

**Universidade Federal de Ouro Preto**

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
PPG CBIOL

---

Tese

---

**INGESTÃO DA DIETA  
HIPERLIPÍDICA POR RATAS  
PROGENITORAS INDUZ AUMENTO  
DA INGESTA CALÓRICA,  
INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E  
DISBIOSE NA PROLE DA SEGUNDA  
GERAÇÃO**

CLAUDIANE MARIA BARBOSA

Ouro Preto  
2022



UFOP

CLAUDIANE MARIA BARBOSA

**INGESTÃO DA DIETA HIPERLIPÍDICA POR  
RATAS PROGENITORAS INDUZ AUMENTO  
DA INGESTA CALÓRICA, INFLAMAÇÃO  
SISTÊMICA E DISBIOSE NA PROLE DA  
SEGUNDA GERAÇÃO**

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas na área de concentração Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

B238i Barbosa, Claudiane Maria.

Ingestão de dieta hiperlipídica por ratas progenitoras induz aumento da ingesta calórica, inflamação sistêmica e disbiose na prole da segunda geração. [manuscrito] / Claudiane Maria Barbosa. - 2022.

76 f.: il.: , gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Dieta. 2. Colesterol. 3. Inflamação. 4. Ratos. I. Alzamora, Andréia Carvalho. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 577.12

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Claudiane Maria Barbosa**

"Ingestão de Dieta Hiperlipídica Por Ratas Progenitoras Induz Aumento da Ingesta Calórica, Inflamação Sistêmica e Disbiose na Prole da Segunda Geração

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Doutor

Aprovada em 10 de junho de 2022

### Membros da banca

Profa. Dra. Andreia Carvalho Alzamora (Presidente - UFOP)  
Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara (Membro - UFOP)  
Prof. Dr. Leandro Marcio Moreira (Membro - UFOP)  
Profa. Dra. Maria Aparecida Ribeiro Vieira (Membro - UFMG)  
Prof. Dr. Wellington Garcia de Campos (Membro - UFSJ)

Andreia Carvalho Alzamora, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 15/06/2022



Documento assinado eletronicamente por **Andreia Carvalho Alzamora, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/07/2022, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0367587** e o código CRC **24D4B5E2**.

Trabalho desenvolvido no **Laboratório de Hipertensão** da Universidade Federal de Ouro Preto com auxílio financeiro da CAPES, FAPEMIG, PROPP-NUPEB-UFOP.

“A verdadeira viagem do descobrimento  
não consiste em procurar novas paisagens,  
mais em ter novos olhos!”

Marcel Proust

Dedico esse trabalho a Deus, e à  
minha família, pessoas que foram  
essenciais para que eu o  
conseguisse concluir com êxito.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andréia Carvalho Alzamora, meus mais sinceros agradecimentos. Pela oportunidade e por confiar em meu trabalho. Agradeço pelos ensinamentos que levarei por toda vida. Foi um convívio enriquecedor. A você minha eterna gratidão.

Aos meus pais Joaquim e Nélia que são a razão de porque estou aqui hoje.

Às minhas irmãs Déia, Lira, Fá e Adelma pela torcida e confiança que sempre depositam em mim.

À tia Efigênia pelas orações.

Aos meus queridos sobrinhos Rodolpho, Arthur, Guilherme, Ana Lívia, Lipe, João Luís.

À Déia, minha irmã querida, pela ajuda e por sempre me fazer acreditar que era possível concluir este meu objetivo. Eterna gratidão.

À Taynara pela amizade. Você contribuiu para esse trabalho mais do que imagina.

À Rosana pela amizade, pela ajuda na organização das eutanásias.

Ao Sr. Wilson e a Dr<sup>a</sup> Vívian pelo auxílio nos experimentos.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sílvia de Paula pela amizade e carinho.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Carneiro, pela confecção e auxílio nas análises das lâminas histológicas.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silvana de Queiroz Silva pela atenção, disponibilidade e ajuda na elaboração dos protocolos dos experimentos.

À prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Yasmine Antonini pela competência e ajuda na análise dos resultados.



Ao prof. Dr. Leandro Márcio Moreira, ao prof. Dr. Wellington Garcia Campos, ao prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes por terem participado da minha banca examinadora de qualificação.

Ao prof. Dr. Leandro Márcio Moreira, ao prof. Dr. Wellington Garcia Campos, a prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Costa Caldeira, prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Ribeiro Vieira por gentilmente aceitarem compor a banca.

À Neuza Evangelista pelo incentivo e amizade.

À Natália Moreira pelo apoio e amizade.

Aos laboratórios parceiros, as meninas do CCA, e todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

Aos animais experimentais que sacrificam suas vidas pela ciência e pelo bem de nossa existência.

À UFOP, por ter me dado à oportunidade de executar este trabalho.

Aos financiadores deste trabalho: CAPES, FAPEMIG, CNPQ, PROPP-NUPEB-UFOP.

## **RESUMO**

Este trabalho apresenta os efeitos da dieta hiperlipídica (DH) consumida pela progenitora ( $G_0$ ) nos distúrbios cardiometabólicos e na microbiota intestinal na prole segunda geração ( $F_2$ ). Ratos submetidos a DH ( $G_0H$ ) ou dieta controle (DC) ( $G_0C$ ) durante o período de acasalamento, gestação e lactação, geraram a prole  $F_2$  ( $F_2-G_0H$  e  $F_2-G_0C$ , respectivamente), que receberam apenas DC. Ambos,  $G_0H$  e  $F_2G_0H$ , apresentaram alterações na microbiota intestinal, aumento da PAM, níveis plasmáticos de TAG, índice de adiposidade e processo inflamatório no depósito de gordura retroperitoneal e no cólon evidenciado pelo aumento da expressão gênica de TNF- $\alpha$ , MCP-1, MyD-88 e CAV-1. Além disso, a prole  $F_2-G_0H$  apresentou aumento da ingestão alimentar, resistência à leptina, colesterol total e níveis plasmáticos de MCP-1 e redução de adiponectina. Em relação às comunidades microbianas, observou-se maior diversidade com 5 famílias de bactérias exclusivas que foram correlacionadas com distúrbios cardiometabólicos. Em geral, a progenitora induziu aumento na ingestão alimentar, inflamação sistêmica e alterações na microbiota na prole  $F_2G_0H$ .

**Palavras chaves:** Dieta hiperlipídica materna, distúrbios cardiometabólicos, prole  $F_2$ , microbiota intestinal, inflamação.

## **ABSTRACT**

This work presents the effects of the high-fat diet (H) consumed by the progenitor (G<sub>0</sub>) on cardiometabolic disorders and on intestinal microbiota in the second generation offspring (F<sub>2</sub>). Rats submitted to H (G<sub>0</sub>H) or control (C) (G<sub>0</sub>C) diets, during mating, gestation and lactation, generated the F<sub>2</sub> offspring (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H and F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C, respectively), which received only C diet. Both, G<sub>0</sub>H and F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H, showed changes in the intestinal microbiota, increased MAP, plasma TAG levels, adiposity index and inflammatory process in retroperitoneal fat and in the colon shown by increased of TNF- $\alpha$ , MCP-1, MyD88 and CAV-1 gene expression. In addition, the F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H showed increased food intake, leptin resistance, total cholesterol and plasma levels of MCP-1 and reduced adiponectin. Regarding to the microbial communities, a greater diversity was observed with 5 unique families of bacteria that have been correlated with cardiometabolic disorders. Overall, progenitor with cardiometabolic disorders induces increase in food intake, systemic inflammation and microbiota alterations in the F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H offspring.

**Keywords:** Maternal high fat diet, cardiometabolic disorders, F<sub>2</sub> offspring, intestinal microbiota.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Delineamento experimental utilizado para obtenção da progenitora G<sub>0</sub> e da prole F<sub>2</sub>.....28
- Figura 2:** Parâmetros bioquímicos, hemodinâmicos e marcadores inflamatórios da progenitora G<sub>0</sub> alimentada com dieta controle (G<sub>0</sub>C) ou hiperlipídica (G<sub>0</sub>H) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) e da prole F<sub>2</sub> proveniente de progenitora G<sub>0</sub>C (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C) ou G<sub>0</sub>H (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H) alimentada com dieta controle (DC) após desmame até completar 90 dias de idade.....40
- Figura 3:** Expressão de mRNA de *adiponectina*, *MCP-1*, *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *MyD-88* e *CAV-1* (qRT-PCR) no depósito de gordura retroperitoneal da progenitora G<sub>0</sub> alimentada com dieta controle (G<sub>0</sub>C) ou hiperlipídica (G<sub>0</sub>H) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) e da prole F<sub>2</sub> proveniente de progenitora G<sub>0</sub>C (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C) ou G<sub>0</sub>H (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H) alimentada com dieta controle (DC) após desmame até completar 90 dias de idade .....42
- Figura 4:** Expressão de mRNA de *adiponectina*, *MCP-1*, *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *TLR-4*, *TLR-2*, *MyD-88*, *CAV-1* e *TJP-1* (qRT-PCR) no cólon da progenitora G<sub>0</sub> alimentada com dieta controle (G<sub>0</sub>C) ou hiperlipídica (G<sub>0</sub>H) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) e da prole F<sub>2</sub> proveniente de progenitora G<sub>0</sub>C (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C) ou G<sub>0</sub>H (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H) alimentada com dieta controle (DC) após desmame até completar 90 dias de idade.....44
- Figura 5:** Fotomiografias de cortes histológicos do cólon demonstrando a intensidade e a extensão da cripta intestinal da progenitora G<sub>0</sub> alimentada com dieta controle (G<sub>0</sub>C) ou hiperlipídica (G<sub>0</sub>H) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) e da prole F<sub>2</sub> proveniente de progenitora G<sub>0</sub>C (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C) ou G<sub>0</sub>H (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H) alimentada com dieta controle (DC) após desmame até completar 90 dias de idade.....46
- Figura 6:** Abundância e diversidade da microbiota fecal/unidade taxonômica da progenitora G<sub>0</sub> alimentada com dieta controle (G<sub>0</sub>C) ou hiperlipídica (G<sub>0</sub>H) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) e da prole F<sub>2</sub> proveniente de progenitora G<sub>0</sub>C (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C) ou G<sub>0</sub>H (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H) alimentada com dieta controle (DC) após desmame até completar 90 dias de idade.....48

**Figura 7:** Análise dos componentes principais e correlação de Pearson entre microbiota fecal e marcadores bioquímicos, hemodinâmicos e plasmáticos da progenitora G<sub>0</sub> alimentada com dieta controle (G<sub>0</sub>C) ou hiperlipídica (G<sub>0</sub>H) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) e da prole F<sub>2</sub> proveniente de progenitora G<sub>0</sub>C (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C) ou G<sub>0</sub>H (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H) alimentada com dieta controle (DC) após desmame até completar 90 dias de idade.....51

**Figura 8:** Análise dos componentes principais e correlação de Pearson entre microbiota fecal e marcadores inflamatórios (*adiponectina*, *MCP-1*, *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *MyD-88* e *CAV-1*) no depósito de gordura retroperitoneal da progenitora G<sub>0</sub> alimentada com dieta controle (G<sub>0</sub>C) ou hiperlipídica (G<sub>0</sub>H) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) e da prole F<sub>2</sub> proveniente de progenitora G<sub>0</sub>C (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C) ou G<sub>0</sub>H (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H) alimentada com dieta controle (DC) após desmame até completar 90 dias de idade.....53

**Figura 9:** Análise dos componentes principais e correlação de Pearson entre microbiota fecal e marcadores inflamatórios (de *adiponectina*, *MCP-1*, *TNF- $\alpha$* , *IL-6*, *TLR-4*, *TLR-2*, *MyD-88*, *CAV-1* e *TJP-1*) no cólon da progenitora G<sub>0</sub> alimentada com dieta controle (G<sub>0</sub>C) ou hiperlipídica (G<sub>0</sub>H) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) e da prole F<sub>2</sub> proveniente de progenitora G<sub>0</sub>C (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C) ou G<sub>0</sub>H (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H) alimentada com dieta controle (DC) após desmame até completar 90 dias de idade .....55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Composição nutricional (g/Kg) e conteúdo energético da dieta controle (DC) e hiperlipídica (DH).....	26
<b>Tabela 2:</b> Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ).....	33
<b>Tabela 3:</b> Valores de estabilidade dos genes gerados pela análise NormFinder.....	34
<b>Tabela 4:</b> Valores de <i>slope</i> e eficiência dos <i>primers</i> avaliados.....	35
<b>Tabela 5:</b> Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores ( <i>primers</i> ).....	36
<b>Tabela 6:</b> Abundância relativa (%) de família de bactérias da microbiota fecal da progenitora G <sub>0</sub> alimentada com dieta controle (G <sub>0</sub> C) ou hiperlipídica (G <sub>0</sub> H) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) e da prole F <sub>2</sub> proveniente de progenitora G <sub>0</sub> C (F <sub>2</sub> -G <sub>0</sub> C) ou G <sub>0</sub> H (F <sub>2</sub> -G <sub>0</sub> H) alimentada com dieta controle (DC) após desmame até completar 90 dias de idade.....	56

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo I:</b> Certificado da CEUA.....	75
<b>Anexo II:</b> Artigo.....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

CAV-1: Caveolina 1

CCA/UFOP: Centro de ciência animal da UFOP

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar

DC: Dieta controle

DH: Dieta hiperlipídica

DNA: Ácido desoxirribonucléico

F<sub>2</sub>: Prole segunda geração

F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C: Prole macho da segunda geração, que após desmame consumiram DC, de progenitora (G<sub>0</sub>C) e genitora que consumiram DC (F<sub>1</sub>-G<sub>0</sub>C) até completar 90 dias de idade.

F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H: Prole macho da segunda geração, que após desmame consumiram DC, de progenitora (G<sub>0</sub>H) que consumiu DH e genitora que consumiu DC (F<sub>1</sub>-G<sub>0</sub>H) até completar 90 dias de idade.

F<sub>3</sub>: Prole terceira geração

G<sub>0</sub>C: Progenitora que consumiu DC no período de acasalamento, gestação e lactação, totalizando 59 dias;

G<sub>0</sub>H: Progenitora que consumiu DH no período de acasalamento, gestação e lactação, totalizando 59 dias;

HOMA-IR: Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina

HOMA-β: Modelo de avaliação da homeostase da capacidade funcional das células β

*Hprt1*: Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

IL-1β: Interleucina 1β

IL-6: Interleucina 6

LIMP/NUPEB/UFOP: Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da UFOP

LPS: Lipopolissacarídeos

MCP-1: Proteína quimiotática de monócito 1

MyD-88: Fator de diferenciação mielóide 88

NFK-B: Fator nuclear Kappa B

PAM: Pressão arterial média

*Ppia*: Peptidilprolil isomerase A

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RGD: *Rat genome database*



RI: Resistência à insulina

RNA: Ácido ribonucléico

*Rplp2*: Fosfoproteína ribossomal P2 da subunidade 60S

SM: Síndrome metabólica

TAB: Tecido adiposo branco

TJP-1: Tight junction protein 1

TLR: Receptor tipo Toll

TLR-2: Receptor tipo Toll 2

TLR-4: Receptor tipo Toll 4

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral  $\alpha$

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>23</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 Objetivo Geral .....	24
3.2 Objetivos Específicos .....	24
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
4.1 Animais.....	25
4.2 Dietas.....	25
4.3 Protocolo experimental.....	27
4.4 Descrição dos procedimentos experimentais.....	30
4.4.1 Avaliação do índice de adiposidade e ingesta calórica.....	30
4.4.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	30
4.4.3 Avaliação da pressão arterial média .....	30
4.4.4 Análises histológicas .....	30
4.4.5 Análise da expressão gênica por Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR) .....	31
4.4.5.1 Extração de RNA Total .....	31
4.4.5.2 Síntese de cDNA .....	31
4.4.5.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) .....	32
4.4.5.4 Reação da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) .....	33
4.4.5.5 Seleção do controle endógeno.....	34
4.4.5.6 Cálculo da eficiência dos primers.....	35
4.4.6 Análise metagenômica fecal.....	36
4.4.6.1 Extração do DNA fecal.....	36
4.4.6.2 Quantificação do DNA fecal.....	37
4.4.6.3 Amplificação parcial do gene DNAr 16S.....	37
4.4.6.4 Sequenciamento.....	38
4.4.6.5 Análise dos dados por ferramentas de bioinformática.....	38
4.5 Análise estatística .....	39
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>

5.1 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G <sub>0</sub> H induziu SM na prole F <sub>2</sub> -G <sub>0</sub> H ..	39
5.2 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G <sub>0</sub> H induziu inflamação no depósito de gordura retroperitoneal na prole F <sub>2</sub> -G <sub>0</sub> H .....	41
5.3 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G <sub>0</sub> H induziu inflamação no cólon na prole F <sub>2</sub> -G <sub>0</sub> H.....	43
5.4 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G <sub>0</sub> H induziu inflamação na cripta intestinal na prole F <sub>2</sub> -G <sub>0</sub> H.....	46
5.5 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G <sub>0</sub> H induziu maior abundância relativa da microbiota fecal na prole F <sub>2</sub> -G <sub>0</sub> H.....	47
5.6 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G <sub>0</sub> H induziu correlação entre a microbiota fecal e os níveis plasmáticos de leptina e a ingesta calórica na prole F <sub>2</sub> -G <sub>0</sub> H .....	50
5.7 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G <sub>0</sub> H induziu correlação entre a microbiota fecal e a expressão gênica de TNF- $\alpha$ no depósito de gordura retroperitoneal na prole F <sub>2</sub> -G <sub>0</sub> H .....	52
5.8 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G <sub>0</sub> H induziu correlação entre a microbiota fecal e a expressão gênica de TJP-1 no cólon da prole F <sub>2</sub> -G <sub>0</sub> H .....	55
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>7. SUMÁRIO.....</b>	<b>64</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>65</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>66</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) pode ser caracterizada por três ou mais fatores de risco que coexistem no mesmo indivíduo como hipertensão, obesidade abdominal, dislipidemia, resistência à insulina (RI) e à leptina (NETO et al., 2012). A leptina é produzida principalmente em adipócitos do tecido adiposo branco (TAB) e aumenta proporcionalmente com o índice de adiposidade (BANKS; LEBEL, 2002), porém estudos evidenciam a possibilidade de síntese na placenta, no músculo esquelético e no coração (PURDHAM et al., 2004). Na circulação sanguínea a leptina se liga a receptores específicos no cérebro, levando ao sistema nervoso central um sinal de saciedade que reflete a quantidade existente de energia em forma de gordura no organismo (KIN E MOUSTADID-MOUSSA, 2000). Contudo, o aumento da estimulação da leptina em seus receptores centrais origina resistência à sua ação no organismo (KIN E MOUSTADID-MOUSSA, 2000).

A resistência à leptina pode levar a desregulação no eixo adipócito versus células  $\beta$  pancreáticas levando a hiperleptinemia e conseqüentemente a hiperinsulinemia, estimulando efeitos pró-inflamatórios, aumento na secreção de insulina, inibição da lipogênese e da lipólise, além de um desequilíbrio entre a ingestão de alimentos e o gasto energético, que em conjunto levam a SM (WOODS et al., 1998; DUCY et al., 2000; OTERO et al., 2005). Já a insulina é produzida pelas células  $\beta$  pancreáticas e sua concentração plasmática é proporcional ao índice de adiposidade (ALARCON et al., 2016). Em estados de RI, os tecidos sensíveis à insulina, como fígado, músculo esquelético e TAB não respondem adequadamente aos níveis circulantes normais de insulina (DOMINICI et al., 2014), resultando em hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, que são características comuns de diabetes tipo 2 e SM. Além disso, a insulina estimula a produção de leptina nos adipócitos, como resposta a leptina por meio de um feedback negativo, diminui a secreção de insulina e aumenta a sensibilidade do tecido a ela, levando à captação de glicose para utilização ou armazenamento de energia (WANG et al., 2001). Tanto a leptina quanto a insulina atuam nas mesmas áreas do hipotálamo para diminuir a ingestão alimentar e aumentar o gasto energético, regulando assim a energia de longo prazo (OSEGBE et al., 2016).

