milk during the postnatal period can develop disorders that will often be noticed in adulthood^{6,3,33}. Therefore, despite the biological programming for proper development, the lack or excess of a set (or all) of the nutrients can interfere with the morphophysiology of various organs and, when it affects the intestine, the condition can even be worsened^{21,34}.

In this context, the present work demonstrated that nutritional extremes during the lactation period can cause different impacts on the body mass of adult rats. It was observed that offspring submitted to less milk intake (group of rats from the LL) became adults with body mass similar to that of normal-nourished animals. Manipulation studies of rat litters have already shown that SL offspring have smaller body size and weight than NL during lactation⁵. Besides, they consume more food and reach the body mass of control rats after weaning. This mass gain is supported, in part, by the greater activity of pathways that stimulate appetite in the post-weaning period¹¹.

On the other hand, it was observed in this study that offspring submitted to greater milk intake (group of rats from SL) became adults with greater body mass when compared to those from NL. In addition, they were animals that accumulated more fat mass, which indicates that they had metabolic changes that remained in adulthood. In this sense, it is important to highlight that increased energy reserve accumulation can lead to obesity, and this is an important risk factor for the development of various metabolic disorders as diabetes, hypertension and cardiovascular diseases both in rodents²⁹ and in humans³⁵.

In both groups exposed to nutritional extremes during lactation, an increase in the area of the jejunum was observed when the rats became adults. This indicates that both the scarcity and the excess of nutrients induce an increase in the contact surface of the

jejunum with food. As the jejunum is the region of the digestive tube responsible for most of the digestion and absorption of nutrients, the increase in its area suggests more efficiency of using the food being ingested³⁶. Newborn rat pups develop marasmatic-type malnutrition, which was caused by a deficiency of several macronutrients in the diet. This type of malnutrition usually leads to a reduction in the jejunal structures participating in the digestion and absorption process of nutrients^{24,37}. As mentioned earlier, rats from LL ingested more food after weaning.

In this sense, were demonstrated that, after 12 days of normal feeding, the offspring that received less food during lactation recover their cell proliferation capacity, which indicates the resumption of the organism's development program. Our results do not allow us to identify when the jejunal area, became hypertrophied. In any case, it should be considered that nutritional deficiency during lactation in rats leads to the development of jejunum with an expanded structure and, therefore, potentially better able to digest and absorb nutrients³⁸.

It is also important to consider that, for the SL rats, the better use of an amount of food that was already being ingested in excess may have contributed to the accumulation of energy reserve and, finally, to the greater body mass observed in this animal group. These are characteristics often observed in obese individuals, who tend to have a longer and wider small intestine, implying an increase in the nutrient absorption area beyond what is necessary³⁶.

The ENS of rats begins its development during the intrauterine period and completes its maturation after birth³⁹. Therefore, during pregnancy, lactation, and even after weaning, important changes occur in the structure and functioning of ENS cells. During this period, there is an improvement in synapses, start and intensification in the production of neurotransmitters and receptors in target cells, with the consequent organization of motility patterns, especially the 36th day after birth^{17,40-42}.

Nitroergic and cholinergic myenteric neurons develop in a time-dependent manner. In rats, the proportion of nNOS-IR neurons progressively increases during the first postnatal week and remains constant thereafter. In contrast, the proportion of cholinergic neurons does not change significantly during the first postnatal week but increases significantly after 14 days of birth^{17,39,43}.

The mechanisms responsible for these neurochemical phenotypes and plasticity remain poorly understood. However, it is already known that, in addition to genetic factors, impact of environmental factors, such as diet, are intimately involved in this process and

can induce plastic alterations in enteric neurons. For example, butyrate, a short-chain fatty acid produced by bacterial fermentation and whose concentration increases during the early postnatal period⁴⁴⁻⁴⁶, has been shown to directly increase the proportion of ChAT-IR, but not nNOS-IR in adults^{42,47,48}.

In this sense, the present study demonstrated that undernutrition or overnutrition during lactation did not change the population density of total myenteric neurons and their subpopulations when considering the sampling of the evaluated intestinal area. On the other hand, due to the increase in the total area of the jejunum in the LL and SL groups, an estimated number of myenteric neurons for the total jejunal area was greater in these groups when compared to the NL group. To explain this result, it is necessary to consider that after birth, the number of myenteric neurons naturally decreases over time⁴⁹. Therefore, from birth to adulthood it is natural to have a loss of enteric neurons⁵⁰.

Considering that the neurons evaluated in this study were from adult rats which were same age, it would be expected that the number of neurons found in the three experimental groups would be similar. However, the higher estimated number of myenteric neurons observed in the LL and SL groups suggests that rats subjected to nutritional stress during lactation trigger mechanisms to improve survival and reduce neuronal apoptosis in a different way compared to nourished rats. Thus, it is suggested that the natural loss of neurons, during the period between the end of lactation and adulthood, may have been slower to maintain neuronal control of target cells that were probably in greater number or greater extent in the jejunum of LL and SL since they presented an enlarged colonic area. Another explanation could be the possibility of neurogenesis in the enteric nervous system after birth⁵¹⁻⁵³, but this is a controversial topic that deserves further investigation.

In addition to the numerical changes, neurons estimated as cholinergic were hypertrophied in both groups exposed to nutritional stress. Cholinergic neurons in the myenteric plexus can assume the function of interneurons or excitatory motor neurons⁵⁹. The observed hypertrophy may indicate greater accumulation of cytoplasmic organelles in the cell body, which may result in greater metabolic activity of these cells^{23,25}. This might be a compensation mechanism due to the increase in the jejunal area and, therefore, an adaptation to meet a greater need for nervous control of a greater extension of the muscle layer. Some authors also consider that neuron cell body hypertrophy is the result of edema^{54,55}, or failure in the traffic of organelles in axons⁵⁶.

Possibly, these last two alternatives do not apply to our results, since there was no perceived delay in body development, which we could consider resulting from a lower capacity for digestion and absorption of nutrients. This suggestion is also supported by the absence of significant difference in the dry mass of the fecal pellets between the SL and LL groups when compared to the control group (NL).

Unlike the myenteric plexus, the number of submucosal neurons was not altered both in the sampling of the jejunal area evaluated and in the numerical projection calculated for the total jejunal area. Anyway, nutritional stress during lactation probably did not interfere with the neuronal survival mechanism in the submucosal plexus. Following the same approach discussed for the myenteric plexus, that the increased jejunal area in SL and LL rats suggests an increase in the number and/or extension of target cells of these neurons, a greater survival of submucosal neurons would also be expected to maintain the functions performed by the submucosal plexus.

Our antagonistic result regarding the number of submucosal neurons points to at least two mutually exclusive possibilities: 1) deficiency in the process of the nervous regulation of blood flow and secretions of the jejunal epithelium or; 2) increased neuronal activity to compensate for the smaller number of submucosal neurons in relation to the enlarged jejunal area. The hypertrophy of submucosal neurons observed in this study supports the second hypothesis, since the increase in the area of the cell body may have been due to an increase in the number of organelles involved in the production of neurotransmitters, as well as structures involved in the process of neuronal secretion. This relationship between hypertrophy and increased function has been assumed by several authors^{26,27,63-65}, but it should be analyzed with caution since other factors, many of which are deleterious, can also cause hypertrophy of the cell body of neurons.