A redução da sensibilidade à leptina e à insulina no hipotálamo, alteram o mecanismo central da fome e do gasto energético, contribuindo para a expansão do TAB e para o desenvolvimento do processo inflamatório (CHOE et al., 2016; MOEHLECKE

et al., 2016; MUIR et al., 2016). A inflamação de baixo grau no TAB é causada pela hipóxia devido a hipertrofia dos adipócitos que favorece infiltração e ativação de proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e redução dos macrófagos (M2) reconhecidos por exercerem ação anti-inflamatória e imunomodulatórios (GALIC; OAKHILL; STEINBERG, 2010). A MCP-1 secreta o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (ENGSTROM et al., 2003), interleucina-6 (IL-6) (DE FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008), receptor tipo toll 4 (TLR-4) (HSIEH et al., 2009) e molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 (MyD-88) (KLEINRIDDERS et al., 2009) e promove a redução de adiponectina. Dessa forma, a MCP-1 contribui para RI e diminuição da captação de glicose (GERHARDT et al., 2001). Já o TNF- $\alpha$  possui efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos (SETHI; HOTAMISLIGIL, 1999), que agem diretamente no adipócito prejudicando a via de sinalização da insulina (BALISTRERI; CARUSO; CANDORE, 2010), estimulando a síntese e a secreção de leptina e a expressão de interleucina-6 (IL-6) no TAB. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, secretada principalmente pelo tecido adiposo visceral, que está envolvida no desenvolvimento da RI e na SM, induzindo redução da expressão do substrato do receptor de insulina-1, transportador de glicose tipo 4 e adiponectina nos tecidos muscular, hepático e TAB (HOTTA; HIRSHMAN; EMALA, 2000; LAGO et al., 2007; OUCHI; WALSH, 2007; REXRODE et al., 2003; STEFFENS; MACH, 2008) e ainda pode exercer um papel anti-inflamatório, regulando o metabolismo lipídico no fígado e no TAB (SCHELLER et al., 2011).

Existem no mínimo, quinze diferentes receptores do tipo Toll (TLR) em mamíferos, dos quais quase todos têm funções definidas nos seres humanos (SPELMAN et al., 2006). Os TLR-2 e TLR-4 são encontrados na membrana da superfície celular altamente conservadas que desempenham papel importante na detecção e reconhecimento de patógenos microbianos, bem como na geração de sinais para a produção de proteínas e citocinas pró-inflamatórias (ALBIGER et al., 2007; GOLDMAN, 2007; KAWAI; AKIRA, 2010). O TLR-4 além de detectar lipopolissacarídeos (LPS), também interage com o MyD-88, que por sua vez atua no sistema nervoso central contribuindo para a expansão do TAB e a resistência à leptina (KLEINRIDDERS et al., 2009). E ainda, o MyD-88 é ativado por ácidos graxos saturados (POLTORAK et al., 1998), induzindo aumento da expressão de vias inflamatórias relacionadas a RI (TSUKUMO et al., 2007). Já o TLR-2 é responsável pelo reconhecimento de vários produtos microbianos, incluindo peptidoglicanos e lipoproteínas (FRANTZ; ERTL; BAUERSACHS, 2007),

desempenhando um papel no sistema imunológico e na regulação da inflamação vascular, induzindo aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (SCHRÖDER; HARDER, 2006).

A inflamação crônica de baixo grau e a redução da barreira intestinal, também são mecanismos envolvidos na gênese da SM (PRIMEAU et al., 2011; WANG et al., 2020), afetando o balanço energético ao regular genes que modulam o gasto e/ou acúmulo de energia, influenciando o perfil metabólico do organismo (ZHANG et al., 1994; LEY et al., 2005). Estudos em camundongos livres de micro-organismos apresentaram alterações no perfil de citocinas (ISHIKAWA et al., 2008), indicando que a microbiota intestinal pode levar a alterações no sistema imune. Além disso, camundongos alimentados com DH apresentaram maior permeabilidade intestinal, aumento da infiltração de células inflamatórias e a presença de DNA bacteriano no TAB (AMAR et al., 2011; CENAC et al., 2002; LAM et al., 2015). Adicionalmente, alterações na microbiota intestinal foram relacionadas ao aumento da permeabilidade intestinal, como elevação dos níveis sistêmicos de LPS, que colabora para o aumento da inflamação e o desenvolvimento da RI (MOREIRA et al., 2012), por ultrapassar a barreira intestinal via transporte transcelular por meio de células epiteliais do intestino delgado (LAM et al., 2012; LAM et al., 2015; YU; HUANG, 2013). O LPS é conhecido como endotoxina altamente tóxica derivada da membrana externa de bactérias gram-negativas, sendo um ativador e regulador da transcrição gênica via fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ -B). Além disso, o LPS pode ser reconhecido por receptores TLR, como o TLR-4, que em pré adipócitos aumenta a expressão de diversas citocinas, principalmente MCP-1, TNF- $\alpha$  e IL-6 prejudicando a sinalização da insulina em adipócitos, contribuindo para processo inflamatório (TAKEDA; AKIRA, 2005).

O trato intestinal possui um sistema de barreira para proteção contra toxinas externas, componentes da dieta e de bactérias. Essa barreira é multifacetada e compreende vários mecanismos de proteção, como uma camada de muco, a própria microbiota intestinal e as tight junction protein 1 (TJP-1). As TJP-1 são proteínas que desempenham um papel na manutenção da integridade e permeabilidade do epitélio intestinal (CHELAKKOT; GHIM; RYU, 2018). O consumo da DH compromete a barreira e aumenta a permeabilidade intestinal, reduz a expressão de proteínas TJP-1, levando a um quadro de hiperpermeabilidade e conseqüentemente ao processo inflamatório (DE LA SERRE et al., 2010; SUZUKI; HARA, 2010; MOREIRA et al., 2012). Por outro lado, a caveolina (CAV) é uma família de proteínas do citoesqueleto formadas por três membros:

1 (CAV -1), 2 (CAV-2) e 3 (CAV-3) que auxiliam na absorção de nutrientes (BOSCHER, CECILE; NABI, 2012). O aumento nos níveis da expressão gênica de CAV-1 no intestino sugere uma maior permeabilidade intestinal à glicose e aos lipídios que são substratos para a microbiota (HAMILTON et al., 2015). No TAB a CAV-1 é um importante regulador da homeostase (MARTIN et al., 2012) e está envolvida na modulação da resposta inflamatória (SINGH et al., 2012) e da via de sinalização da insulina (PALACIOS-ORTEGA et al., 2014). A inflamação crônica de baixo grau e a redução na função da barreira intestinal, também são mecanismos envolvidos na gênese da SM (PRIMEAU et al., 2011; WANG et al., 2020). Além disso, estudos mostraram que a variação na composição da microbiota intestinal de indivíduos com peso ideal e sobrepeso pode ser influenciada durante a gestação, pelo consumo da DH e pelo quadro de SM levando ao desequilíbrio da microbiota intestinal (CANI et al., 2007).

A microbiota intestinal é um ecossistema composto por grande diversidade de bactérias que refere-se à variedade de espécies existentes dentro de um mesmo ecossistema (LEVINE, 2010) e abundância é o valor que representa o número de organismos de determinada espécie em uma área específica (LEVINE, 2009) que podem trocar ou competir por nutrientes, moléculas de sinalização ou mecanismos de evasão imunológica por meio de interações ecológicas (BAUMLER et al., 2016; SCHIRMER et al., 2016; EICKHOFF et al., 2018), além de exercerem diferentes funções no organismo, como a absorção de nutrientes, proteção contra patógenos e modulação do sistema imune (MORAES, 2014). O papel da microbiota intestinal na saúde e na doença depende principalmente da abundância de bactérias, entretanto pouco se sabe sobre as interações microbianas no contexto das doenças metabólicas humanas (CHEN et al., 2020). Métodos como análise de correlações, estão sendo utilizados para estudar as interações entre marcadores de distúrbios metabólicos e a microbiota intestinal (BERRY et al., 2014; BANERJEE et al., 2018; CHEN et al., 2020), contudo já está bem descrito que fatores internos e principalmente externos modulam a composição e a função da microbiota intestinal (COTILLARD et al., 2013; MORAES, 2014).

A menor diversidade bacteriana tem sido associada à piora do processo inflamatório sistêmico, da dislipidemia, aumento da adiposidade e RI em indivíduos franceses e dinamarqueses, quando comparados a indivíduos com padrão alimentar mais saudável (MACDONALD; MONTELEONE, 2005; COTILLARD et al., 2013). A DH é capaz de induzir alterações na diversidade e composição da microbiota intestinal modificando a razão entre o filo Firmicutes (parede celular gram-positiva) e o filo

Bacteroidetes (parede celular gram-negativa) (CANI et al., 2008; DANIEL et al., 2014). O filo Bacteroidetes têm sido associado a um efeito protetor, enquanto o filo Firmicutes parecem aumentar o risco da SM (CLARKE et al., 2012; INDIANI et al., 2018; KIM et al., 2019). Esses dois filos representam mais de 90% da composição bacteriana, entretanto o aumento da razão Firmicutes/Bacteroidetes induz aumento do depósito de gordura nos adipócitos, contribuindo para a SM (BERVOETS et al., 2013). Adicionalmente, DH além de oferecer maior disponibilidade de fonte calórica, favorece a proliferação de bactérias Firmicutes que são mais eficientes em extrair energia dos nutrientes, o que resulta num maior aproveitamento das calorias (LEY et al., 2005; TURNBAUGH et al., 2006, CLARKE et al., 2012). Portanto, não conta apenas o valor calórico das dietas, mas também o ambiente intestinal que varia de acordo com o tipo de dieta consumida. Dessa forma, o consumo da DH contribui para um ambiente intestinal com a prevalência de bactérias do filo Firmicutes, que por apresentar maior capacidade de metabolização dos alimentos, contribui para a obesidade (CLARKE et al., 2012).

O consumo da DH, a alteração na permeabilidade e na microbiota intestinal, o aumento de citocinas pró-inflamatórias, a resistência à leptina e à insulina, a expansão do TAB e a inflamação do intestino estão associados com o fenótipo da SM, que pode ser transferido para as gerações subsequentes levando a alterações intergeracionais (KÖNNER; BRÜNING, 2012; ZAK-GOŁĄB et al., 2013; LOBIONDA et al., 2019; VISHVANATH; GUPTA, 2019).

As programações intergeracionais são características que podem ser herdadas, reversíveis e ainda, serem transmitidas aos descendentes (HEARD; MARTIENSSEN, 2014), afetando a expressão do gene ou do fenótipo celular, alterando o epigenoma (CHOI; LEE, 2013). Os fenótipos em modelos animais são geralmente considerados intergeracional quando os efeitos de uma exposição ambiental persistir por pelo menos duas gerações (PATTI, 2013). Fatores de riscos nutricionais como o consumo da DH durante a gravidez e o aleitamento materno, afetam as programações intergeracionais promovendo alterações em diferentes vias metabólicas, tanto na prole segunda (F2) como na terceira (F3) geração, induzindo hipertensão, aumento do índice de adiposidade, dislipidemia, resistência à leptina e à insulina que são características da SM (WATERLAND; MICHELS, 2007; PENTINAT et al., 2010).



## 2. JUSTIFICATIVA

O consumo da DH induz inflamação, RI, resistência à leptina, levando a um quadro de SM e ainda alterações na microbiota intestinal. Estudos intergeracionais em humanos são limitados em avaliar a contribuição da dieta materna no fenótipo da prole, devido à dificuldade em separar os efeitos pré-natal de influências ambientais ao longo das gerações. Portanto, modelos experimentais de roedores com condições dietéticas e ambientais controladas são úteis para examinar como a nutrição materna durante períodos de desenvolvimento influencia no surgimento de distúrbios metabólicos nas gerações futuras.

No entanto, a maioria dos estudos tem utilizado modelos de alimentação em longo prazo, no qual, a DH materna é fornecida semanas antes da gestação até a idade adulta da prole F<sub>1</sub> e ou F<sub>2</sub>. Como consequência, a má nutrição antes dos períodos de desenvolvimento e durante a vida da prole F<sub>1</sub> pode interferir nos distúrbios metabólicos da prole. Neste sentido, foi desenvolvido em nosso laboratório o protocolo animal, no qual a exposição à DH materna limitou-se aos períodos de acasalamento, gestação e lactação (59 dias) das progenitoras G<sub>0</sub>. Ambas as proles F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> receberam DC após o desmame até completarem 90 dias de idade. Por meio do nosso protocolo animal, foi demonstrado que a DH materna da G<sub>0</sub> induziu distúrbios característicos da SM nas proles F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, independente da nutrição pós-natal. A DH utilizada no presente estudo foi escolhida por ter sido a intervenção nutricional mais eficaz na indução da SM em ratos, mas que são característicos da SM humana (DE CASTRO et al., 2013).

No presente estudo, esperamos ampliar o entendimento acerca de como o fenótipo da SM de G<sub>0</sub>H pode levar a alterações intergeracionais que foram transferidas para a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H induzindo alteração na microbiota fecal e no processo inflamatório.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da DH consumida pela progenitora G<sub>0</sub>H na ingestão alimentar, no processo inflamatório, nas funções cardiometabólicas e na microbiota fecal da prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

3.2.1. Caracterizar a SM (ingesta calórica, índice de adiposidade, pressão arterial média, níveis plasmáticos de leptina, adiponectina, MCP-1, triacilglicerol, glicemia de jejum, colesterol total, insulina, HOMA-IR e HOMA-β) induzida por DH na progenitora G<sub>0</sub>H e na prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H;

3.2.2. Avaliar o processo inflamatório no depósito de gordura retroperitoneal (adiponectina, MCP-1, TNF-α, IL-6, MyD-88 e CAV-1) da progenitora G<sub>0</sub>H e da prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H;

3.2.3. Avaliar o processo inflamatório no cólon (adiponectina, MCP-1, TNF-α, IL-6, TLR-4, TLR-2, MyD-88, CAV-1 e TJP-1) da progenitora G<sub>0</sub>H e da prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H;

3.2.4. Avaliar o processo inflamatório na cripta intestinal da progenitora G<sub>0</sub>H e da prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H;

3.2.5. Avaliar a diversidade e a abundância da microbiota intestinal da progenitora G<sub>0</sub>H e da prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Ratos Fisher (n=36), com 90 dias de idade, machos ( $290\text{g} \pm 10$ ) e fêmeas ( $220\text{g} \pm 10$ ) permaneceram em gaiolas individuais e em ciclo claro-escuro 12h-12h no Centro de Ciência Animal da UFOP (CCA/UFOP). Durante todo o experimento os animais tiveram livre acesso à água e às dietas. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Ética em Cuidados de Animais Experimentais. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal de Ouro Preto nº do protocolo 2016/49 (anexo I). A progenitora G<sub>0</sub>H e a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H foram mantidas na sala de experimentação do CCA-UFOP por um período de 149 dias e 90 dias, respectivamente.

### 4.2 Dietas

As progenitoras G<sub>0</sub> com 90 dias de idade foram alimentadas durante acasalamento (10 dias), gestação (28 dias) e lactação (21 dias), total de 59 dias, com a DC, AIN-93M ou com a DH (DE CASTRO et al., 2013). Já, as genitoras da primeira geração (G<sub>1</sub>) com 90 dias de idade foram alimentadas durante acasalamento (10 dias), gestação (28 dias) e lactação (21 dias), total de 59 dias, somente com a DC. As proles F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> também foram alimentadas somente com a DC por um período de 90 dias. A DC era composta de 72,07% de carboidratos, 14% de proteínas e 4,0% de lipídeos, apresentando um total de 3,80 kcal por 1 grama de dieta. A DH era constituída por 39,53% de lipídeos (37% de banha de porco), 20,68% de carboidratos e 18,50% de proteínas, apresentando um total de 5,19 kcal por 1 grama de dieta. A DC foi proveniente do CCA-UFOP e a DH foi adquirida de *Domeneghetti & Corrêa Ltda* (Jaú, São Paulo, Brasil). A composição nutricional das dietas está descrito na tabela **I** abaixo:

**Tabela 1.** Composição e conteúdo energético das dietas (g/Kg)

<b>Ingredientes (g/Kg)</b>	<b>DC (AIN-93M)</b>	<b>DH (AIN-93)</b>
Amido de milho	620.70	-
Sacarose	100.00	-
Frutose	-	34.2
Caseína	140.00	180.50
Leite condensado	-	316.00
Óleo de Soja	40.00	-
Banha de porco	-	370.00
Fibra (celulose)	50.00	50.00
Farelo de trigo	-	-
Mix de minerais (AIN-93G-MX)*	-	35.00
Mix de minerais (AIN-93M-MX)*	35.00	-
Mix de vitaminas (AIN-93G-VX)*	10.00	10.00
DL-Metionina	1.80	3.00
Cloridrato de colina	2.50	2.50
<b>Macronutrientes (% por peso)</b>		
Proteína	14.00	18.50
Carboidrato	72.07	20.68
Gordura	4.00	39.53
<b>Macronutrientes (% Kcal)</b>		
Proteína	14.72	15.60
Carboidrato	75.82	15.92
Gordura	9.46	68.48
Saturada	15.20	61.37
Monoinsaturada	23.30	0.38
Poliinsaturada	60.00	44.13
Colesterol	0.03	0.07
<b>Kcal/g</b>	3.80	5.20
<b>Kj/g</b>	15.91	21.77

Composição da dieta (g/100g) consumida pelos animais. A porcentagem de Kcal foi calculada com base nas calorias fornecidas por cada macro nutriente, sendo: carboidratos 4 kcal/g; proteínas 4 Kcal/g; e lipídios 9 Kcal/g. A porcentagem de gorduras poli-insaturadas, monoinsaturadas e saturadas foi calculada de acordo com a quantidade total de lipídios (g) fornecida em cada dieta.

### 4.3 Protocolo Experimental

Foram utilizados ratos Fisher machos e fêmeas ( $G_0$ ) não consanguíneos, com 90 dias de idade, provenientes do CCA-UFOP. Os animais foram divididos em 2 grupos, um grupo recebeu DH contendo 37% de banha e 5,2 Kcal/g durante o período de acasalamento, gestação e lactação para indução da programação nutricional. Para comparação, o outro grupo recebeu DC com 3,8 Kcal/g. Após o período de acasalamento os machos foram eutanasiados. Logo após o desmame das proles, as progenitoras ( $G_0$ ) foram eutanasiadas. As proles  $F_1$ , provenientes tanto de progenitoras  $G_0$  que receberam DC ou de progenitoras que receberam DH, após o desmame foram alimentadas apenas com DC e acompanhadas por 90 dias. Ao final de 90 dias, parte da prole  $F_1$  foi eutanasiada. Outra parte dos ratos da geração  $F_1$ , continuou a receber DC e foi acasalada para gerar a segunda geração ( $F_2$ ). A geração  $F_2$  foi acompanhada por 90 dias de idade e também consumiu apenas DC. Os grupos experimentais utilizados neste estudo foram somente as progenitoras  $G_0$  sendo denominadas de  $G_0$  que consumiram DC ( $G_0C$ ) e  $G_0$  que consumiram DH ( $G_0H$ ) e as proles machos  $F_2$  e os grupos denominados:  $F_2-G_0C$  referentes a prole  $F_2$  provenientes de progenitoras  $G_0$  alimentadas com DC e  $F_2-G_0H$  referente a prole  $F_2$  provenientes de progenitoras  $G_0$  alimentadas com DH.

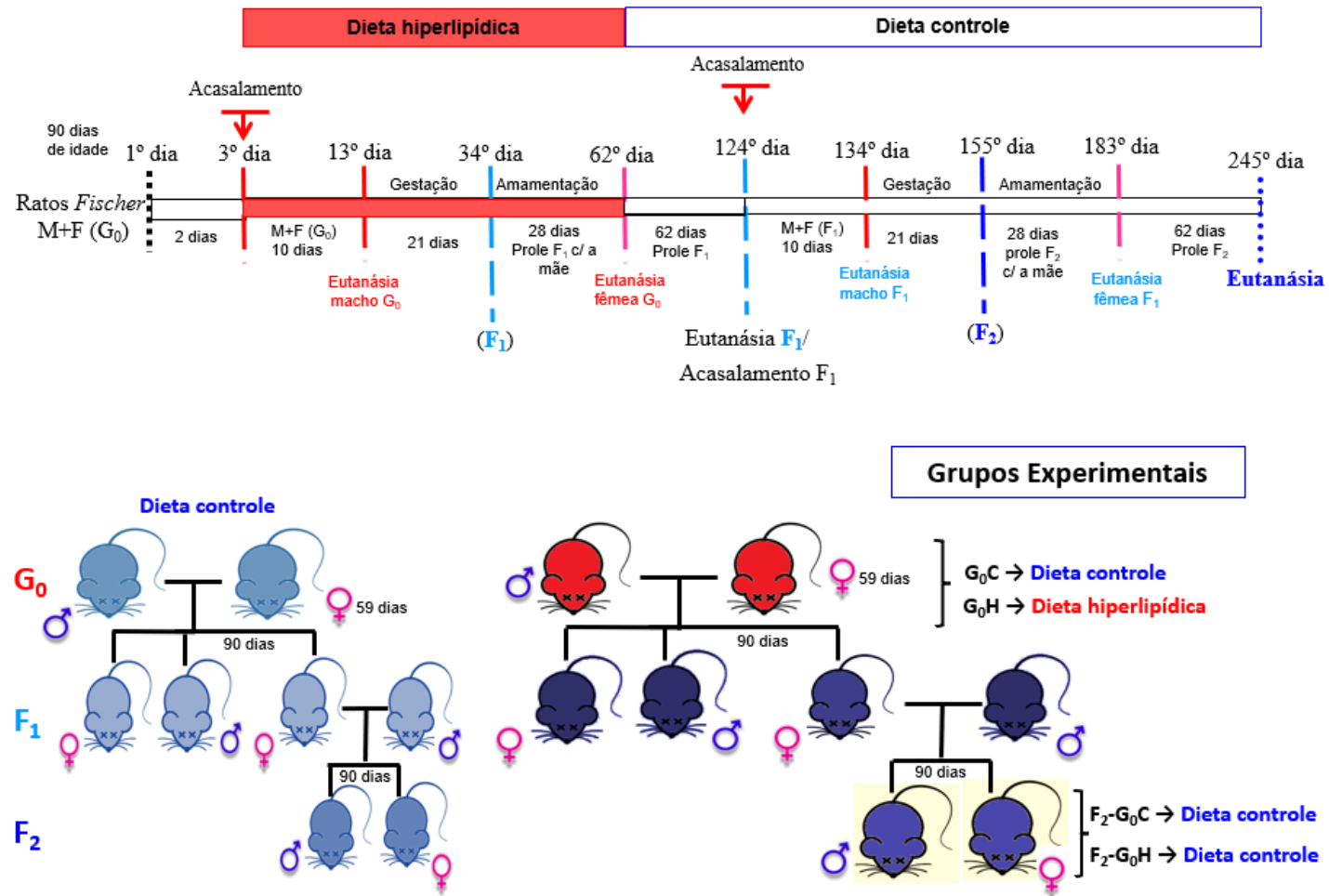


Figura 1: Representação esquemática do delineamento experimental

Os ratos foram divididos em 4 grupos:

**Grupo G<sub>0</sub>C:** progenitora que consumiu DC no período de acasalamento (10 dias), gestação (28 dias) e a lactação (21 dias); n =9

**Grupo G<sub>0</sub>H:** progenitora que consumiu DH no período de acasalamento, (10 dias), gestação (28 dias) e a lactação (21 dias); n =8

**Grupo F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C:** prole macho da segunda geração, proveniente de progenitora G<sub>0</sub>C alimentada com DC após desmame até completar 90 dias de idade; n =12

**Grupo F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H:** prole macho da segunda geração, proveniente de progenitora G<sub>0</sub>H alimentada com DC após desmame até completar 90 dias de idade; n =12

#### **4.4 Descrição dos procedimentos experimentais**

##### **4.4.1 Avaliação do índice de adiposidade e ingesta calórica**

O índice de adiposidade foi utilizado para avaliar o aumento dos depósitos de gordura e foi calculado como [(peso absoluto (g) dos depósitos de gordura inguinal + epididimal + retroperitoneal) / peso do rato (g)] x 100 (COX; LAUGHTON; POWLEY, 1985). A ingesta calórica foi calculada pela fórmula  $\text{ingesta calórica} = (\text{ingesta alimentar (g)} \times (\text{valor calórico da dieta em Kcal}))$  (VOLPATO et al., 2012).

##### **4.4.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos**

As amostras de sangue (jejum 12 h) foram coletadas e centrifugadas (8.000g, 4°C, 6 min) para separação do soro para dosagem de glicemia de jejum, colesterol total, triacilglicerol que foram realizadas em Kits comerciais individuais (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Os níveis de insulina, leptina, adiponectina e MCP-1 foram determinados pelo método de imunossensaio tipo sanduíche Elisa usando o Kit Ultra-Sensible Rat Elisa (Crystal Chem, Downers Grove, IL., EUA) de acordo com as instruções fornecido pelo fabricante. Foi calculado modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR) =  $\text{insulina de jejum (mIU/ml)} \times \text{glicose de jejum (mmol/ml)} / 22,5$  e modelo de avaliação da homeostase da capacidade funcional das células  $\beta$  (HOMA-  $\beta$ ) =  $20 \times \text{insulina de jejum } (\mu\text{m/L}) / \text{glicose de jejum (mmol/ml)} - 3,5$  (MATTHEWS et al., 1985).

#### **4.4.3 Avaliação da pressão arterial média**

Após 48 horas de canulação da artéria e veia femural sob anestesia (cetamina e xilazina, 80 e 10 mg/Kg, ip, respectivamente) (Syntec, São Paulo, Brasil), em ratos acordados, a pressão arterial média (PAM) pulsátil foi monitorada por um transdutor de pressão MLT1199 acoplado para um amplificador de sinal de pressão arterial (ML221 Bridge Amp, ADInstruments, Sydney, Austrália). A PAM foi derivada das ondas de pressão pulsátil e continuamente registrada em um sistema de aquisição digital Power lab (Power lab 4/30, ADInstruments) com uma taxa de amostragem de 100 Hz e uma janela de digitalização de 20 mV.

#### **4.4.4 Análises histológicas**

Fragmentos do intestino grosso, especificamente o cólon foram fixados em solução de formalina tamponada, cortados transversalmente, processados em série decrescente de álcoois e incluídos em blocos de parafina. Secções parafinadas de aproximadamente quatro  $\mu\text{m}$  foram obtidos em micrótomo semiautomático, montadas e coradas pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E). Os cortes foram desparafinados, hidratados e corados pela hematoxilina e após serem lavados em água corrente para retirada do excesso do corante, foram contracorados pela eosina. Após a última lavagem em água corrente, foram desidratados e montados com lamínula e Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). As fotomicrografias foram obtidas em microscópio Leica DM5000 acoplados à câmera digital. Estes procedimentos operacionais são padrões do laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (LIMP/NUPEB/UFOP), seguindo as normas de controle de qualidade do laboratório. As imagens do cólon foram digitalizadas através da microcâmera Leica MC170HO associada ao microscópio Leica DM5000B. Para a análise foram feitas 30 imagens aleatórias (área total percorrida igual a  $35.000\mu\text{m}^2$ ) com a objetiva de 40X. A intensidade, extensão da inflamação foi realizada através de uma análise semiquantitativa, adaptada por ERBEN et al., (2014). O resultado foi apresentado usando escore em escala mínimo (<10%, valor 1), discreto (10-25%, valor 2), moderada (26-50%, valor 3) ou intenso (> 51%, valor 4) para a intensidade. Para a extensão foi utilizado o escore mínimo (valor 1; mucosa), discreto (valor 2; mucosa e submucosa) e moderado (valor 3; mucosa, submucosa e intramural).



#### **4.4.5 Análise da expressão gênica por Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)**

##### **4.4.5.1 Extração de RNA Total**

O RNA total do depósito de gordura retroperitoneal e cólon foram extraídos utilizando o kit SV Total Isolation System (Promega™, Madison WI) seguindo a recomendação do fabricante. Resumidamente, aproximadamente 100 mg do depósito de gordura retroperitoneal e 10 mg de cólon foram homogeneizados em 250 µL de Trizol® Reagent (Invitrogen™, Carlsbad, CA) com auxílio de um homogenizador ultra 80, em 3 pulsos de 30 segundos com intervalo de 30 segundos no gelo. Depois de incubados a temperatura ambiente por 10 minutos, foram adicionados 50 µl de clorofórmio (Sigma, ST. Louis, MO) e as amostras foram homogeneizadas por 1 minuto com auxílio de um vórtex, seguido de uma incubação de 25 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados por 15 minutos a  $12.000 \times g$  a 4° C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo tipo eppendorf e foi adicionado 75 µl de etanol 95% (Sigma), preparado com H<sub>2</sub>O livre de RNAses para precipitar os ácidos nucleicos e transferida para a coluna de ligação que acompanha o kit. Em seguida, o RNA foi purificado com o kit SV Total Isolation System (Promega™) conforme instrução do fabricante. O controle de qualidade do RNA foi realizado a partir da quantificação e avaliação do grau de pureza do mesmo pelo aparelho Nanovue® (GE) seguida da análise das preparações em gel de agarose (1,2%) TBE/Formamida. A densidade óptica (quantificação) do RNA extraído foi mensurada no comprimento de onda a 260 nm, enquanto a relação entre os comprimentos de onda 260/280 foi indicativa de pureza e a relação 260/230 indicativa de contaminação. As razões acima de 1,8 foram aceitas como adequadas para quantificação da expressão gênica (MANCHESTER, 1996; FLEIGE; PFAFFL, 2006; BECKER et al., 2010).

##### **4.4.5.2 Síntese de cDNA**

O ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total utilizando o kit *Hight-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O meio de reação continha 2 µL de tampão 10× (500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3), 0,8 µL da mistura de desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) 100 mM, 2 µL de *primers* randômicos e 1 µL da enzima transcriptase reversa *MultiScribe* (50

U/ $\mu$ L). A reação foi realizada nas seguintes condições, 10 minutos a 25°C, seguido de 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C no termociclador (*Biocycler*, modelo MJ96+, cidade e país). As amostras de cDNA foram estocadas a -20°C até o momento do uso.

#### **4.4.5.3 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers)**

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos transcritos de interesse foram desenhados de acordo com sequências de mRNA depositadas no banco de dados “*Rat Genome Database*” (*RGD*, disponível em <http://rgd.mcw.edu>) e posteriormente idealizados pelo *NCBI/ Primer-BLAST* (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>), conforme a tabela 2).

**Tabela 2.** Sequência de primers de genes selecionados para qRT-PCR

Gene	Nº de acesso	Sequência primer (5'–3')
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	NM_012675.3	F5'-CGTCAGCCGATTTGCCATTT-3' R5'-TCCCTCAGGGGTGTCCTTAG-3'
<i>Adiponectina</i>	NM_144744.3	F5'-GCCGTTCTCTTCACCTACGAC-3' R5'-GGTCTCCCACCTCCAGATGG-3'
<i>CAV-1</i>	NM_031556.3	F5'-CGCACACCAAGGAGATTGA-3' R5'-CCATAGGGATGCCGAAGATG-3'
<i>MCP-1</i>	NM_031530.1	F5'-TAGCATCCACGTGCTGTCTC-3' R5'-CAGCCGACTCATTGGGATCA-3'
<i>Hprt-1</i>	NM_012583.2	F5'-TAGGTCCATTCCTATGACTGTAGA -3' R5'-TGGCCTGTATCCAACACTTC-3'
<i>TJP-1</i>	NM_001106266.1	F5'-GCAATTCGGTATCGTTGGATTT-3' R5'-CGGTTGTATGCTGGAGTGAT-3'
<i>IL-6</i>	NM_012589.2	F5'-CATTTCACAAGTCGGAGGCT-3' R5'-TCTGACAGTGCATCATCGCT-3'
<i>MyD-88</i>	NM_198130.1	F5'-GACAGCAGTGTCCCACAGAC-3' R5'-AGCAGATGAAGGCGTCGAAA-3'
<i>TLR-2</i>	NM_198769.2	F5'-ATCACTGCACCCTCAATGATGGG-3' R5'-TGTGCAGGCTCCGTATTGTT-3'
<i>TLR-4</i>	NM_019178.1	F5'-TTTCTGAGTAGCCGCTCTGG-3' R5'-CTCCCACTCGACGTAGGTGT-3'

Primers usado (Forward and Reverse)

#### 4.4.5.4 Reação da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Para a análise da expressão dos genes em estudo foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qRT-PCR). A quantificação dos produtos formados durante os ciclos de amplificação foi realizada pelo reagente *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em placas de 96 poços. Para a análise, foram pipetados 2  $\mu$ L de cDNA diluído 5 $\times$  em água livre de DNase, 3  $\mu$ L dos primers (na concentração de 2,5  $\mu$ M) e 5  $\mu$ L de *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), totalizando um volume final de reação de 10  $\mu$ L.

Os ensaios foram realizados em triplicata técnica para todos os genes avaliados, com o gene de referência (*Hprt-1*) presente em todas as placas. A reação de qRT-PCR foi conduzida conforme programação contida no aparelho ABI 7500 Applied Biosystems: 95° C por 10 min (ativação da polimerase), 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento dos primers e extensão) A especificidade

dos produtos obtidos foi confirmada pela análise das curvas de dissociação do produto amplificado ao final de cada reação.

Os valores de baseline foram ajustados para 3-15 ciclos e o threshold foi fixado em 0,2. Os dados obtidos foram analisados utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica Cq comparativo ou  $2^{-\Delta Cq}$ ) que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as diferentes amostras. A expressão dos genes alvo foi normalizada pelo gene de referência (*Hprt-1*) ( $\Delta Cq = Cq$  do gene alvo –  $Cq$  do gene de referência) e os resultados foram alcançados por uma fórmula aritmética que considerou a quantidade do alvo, normalizado ( $2^{-\Delta Cq}$ ).

#### 4.4.5.5 Seleção do controle endógeno

Para a escolha do gene normalizador foi realizada a análise dos dados da expressão gênica por qRT-PCR para três controles endógenos: hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (*Hprt1*), fosfoproteína ribossomal P2 da subunidade 60S (*Rplp2*) e peptidilprolil isomerase A (*Ppia*). Os resultados foram analisados utilizando o software *NormFinder*, que classifica o conjunto de genes de acordo com a sua estabilidade em um determinado conjunto de amostras, gerando uma medida de estabilidade, onde um valor mais baixo implica em uma maior estabilidade na expressão gênica (ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004). Como mostrado na tabela 3, o gene *Hprt1* por ter apresentado menor variação entre as amostras de diferentes grupos experimentais foi identificado pelo software *NormFinder* como o controle ideal para o presente estudo.

**Tabela 3.** Valores de estabilidade dos genes gerados pela análise *NormFinder*

Gene	Valor de estabilidade	Gene ideal	Valor de estabilidade - gene ideal
<i>Hprt1</i>	0,200	<i>Hprt1</i>	0,200
<i>Rplp2</i>	0,322		
<i>Ppia</i>	0,258		

#### 4.4.5.6 Cálculo da eficiência dos primers

Para determinar a eficiência da amplificação dos genes alvo e do gene de referência foram construídas curvas padrões para cada amplicon. As curvas padrões foram estabelecidas com cinco diluições seriadas (diluição 4x) a partir de um pool de cDNA das amostras. A curva padrão foi gerada em um gráfico de regressão linear semi-log do valor de Cq (eixo Y) em comparação ao log da quantidade inicial do ácido nucléico (eixo X).

O valor do slope gerado pela curva padrão foi utilizado para estimar a eficiência de amplificação. Uma reação com 100% de eficiência apresentaria um aumento de 10 vezes no amplicon da PCR a cada 3,32 ciclos durante a fase exponencial de amplificação ( $\log_2 10 = 3,3219$ ); assim, o amplicon dobraria em quantidade durante a fase exponencial.

A estimativa da eficiência (E) foi calculada pela fórmula:  $E = (10^{-1/\text{slope} - 1}) \times 100$ . Desse modo, os primers foram considerados adequados para avaliar a expressão gênica quando apresentaram eficiência de reação entre 80 e 120%. A tabela 4 mostra os valores de *slope* e as eficiências dos *primers* avaliados.

**Tabela 4.** Valores de *slope* e eficiências dos *primers* avaliados

<b>Gene</b>	<b><i>Slope</i></b>	<b>Eficiência do <i>primer</i> (%)</b>
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	-3,24	104
<i>Adiponectina</i>	-3,12	109
<i>CAV-1</i>	-3,43	96
<i>MCP-1</i>	-3,31	100
<i>Hprt-1</i>	-3,11	110
<i>TJP-1</i>	-3,33	99
<i>IL-6</i>	-3,49	103
<i>MyD-88</i>	-3,31	100
<i>TLR-2</i>	-3,38	101
<i>TLR-4</i>	-3,47	98

#### **4.4.6 Análise metagenômica fecal**

##### **4.4.6.1 Extração do DNA fecal**

Um dia antes da eutanásia, os ratos foram colocados individualmente em caixas e após deserção espontânea; as fezes foram coletadas imediatamente, para análise metagenômica. Para a extração de DNA total microbiano foi utilizado 0,30g de cada amostra das fezes, utilizando o Kit DNeasy PowerSoil (QIAGEN®), específico para extração de DNA fecal, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram conservadas em freezer (-20 °C).

#### 4.4.6.2 Quantificação do DNA fecal

Após o processo de extração das amostras de DNA foram quantificadas e verificadas quanto a pureza usando um espectrofotômetro do tipo NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, USA) na faixa de comprimento de onda de A260/280 nm. Foi realizado eletroforese em gel de agarose 0,8%, contendo 2µl de Brometo de Etídeo, eluídos em TAE 1x, com corrida de 25 minutos a 90V para confirmar qualidade do DNA extraído. A visualização do DNA foi realizada sob luz UV e a imagem foi registrada em um sistema fotodocumentador de gel (VilberLourmet, France).

#### 4.4.6.3 Amplificação parcial do gene DNAr 16S

Após a extração e quantificação, o DNA total foi utilizado para amplificação parcial do gene ribossomal 16S, por meio de uma reação em cadeia de polimerase (PCR-*Polymerase Chain Reaction*). Para isso foram utilizados oligonucleotídeos complexos (FOUHY et al., 2016), em que cada um continha 10 núcleotídeos do *barcode*, os quais funcionavam como identificadores para cada amostra (tabela 5).

**Tabela 5.** Sequências dos oligonucleotídeos (em verde) ligados ao *barcode* (em roxo) e adaptador (em azul)

BC11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT <b>CCTCGAATCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</b>
BC12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT <b>AGGTGGTTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</b>
BC13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT <b>CTAACGGACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</b>
BC14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT <b>TTGGAGTGTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</b>
BC15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT <b>TCTAGAGTTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</b>
BC16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT <b>CTGGATGACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</b>
BC17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT <b>CTATTCGTTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</b>
BC18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>AGGCAATTGCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</b>
BC19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT <b>TAGTCGGACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</b>
BC20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG <b>CAGATCCATCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</b>
BC21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT <b>CGCAATTACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</b>
BC22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT <b>TCGAGACGCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA</b>

A PCR foi preparada para um volume final de 30 µl, contendo 3 µl de Buffer (10X); 1,13 µl de dNTP (10mM); 1,5 µl de MgSO<sub>4</sub> (50mM); 4,5 µl de oligonucleotídeo senso (1 µM); 4,5 de oligonucleotídeo antisenso (1 µM); 20 ng de DNA; 0,48 µl de Platinum® Taq (Invitrogen) (5U/µl) e água Mili-q estéril livre de nucleases para

completar o volume final da reação. A amplificação foi realizada em termociclador Biocycler®, sendo um ciclo inicial de 3 minutos por 95°C, seguido de 35 ciclos de 20 segundos a 98°C, 15 segundos a 60°C, 1 minuto a 72°C, e um ciclo final de 1 minuto a 72°C.

Após a amplificação os amplicons foram analisados em gel de agarose 0,8%, utilizando 5 µl do produto PCR para verificação da qualidade. Confirmada a qualidade na amplificação, 25 µl do produto final da PCR foi purificado usando o kit de purificação PCR (QIAGEN®), seguindo instruções do fabricante. Mais uma vez o produto da reação de purificação foi avaliado em gel de agarose 0,8%, utilizando 2 µl do produto purificado, para verificar a integridade do produto.

#### **4.4.6.4 Sequenciamento**

O sequenciamento usando plataforma Ion Torrent® foi realizado no Laboratório Multiusuário de Genômica da Universidade Federal de Ouro Preto. A biblioteca de DNA foi quantificada utilizando Kit Qubids DNA HS™ (High Sensitivity) no Qubit 2.0 fluorômetro (Life Technologies, USA) e em seguida, realizada a normalização das amostras em 70 pM. Para a montagem da biblioteca, 20 µl de cada amostra foram colocadas em um único tubo tipo eppendorff e homogeneizadas. Posteriormente 25 µl deste *pool* de DNA foi carregado no chip 318 v2™ (Life Technologies, USA), e este inserido no sequenciador Ion PGM™ (Life Technologies, USA). Durante a preparação do sequenciador para a leitura das amostras foram utilizados: Ion PGM Hi-Q View Chef™ (Reagentes e Soluções) e Ion PGM Hi-Q View Sequencing™ (Life Technologies, USA). As leituras (*reads*) de baixa qualidade e sequências policlonais foram filtradas pelo software do próprio equipamento (PGM) e os dados obtidos foram exportados em arquivos FastQ.