Another result that deserves to be highlighted is that the both nutritional extremes during lactation provokes different responses from the neuronal subpopulations evaluated in the submucosal plexus. In the SL group, hypertrophy was observed only in neurons weakly labelled for the presence of calretinin. In the LL group, the two subpopulations evaluated were hypertrophied. To discuss this result, we consider that submucosal neurons weakly labeled for calretinin are potentially VIPergic, while those strongly labeled are potentially cholinergic, as suggested by some authors²⁶. In this sense, it is known that the VIP secreted on the lining epithelium of the intestine triggers a cellular response mediated by the activation of adenylyl cyclase, resulting in an increase in cAMP, which promotes chloride secretion in a more rapid, intense, but short-lived, way^{57,58}. Acetylcholine activates the opening of calcium channels, also leading to chloride

secretion, but with a longer-lasting effect^{59,60}. Hypertrophy of potentially VIPergic neurons was observed in both the SL and LL groups, indicating that a greater amount of VIP is possibly needed to maintain fluid control between the mucosa and the intestinal lumen in adult rats exposed to nutritional stress during the lactation. The hypertrophy of potentially cholinergic neurons, observed only in animals from the LL, indicates that the lower availability of nutrients during lactation in rats possibly causes an increase in the function of these cells in adulthood.

In short, rats deprived of nutrients during lactation tend to have a submucosal plexus structure that favors greater fluid outflow from the intestinal mucosa, which can influence the process of digestion and absorption of nutrients. Future studies that evaluate the process of digestion and absorption of nutrients, as well as the control of fluid transit between the mucosa and the intestinal lumen, in an experimental situation equivalent to ours, will be able to elucidate these hypotheses.

5 CONCLUSION

It is concluded that malnutrition and overnutrition during lactation in Wistar rats reduce postnatal myenteric neuronal loss to adulthood, but does not alter the number of jejunal submucosal neurons. Furthermore, this nutritional stress causes hypertrophy of the cell body of myenteric neurons estimated as cholinergic and also of submucosal neurons labelled weakly and strongly for calretinin.

Acknowledgment

This work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES) – Financing Code 001.

6 REFERENCES

1. Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr.* 1999;69(2):179-197.
2. Plagemann A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Horm Res.* 2006;65(SUPPL. 3):83-89.
3. Liu HW, Srinivasan M, Mahmood S, Smiraglia DJ, Patel MS. Adult-onset obesity induced by early life overnutrition could be reversed by moderate caloric restriction. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2013;305(7):785-794.
4. Chernoff N, Gage MI, Stoker TE, Cooper RL, Gilbert ME, Rogers EH. Reproductive effects of maternal and pre-weaning undernutrition in rat offspring:

- Age at puberty, onset of female reproductive senescence and intergenerational pup growth and viability. *Reprod Toxicol*. 2009;28(4):489-494.
5. Fiorotto ML, Burrin DG, Perez M, Reeds PJ. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 1991;260(6 29-6).
 6. Habbout A, Delemeasure S, Goirand F, et al. Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. *Biochimie*. 2012;94(1):117-124.
 7. Rodrigues AL, De Moura EG, Fonseca Passos MC, Potente Dutra SC, Lisboa PC. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *J Physiol*. 2009;587(11):2647-2661.
 8. 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*. 2012;26(5):641-653.
 9. Glavas MM, Kirigiti MA, Xiao XQ, et al. Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. *Endocrinology*. 2010;151(4):1598-1610.
 10. Bouret SG. Nutritional programming of hypothalamic development: critical periods and windows of opportunity. *Int J Obes Suppl*. 2012;2(S2):S19-S24.
 11. Juan De Solis A, Baquero AF, Bennett CM, Grove KL, Zeltser LM. Postnatal undernutrition delays a key step in the maturation of hypothalamic feeding circuits. *Mol Metab*. 2016;5(3):198-209.
 12. Sloboda DM, Howie GJ, Pleasants A, Gluckman PD, Vickers MH. Pre- and postnatal nutritional histories influence reproductive maturation and ovarian function in the rat. *PLoS One*. 2009;4(8):1-8.
 13. Park KS, Kim SK, Kim MS, et al. Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. *J Nutr*. 2003;133(10):3085-3090.
 14. McMenemy CA, Clyburn C, Browning KN. High-Fat Diet During the Perinatal Period Induces Loss of Myenteric Nitroergic Neurons and Increases Enteric Glial Density, Prior to the Development of Obesity. *Neuroscience*. 2018;393:369-380.
 15. Coley E JL, Hsiao EY. Malnutrition and the microbiome as modifiers of early neurodevelopment. *Trends Neurosci*. 2021;44(9):753-764.
 16. Gomes JR, Freitas JR, Grassioli S. Effects of Physical Exercise on the Intestinal Mucosa of Rats Submitted to a Hypothalamic Obesity Condition. *Anat Rec*. 2016;299(10):1389-1396.
 17. Vries P De, Soret R, Suply E, Heloury Y, Neunlist M. Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. Published online 2021:539-547.
 18. Hao MM, Bornstein JC, Vanden P, Lomax AE, Young HM, Foong JPP. The

- emergence of neural activity and its role in the development of the enteric nervous system. *Dev Biol.* 2013;382(1):365-374.
19. Foong JPP. The enteric nervous system. *Am J Gastroenterol.* 2016;89(8):135-143.
 20. Foong JPP, Nguyen T V., Furness JB, Bornstein JC, Young HM. Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development. *J Physiol.* 2012;590(10):2375-2390.
 21. Schäfer KH, Hänsgen A, Mestres P. Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *Anat Rec.* 1999;256(1):20-28.
 22. Lim CR. Neuronal Plasticity in the Enteric Nervous System Motor Pathways. 2014;(March).
 23. Natali MRM, Miranda-Neto MH. Effects of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of the duodenum of rats. *Arq Neuropsiquiatr.* 1996;54(2):273-279.
 24. De Miranda Neto MH, Molinari SL, Stabile SR, De Mello Gonçalves Sant'ana D, Natali MRM. Morphologic and quantitative study of the myenteric neurons of the jejunum of malnourished rats (*Rattus norvegicus*). *Arq Neuropsiquiatr.* 1999;57(2 B):387-391.
 25. Leite-Mello EVS, Stabile SR, Miranda-Neto MH. Effect of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. *Arq Neuropsiquiatr.* 1997;55(1):106-113.
 26. Furness JB, Bornstein JC, Trussell DC. Shapes of nerve cells in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine revealed by the intracellular injection of dye. *Cell Tissue Res.* 1988;254(3):561-571.
 27. Roser M, Ritchie H, Ortiz-Ospina E. World Population Growth- Our World in Data. *Popul Ref Bur.* Published online 2020:492–507. <https://ourworldindata.org/world-population-growth#citation>
 28. Leisinger KM. Food Security for a Growing World Population – 200 Years After Malthus, Still an Unsolved Problem. *GAIA - Ecol Perspect Sci Soc.* 2017;5(5):213-224.
 29. Eslick GD. Prevalence and Epidemiology of Gastrointestinal Symptoms Among Normal Weight, Overweight, Obese and Extremely Obese Individuals. *Gastroenterol Clin North Am.* 2010;39(1):9-22.
 30. Silva FC, de Menezes RC, Chianca DA. The implication of protein malnutrition on cardiovascular control systems in rats. *Front Physiol.* 2015;6(SEP).
 31. DRI. *Institute of Medicine; Food and Nutrition Board; Dietary Reference Intakes: Energy; Carbohydrate; Fiber; Fat; Fatty Acids; Cholesterol; Protein and Amino Acids.*; 2005.
 32. Berseth CL. Gastrointestinal motility in the neonate. *Clin Perinatol.*