#### **4.4.6.5 Análise dos dados por ferramentas de bioinformática**

As análises foram realizadas no laboratório de microbiologia e ecologia da Universidade Federal de Ouro Preto. Os dados do sequenciamento foram processados utilizando o software Ion Reporter™ 5.10.5.0. Em seguida foi gerado pelo sistema Ion Torrent uma tabela contendo a contagem de reads correspondentes para unidade taxonômica operacional (OTU). Uma árvore filogenética foi construída pelo Software Prisma 6.0.

#### 4.5 Análise estatística

Os resultados são expressos como médias  $\pm$  SEM. Os dados foram analisados quanto à normalidade de Kolmogorov-Smirnov e seguiram a distribuição normal padrão. Em seguida, foram avaliados por One-way ANOVA, seguido do pós-teste de Sidak's. As análises estatísticas foram realizadas com o software *Graph pad Prism 6 for Windows*, (Inc., San Diego, CA, USA). A significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

A regressão linear foi realizada em pares (família de bactérias e parâmetros bioquímicos, hemodinâmicos, marcadores inflamatórios) entre os grupos (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H) e seguida da análise do coeficiente de correlação de Pearson. Os dados de PCA para cada marcador e microbiota intestinal (abundância relativa da classificação taxonômica) foram realizados usando a escala estatística spss e o software R.

A análise de porcentagem de similaridade (SIMPER) foi usada para identificar as bactérias que contribuíram para as diferenças (matrizes de Bray-Curtis) entre os grupos.

### 5. RESULTADOS

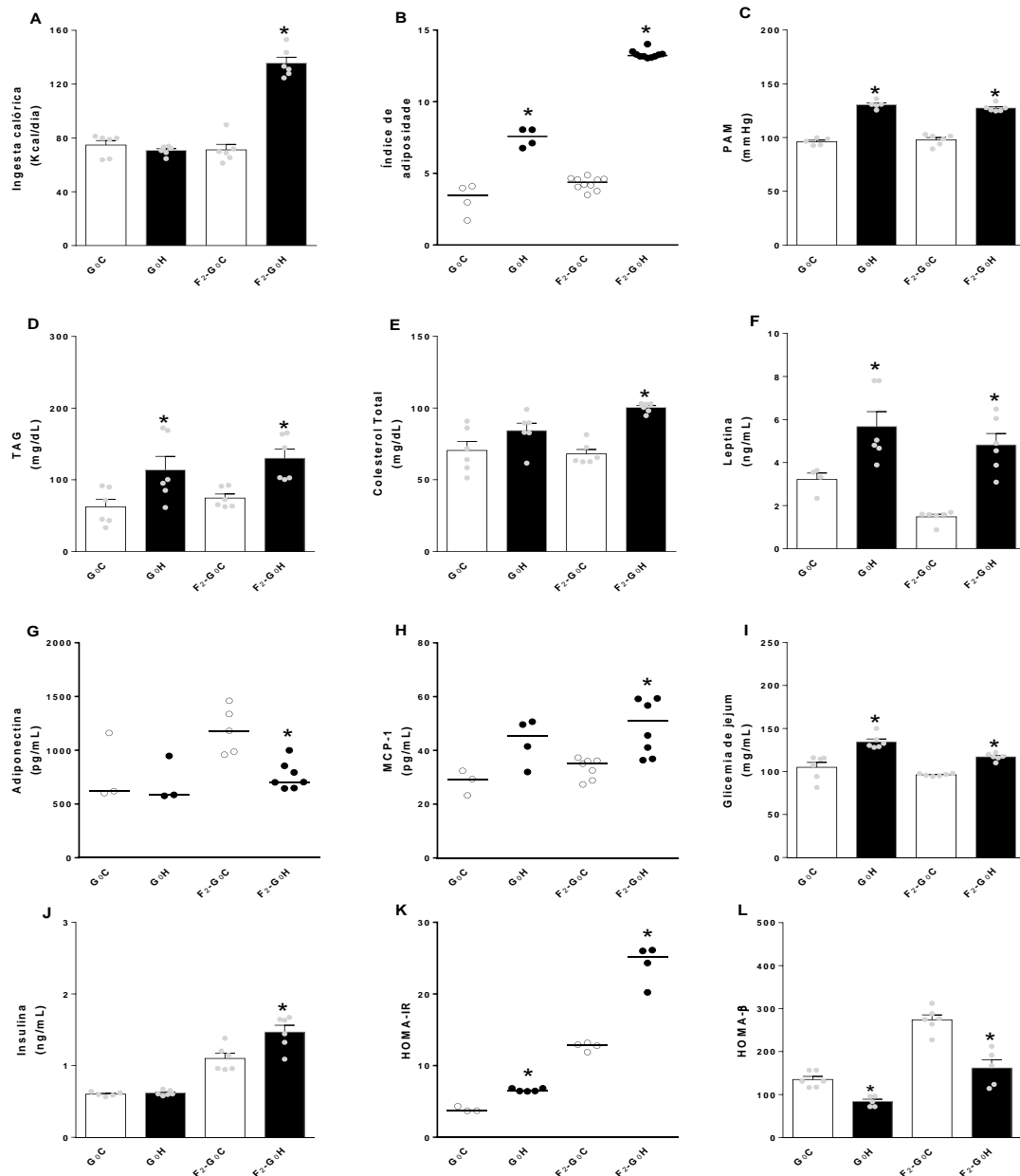
#### 5.1 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G<sub>0</sub>H induziu SM na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H

A progenitora G<sub>0</sub>H apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) no índice de adiposidade ( $7,49 \pm 0,33$ ,  $n=4$ ), nos níveis plasmáticos de TAG ( $114 \pm 18,75$  mg/dL,  $n=6$ ), de leptina ( $5,67 \pm 0,69$  ng/mL,  $n=6$ ) e de glicose ( $134,5 \pm 3,37$  ng/mL,  $n=7$ ), do HOMA-IR ( $6,59 \pm 0,094$ ,  $n=5$ ), na PAM ( $130,7 \pm 1,67$  mmHg,  $n=6$ ), e redução ( $p < 0,05$ ) do HOMA- $\beta$  ( $83,99 \pm 5,42$   $n=5$ ) comparado a progenitora G<sub>0</sub>C ( $3,19 \pm 0,55$ ,  $n=6$ ;  $62,45 \pm 10,34$  mg/dL,  $n=6$ ;  $3,21 \pm 0,29$  ng/mL,  $n=5$ ;  $104,9 \pm 5,78$  ng/mL,  $n=6$ ;  $3,91 \pm 0,21$   $n=4$ ;  $96,22 \pm 1,41$  mmHg,  $n=5$ ;  $135,1 \pm 7,39$   $n=5$  respectivamente; Fig.2B, C, D, F, I, K e L). Não houve diferença na ingesta calórica, nos níveis plasmáticos de colesterol total, de adiponectina, de MCP-1 e de insulina, comparado a progenitora G<sub>0</sub>C (Fig.2A, E, G, H e J).

A prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) na ingesta calórica ( $135,7 \pm 4,38$  kcal dia,  $n=6$ ), no índice de adiposidade ( $13,31 \pm 0,089$ ,  $n=10$ ), na PAM ( $127,5 \pm 1,39$  mmHg,  $n=8$ ), nos níveis plasmáticos de TAG ( $130 \pm 12,86$  mg/dL,  $n=6$ ), de colesterol total ( $100,3 \pm 1,38$  mg/dL,  $n=8$ ), de leptina ( $4,83 \pm 0,53$  ng/mL,  $n=6$ ), de MCP-1 ( $52,39 \pm 3,79$   $\mu$ g/mL,  $n=7$ ), de glicose ( $117,2 \pm 1,69$  ng/mL,  $n=6$ ) e de insulina ( $1,47 \pm 0,09$  ng/mL,  $n=6$ ), e do HOMA-IR ( $24,17 \pm 1,38$   $n=4$ ) e redução ( $p < 0,05$ ) dos níveis plasmáticos de adiponectina ( $675 \pm 16,34$   $\mu$ g/mL,  $n=6$ ) e do HOMA- $\beta$  ( $162 \pm 18,97$   $n=5$ )



comparado à prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C (71,20 ± 4,02 kcal/dia, n=6; 4,29 ± 0,137, n=10; 97,95 ± 2,11mmHg, n=6; 74,58 ± 5,62 mg/dL, n=6; 68,01 ± 3,11 mg/dL, n=6; 1,48 ± 0,12 ng/mL, n=6; 33,34 ± 1,47 ρg/mL, n=7; 96,2 ± 0,57 ng/mL, n=6; 1,10 ± 0,072 ng/mL, n=6; 12,69 ± 0,28 n=4; 1241 ± 102,2 ρg/mL, n=4; 274 ± 11,50 n=6 respectivamente; Fig.2A-L).

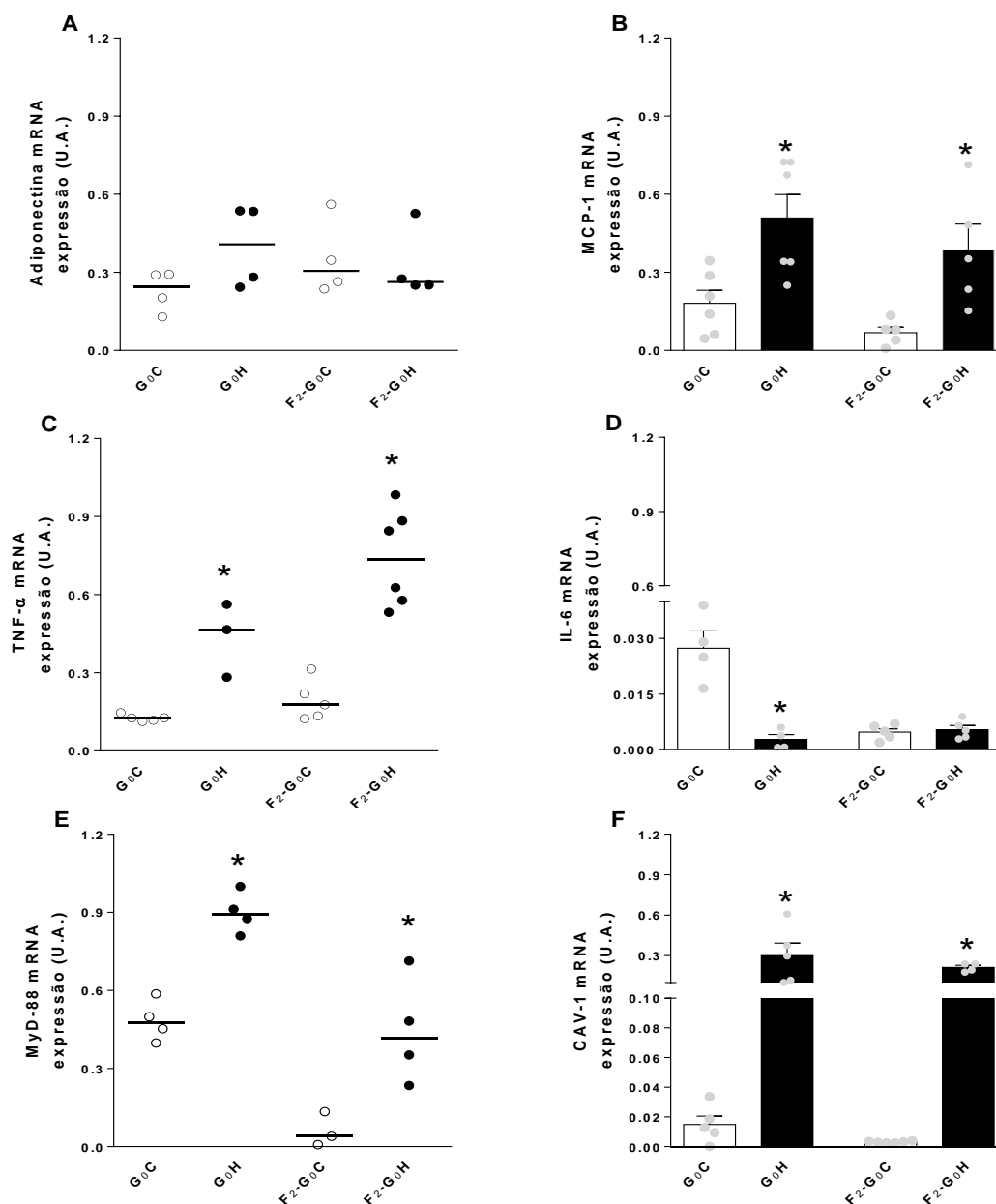


**Figura 2: Parâmetros bioquímicos, hemodinâmicos e marcadores inflamatórios.** Ingesta calórica (painel A), índice de adiposidade (painel B), pressão arterial média (PAM, painel C), triacilglicerol (TAG, painel D), colesterol total (painel E), leptina (painel F), adiponectina (painel G), proteína quimiotática para o monócito 1 (MCP-1, painel H), glicose (painel I), insulina (painel J), modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR, painel K) e modelo de avaliação da homeostase da capacidade funcional da células  $\beta$  (HOMA- $\beta$ , painel L) da progenitora que consumiu dieta hiperlipídica (DH, G<sub>0</sub>H; n=3-8) ou controle (DC, G<sub>0</sub>C; n=3-8) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) e da prole F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C, n=3-8) que consumiu DC após desmame até 90 dias de idade. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média usando ANOVA *One-way* seguido do pós teste *Sidak's*. \*p < 0,05 comparado aos respectivos controles.

## 5.2 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G<sub>0</sub>H induziu inflamação no depósito de gordura retroperitoneal na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H

A progenitora G<sub>0</sub>H apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica (U.A) de *MCP-1* ( $0,509 \pm 0,090$ ,  $n=6$ ), *TNF- $\alpha$*  ( $0,437 \pm 0,082$ ,  $n= 3$ ), *MyD-88* ( $0,900 \pm 0,039$ ,  $n=4$ ), *CAV-1* ( $0,300 \pm 0,093$ ,  $n=5$ ), e redução ( $p < 0,05$ ) da *IL-6* ( $0,003 \pm 0,001$ ,  $n=4$ ) comparada a progenitora G<sub>0</sub>C ( $0,181 \pm 0,049$ ,  $n=6$ ;  $0,1261 \pm 0,006$ ,  $n=5$ ;  $0,484 \pm 0,040$ ,  $n=4$ ;  $0,015 \pm 0,005$ ,  $n=5$ ;  $0,027 \pm 0,004$ ,  $n=4$  respectivamente) no depósito de gordura retroperitoneal (Fig.3B-E). Não houve diferença na expressão gênica da *adiponectina* comparada a progenitora G<sub>0</sub>C (Fig.3A).

A prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica (U.A) de *MCP-1* ( $0,387 \pm 0,099$ ,  $n=5$ ), *TNF- $\alpha$*  ( $0,464 \pm 0,138$ ,  $n=6$ ), *MyD-88* ( $0,446 \pm 0,102$ ,  $n=4$ ), *CAV-1* ( $0,212 \pm 0,015$ ,  $n=4$ ) comparada à prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C ( $0,068 \pm 0,021$ ,  $n=5$ ;  $0,108 \pm 0,023$ ,  $n=6$ ;  $0,060 \pm 0,038$ ,  $n=3$ ;  $0,003 \pm 0,002$ ,  $n=6$  respectivamente) no depósito de gordura retroperitoneal (Fig.3B, C, E e F). Não houve diferença na expressão gênica de *adiponectina* e de *IL-6* comparada a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C (Fig.3A e D).

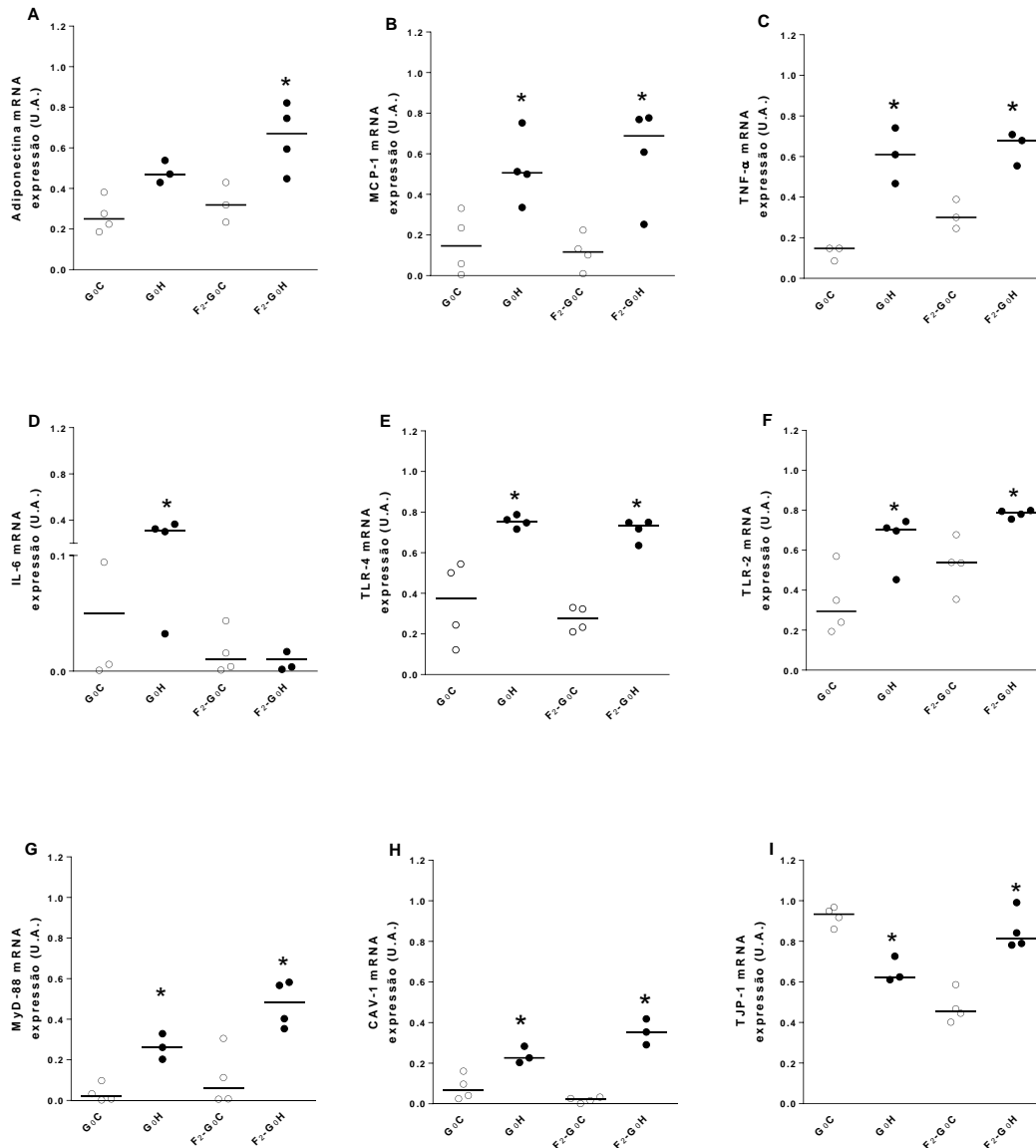


**Figura 3: Avaliação da expressão mRNA de marcadores inflamatórios no depósito de gordura retroperitoneal (U.A), adiponectina (painel A), proteína quimiotática para o monócito 1 (MCP-1, painel B), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , painel C), interleucina 6, (IL-6, painel D), molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide (MyD-88, painel E) e caveolina (CAV-1, painel F) da progenitora que consumiu dieta hiperlipídica (DH, G<sub>0</sub>H; n=3-6) ou controle (DC, G<sub>0</sub>C; n=3-6) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) e da prole F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C, n=3-6) que consumiu DC após desmame até 90 dias de idade. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média usando ANOVA *One-way* seguido do pós teste *Sidak's*. \*p < 0,05 comparado aos respectivos controles.**

### 5.3 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G<sub>0</sub>H induziu inflamação no cólon na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H

A progenitora G<sub>0</sub>H apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica (U.A) de *MCP-1* ( $0,525 \pm 0,086$ ,  $n= 4$ ), *TNF- $\alpha$*  ( $0,606 \pm 0,079$ ,  $n= 3$ ), *IL-6* ( $0,256 \pm 0,076$ ,  $n= 4$ ), *TLR-4* ( $0,753 \pm 0,015$ ,  $n= 4$ ), *TLR-2* ( $0,651 \pm 0,067$ ,  $n= 4$ ), *MyD-88* ( $0,264 \pm 0,036$ ,  $n= 3$ ), *CAV-1* ( $0,238 \pm 0,024$ ,  $n= 3$ ) e redução ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica de *TJP-1* ( $0,654 \pm 0,036$ ,  $n= 3$ ) comparado a progenitora G<sub>0</sub>C ( $0,157 \pm 0,076$ ,  $n= 4$ ;  $0,127 \pm 0,021$ ,  $n= 3$ ;  $0,056 \pm 0,031$ ,  $n= 4$ ;  $0,353 \pm 0,101$ ,  $n= 4$ ;  $0,338 \pm 0,084$ ,  $n= 4$ ;  $0,035 \pm 0,022$ ,  $n= 4$ ;  $0,081 \pm 0,031$ ,  $n= 4$ ;  $0,924 \pm 0,024$ ,  $n= 4$  respectivamente) no cólon (Fig.4B-I). Não houve diferença na expressão gênica de *adiponectina* comparado a progenitora G<sub>0</sub>C (Fig.4A).

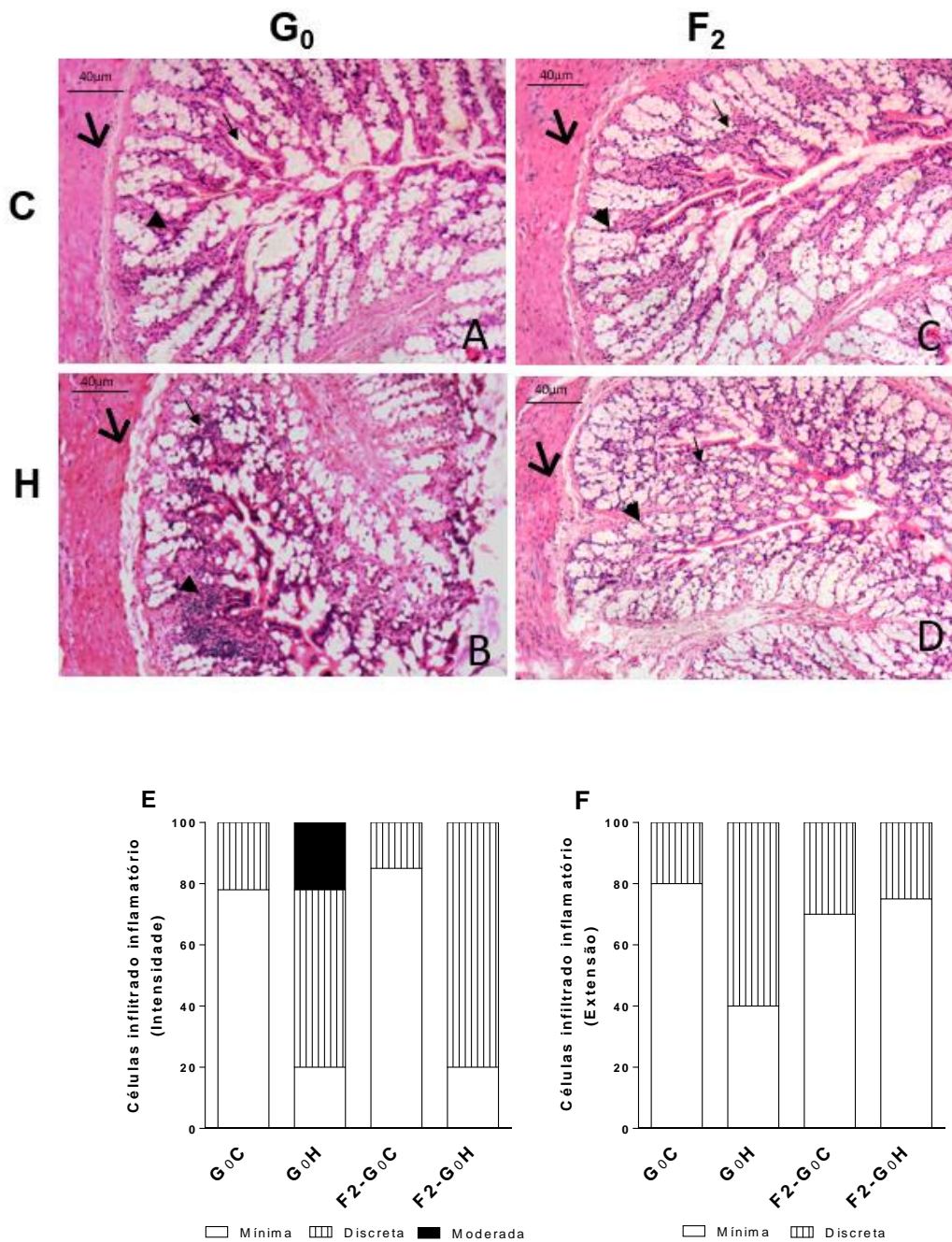
A prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H apresentou aumento ( $p < 0,05$ ) na expressão gênica (U.A) de *adiponectina* ( $0,652 \pm 0,083$ ,  $n= 4$ ), *MCP-1* ( $0,602 \pm 0,123$ ,  $n= 4$ ), *TNF- $\alpha$*  ( $0,647 \pm 0,047$ ,  $n= 3$ ), *TLR-4* ( $0,713 \pm 0,027$ ,  $n= 4$ ), *TLR-2* ( $0,783 \pm 0,009$ ,  $n= 4$ ), *MyD-88* ( $0,476 \pm 0,058$  U.A,  $n= 4$ ), *CAV-1* ( $0,354 \pm 0,037$ ,  $n= 3$ ), *TJP-1* ( $0,851 \pm 0,084$ ,  $n=4$ ), comparado à prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C ( $0,328 \pm 0,056$ ,  $n= 3$ ;  $0,117 \pm 0,044$ ,  $n= 4$ ;  $0,312 \pm 0,042$ ,  $n= 3$ ;  $0,274 \pm 0,031$ ,  $n= 4$ ;  $0,527 \pm 0,027$ ,  $n= 4$ ;  $0,108 \pm 0,070$ ,  $n= 4$ ;  $0,020 \pm 0,007$ ,  $n= 4$ ;  $0,475 \pm 0,039$ ,  $n= 4$ ; respectivamente) no cólon (Fig.4A, B, C, E, F, G, H). Não houve diferença na expressão gênica de *IL-6* comparado à prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C (Fig.4D).



**Figura 4: Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios no cólon (U.A), adiponectina (painel A), proteína quimiotática para o monócito 1 (MCP-1, painel B), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , painel C), interleucina 6, (IL-6, painel D), receptor tipo toll 4, (TLR-4, painel E), receptor tipo toll 2 (TLR-2, painel F), molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide (MyD-88, painel G), caveolina (CAV-1, painel H), tight junction protein 1, (TJP-1, painel I) da progenitora que consumiu dieta hiperlipídica (DH, G<sub>0</sub>H, n=3-6) ou dieta controle (DC, G<sub>0</sub>C, n=3-6) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias), e da prole F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C, n=3-6) que consumiu DC após desmame até 90 dias de idade. Valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média usando ANOVA One-way seguido do pós teste Sidak's. \*p < 0,05 comparado aos respectivos controles.**

#### **5.4 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G<sub>0</sub>H induziu inflamação na cripta intestinal na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H**

A análise semiquantitativa do processo inflamatório da cripta intestinal do cólon ERBEN et al. (2014) mostrou que a progenitora G<sub>0</sub>H e a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H apresentaram intensidade mínima (G<sub>0</sub>H = 20% e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H = 20%), intensidade discreta (G<sub>0</sub>H = 58% e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H = 80%) e somente G<sub>0</sub>H apresentou intensidade moderada (22%) (Fig.5B, D e E) e apresentou extensão mínima (G<sub>0</sub>H = 40% e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H = 75%) e extensão discreta (G<sub>0</sub>H = 60% e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H = 25%) no processo inflamatório da cripta (Fig.5B e F). Já os animais que se alimentaram com DC apresentaram intensidade do processo inflamatório classificados como intensidade mínima (G<sub>0</sub>C=78% e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C=85%) e intensidade discreta (G<sub>0</sub>C = 22% e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C = 15%) (Fig.5A, C e E) e apresentaram extensão mínima (G<sub>0</sub>C = 80% e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C = 70%) e extensão discreta (G<sub>0</sub>C = 20% e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C = 30%) no processo inflamatório da cripta intestinal (Fig.5A, C e F).



**Figura 5: Avaliação da representação histomorfológica de células inflamatórias na cripta intestinal.**

Fotomicrografias do cólon corado com hematoxilina e eosina (H&E) da progenitora que consumiu dieta hiperlipídica (DH, G<sub>0</sub>H, painel B; n=3-6) ou dieta controle (DC, G<sub>0</sub>C, painel A; n=3-6) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias), e da prole F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C, painel C e D; n=3-6, respectivamente) que consumiu DC após desmame até 90 dias de idade. Magnificação × 400. Bar = 50µm. Setas indicam intensidade e extensão de células inflamatórias. Avaliação qualitativa da intensidade da inflamação no cólon (painel E), utilizando grau mínimo (< 10%, valor 1), discreto (10-25%, valor 2), moderado (26-50%, valor 3) ou intenso (>51%, valor 4). Avaliação qualitativa da extensão da inflamação no cólon (painel F), utilizando o escore mínimo (valor 1; mucosa), discreto (valor 2; mucosa e submucosa) e moderado (valor 3; mucosa, submucosa e intramural).



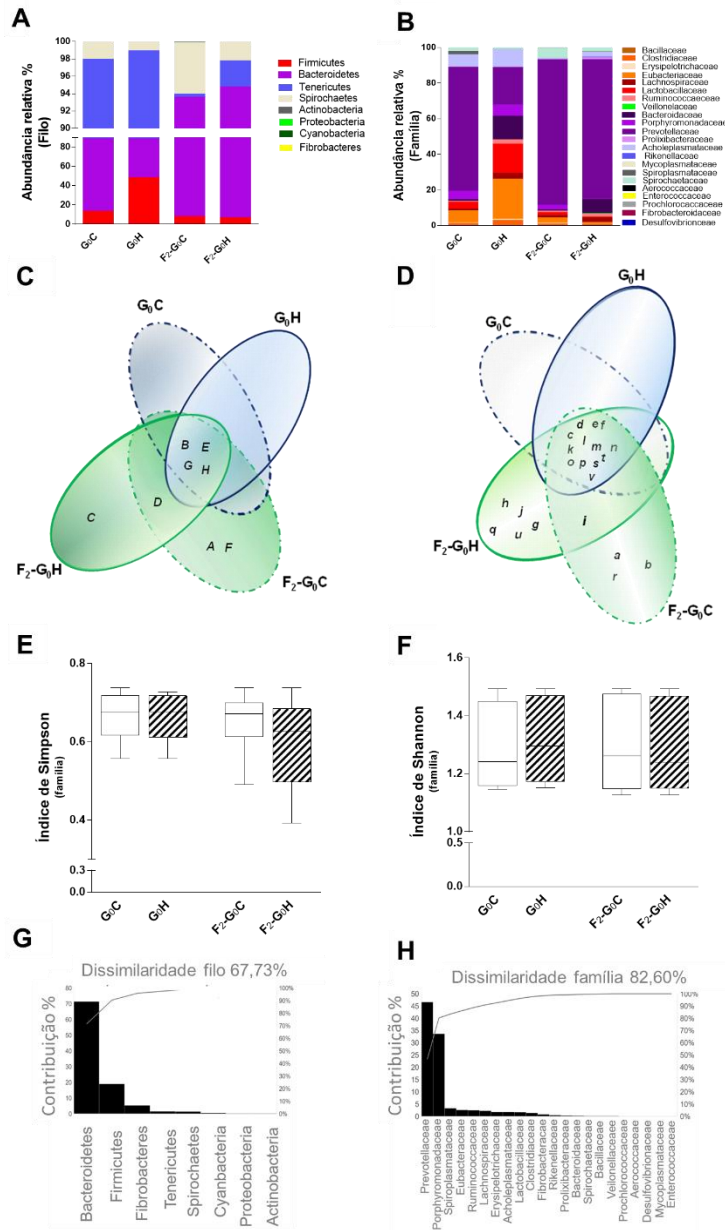
## 5.5 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G<sub>0</sub>H induziu maior diversidade e abundância relativa da microbiota fecal na F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H

O sequenciamento do genoma rRNA mostrou que a composição da assembleia de bactérias variou entre os grupos estudados, de acordo com o diagrama de Venn e o SIMPER, sendo que em nível de filo houve compartilhamento de 50% e dissimilaridade de 67,73%, respectivamente, dos filos de bactérias entre as progenitoras G<sub>0</sub>H e G<sub>0</sub>C e as proles F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C (Fig.6A, C e G). Enquanto em nível de família foi verificado o compartilhamento de 59,1% e dissimilaridade de 82,6% das bactérias, respectivamente, entre as progenitoras G<sub>0</sub>H e G<sub>0</sub>C e as proles F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C (Fig.6B, D e H).

No entanto, a progenitora G<sub>0</sub>H apresentou redução na abundância relativa do filo Bacteroidetes (40,85%) e aumento de Firmicutes (48,38%) comparado a progenitora G<sub>0</sub>C (Fig.6A e C, tabela 6). Em nível de família, a progenitora G<sub>0</sub>H apresentou aumento nas bactérias do filo Bacteroidetes (*Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prolixbacteraceae*) e redução da família *Prevotellaceae* e aumento das bactérias do filo Firmicutes (*Clostridiaceae*, *Eubacteraceae*, *Lachospiraceae*, *Lactobacillaceae*, *Ruminococcaceae*), comparado a progenitora G<sub>0</sub>C (Fig.6B e D, tabela 6).

A prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H apresentou abundância relativa similar do filo Bacteroidetes e de Firmicutes comparado a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C (Fig.6A, tabela 6). Em nível de família, a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H apresentou aumento das bactérias do filo Bacteroidetes (*Bacteroidaceae* e *Prolixbacteraceae*) e redução (*Porphyromonadaceae* e *Prevotellaceae*) e aumento das bactérias do filo Firmicutes (*Lachospiraceae* e *Ruminococcaceae*) e redução (*Clostridiaceae*, *Eubacteraceae*, *Lactobacillaceae*) comparado a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C (Fig.6B, tabela 6). A análise do diagrama de Venn mostrou que a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H apresentou cinco famílias de bactérias exclusivas no filo Bacteroidetes (*Rikenellaceae*), no filo Cyanobacteria (*Aerococcaceae*), no filo Firmicutes (*Bacillaceae* e *Veillonellaceae*) e no filo Tenericutes (*Mycoplasmataceae*). Já a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C apresentou três famílias de bactérias exclusivas no filo Actinobacteria (*Desulfovibrionaceae* e *Prochlorococcaceae*), e no filo Proteobacteria (*Enterococcaceae*) (Fig.6C e D, tabela 6).

Em relação a diversidade de família de bactérias, não houve diferença nos índices de Simpson e Shannon na progenitora G<sub>0</sub>H (0,6672 e 1,313, n=6 respectivamente) e na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (0,6050 e 1,286, n=6 respectivamente) comparado a seus respectivos controles, G<sub>0</sub>C (0,6649 e 1,285, n=6 respectivamente) e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C (0,6481 e 1,293, n=6 respectivamente) (Fig.6E e F).



**Figura 6: Abundância e diversidade da microbiota fecal/ unidade taxonômica operacional (OTUs).** Abundância relativa filo (painel A), abundância relativa família (painel B), diagrama de Venn nível filo Actinobacteria (A), Bacteroidetes (B), Cyanobacteria (C), Fibrobacteres (D), Firmicutes (E), Proteobacteria (F), Spirochaetes (G), Tenericutes (H) (painel C) e nível família *Desulfovibrionaceae* (a), *Prochlorococcaceae* (b), *Bacteroidaceae* (c), *Porphyromonadaceae* (d), *Prevotellaceae* (e), *Prolixibacteraceae* (f), *Rikenellaceae* (g), *Aerococcaceae* (h), *Fibrobacteraceae* (i), *Bacillaceae* (j), *Clostridiaceae* (k), *Erysipelotrichaceae* (l), *Eubacteraceae* (m), *Lachnospiraceae* (n), *Lactobacillaceae* (o), *Ruminococcaceae* (p), *Veillonellaceae* (q), *Enterococcaceae* (r), *Spirochaetaceae* (s), *Acholeplasmataceae* (t), *Mycoplasmataceae* (u), *Spiroplasmataceae* (v) (painel D), diversidade da família por índice de Simpson (painel E) e Shannon (painel F), análise de porcentagem de similaridade (SIMPER) nível filo (painel G) e nível família (painel H) da microbiota fecal pela progenitora que consumiu dieta hiperlipídica (DH, G<sub>0</sub>H; n=6) ou controle (DC, G<sub>0</sub>C; n=6) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (28 dias) e a lactação (21 dias) e da prole F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C, n=6) que consumiu DC após desmame até 90 dias de idade. Valores expressos como média ± erro padrão da média usando ANOVA *One-way* seguido do pós teste *Sidak*'s.

## 5.6 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G<sub>0</sub>H induziu maior correlação entre a microbiota fecal e os níveis plasmáticos de leptina e a ingesta calórica na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H

A análise de componentes principais (PCA) tem o objetivo de visualizar as diferenças na composição da família bacteriana entre DC e DH ingerida pela progenitora (G<sub>0</sub>C e G<sub>0</sub>H) e transmitidos aos seus respectivos descendentes (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C) que estavam mais fortemente associados a diferentes parâmetros avaliados. Em relação aos parâmetros plasmáticos o componente 1 explicou 54,73% da variação total, sendo que a progenitora G<sub>0</sub>H apresentou maior relação com os níveis plasmáticos de adiponectina, leptina, TAG, glicose, PAM e MCP-1 (Fig.7A). Já o componente 2 explicou 40,38% da variação total, sendo que a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H apresentou maior relação com os níveis plasmáticos de adiponectina, índice de adiposidade, colesterol, ingesta calórica, HOMA-IR e insulina (Fig.7A).

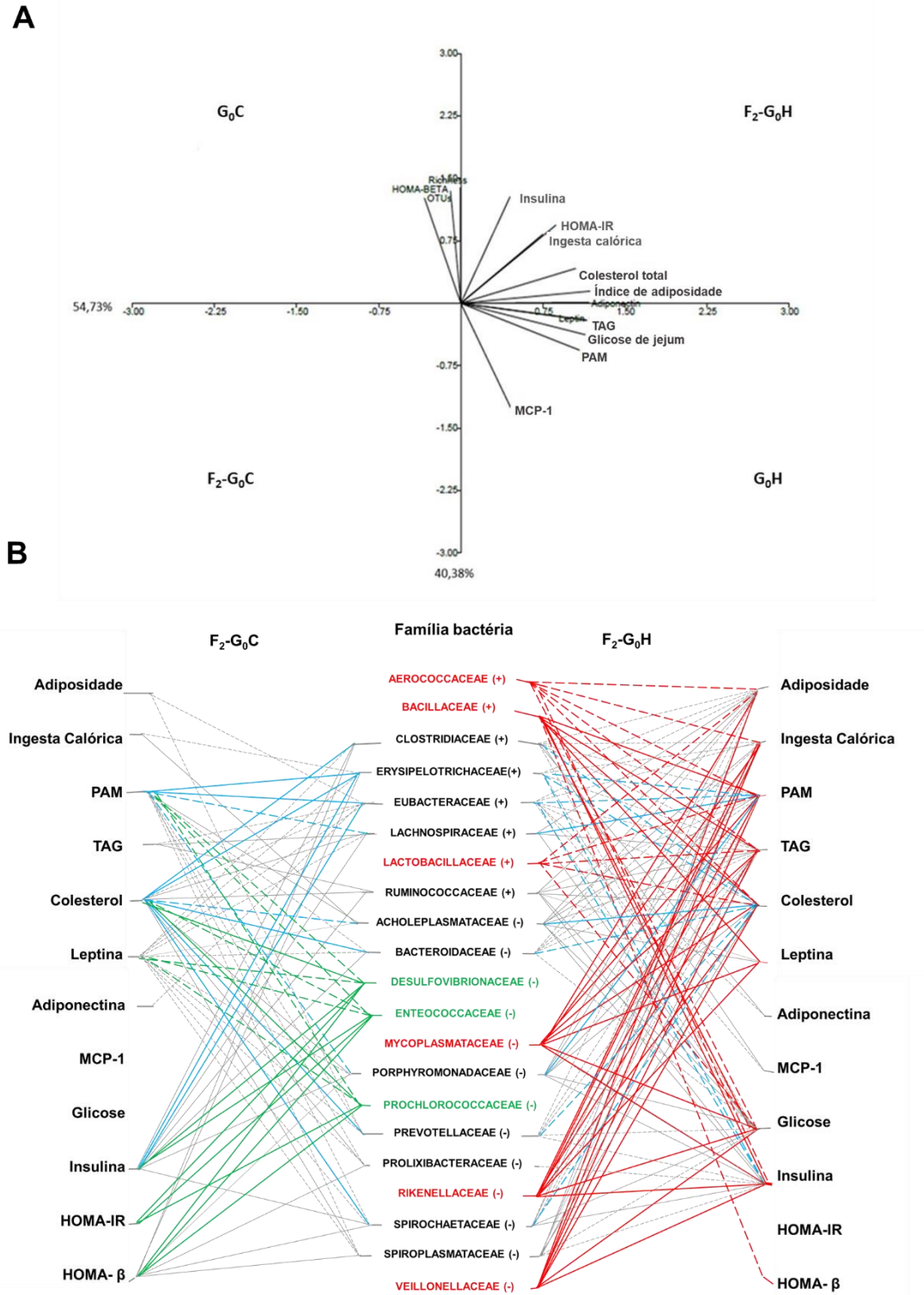
De forma exclusiva, o número de OTUs de bactérias das famílias *Bacillaceae*, *Veillonellaceae*, *Mycoplasmataceae* e *Rikenellaceae* apresentou correlação positiva com PAM e níveis plasmáticos de TAG, colesterol, glicose e insulina na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (Fig.7B). As famílias *Bacillaceae*, *Mycoplasmataceae* e *Rikenellaceae* foram positivamente correlacionadas com a leptina na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (Fig.7B). As famílias *Mycoplasmataceae*, *Rikenellaceae* e *Veillonellaceae* apresentaram correlação positiva com o índice de adiposidade e a ingestão calórica na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (Fig.7B). Apenas a família *Bacillaceae* apresentou correlação negativa com HOMA- $\beta$  na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (Fig.7B). As famílias *Lactobacillaceae* e *Aerococaceae* apresentaram correlação negativa com o índice de adiposidade, PAM e níveis plasmáticos de TAG, colesterol total e glicose. Além disso, a família *Aerococaceae* foi negativamente correlacionada com a ingestão calórica e os níveis de insulina plasmática na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (Fig.7B).