- 1996;23(2):179-190.
33. Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr.* 2001;4(2b):611-624.
 34. Girotti PA, Misawa R, Palombit K, Mendes CE, Bittencourt JC, Castelucci P. Differential effects of undernourishment on the differentiation and maturation of rat enteric neurons. *Cell Tissue Res.* 2013;353(3):367-380.
 35. Yamashiro Y, Nagpal R, Nagata S. Metabolic disease: Obesity, malnutrition, and intestinal microbiota. *J Pediatr Biochem.* 2015;5(2):65-70.
 36. Santoro S, Velhote MCP, Malzoni CE, Milleo FQ, Klajner S, Campos FG. Preliminary results from digestive adaptation: A new surgical proposal for treating obesity, based on physiology and evolution. *Sao Paulo Med J.* 2006;124(4):192-197.
 37. Lago ES, Teodósio NR, Araújo CR, et al. Rat models of protein and protein-energy malnutrition. *Int J Vitam Nutr Res.* 1993;63(1):52-56.
 38. Goodlad RA, Wright NA. Epidermal growth factor (EGF). *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1996;10(1):33-47.
 39. Hao MM, Young HM. Development of enteric neuron diversity. *J Cell Mol Med.* 2009;13(7):1193-1210.
 40. Matini P, Mayer B, Faussone-Pellegrini MS. Neurochemical differentiation of rat enteric neurons during pre- and postnatal life. *Cell Tissue Res.* 1997;288(1):11-23.
 41. Vannucchi MG, Faussone-Pellegrini MS. Differentiation of cholinergic cells in the rat gut during pre-and postnatal life. *Neurosci Lett.* 1996;206(2-3):105-108.
 42. Soret R, Chevalier J, De Coppet P, et al. Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats. *Gastroenterology.* 2010;138(5).
 43. Rothman TP, Gershon MD. Phenotypic expression in the developing murine enteric nervous system. *J Neurosci.* 1982;2(3):381-393.
 44. Barrat E, Michel C, Poupeau G, et al. Supplementation with galactooligosaccharides and inulin increases bacterial translocation in artificially reared newborn rats. *Pediatr Res.* 2008;64(1):34-39.
 45. Cossais F, Durand T, Chevalier J, et al. Postnatal development of the myenteric glial network and its modulation by butyrate. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2016;310(11):G941-G951.
 46. Jena A, Montoya CA, Mullaney JA, et al. Gut-Brain Axis in the Early Postnatal Years of Life: A Developmental Perspective. *Front Integr Neurosci.* 2020;14.
 47. Foong JPP, Hung LY, Poon S, Savidge TC, Bornstein JC. Early life interaction between the microbiota and the enteric nervous system. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* 2020;319(5):G541-G548.

48. Hitchcock RJ, Pemble MJ, Bishop AE, Spitz L, Polak JM. Quantitative study of the development and maturation of human oesophageal innervation. *J Anat.* 1992;180 (1):175-183
49. Gabella G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J Anat.* 1971;109(1):81-95.
50. Furness JB. The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2006;130(1-2):1-5.
51. Liu MT, Kuan YH, Wang J, Hen R, Gershon MD. 5-HT4 receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. *J Neurosci.* 2009;29(31):9683-9699.
52. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 1969;137(4):433-457.
53. Becker L, Peterson J, Kulkarni S, Pasricha PJ. Ex Vivo Neurogenesis within Enteric Ganglia Occurs in a PTEN Dependent Manner. *PLoS One.* 2013;8(3).
54. Mantyh CR, Pappas TN, Lapp JA, et al. Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal *Clostridium difficile* toxin A in the rat ileum. *Gastroenterology.* 1996;111(5):1272-1280.
55. Rivera LR, Thacker M, Castelucci P, Bron R, Furness JB. The reactions of specific neuron types to intestinal ischemia in the guinea pig enteric nervous system. *Acta Neuropathol.* 2009;118(2):261-270.
56. Santos MS, Barbosa J, Veloso GS, et al. Trafficking of green fluorescent protein tagged-vesicular acetylcholine transporter to varicosities in a cholinergic cell line. *J Neurochem.* 2001;78(5):1104-1113.
57. Brehmer A, Lindig TM, Schrödl F, et al. Morphology of enkephalin-immunoreactive myenteric neurons in the human gut. *Histochem Cell Biol.* 2005;123(2):131-138.
58. Ozaki H, Blondfield DP, Hori M, Sanders KM, Publicover NG. Cyclic AMP-mediated regulation of excitation-contraction coupling in canine gastric smooth muscle. *J Physiol.* 1992;447(1):351-372.
59. Ekblad E, Bauer AJ. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. In: *Neurogastroenterology and Motility.* Vol 16. ; 2004:123-128.
60. Sato T, Yoshitake K, Hitomi G. Mechanism of fluoride absorption from the gastrointestinal tract in rats. In: *Studies in Environmental Science.* Vol 27. ; 1986:325-332.

Table 1 - Biometric parameters of adult rats submitted to nutritional changes, by manipulating the size of litters, during lactation.

ANALYZED PARAMETER	NL	SL	LL
Body mass (g)	372,0 ± 7,22	417,3 ± 12,37	379,5 ± 6,78
Jejunum mass (g)	8,90 ± 0,46	9,89 ± 0,76	9,60 ± 0,44
Jejunum mass (g)/ body mass	0,02 ± <0,01	0,02 ± <0,01	0,03 ± <0,01
Jejunum length (cm)	81,00 ± 3,81	87,43 ± 3,88	87,86 ± 2,03
Jejunum width (cm)	1,20 (1,00 - 1,40)	1,60 (0,90 - 1,80)	1,50(1,50-1,90)*
Jejunum area (cm)	81,62 ± 4,71	135,8 ± 7,97*	131,3 ± 15,97*
Retroperitoneal fat (g)	3,49 ± 0,43	5,93 ± 0,78*	3,54 ± 0,34
Retroperitoneal fat (g)/ 100g of body mass	0,94 ± 0,10	1,29 ± 0,20	0,81 ± 0,11
Periepididymal fat (g)	4,15 ± 0,23	6,93 ± 0,68*	4,52 ± 0,33
Perigonadal fat (g)/ 100g of body mass	1,12 ± 0,05	1,64 ± 0,13*	1,12 ± 0,10
Dry weight of fecal pellets (g)	7,82 ± 0,20	8,18 ± 0,34	7,41 ± 0,36

Results obtained using Student's t test, data expressed as mean (\pm SEM); and Mann-Whitney test, data expressed as median (25% - 75% percentiles); *p<0.05, significant difference compared to the NL group.

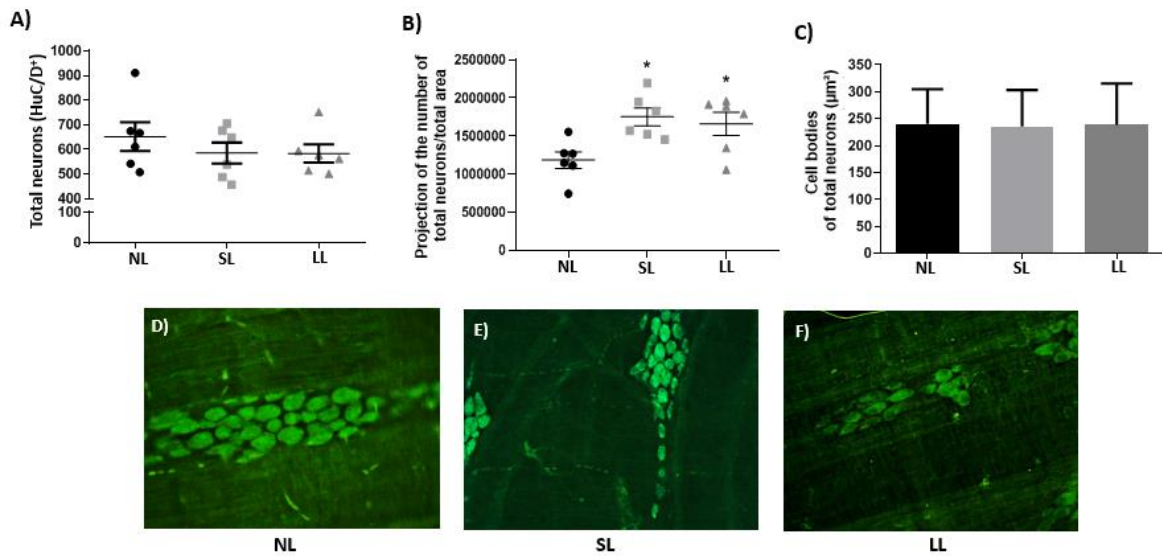


Figure 1: Population density of total neurons in 0.0448 cm² of the muscle layer (A), projection of the number of neurons for the total area of the jejunum (B) and cell body area (C) of myenteric neurons HuC/D⁺ of adult rats submitted to alterations by manipulating litter size during lactation. Photomicrographs of antibody-labeled myenteric neurons against the HuC/D⁺ protein in the jejunum of NL (D), SL (E) and LL (F) animals. Scale bar: 20 μm. Results obtained using Student's t test (A and B), data expressed as mean ± SEM; and Mann-Whitney test (C); data expressed as median and interquartile range. *p<0.05, significant difference when compared to the NL group.

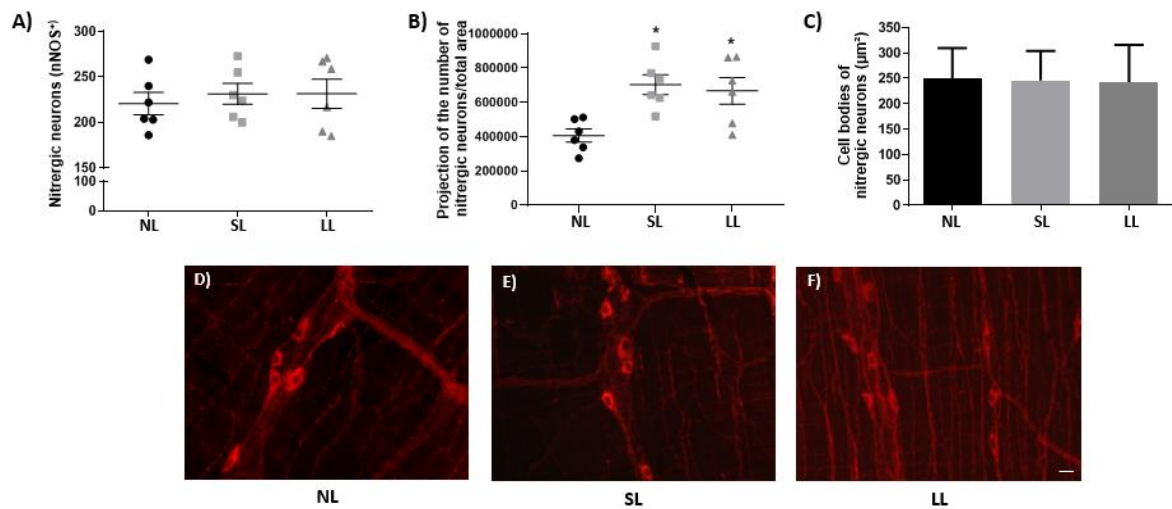


Figure 2: Population density of nitrenergic neurons in 0.0448 cm² of the muscle layer (A), projection of the number of neurons for the total area of the jejunum (B) and cell body area (C) of nNOS⁺ myenteric neurons from adult rats undergoing nutritional changes, by manipulating the size of litters during lactation. Photomicrographs of anti-nNOS-labeled myenteric neurons from the jejunum of animals from NL (D), SL (E) and LL (F). Scale bar: 20 µm. Results obtained using Student's t test (A and B), data expressed as mean ± SEM; and Mann-Whitney test (C), data expressed as median and interquartile range. *p<0.05, significant difference when compared to the NN group.