Porém, o número de OTUs das bactérias da família *Acholeplasmataceae* apresentou correlação positiva, enquanto *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* e a *Spirochaetaceae* apresentaram uma correlação negativa com os níveis plasmáticos de colesterol total na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H comparado a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C que apresentaram essas correlações negativas e positivas com esses parâmetros, respectivamente (Fig.7B). Já as bactérias *Erysipelotrichaceae*, *Eubacteraceae* apresentaram correlação negativa com a PAM, e apenas a *Lachospiraceae*, apresentou correlação positiva na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H comparado a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C que apresentaram essas correlações positivas e negativas com esses parâmetros, respectivamente (Fig.7B). Já as

famílias *Eubacteraceae* e *Erysipelotrichaceae* apresentaram correlação negativa com os níveis plasmáticos de insulina, na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H comparado a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C que apresentaram essas correlações positivas com esse parâmetro, respectivamente (Fig.7B).

E ainda de forma exclusiva a *Desulfovibrionaceae*, *Enterococcaceae* e *Prochlorococcaceae* apresentaram correlação negativa com a PAM e os níveis plasmáticos de leptina e correlação positiva com os níveis plasmáticos de insulina, HOMA-IR e HOMA- $\beta$  na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C que consumiram DC (Fig.7B).

E finalmente, o número de OTUs de quaisquer bactérias não apresentou nenhum tipo de correlação com os níveis plasmáticos de MCP-1 e de glicose na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C que consumiram DC (Fig.7B).



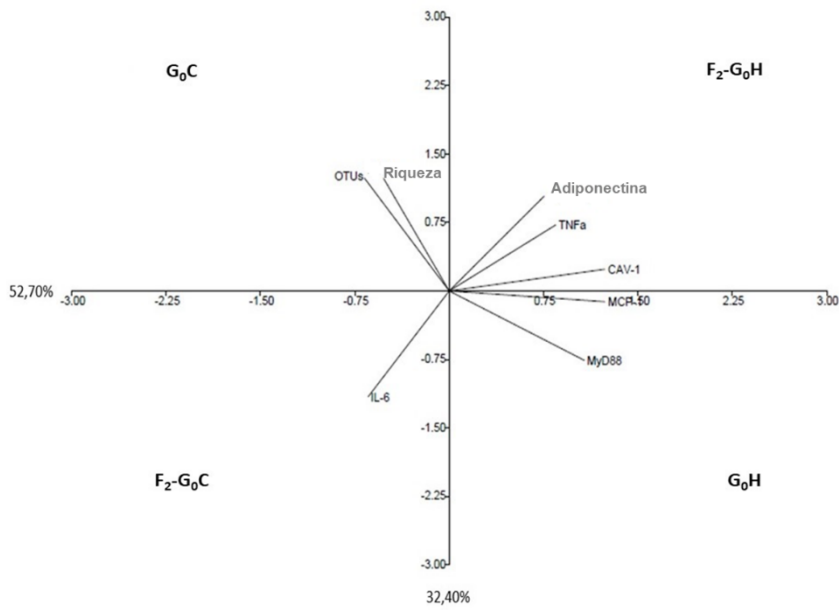
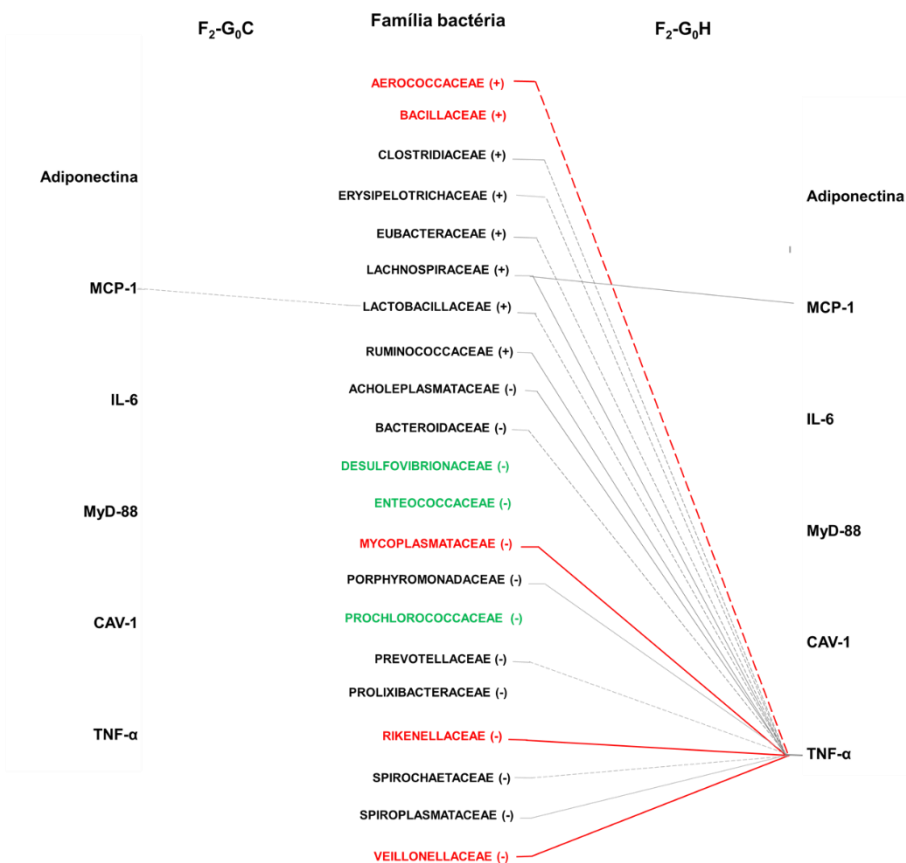
**Figura 7: Análise dos componentes principais (PCA; painel A) e correlação de Pearson's (painel B) entre microbiota fecal e marcadores bioquímicos, hemodinâmicos e plasmáticos da prole F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C, n=6) que consumiu DC após desmame até completar 90 dias de idade. A linha sólida representa uma correlação positiva e a linha pontilhada representa uma correlação negativa. Em verde correlação exclusiva de F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C, em vermelho correlação exclusiva de F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H, em azul correlação contrária entre F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e em cinza correlações presentes em todos os grupos.**

### **5.7 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G<sub>0</sub>H induziu correlação entre a microbiota fecal e a expressão gênica de TNF- $\alpha$ no depósito de gordura retroperitoneal na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H**

O componente 1 explicou 52,7% da variação total da expressão gênica de marcadores inflamatórios no depósito de gordura retroperitoneal, sendo que a progenitora G<sub>0</sub>H apresentou maior relação com a expressão gênica de *MCP-1* e *MyD-88*. Enquanto o componente 2 explicou 32,4% da variação total de bactérias na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H com maior relação entre a expressão gênica de *adiponectina*, *TNF- $\alpha$*  e *CAV-1* (Fig.8A).

De forma exclusiva, o número de OTUs das bactérias das famílias *Mycoplasmataceae*, *Rikenellaceae*, e a *Veillonellaceae* apresentaram correlação positiva com a expressão gênica de *TNF- $\alpha$*  no depósito de gordura retroperitoneal na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (Fig.8B). Já a *Bacillaceae* não apresentou correlação no depósito de gordura retroperitoneal na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (Fig.8B). E ainda de forma exclusiva as famílias *Desulfovibrionaceae*, *Enterococcaceae* e *Prochlorococcaceae* não apresentaram correlação no depósito de gordura retroperitoneal na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C que consumiu DC (Fig.8B).

Além disso, o número de OTUs das bactérias das famílias *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Acholeplasmataceae*, *Spiroplasmataceae* e *Porphyromonadaceae*, apresentaram correlação positiva e as bactérias *Aerococcaceae*, *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Eubacteraceae*, *Lactobacillaceae*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* e *Spirochaetaceae* apresentaram correlação negativa com a expressão gênica de *TNF- $\alpha$*  no depósito de gordura retroperitoneal somente na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (Fig.8B). Por outro lado, o número de OTUs de quaisquer bactérias não apresentaram nenhum tipo de correlação com a expressão gênica de *adiponectina*, *IL-6*, *MyD-88*, *CAV-1* e *TNF- $\alpha$*  no depósito de gordura retroperitoneal na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C que consumiu DC (Fig.8B).

**A****B**

**Figura 8: Análise dos componentes principais (PCA; painel A) e correlação de Pearson's (painel B) entre abundância da microbiota fecal e marcadores inflamatórios no depósito de gordura retroperitoneal da prole F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C; n=6) que consumiram DC após desmame até completar 90 dias de idade. A linha sólida representa correlação positiva e a linha pontilhada representa correlação negativa. Em verde correlação exclusiva de F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C, em vermelho correlação exclusiva de F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H, em azul correlação contrária entre F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e em cinza correlações presentes em todos os grupos.**

## 5.8 A dieta hiperlipídica ingerida pela progenitora G<sub>0</sub>H induziu correlação entre a microbiota fecal e expressão gênica de TJP-1 no cólon da prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H

O componente 1 explicou 60,5% da variação total da expressão gênica de marcadores inflamatórios no cólon apresentando maior relação com a expressão gênica de *CAV-1*, *MCP-1*, *TLR-4*, *TJP-1*, e *IL-6* para progenitora G<sub>0</sub>H. Já o componente 2 explicou 27,46% da variação total dos parâmetros do cólon apresentando maior relação entre a riqueza de bactérias, a expressão gênica de *adiponectina*, *TLR-2*, *MyD88*, *TNF- $\alpha$*  na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (Fig. 9A).

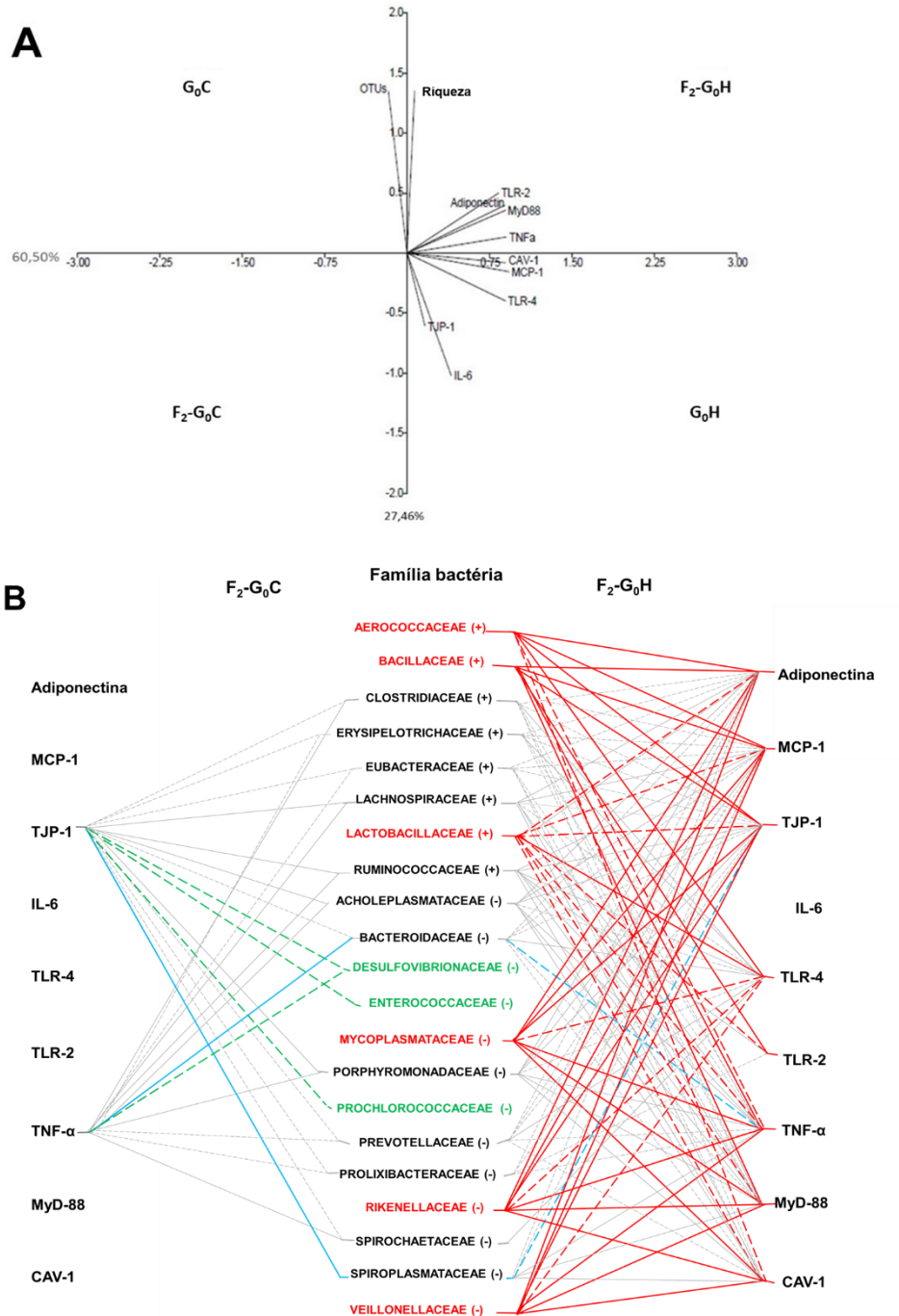
De forma exclusiva, o número de OTUs da família *Bacillaceae* apresentou correlação positiva com expressão gênica de *adiponectina*, *MCP-1*, *TJP-1*, *TLR-2*, *TNF- $\alpha$* , *MyD-88* no cólon na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (Fig.9B). A *Aerococcaceae* apresentou correlação positiva com a expressão gênica de *adiponectina*, *MCP-1*, *TJP-1*, *TLR-4* e correlação negativa com a expressão gênica de *TNF- $\alpha$*  e *CAV-1* na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H. A *Veillonellaceae*, *Mycoplasmataceae* e *Rikenellaceae* apresentaram correlação positiva com a expressão gênica de *adiponectina*, *MCP-1*, *TJP-1*, *TNF- $\alpha$* , *MyD-88*, *CAV-1* e correlação negativa com a expressão gênica de *TLR-4* no cólon na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (Fig.9B). E ainda *Lactobacillaceae* apresentou correlação positiva com a expressão gênica de *TLR-4* e correlação negativa com a expressão gênica de *adiponectina*, *MCP-1*, *TJP-1*, *TRL-2*, *TNF- $\alpha$* , *MyD-88* e *CAV-1* no cólon na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H (Fig.9B).

E ainda de forma exclusiva, *Enterococcaceae*, *Desulfovibrionaceae* e *Prochlorococcaceae* apresentaram correlação negativa com a expressão gênica de *TJP-1*. E a *Desulfovibrionaceae* apresentou correlação negativa com a expressão gênica de *TNF- $\alpha$*  no cólon na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C que consumiu DC (Fig.9B).

Além disso, o número de OTUs da família *Spiroplasmataceae* apresentou correlação negativa com a expressão gênica de *TJP-1* no cólon na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H comparado a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C que apresentou correlação positiva com esse mesmo parâmetro (Fig.9B). A *Bacteroidaceae* apresentou correlação negativa com a expressão gênica de *TNF- $\alpha$*  no cólon na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H comparado a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C que apresentou correlação positiva com esse mesmo parâmetro (Fig.9B).

No entanto, não foi observado nenhum tipo de correlação entre o número de OTUs de quaisquer bactérias com a expressão gênica de *adiponectina*, *MCP-1*, *IL-6*, *TLR-4*, *TLR-2*, *MyD-88* e *CAV-1* no cólon da prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C que consumiu DC (Fig.9B).





**Figura 9: Análise dos componentes principais (PCA; painel A) e correlação de Pearson's (painel B) entre microbiota fecal e marcadores inflamatórios no cólon da prole F<sub>2</sub> (F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C; n=6) que consumiram DC após desmame até completar 90 dias de idade. A linha sólida representa uma correlação positiva e a linha pontilhada representa uma correlação negativa. Em verde correlação exclusiva de F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C, em vermelho correlação exclusiva de F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H, em azul correlação contrária entre F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C e F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H e em cinza correlações presentes em todos os grupos.**

**Tabela 6:** Abundância relativa (%) de família de bactérias da microbiota fecal da prole F<sub>2</sub>.G<sub>0</sub>H oriundas de progenitoras (G<sub>0</sub>H) que consumiram dieta hiperlipídica

<b>Bactérias</b>	<b>G<sub>0</sub>C</b>	<b>G<sub>0</sub>H</b>	<b>F<sub>2</sub>.G<sub>0</sub>C</b>	<b>F<sub>2</sub>.G<sub>0</sub>H</b>
<b>Filo Actinobacteria (-)</b>				
<i>Desulfovibrionaceae</i> (-)	0,00	0,00	0,03	0,00
<i>Prochlorococcaceae</i> (-)	0,00	0,00	0,01	0,00
<b>Subtotal</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,04%</b>	<b>0,00%</b>
<b>Filo Bacteroidetes (-)</b>				
<i>Bacteroidaceae</i> (-)	0,92	13,28	0,65	7,96
<i>Porphyromonadaceae</i> (-)	4,83	6,32	2,69	0,23
<i>Prevotellaceae</i> (-)	69,58	20,92	81,63	78,16
<i>Prolixibacteraceae</i> (-)	0,22	0,34	0,37	1,14
<i>Rikenellaceae</i> (-)	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,36</b>
<b>Subtotal</b>	<b>75,56%</b>	<b>40,85%</b>	<b>85,40%</b>	<b>87,86%</b>
<b>Filo Cyanobacteria (-)</b>				
<i>Aerococcaceae</i> (+)	0,00	0,00	0,00	0,02
<b>Subtotal</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,02%</b>
<b>Filo Fibrobacteres (-)</b>				
<i>Fibrobacteraceae</i> (-)	0,00	0,00	0,02	0,01
<b>Subtotal</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,02%</b>	<b>0,01%</b>
<b>Filo Firmicutes (+)</b>				
<i>Bacillaceae</i> (+)	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,26</b>
<i>Clostridiaceae</i> (+)	1,38	3,02	1,11	0,69
<i>Erysipelotrichaceae</i> (+)	0,39	0,68	0,28	0,20
<i>Eubacteraceae</i> (+)	6,77	22,48	2,90	0,83
<i>Lachospiraceae</i> (+)	0,86	3,33	1,57	2,51
<i>Lactobacillaceae</i> (+)	3,81	16,37	1,40	0,42
<i>Ruminococcaceae</i> (+)	0,55	2,50	0,91	1,69
<b>Subtotal</b>	<b>13,76%</b>	<b>48,38%</b>	<b>8,30%</b>	<b>6,61%</b>
<b>Filo Firmicutes (-)</b>				
<i>Veillonellaceae</i>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,33</b>
<b>Subtotal</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,33%</b>
<b>Filo Proteobacteria (-)</b>				
<i>Enterococcaceae</i>	0,00	0,00	0,02	0,00
<b>Subtotal</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,00%</b>	<b>0,02%</b>	<b>0,00%</b>
<b>Filo Spirochaetes (-)</b>				
<i>Spirochaetaceae</i> (-)	1,99	1,04	5,95	2,16
<b>Subtotal</b>	<b>1,99%</b>	<b>1,04%</b>	<b>5,95%</b>	<b>2,16%</b>
<b>Filo Tenericutes (-)</b>				
<i>Acholeplasmataceae</i> (-)	6,79	9,70	0,21	2,58
<i>Mycoplasmataceae</i> (-)	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,06</b>
<i>Spiroplasmataceae</i> (-)	1,90	0,03	0,06	0,36
<b>Subtotal</b>	<b>8,69%</b>	<b>9,73%</b>	<b>0,27%</b>	<b>3,01%</b>
<b>Total</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>

## 6 DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que o consumo da DH pela progenitora durante um curto período de tempo (acasalamento, gestação e lactação) induziu na prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H aumento na ingesta calórica da DC, inflamação e aumento no índice de adiposidade, resistência à leptina e à insulina. Além disso, a prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H apresentou alterações na microbiota intestinal e diferentes distúrbios cardiometabólicos.