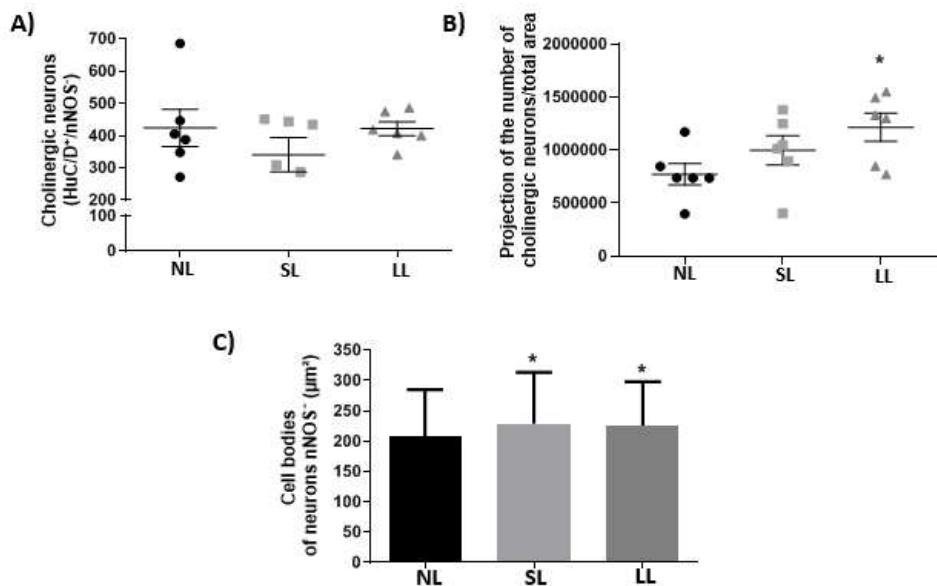


Figure 3: Cholinergic neuronal population density in 0.0448 cm² of the muscle layer (A), projection of the number of neurons for the total area of the jejunum (B) and cell body area (C) of myenteric neurons estimated as cholinergic (HuC/D⁺/nNOS⁻) of adult rats subjected to nutritional changes, by manipulating the size of litters, during lactation. Results obtained using Student's t test (A and B), data expressed as mean ± SEM; and Mann-Whitney test (C), data expressed as median and interquartile range. *p<0.05, significant difference when compared to the NL group.

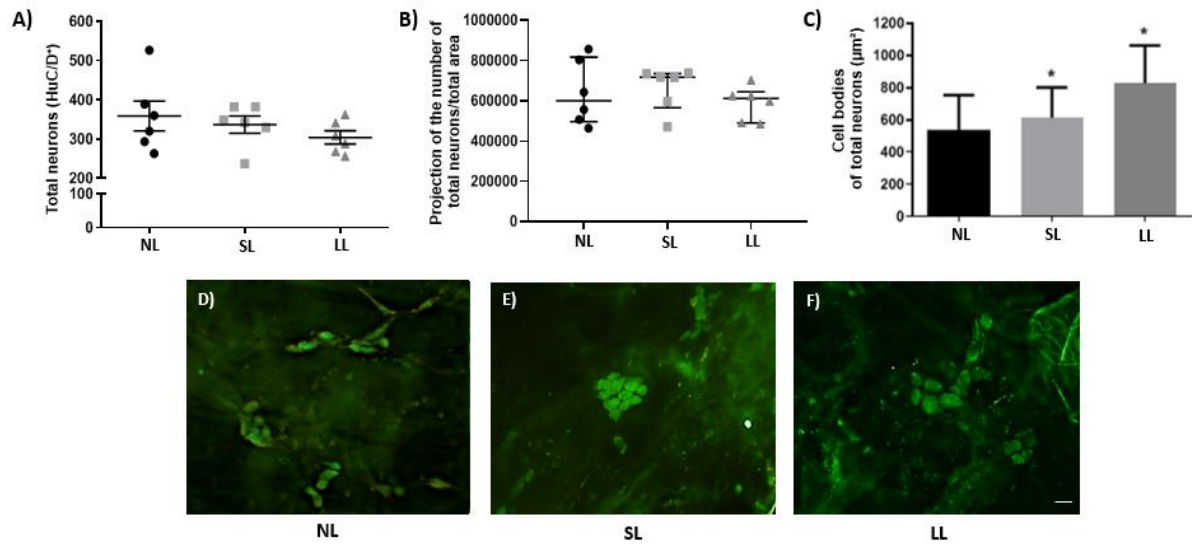


Figure 4: Neuronal total population density in 0.0448 cm² of submucosa layer (A), projection of the number of neurons for the total area of the jejunum (B) and cell body area (C) of submucosal neurons HuC/D⁺ of adult rats submitted to alterations by manipulating litter size during lactation. Photomicrographs of antibody-labeled submucosal neurons against the jejunum HuC/D⁺ protein of animals from NL (D), SL (E) and LL (F). Scale bar: 20 μm. Results obtained using Student's t test (A), data expressed as mean ± SEM; and Mann-Whitney test (B and C); data expressed as median and interquartile range. *p<0.05, significant difference when compared to the NL group.

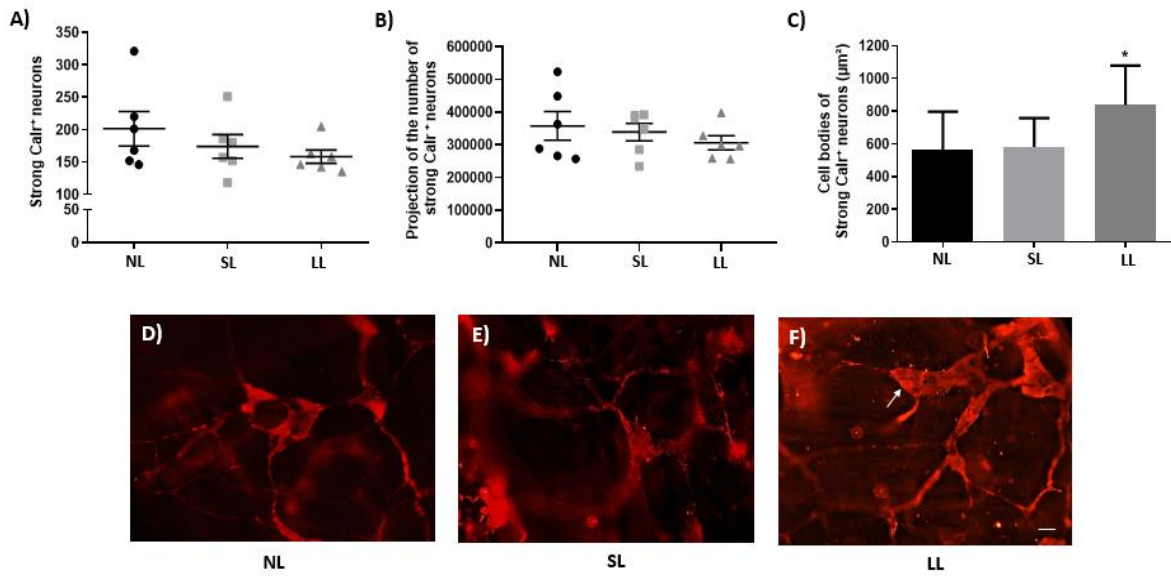


Figure 5: Neuronal population density immunoreactive to calretinin (Calr) in 0.0448 cm² of submucosa layer (A), projection of the number of neurons for the total area of the jejunum (B) and cell body area (C) of strongly labeled submucosal Calr⁺ neurons from adult rats undergoing alterations by manipulating litter size during lactation. Photomicrograph of submucosal Calr⁺ neurons from the jejunum of NL animals (D); arrow points strongly marked neurons. Scale bar: 20 μm. Results obtained using Student's t test (A and B), data expressed as mean ± SEM; and Mann-Whitney test (C); data expressed as median and interquartile range. *p<0.05, significant difference when compared to the NL group.

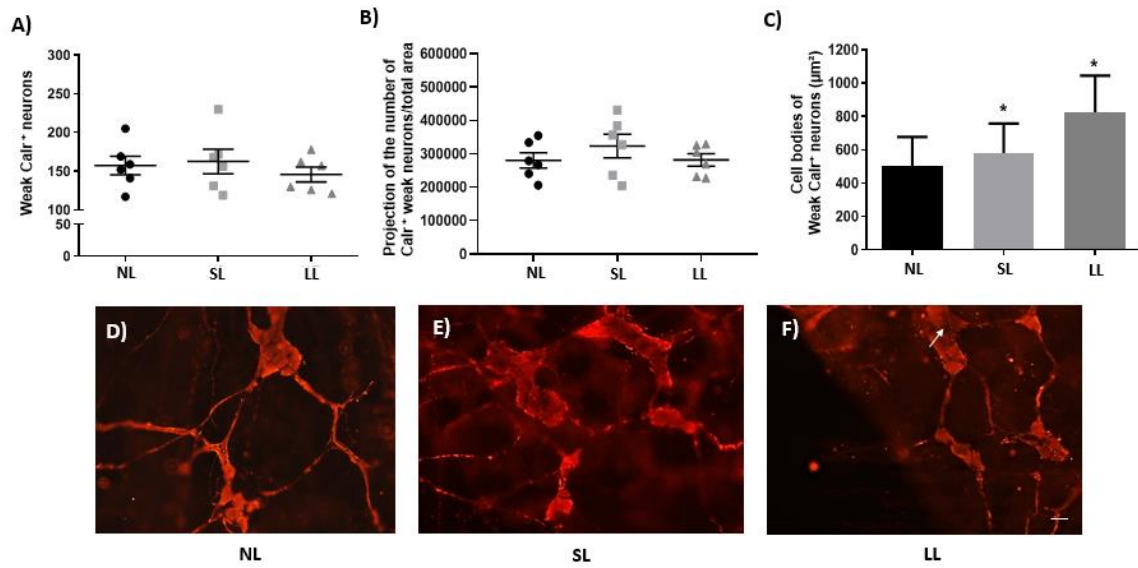


Figure 6: Neuron vipergic population density at 0.0448 cm² (A), projection of the number of neurons for the total area of the jejunum (B) and cell body area (C) of weakly labeled submucosal Calr⁺ neurons from adult rats undergoing alterations by manipulating litter size during lactation. Photomicrograph of submucosal Calr⁺ neurons from the jejunum of NL animals (D); arrow points to weakly labeled neurons. Results obtained using Student's t test (A and B), data expressed as mean ± SEM; and Mann-Whitney test (C); data expressed as median and interquartile range. *p<0.05, significant difference when compared to the NL group.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos observa-se que a facilidade de acesso a alimentos muito calóricos e pobres em nutrientes faz com que a introdução deste tipo de alimentação ocorra ainda nos primeiros anos da vida. Em contrapartida, a desnutrição por falta de acesso a alimentos básicos, principalmente proteínas, permanece elevada em algumas regiões do país. Com isto, verificou-se um aumento no interesse da comunidade em geral para entender como alterações nutricionais no início da vida interferem na homeostase do organismo na vida adulta.

Em nosso trabalho, demonstramos que a exposição de ratos a extremos nutricionais durante a lactação provoca atraso no processo de perda de neurônios de ambos plexos entéricos que naturalmente ocorre durante o desenvolvimento de animais. Por outro lado, durante esse processo, neurônios mientéricos colinérgicos e neurônios submucosos marcados fracamente e fortemente com calretinina se tornaram hipertrofiados. Além disso, observamos que ratos supernutridos durante a lactação apresentam maior massa corporal, incluindo massa gorda, e maior área de jejuno, quando comparados a ratos normonutridos.

Futuros estudos poderão avaliar a funcionalidade de neurônios mientéricos colinérgicos e submucosos de ratos adultos submetidos a estresse nutricional durante a lactação, por intermédio da análise de motilidade do intestino delgado desses animais.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DOS ITENS 1 a 3

ACEVEDO, E. *et al.* Kwashiorkor y marasmo-kwashiorkor en niños hospitalizados. *Pediatría (Asunción)*, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 16-22, 2018.

AMORIM, C. **Estudo morfológico da mucosa intestinal de ratos submetidos à desnutrição proteico-calórica experimental**. Ribeirão Preto: FMUSP-RP. Tese (doutorado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1984.

ARAÚJO, E. *et al.* Biometric and food consumption parameters of rats subjected to hypoproteic and hypocaloric diet. **Arq. Ciên. Vet. Zool**, v. 8, n. 2, p.133-140, 2005.

BALABAN, G.; SILVA, G. Efeito protetor do aleitamento materno contra a obesidade infantil. **J. Pediatr. (Rio J.)**, Porto Alegre, v. 80, n. 1, p. 7-16, 2004.

BECK, MARTIN *et al.* ChAT and NOS in human myenteric neurons: Co-existence and co-absence. **Cell and Tissue Research**, v. 338, n. 1, p. 37–51, 2009.

BERALDI, E *et al.* HIGH-FAT diet promotes neuronal loss in the myenteric plexus of the large intestine in mice. **Dig Dis Sci**, v.60 n. 4 p. 841-9, 2016.

BOURET, S. Nutritional programming of hypothalamic development: critical periods and windows of opportunity. **International Journal of Obesity Supplements**. p.19-24, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Estado Nutricional dos Indivíduos Acompanhados**, 2011. Disponível em: <http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/orientacoes_coleta_analise_dados_an_tropometricos.pdf> Acesso em: 13 de dez. de 2020

BREHMER, A; SCHRÖDL, F; NEUHUBER, W. Morphological classifications of enteric neurons - 100 years after Dogiel. **Anatomy and Embryology**, v. 200, n. 2, p. 125–135, 1999.

BREHMER, A *et al.* Morphology of enkephalin-immunoreactive myenteric neurons in the human gut. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 123, n. 2, p. 131–138, 2005.

BURNS, A. J. *et al.* Development of the enteric nervous system and its role in intestinal motility during fetal and early postnatal stages. **In Seminars in pediatric surgery**, v. 18, n. 4, p. 196-205, 2009.

CAMPOS, B. PALANCHI, A.C., Maternal nutrition and fetal programming: the role of eating habits in embryonic and postnatal development. **Saúde em Revista**, Piracicaba, v. 17, n. 45, p. 49-59, 2017.

CHERNOFF, N; GAGE, M; STOKER, T. *et al.* Effects of maternal and pre-weaning undernutrition in rat offspring: age at reproductive senescence and intergeneration pup growth and viability. **Reproductive Toxicology**. v. 28, p. 489-494, 2009.

CIRILO, C. *et al.* Dietary restriction interferes with oxidative status and intrinsic intestinal innervation in aging rats, **Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 673-680, 2013.

COUTINHO. *et al.* desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. s332-s340, 2008.

DASGUPTA, S *et al.* Amniotic fluid: Source of trophic factors for the developing intestine. **World J Gastrointest Pathophysiol**. 2016. Disponível em: <doi:10.4291/wjgp.v7.i1.38> Acesso em: 12 de fev. de 2021

ESLICK, G. D. Prevalence and epidemiology of gastrointestinal symptoms among normal weight overnight, obese and extremely obese individuals. **Gastroenterol. Clin. N. Am.**, v. 39, p. 9-22, 2010.