Dados anteriores de nosso estudo (BARBOSA et al., 2020) mostraram que as progenitoras G<sub>0</sub>H apresentaram distúrbios característicos da SM que foram transmitidos aos seus descendentes F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub>, apesar de terem sido alimentados somente com DC após desmame. No presente estudo, as progenitoras G<sub>0</sub>H reduziram quantidade de ingesta da DH tornando a ingesta calórica semelhante à DC ingerida pelos progenitores G<sub>0</sub>C. No entanto, a prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H ingeriu maior quantidade de DC do que a prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>C. Tanto a progenitora G<sub>0</sub>H quanto a prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H apresentaram alterações na microbiota intestinal, aumento da PAM, dos níveis plasmáticos de leptina, glicose, TAG, índice de adiposidade, HOMA-IR, aumento na expressão gênica de *TNF-α*, *MCP-1*, *MyD-88* e *CAV-1* no depósito de gordura retroperitoneal e aumento na expressão gênica de *MCP-1*, *TLR-4*, *TLR-2*, *TNF-α*, *MyD-88*, *CAV-1* e aumento da expressão gênica de *TJP-1* na progenitora e redução na prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H no cólon. Esses distúrbios foram induzidos provavelmente pelo aumento dos níveis de leptina e ou insulina nos grupos (G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H). De fato, estudos na literatura mostraram que a ingestão de DH pode alterar a via de sinalização da leptina e insulina em ratos Sprague-Dawley (PARK et al., 2001) e em camundongos (WHITE et al., 2013) e aumento nos níveis plasmáticos de glicose e de TAG e expressão gênica de *TNF-α*, *IL-6* e *adiponectina* no depósito de gordura retroperitoneal (PARK et al., 2001; CEDDIA et al., 2005; PAZ-FILHO, 2012). No presente estudo, ambos os grupos, progenitora G<sub>0</sub>H e prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H, apresentaram resistência à leptina e à insulina e inflamação no depósito de gordura retroperitoneal.

HUANG et al. (2017) demonstraram que o consumo da DH durante oito semanas antes do acasalamento e mais seis semanas nos períodos de acasalamento, gestação e lactação também induziu intolerância à glicose na progenitora G<sub>0</sub> e na prole F<sub>2</sub> de ratos, apesar de ter sido alimentada com DC após desmame. Nesse estudo foi observado ainda que a DH materna induziu aumento nos níveis plasmáticos de glicose de jejum na prole F<sub>2</sub> com três semanas de idade e redução dos níveis plasmáticos de insulina e do HOMA-β na prole F<sub>2</sub> com três e doze semanas de idade indicando que a DH materna durante a pré-gestação, gestação e lactação levou a intolerância à glicose devido ao prejuízo na

função e proliferação das células  $\beta$  pancreáticas (HUANG et al., 2017). No nosso modelo animal, observamos que a DH materna induziu hiperinsulinemia, intolerância à glicose e redução no HOMA- $\beta$  na prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H.

Além disso, nossos dados sugerem um aumento entre os níveis plasmáticos de leptina e expressão gênica de *MCP-1*, *TNF- $\alpha$* , *MyD-88* e *CAV-1* e redução na expressão gênica de *IL-6* no depósito de gordura retroperitoneal com aumento da abundância de bactérias do filo Firmicutes e diminuição do filo Bacteroidetes na microbiota intestinal das progenitoras G<sub>0</sub>H. A IL-6 é uma citocina não só envolvida em respostas de inflamação e infecção, mas também na regulação de processos metabólicos, regenerativos e neurais. A IL-6 tem propriedades pró e anti-inflamatórias, considerando que poucas células expressam o receptor IL-6 e respondem ao IL-6 (sinalização clássica), todas as células podem ser estimuladas através de um receptor IL-6 solúvel (trans-sinalização). A sinalização clássica e trans pode ser inibida diferencialmente. Aparentemente, o IL-6 via sinalização clássica tem funções regenerativas e anti-inflamatórias, enquanto a sinalização trans é pró-inflamatória (SCHELLER et al., 2011).

Nossos dados são corroborados com o estudo de EVERARD et al. (2011) que relatou que camundongos C57BL/6J alimentados com DH (60% de gordura) por 8 semanas apresentaram resistência à leptina, aumento do filo Firmicutes e redução do filo Bacteroidetes, sugerindo que a sensibilidade à leptina modula a microbiota intestinal. A DH e a microbiota intestinal através de seus metabólitos podem regular as condições inflamatórias, metabólicas e hemodinâmicas do hospedeiro (BELKAID E HAND, 2014; ARRIETA et al., 2015; KNIP E SILIJANDER, 2016; MEIJNIKMAN et al., 2018), no entanto, não encontramos estudos na literatura avaliando os efeitos intergeracionais da DH na microbiota intestinal.

Dados da literatura utilizando grande variedade de modelos animais mostraram que a DH está relacionada a abundância de diferentes famílias de bactérias no intestino tais como camundongos alimentados com DH (43% de gordura) apresentaram aumento de *Erysipelotrichaceae* (FLEISSNER et al., 2010), ratos Wistar alimentados com DH (45% de gordura) apresentaram redução da abundância de *Prevotellaceae* e aumento de *Clostridiaceae* (HAMILTON et al., 2015). Ademais, estudos da literatura mostraram que a DH e/ou situações de resistência à insulina e aumento do índice de adiposidade estão associados a abundância de *Desulfovibrionaceae* e *Enterococcaceae* em camundongos C57BL/6 (CAMPBELL et al., 2019; LIU et al., 2021) e camundongos RELM $\beta$  KO (modelo experimental de colite) (HILDEBRANT et al., 2009) e camundongos *ApoA1*<sup>-/-</sup>

(ZHANG et al., 2010) mostrado pela redução da abundância de *Prevotellaceae* e aumento de *Clostridiaceae* no íleo de ratos que consumiram DH por uma semana. De fato, KREZNAR et al. (2017) mostraram em camundongos C57BL/6 que consumiram DH apresentaram níveis mais elevados de *Bacteroidaceae* que foi associado ao aumento da massa corporal e da secreção de insulina, sugerindo que a microbiota altera o fenótipo metabólico. E ainda, estudos em humanos obesos e hipertensos mostraram que chineses apresentaram aumento na abundância de *Erysipelotrichaceae* (LI et al., 2019) enquanto mulheres holandesas apresentaram redução na abundância de *Ruminococcaceae* nas fezes (VERHAAR et al., 2020). Por outro lado, KARLSSON et al. (2012) mostraram níveis reduzidos de *Desulfovibrionaceae* nas fezes de crianças suecas com sobrepeso e obesas.

Na prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H não houve diferença na diversidade nos níveis de filo e família pelo índice de Simpson e Shannon. Assim, XIE et al. (2018) mostraram em camundongos descendentes de F<sub>1</sub> de genitoras alimentadas com DH, não apresentaram diferença na diversidade da microbiota pelo índice de Simpson e Shannon nas 5 semanas. No entanto, no presente estudo, houve dissimilaridade entre os grupos (G<sub>0</sub>C, G<sub>0</sub>H, F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>C, F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H) (pelo SIMPER), mostrando predominância do filo Bacteroidetes e da família *Prevotellaceae*, que estão relacionados ao consumo da DC. Os resultados do presente estudo demonstraram um aumento na riqueza e abundância nos níveis de filo e família na prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H, mostrando que a composição da comunidade de bactérias altera entre os grupos F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>C e F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H. Por outro lado, o grupo (F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>C) apresentou exclusividade para três famílias *Desulfovibrionaceae*, *Prochlorococcaceae* e *Enterococcaceae* que se relacionaram negativamente com os níveis plasmáticos de leptina sugerindo que a leptina pode estar relacionada a alterações na microbiota intestinal. Além disso, no presente estudo as famílias de bactérias (*Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Eubacteraceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Acholeplasmataceae*, *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae*, *Spirochaetaceae* e *Spiroplasmataceae*) que apesar de comuns entre todos os grupos, apresentaram correlações opostas (negativa, positiva ou vice-versa) entre os grupos F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>C com os níveis plasmáticos insulina e colesterol total, PAM e expressão gênica de *TNF-α* no depósito de gordura retroperitoneal e expressão gênica de *TJP-1* no cólon, reforçando o papel destas famílias de bactérias no estado fisiológico do hospedeiro.

No grupo F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H, foram encontradas cinco famílias de bactérias exclusivas (*Rikenellaceae*, *Bacillaceae*, *Veilonellaceae*, *Mycoplasmataceae* e *Aerococcaceae*) que se correlacionaram com alterações cardiometabólicas apresentadas pelo aumento da

PAM, níveis plasmáticos de leptina, de insulina, de glicose, de TAG e de colesterol total, índice de adiposidade, ingestão calórica, HOMA- $\beta$  e processos inflamatórios evidenciados pelo aumento da expressão gênica de *TNF- $\alpha$*  no depósito de gordura retroperitoneal e aumento na expressão gênica de *adiponectina*, *MCP-1*, *TJP-1*, *TLR-4*, *TLR-2*, *TNF- $\alpha$* , *MyD-88* e *CAV-1* no cólon. Esses distúrbios provavelmente foram induzidos pelo aumento dos níveis de leptina e ou insulina observados nestes ratos.

Estudos da literatura mostram que as famílias das bactérias *Rikenellaceae*, *Veillonellaceae* e *Bacillaceae* presentes na microbiota intestinal exclusivamente na prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H estão relacionadas com o aumento de mediadores inflamatórios (GEURTS et al., 2011; KIM et al. 2019; O'DONAVAN et al. 2020). De fato, estudos mostraram que o aumento na abundância de *Rikenellaceae* parece induzir aumento da expressão gênica de *TNF- $\alpha$*  e *MCP-1* no TAB de camundongos (db/db) que apresentaram diabetes tipo 2 e são resistentes a leptina que consumiram DC (GEURTS et al., 2011) e aumento dos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-6 e níveis proteicos de TLR-4 no cólon induzindo aumento da permeabilidade intestinal via TLR-4, piorando o quadro de obesidade em camundongos C57BL/6J que consumiram DH (60% de gordura) (KIM et al. 2019). Ademais, O'DONAVAN et al. (2020) mostraram que a abundância de *Veillonellaceae* no intestino de porcos alimentados com DH apresentou correlação com o aumento nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , de glicose e de insulina. Adicionalmente, dados da literatura mostraram aumento da abundância de *Bacillaceae* correlacionado com o processo inflamatório no intestino tanto em camundongos CB57BL/6 com colite induzida por sulfato de dextrano de sódio que apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- $\alpha$  (DE FAZIO et al., 2014) como em humanos com doença de Crohn (MARLOW et al., 2013).

Além disso, estudos mostraram que alterações na microbiota intestinal relacionada a dieta pode alterar a permeabilidade intestinal induzindo a inflamação e distúrbios metabólicos (SUZUKI E HARA, 2010; LOBIONDA et al., 2019). De fato, as famílias *Bacteroidaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Ruminococcaceae* foram correlacionadas com aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 e expressão gênica de *TJP-1* no cólon de camundongos com colite induzida por deleção de TNF- $\alpha$  (TNF<sup>deltaARE</sup>) (SCHAUBECK et al., 2016), em ratos Sprague-Dawley que consumiram dieta de cafeteria (QU et al., 2017), em camundongos C57BL/6J alimentados com DH (Kim et al., 2019), em camundongos machos C57BL/6J que ingeriram sulfonato de perfluorooctano para indução de doença hepática gordurosa não alcoólica (WANG et al., 2020). Nossos dados

estão de acordo com esses estudos que mostraram que a prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H apresentou correlação contrária ao grupo F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>C para as famílias *Bacteroidaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Spiroplasmataceae*, *Ruminococaceae* para a expressão gênica de *TJP-1*, *TNF-α* e *CAV-1* no cólon. Todas essas variedades de observações da literatura mostraram que alterações no epitélio e na microbiota intestinal são dinâmicas e dependentes da região intestinal, do período da ingesta da DH, da idade e espécie animal (SCHAUBECK et al., 2016; WANG et al., 2020).

Estudos mostraram que o consumo da DH pode alterar a microbiota, aumentar a permeabilidade da membrana (BRUN et al., 2006) e reduzir a expressão gênica de *TJP-1* no intestino em camundongos e ratos com diabetes (MUJAWDIJA et al., 2020, CHEHADE et al., 2002; RINCON et al., 2006). Adicionalmente, ratos Sprague-Dawley com RI alimentados com DH apresentaram um prejuízo na interação entre a fosforilação da *CAV-1* e a via de sinalização da insulina, que pode estar relacionada à inflamação e a expansão do TAB (YANG et al., 2007). Nossos dados estão de acordo com a literatura em que a expansão do TAB leva a um quadro de inflamação crônica de baixo grau com aumento da expressão gênica de *MyD-88* e *TLR-4* (BELKAID E HAND, 2014).

Certos estudos demonstraram que progenitores que consumiram DH apresentaram alteração na composição da microbiota intestinal da prole F<sub>1</sub> (XIE, et al., 2018; WANKHADE et al., 2018, GUO et al., 2018). Esses poucos estudos na literatura utilizaram camundongos ou ratos mostraram diferenças na duração e composição da dieta para os progenitores e ou descendência F<sub>1</sub>. No entanto, em geral, esses estudos mostraram que a alimentação de progenitores com DH induz na prole F<sub>1</sub> aumento na expressão gênica de *TNF-α*, *IL-6* e nos níveis proteicos de *TJP-1* sem inflamação na cripta intestinal. Mas foi demonstrado um predomínio das famílias *Clostridiaceae*, *Lachnospiraceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae* e *Ruminococcaceae* sugerindo que a microbiota intestinal pode regular o processo inflamatório, condições metabólicas e hemodinâmicas da prole F<sub>1</sub> (XIE, et al., 2018; WANKHADE et al., 2018, GUO et al., 2018). Embora os estudos mencionados acima não tenham sido avaliados na prole F<sub>2</sub>, os dados da prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H do presente estudo estão de acordo com esses estudos. A prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H não apresentou inflamação, mas aumentou as citocinas inflamatórias indicando inflamação de baixo grau e apresentou correlação oposta ao grupo F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>C para as famílias *Bacteroidaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Spiroplasmataceae* e *Ruminococcaceae* para a expressão gênica de *TJP-1*, *TNF-α* e *CAV-1* no cólon, sugerindo aumento da permeabilidade intestinal que pode contribuir para inflamação sistêmica de baixo grau.

No presente estudo, o consumo de DH pela progenitora G<sub>0</sub>H induziu redução na expressão gênica de *TJP-1* no cólon, que desempenham papel importante na manutenção da integridade e permeabilidade do epitélio intestinal, podendo estar associada a inflamação no cólon e infiltração de células inflamatórias com intensidade moderada e extensão leve na cripta intestinal, sugerindo aumento da permeabilidade da membrana intestinal e inflamação local. Além disso, as progenitoras G<sub>0</sub>H, mostraram redução na abundância da família *Prevotellaceae* e aumento da família *Eubacteraceae* e *Lactobacillaceae* da microbiota intestinal, RI e aumento da expressão gênica de *CAV-1* que é uma proteína de membrana integral, envolvida em múltiplas funções celulares, sendo fundamental para a sinalização mediada pelo receptor de insulina, secreção de insulina e o desenvolvimento da RI, sugerindo crosstalk entre *CAV-1* e a via da insulina, induzindo expansão do depósito de gordura retroperitoneal e inflamação sistêmica induzida pela DH (HADDAD et al., 2020). Esses distúrbios presentes na progenitora G<sub>0</sub>H foram transferidos para a prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H.

Além disso, dados da literatura com diversos modelos experimentais como camundongos (FLEISSNER et al., 2010; MARTINEZ et al., 2019; CAMPBELL et al., 2019; LIU et al., 2021), ratos (HAMILTON et al., 2015), codornas japonesas suscetíveis à aterosclerose e codornas resistentes à aterosclerose (LIU et al., 2015) e humanos (KARLSSON et al., 2012; LI et al., 2019; VERHAAR et al., 2020) alimentados com DH são relacionados à abundância de diferentes famílias de bactérias no intestino como as famílias: *Erysipelotrichaceae*, *Spiroplasmataceae*, *Prevotellaceae*, *Clostridiaceae*, *Desulfovibrionaceae*, *Enterococcaceae*, *Bacteroidaceae* e *Ruminococcaceae*.

No presente estudo o consumo da DH pela progenitora G<sub>0</sub>H induziu no cólon redução na expressão gênica do *TJP-1*, infiltração de células inflamatórias e dano mucosal na cripta, sugerindo aumento da permeabilidade da membrana intestinal. Além de alterações na microbiota com redução da abundância de *Prevotellaceae* e aumento de *Clostridiaceae*, e ainda RI e aumento na expressão gênica de *CAV-1*, que pode estar relacionado com o desequilíbrio no crosstalk entre estas vias, induzindo expansão do depósito de gordura retroperitoneal e inflamação sistêmica na progenitora G<sub>0</sub>H, que foi transferido para a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H.

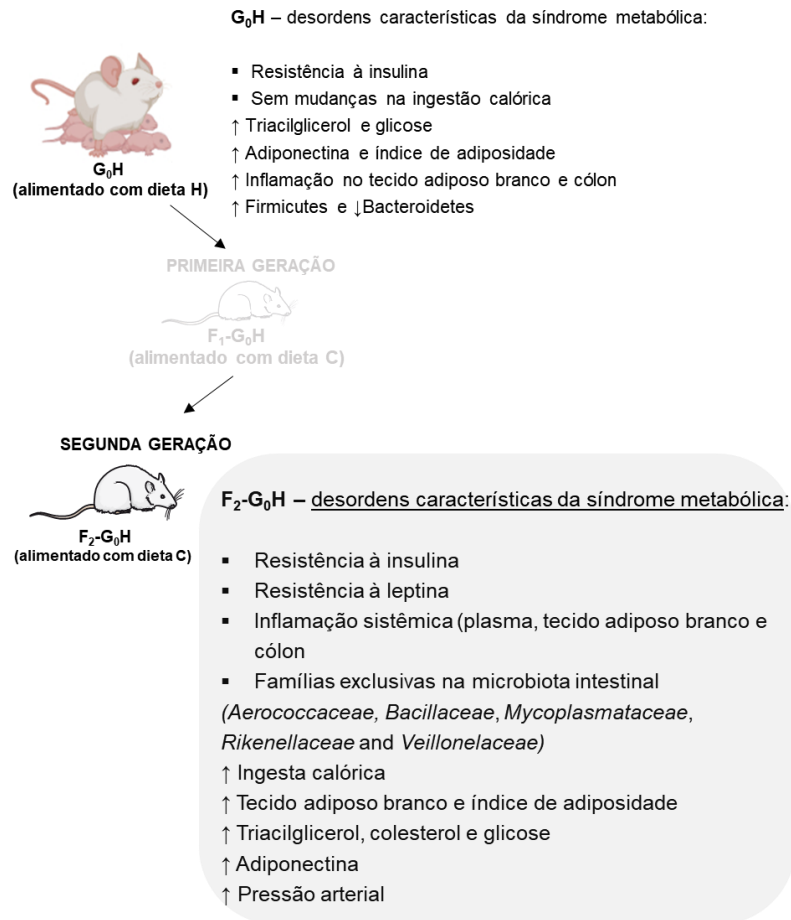
Em conjunto, nossos dados sugerem que os distúrbios induzidos pela DH na progenitora G<sub>0</sub>H levaram a diversas alterações na microbiota, no metabolismo do depósito de gordura retroperitoneal e no aumento da ingesta de DC pela prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H. Um possível mecanismo de que o aumento da ingesta da DC pela prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H favoreceu a



expansão do depósito de gordura retroperitoneal que levou ao processo inflamatório e aumento dos níveis plasmáticos de leptina que parece ter induzido a expressão gênica de *CAV-1*, como demonstrado pela correlação entre os níveis plasmáticos de leptina e expressão gênica de *CAV-1* ( $r=0.9078$ ). Esses dados, juntamente com o aumento da expressão gênica de *TJP-1*, sugerem maior permeabilidade de membrana e disponibilidade de componentes da dieta, que atuam como substrato para bactérias, levando ao aumento da diversidade com a presença das famílias *Aerococcaceae*, *Rikenellaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Bacillaceae*, *Veilonellaceae* e *Lactobacillaceae* na prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H. Embora o papel dessas famílias bacterianas na SM ainda não seja claro, nossos dados juntos sugerem que mudanças específicas na microbiota intestinal não são apenas dependentes da dieta ingerida, mas estão intimamente relacionadas ao fenótipo da SM herdado pela prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H.