FERRIGNO, M. **Veganismo e libertação animal: um estudo etnográfico**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Filosofia e Ciências Humanas, Campinas – SP, 2012.

FOONG, J. P. P. *et al.* Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 10, p. 2375-2390, 2012.

FOONG, J. P. P. Postnatal development of the mouse enteric nervous system. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 891, p.135-143, 2016.

FRAGA, J; VARELA, D. A relação entre a desnutrição e o desenvolvimento infantil. **Revista Associação Brasileira de Nutrição**, v. 4, p.5, 2012.

FREITAS, R. **Avaliação biológica e de fatores gênicos modulados pelos retinóides no ciclo celular, proliferação, diferenciação, apoptose e necrose em células de cripta intestinal de rato**. 2014. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2014.

FRIESEN SR, BOLEY JO, MILLER DR. The myenteric plexus of the pylorus: its early normal development and its changes in hypertrophic pyloric stenosis. **Surgery**. v.39 p.21-29, 1956

FU, X. *et al.* Effects of gastrointestinal motility on obesity. **Nutrition & metabolism**. v. 11, n. 1, p. 1-12, 2014.

FURNESS, J. The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 130, n. 1–2, p. 1–5, 2006.

FURNESS, J *et al.* The enteric nervous system and neurogastroenterology. **Gastroenterology e Hepatology**. v.9, p.286-204, 2012.

FURNESS, J. B. *et al.* Shapes of nerve cells in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine revealed by the intracellular injection of dye. **Cell and tissue research**, v. 254, n. 3, p. 561-571, 1988.

GABELLA, G. Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. **Journal of Anatomy**, v. 109, n. 1, p. 81, 1971.

GARCIA, M; Brasil da fome: 17 pessoas morrem de desnutrição todos os dias no país. **Observatório do terceiro setor**, 2019. Disponível em: <<https://observatorio3setor.org.br/noticias/brasil-da-fome-17-pessoas-morrem-de-desnutricao-todos-os-dias-no-pais/>> Acesso em: 16 de set. de 2020.

GIACOMELLI, F, MARÇAL-NATALI, M. A utilização de ratos em modelos experimentais de carências nutricionais. **Arq. Ciênc. Saúde. Unipar**; v. 3, n. 3 p. 239-249, 1999.

GIARONI, C. *et al.* Plasticity in the enteric nervous system. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 117, n. 6, p. 1438-1458, 1999.

GIROTTI, P. A. Análise morfoquantitativa dos neurônios mioentéricos e submucosos imunorreativos aos receptores P2X2 e P2X7, ao óxido nítrico sintase (NOS), à calretinina, à calbindina e à colina acetil transferase (ChAT) do colo distal de ratos submetidos à desnutrição e à renutrição protéica. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfuncionais) – **Instituto de Ciências Biomédicas**, Universidade de São Paulo, 2007.

GIROTTI, P. A, *et al.* Differential effects of undernourishment on the differentiation and maturation of rat enteric neurons. **Cell and tissue research**, v. 353, n. 3, p. 367-380, 2013.

GOMEZ J; PARKMAN, HP. Gastrointestinal motility and functional disorders. **ACP Medicine**. 2009.

HABBOU, A *et al.* Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. **Biochimie**. v. 94, p. 117-124, 2012.

JUNQUEIRA, L; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Ed. GEN Guanabara Koogan S.A. 2008.

KIELY, J *et al.* Leptin increases small intestinal response to cholecystokinin in leptin-deficient obese mice. **J. Surg. Res.**, v.124, p.146- 150, 2005a.

KIELY, J *et al.* Leptin increases small intestinal response to cholecystokinin in leptin-deficient obese mice. **J. Surg. Res.**, v.124, p.146- 150, 2005b.

KUNZ, R *et al.* Sericina como tratamento da obesidade: efeitos morfofisiológicos de camundongos obesos por dieta hiperlipídica. **Einstein (São Paulo)**, v.18, p. 4876, 2020.

LECCI, A; SANTICIOLI, P; MAGGI, A. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. **Current opinion in pharmacology**. v. 2, n. 6, p. 630-641, 2002.

LEITE-MELLO *et al.* Effect of maternal protein deprivation on morphological and quantitative aspects of the myenteric plexus neurons of proximal colon in rats. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** v. 55, n. 1, p. 106-113, 1997.

LIU, H-W *et al.* Adult-onset obesity induced by early life overnutrition could be reversed by moderate caloric restriction. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** v. 305, n. 7, p. E785-E794, 2013.

LUZ, C. *et al.* Efeitos da sobrecarga de frutose e atividade física sobre a parede intestinal do cólon ascendente e plexo mientérico de ratos. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 17, n. 2, p. 77-84, 2013.

MELLO, S. *et al.* Estudo morfoquantitativo do plexo mioentérico do duodeno de ratos submetidos a carência de proteínas e vitaminas do complexo. **Biological Sciences**, v.26 n. 2, p. 251-256, 2004.

MEZARROBA, D. **Efeitos da dieta hipoproteica-hiperglicídica sobre o metabolismo desidrativo e as ações periféricas dos hormônios tireóideos**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Medicina, Cuiabá, 2015.

MIRANDA, N *et al.* Morphologic and quantitative study of the myenteric neurons of the jejunum of malnourished rats (*Rattus norvegicus*). **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, São Paulo, v. 57, n. 2B, p. 387-391, 1999.

MISAWA, R. *et al.* Quantitative morphological study of the P2X receptor, nitric oxide synthase, calretinin, calbindin and choline acetyltransferase in neurons of the rat ileum following undernutrition na refeeding. **European Journal of nutrition**. 2007.

MOLINA, G.; PELISSARI, F.; FEIRHMAN, A. C. Consequências da desnutrição protéica para o trato gastrointestinal. **Arquivos Do Mudi**, p.13 n.1/2/3, v.12-24, 2013.

MOORE, K.L., PERSAUD, T.V.N, Embriologia Clínica. 9 ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2012.

MOREIRA, N *et al.* Atrofia de neurônios do plexo mientérico do íleo de ratos submetidos à intensa carência de proteínas. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, p. 34, v.2, p. 207-212, 2012.

MIZUNO, M.S. **Análises morfoquantitativa e do código químico do receptor purinérgico P2X2 no plexo mioentérico do íleo de camundongos obesos fêmeas e machos (ob/ob)**. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

NATALI, M; MIRANDA, M. Effects of maternal proteic undernutrition on the neurons of the myenteric plexus of the duodenum of rats. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 54, n. 2, p. 273-279, 1996.

NHAMPOSSE, C. **Avaliação morfoquantitativa nos músculos estriados esqueléticos de ratos wistar (*Rattus norvegicus*) dos efeitos da dieta utilizada na alimentação de crianças das zonas rurais de Moçambique**. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

ORÍÁ, R. B., BRITO, G.A.C. Sistema digestório: integração básico-clínica. São Paulo, **Blucher**. 2016.

PATEL, M.; SRINIVASAN, M.; LAYCHOCK, S. Metabolic programming: role of nutrition in the immediate postnatal life. **J. Inherit Metab.** v. 32, p. 218-228, 2009.

PATEL, M; SRINIVASAN, M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Ann. Nutr. Metab.** v. 58, n.2, p. 18-28, 2011.

PIERAMICO, O., *et al.* Interdigestive gastroduodenal motility and cycling of putative regulatory hormones in severe obesity. **Scand J Gastroenterol.** 1992.

PLAGEMANN, A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. **Horm. Res.** v. 65, n. 3, p. 83-89, 2006.

PLAGEMANN, A *et al.* Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.** v. 26, p. 641-653, 2012.

RODRIGUES, A *et al.* Postnatal early overnutrition changes the leptin signaling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. **J. Physiol.** v. 587, n. 11, p. 2647-2661, 2009.

SANDERS, M. *et al.* Regulation of gastrointestinal motility—insights from smooth muscle biology. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.** v.11, p.633-645, 2012.

SANT'ANA, D. *et al.* Morphological and quantitative study of the myenteric plexus of the ascending colon of rats subjected to proteic desnutrition. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, São Paulo, v. 55, n. 4, p. 687-695, 1997.

SCHOFFEN, J. *et al.* Food restriction enhances oxidative status in aging rats with neuroprotective effects on myenteric neuron populations in the proximal colon. **Exp. Gerontol.**, v.51, p.54-64, 2014.

SMITH, B. Progress report disorders of the myenteric plexus. **Gut**, v. 11, p. 271–274, 1970.

SOARES, A. *et al.* Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice. **BMC Gastroenterol.** v. 15, p. 3, 2015

SOARES, A *et al.* Effects of the neonatal treatment with monosodium glutamate on myenteric neurons and the intestine wall in the ileum of rats. **J Gastroenterol.** v. 41, p.674–680, 2006

SOLIS, A. *et al.* Postnatal undernutrition delays a key step in the maturation of hypothalamic feeding circuits. **Molecular Metabolism.** v. 5, p. 198-209, 2016.

SPANGÉUS, A.; EL-SALHY, M. Myenteric plexus of obese diabetic mice (an animal model of human type 2 diabetes). **Histol. Histopathol.**, v. 16, p. 159-165, 2001.

STENKAMP-STRAHM, C.M. et al. High-fat diet ingestion correlates with neuropathy in the duodenum myenteric plexus of obese mice with symptoms of type 2 diabetes. **Cell and tissue research**. v. 354, n. 2, p. 381-394, 2013.

VANNUCCHI, H.; UNAMUNO, M; MARCHINI, J. S. Avaliação do estado nutricional. **Medicina (Ribeirão Preto)**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 5-18, 1996.

VOLTARELLI, F. **Spirulina e exercício na recuperação de ratos submetidos à desnutrição protéica**. 199 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2008.

VRIES, P., *et al.* Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 299, n. 2, p. 539-547, 2010.

WISEN, O; JOHANSSON, C. Gastrointestinal function in obesity: motility, secretion, and absorption following a liquid test meal. **Metabolism**, v.41, n.4, p. 390-395, 1992.

WOOD, J. Enteric Nervous System: Neuropathic Gastrointestinal Motility. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 7, p. 1803–1816, 2016.

XING, J; CHEN, J. Alterations of gastrointestinal motility in obesity. **Obes. Red.**, v.12, n. 11, p.1723-1732, 2004.

YOUNG, H. M. *et al.* Expression of Ret-, p75NTR-, Phox2a-, Phox2b-, and tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by undifferentiated neural crest-derived cells and different classes of enteric neurons in the embryonic mouse gut. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 216, n. 2, p. 137-152, 1999.

ANEXOS



~~ANEXO A~~ [EJDA01]

ANEXO A [EJDAA2]

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) protocolo 164/2019 , processo nº 18310.2019.03



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 164/2019

Londrina, 25 de novembro de 2019.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "**Alterações nutricionais pós-natais por manipulação do tamanho da ninhada em ratos: efeitos da colecistocinina e do lipopolissacarídeo na homeostase energética em machos e avaliação de parâmetros metabólicos e reprodutivos em fêmeas e suas proles.**" protocolo CEUA nº 18310.2019.03 sob a responsabilidade de **Ernane Torres Uchôa**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) no dia **25/11/2019**.

Este projeto tem por objetivo investigar o papel da colecistocinina e do lipopolissacarídeo na homeostase energética de ratos machos Wistar submetidos a alterações nutricionais no período pós-natal por redução ou por expansão da ninhada, bem como avaliar os efeitos da expansão da ninhada no desenvolvimento sexual, metabólico e reprodutivo de fêmeas. **Grau de invasividade: 3.**

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/01/2020 a 31/12/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico
Nº de animais	1732, sendo 876 Machos e 856 Fêmeas
Peso/ Idade	Matrizes: 146 Machos e 126 Fêmeas (Biotério Central) Prole estimada: 730 Machos e 730 Fêmeas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue, cérebro, testículos, ovários, glândulas adrenais e tecido adiposo

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do CONCEA, em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão, conforme vigência expressa neste ofício, encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA/UEL (<http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>).

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.


Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Profª Drª **Maria Fernanda Rodrigues Graciano**
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). **Ernane Torres Uchôa**
Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia Departamento Ciências Fisiológicas/CCB
C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/CCB
C/C para o Biotério Central do CCB

ANEXO B**ANEXO B**

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel) protocolo 44/2020 , processo nº18310.2019.03

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

OF. CIRC. CEUA Nº 44/2020

Londrina, 17 de abril de 2020.

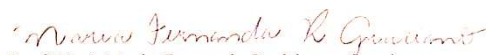
Prezado(a) professor(a),

Em resposta ao pedido de adendo (registrado em processo 4343.2020.78) referente ao projeto 18310.2019.03 "Alterações nutricionais pós-natais por manipulação do tamanho da ninhada em ratos: efeitos da colecistocinina e do lipopolissacarídeo na homeostase energética em machos e avaliação de parâmetros metabólicos e reprodutivos em fêmeas e suas proles" sob a responsabilidade de **Ernane Torres Uchôa** e previamente aprovado pelo **OF. CIR. CEUA 164/2019**, a CEUA-Uel certifica que o mesmo teve parecer aprovado em reunião realizada em 16/04/2020.

O adendo solicita a utilização do trato gastrointestinal para análise histopatológica da parede, bem como avaliação de células do sistema nervoso entérico por imunofluorescência e análise de motilidade gastrointestinal. É solicitada a avaliação histológica da aorta e em resposta a constritores e relaxantes *in vitro*, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio. Não haverá necessidade de utilização de mais animais ou modificação das metodologias experimentais, pois os tecidos serão retirados após a eutanásia já prevista no projeto originalmente.

Cumprе orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.


Profª Draª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/Uel

**Profª Drª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano**
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr. (a) Ernane Torres Uchôa
Responsável pelo projeto
Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB
Centro de Ciências Biológicas/CCB

ANEXO C

Author guidelines available in:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13652982/homepage/ForAuthors.html>