Assim, as progenitoras G<sub>0</sub>H alimentadas com DH durante o acasalamento, gestação e lactação apresentaram alterações cardiometabólicas, na microbiota intestinal e no ambiente uterino, que provavelmente, por meio de modificações intergeracionais, alteraram as células germinativas da prole F<sub>1</sub>G<sub>0</sub>H que se transferiu para a segunda geração F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H esses distúrbios cardiometabólicos e alterações na microbiota intestinal. No entanto, apesar de sugerirmos o aumento dos níveis plasmáticos de leptina e de insulina e a alteração na microbiota como possíveis gatilhos para induzir distúrbios cardiometabólicos na prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H, mais estudos são necessários para confirmar essa sugestão, bem como elucidar os mecanismos intergeracionais envolvidos. O presente estudo apontou a importância da alimentação durante o período de acasalamento, gestação e lactação da progenitora para garantir a saúde de sua prole. Apesar da mudança apresentada na riqueza e dissimilaridade na microbiota intestinal F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H, mais estudos são necessários para esclarecer a substituição ou novo rearranjo entre essas famílias bacterianas entre os grupos F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H e F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>C. Embora essas famílias bacterianas exclusivas tenham uma pequena ocorrência na microbiota intestinal, essas bactérias parecem ser importantes no papel dessa comunidade bacteriana nas condições fisiopatológicas da prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H. Experimentos de inoculação dessas bactérias em animais saudáveis talvez possam confirmar a patogenicidade dessas famílias.

## 7. SUMÁRIO

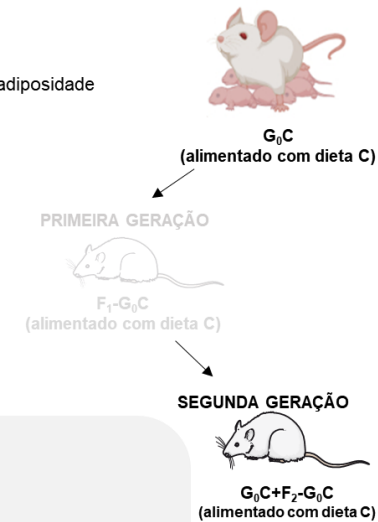


**G<sub>0</sub>C** – níveis normais de:

- ✓ Insulina, glicose
- ✓ Ingesta calórica
- ✓ Triacilglicerol e colesterol
- ✓ Adiponectina e índice de adiposidade
- ✓ Ausência de inflamação
- ✓ Microbiota equilibrada

**F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C** - níveis normais de:

- ✓ Pressão arterial
- ✓ Marcadores bioquímicos e inflamatórios no plasma, tecido adiposo branco e cólon
- ✓ Famílias exclusivas na microbiota intestinal (*Desulfovibrionaceae*, *Enterococcaceae* and *Prochlorococcaceae*)



## 8. CONCLUSÃO

A DH consumida pela progenitora durante o período de acasalamento, gestação e lactação induziu, na prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H, inflamação e expansão do tecido adiposo retroperitoneal, provavelmente devido à resistência da leptina e insulina sustentada pelo aumento do consumo da DC pela prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H. Além disso, a prole F<sub>2</sub>G<sub>0</sub>H apresentou alterações na microbiota intestinal e diferentes distúrbios cardiometabólicos que parecem estar associados as 5 famílias de bactérias exclusivas.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do conjunto de evidências que sugerem nossa conclusão, experimentos adicionais são necessários para confirmar o papel dessas 5 famílias de bactérias exclusivas (*Aerococcaceae*, *Bacillaceae*, *Mycoplasmataceae*, *Rikenellaceae* e *Veillonellaceae*) presentes na prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H na indução dos distúrbios característicos da SM. Nossa sugestão é inocular estas 5 famílias de bactérias exclusivas em animais saudáveis, F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C, provenientes de progenitoras que se alimentaram somente de DC, para observarmos se esses animais F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>C desenvolvem SM. Além disso, experimentos que avaliem a herança intergeracional, como alterações epigenéticas dos genes promotores da leptina, insulina no hipotálamo e dos marcadores inflamatórios no intestino, confirmem a transferência do fenótipo da SM da progenitora G<sub>0</sub>H para a prole F<sub>2</sub>-G<sub>0</sub>H.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALARCON, C. et al. Pancreatic  $\beta$ -cell adaptive plasticity in obesity increases insulin production but adversely affects secretory function. **Diabetes**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 438–450, 2016. DOI: 10.2337/db15-0792.

ALBIGER, B.; DAHLBERG, S.; HENRIQUES-NORMARK, B.; NORMARK, S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: Focus on the Toll-like receptors. **Journal of Internal Medicine**, [S. l.], v. 261, n. 6, p. 511–528, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2007.01821.x.

AMAR, J. et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: Molecular mechanisms and probiotic treatment. **EMBO Molecular Medicine**, [S. l.], v. 3, n. 9, p. 559–572, 2011. DOI: 10.1002/emmm.201100159.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, [S. l.], v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.

ARRIETA, M.; STIEMSMA, L. T.; DIMITRIU, P. A.; THORSON, L.; RUSSELL, S.; YURIST-DOUTSCH, S.; KUZELJEVIC, B.; GOLD, M. J.; BRITTON, H. M.; LEFEBVRE, D. L.; SUBBARAO, P.; MANDHANE, P.; BECKER, A.; MCNAGNY, K. M.; SEARS, M.R.; KOLLMANN, T.; MOHN, W. W.; TURVEY, S. E.; FINLAY, B. B. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. **Sci Transl Med**, 7 (307): 307ra 152, 2015. DOI: 10.1126/scitranslmed.aab2271.

BALISTRERI, C. R.; CARUSO, C.; CANDORE, G. The role of adipose tissue and adipokines in obesity-related inflammatory diseases. **Mediators of Inflammation**, [S. l.], v. 2010, 2010. DOI: 10.1155/2010/802078.

BANERJEE, S.; SCHLAEPPI, K. & van der Heijden, M. G. A. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. **Nat. Rev. Microbiol**, [S. l.], v.16, p. 567–576, 2018.

BANKS, W. A.; LEBEL, C. P. Strategies for the delivery of leptin to the CNS. **Journal of Drug Targeting**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 297–308, 2002. DOI: 10.1080/10611860290031895.

BARBOSA, C. M.; FIGUEIREDO, V. P.; BARBOSA, M. A.; CARDOSO L. M.; ALZAMORA A. C. Maternal high-fat diet triggers metabolic syndrome disorders that are transferred to first and second offspring generations, **British Journal of Nutrition**, 123(1), 59–71, 2020. DOI:10.1017/S0007114519002708.

BAUMLER, A. J. & SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, [S. l.], v. 535, p. 85–93, 2016.

BECKER, C.; HAMMERLE-FICKINGER, A.; RIEDMAIER, I.; PFAFFL, M. W. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. **Methods**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 237–243, 2010. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.01.010.

BELKAID, Y.; HAND, T. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. **Cell**, 157(1): 121–141, 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011

BERRY, David, & WIDDER, S. Deciphering microbial interactions and detecting keystone species with co-occurrence networks. **Front. Microbiol**, [S. l.],v. 5, n. 219, 2014.DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00219>.

BERVOETS, L.; VAN HOORENBEECK, K.; KORTLEVEN, I.; VAN NOTEN, C.; HENS, N.; VAEL, C.; GOOSSENS, H.; DESAGER, K. N.; VANKERCKHOVEN, V. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: A cross-sectional study. **Gut Pathogens**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1, 2013. DOI: 10.1186/1757-4749-5-10.

BOSCHER, CECILE; NABI, I. R. Chapter 3 Role in Cell Signaling. **Advances in experimental medicine and biology**, [S. l.], p. 29–50, 2012.

- BRUN, P.; CASTAGLIUOLO, I.; Di LEO, V.; BUDA, A.; PINZANI, M.; PALÙ, G.; MARTINES D. (2007). Increased intestinal permeability in obese mice: New evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis, **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, 292(2), 518–525, 2006. DOI:10.1152/ajpgi.00024.2006.
- CAMPBELL, C. L.; YU, R.; LI, F.; ZHOU, Q.; CHEN, D.; QI, C.; YIN, Y.; SUN, J. Modulation of fat metabolism and gut microbiota by resveratrol on high-fat diet-induced obese mice, **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, 12, 97–107, 2019. DOI:10.2147/DMSO.S192228.
- CÂNDIDO, F. G.; VALENTE, F. X.; GRZEŚKOWIAK, Ł. M.; MOREIRA, A. P. B.; ROCHA, D. M. U. P.; ALFENAS, R de C. G. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity, **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 69(2), 125–143, 2017. DOI:10.1080/09637486.2017.1343286.
- CANI, P. D.; DELZENNE, N. M.; AMAR, J.; BURCELIN, R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. **Pathologie Biologie**, [S. l.], v. 56, n. 5, p. 305–309, 2008. DOI: 10.1016/j.patbio.2007.09.008.
- CANI, P. D.; NEYRINCK, A. M.; FAVA, F.; KNAUF, C.; BURCELIN, R. G.; TUOHY, K. M.; GIBSON, G. R.; DELZENNE, N. M. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. **Diabetologia**, [S. l.], v. 50, n. 11, p. 2374–2383, 2007. DOI: 10.1007/s00125-007-0791-0.
- CEDDIA, R. B. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: Implications for glucose and fatty acids homeostasis, **International Journal of Obesity**, 29(10), 1175–1183, 2005. DOI:10.1038/sj.ijo.0803025.
- CENAC, N. et al. Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. **American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 161, n. 5, p. 1903–1915, 2002. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64466-5.
- CHEHADE, J. M.; HAAS, M. J.; MOORADIAN, A. D. Diabetes-related changes in rat cerebral occludin and zonula occludens-1 (ZO-1) expression. **Neurochemical Research**, v. 27, n. 3, p.249-252, 2002.
- CHELAKKOT, C.; GHIM, J.; RYU, S. H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. **Experimental and Molecular Medicine**, [S. l.], v. 50, n. 8, 2018. DOI: 10.1038/s12276-018-0126-x.
- CHEN, L.; COLLIJ, V. et al. Gut microbial co-abundance networks show specificity in inflammatory bowel disease and obesity. **Nature**, [S. l.], v.11, n.4018, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17840-y>.
- CHOE, S. S; HUH, J. Y; HWANG, I. J; KIM, J. I; KIM, J. B. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 7, n. APR, p. 1–16, 2016. DOI: 10.3389/fendo.2016.00030.
- CHOI, J. D; LEE, J. Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. **Genomics & Informatics**, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 164, 2013. DOI: 10.5808/gi.2013.11.4.164.
- CLARKE, S. F.; MURPHY, E. F.; NILAWEERA, K; ROSS, P. R.; SHANAHAN, F; COTTER, P. W.; COTTER, P. D. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: New insights. **Gut Microbes**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 186–202, 2012. DOI: 10.4161/gmic.20168.
- COTILLARD, A. et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. **Nature**, [S. l.], v. 500, n. 7464, p. 585–588, 2013. DOI: 10.1038/nature12480.
- COX, J. E.; LAUGHTON, W. B.; POWLEY, T. L. Precise estimation of carcass fat from total body water in rats and mice. **Physiology and Behavior**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 905–910, 1985.

DOI: 10.1016/0031-9384(85)90258-6.

DANIEL, H. et al. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. **ISME Journal**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 295–308, 2014. DOI: 10.1038/ismej.2013.155.

DE CASTRO, U. G. M; DOS SANTOS, R. A. S; SILVA, M. E; DE LIMA, W. G; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J; ALZAMORA, A. C. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. **Lipids in Health and Disease**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–11, 2013. DOI: 10.1186/1476-511X-12-136.

DE FAZIO, L.; CAVAZZA, E.; SPISNI, E.; STRILLACCI, A.; CENTANNI, M.; CANDELA, M.; PRATICÒ, C.; CAMPIERI, M.; RICCI, C.; VALERII, M. C. Longitudinal analysis of inflammation and microbiota dynamics in a model of mild chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. **World Journal of Gastroenterology**, 20(8), 2051–2061, 2014. DOI:10.3748/wjg.v20.i8.2051.

DE FERRANTI, S; MOZAFFARIAN, D. The perfect storm: Obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. **Clinical Chemistry**, [S. l.], v. 54, n. 6, p. 945–955, 2008. DOI: 10.1373/clinchem.2007.100156.

DE LA SERRE, C. B; ELLIS, C. L.; LEE, J; HARTMAN, A. L.; RUTLEDGE, J. C.; RAYBOULD, H. E. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, [S. l.], v. 299, n. 2, p. 440–448, 2010. DOI: 10.1152/ajpgi.00098.2010.

DESAI, M.; JELLYMAN, J. K.; HAN, G.; BEALL, M.; LANE, R. H.; ROSS, M.G. Rat Maternal obesity and high fat diet program offspring metabolic syndrome. **Am J Obstet Gynecol**. 211(3): 237. e1-237 e.237, 2014. DOI: 10.1016/j.ajog.2014.03.025.

DOMINICI, F. P.; BURGHI, V; MUÑOZ, M. C.; GIANI, J. F. Modulation of the action of insulin by angiotensin-(1-7). **Clinical Science**, [S. l.], v. 126, n. 9, p. 613–630, 2014. DOI: 10.1042/CS20130333.

DUCY, P. et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: A central control of bone mass. **Cell**, [S. l.], v. 100, n. 2, p. 197–207, 2000. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81558-5.

EICKHOFF, M. J. & BASSLER, B. L. SnapShot: bacterial quorum sensing. **Cell**, [S. l.], v.174, n.1328, 2018.

EVERARD, A., LAZAREVIC, V., DERRIEN, M., GIRARD, M., MUCCIOLI, G. M., NEYRINCK, A.M., POSSEMIERS, S., VAN HOLLE, A., FRANÇOIS, P., DE VOS, W. M., DELZENNE, N. M., SCHRENZEL, J., CANI, P. D. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice, **Diabetes**, 60(11), 2775–2786, 2011. DOI:10.2337/db11-0227.

FESTI, D; SCHIUMERINI, R; EUSEBI, L. H; MARASCO, G; TADDIA, M; COLECCHIA, A. Gut microbiota and metabolic syndrome. **World Journal of Gastroenterology**, [S. l.], v. 20, n. 43, p. 16079–16094, 2014. DOI: 10.3748/wjg.v20.i43.16079.

FLEIGE, S; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, [S. l.], v. 27, n. 2–3, p. 126–139, 2006. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.003.

FLEISSNER, C. K.; HUEBEL, N.; EL-BARY, M. M.; LOH, G.; KLAUS, S.; BLAUT, M. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. **PLoS One**, 5(10), 10919, 2010. DOI: 10.1017/S0007114510001303.

FOUHY F; CLOONEY A; STANTON C; CLAEISSON M. 16S rRNA gene sequencing of mock microbial populations- impact of DNA extraction method, primer choice and sequencing platform. **BMC Microbiol**, [S. l.], v.16, n. 123, 2016. DOI: 10.1186/s12866-016-0738-z.

- FRANTZ, S; ERTL, G; BAUERSACHS, J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, [S. l.], v. 4, n. 8, p. 444–454, 2007. DOI: 10.1038/ncpcardio0938.
- GALIC, S; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], v. 316, n. 2, p. 129–139, 2010. DOI: 10.1016/j.mce.2009.08.018.
- GERHARDT, C. C.; ROMERO, I. A.; CANCELLO, R.; CAMOIN, L.; STROSBERG, A. D. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], v. 175, n. 1–2, p. 81–92, 2001. DOI: 10.1016/S0303-7207(01)00394-X.
- GEURTS, L.; LAZAREVIC, V.; DERRIEN, M.; EVERARD, A.; ROYE, M. V.; KNAUF, C.; VALET P.; GIRARD, M.; MUCCIOLI, G. G.; FRANÇOIS, P.; DE VOS, J.; SCHRENZEL, W. M.; DELZENNE, N. M.; CANI, P. D. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistance mice: Impact on apelin regulation in adipose tissue. **Front Microbiol**, 2(149), 2011. DOI:10.3389/fmicb.2011.00149.
- GOLDMAN, M. Translational mini-review series on Toll-like receptors: Toll-like receptor ligands as novel pharmaceuticals for allergic disorders. **Clinical and Experimental Immunology**, [S. l.], v. 147, n. 2, p. 208–216, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03296.x.
- GUO, Y.; WANG, Z.; CHEN, L.; TANG, L.; WEN, S.; LIU, Y.; YUAN J. Diet induced maternal obesity affects offspring gut microbiota and persists into young adulthood, **Food and Function**, 9(8), 4317–4327, 2018. DOI:10.1039/c8fo00444g.
- HAMILTON, M. K; BOUDRY, G; LEMAY, D. G.; RAYBOULD, H. E. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, [S. l.], v. 308, n. 10, p. G840–G851, 2015. DOI: 10.1152/ajpgi.00029.2015.
- HEARD, E; MARTIENSSEN, R. A. Transgenerational epigenetic inheritance: Myths and mechanisms. **Cell**, [S. l.], v. 157, n. 1, p. 95–109, 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.045.
- HILDEBRANT, M. A.; HOFFMANN, C.; SHERRILL-MIX, S. A.; KEILBAUGH, S. A.; HAMADY, M.; CHEN, Y.; KNIGHT, R.; AHIMA, R. S.; BUSHMAN, F.; WU, G. D. High fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. **Gastroenterology**, v.137, p. 1716–1724, 2009. DOI:10.1053/j.gastro.2009.08.042.
- HOTTA, K; HIRSHMAN, C. A.; EMALA, C. W. TNF- $\alpha$  increases transcription of G $\alpha$ (i-2) in human airway smooth muscle cells. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, [S. l.], v. 279, n. 2 23-2, p. 319–325, 2000. DOI: 10.1152/ajplung.2000.279.2.1319.
- ISHIKAWA, H.; TANAKA, K.; MAEDA, Y.; AIBA, Y.; HATA, A.; TSUJI, N. M.; KOGA, Y.; MATSUMOTO, T. Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25 + CD4+ T cells. **Clinical and Experimental Immunology**, [S. l.], v. 153, n. 1, p. 127–135, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2008.03668.x.
- KARLSSON, C. L. J.; ÖNNERFÄLT, J.; XU, J.; MOLIN, G.; AHRNÉ, S.; THORNGREN-JERNECK, K. The microbiota of the gut in preschool children with normal and excessive body weight, **Obesity**, 20(11), 2257–2261, 2012. DOI:10.1038/oby.2012.110.
- KAWAI, T; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. **Nature Immunology**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010. DOI: 10.1038/ni.1863.
- KIM, B; CHOI, H; YIM, J. Effect of Diet on the Gut Microbiota Associated with Obesity. **Journal of Obesity & Metabolic Syndrome**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 216–224, 2019. DOI: 10.7570/jomes.2019.28.4.216.
- KLEINRIDERS, A; SCHENTEN, D; KÖNNER, A. C; BELGARDT, B. F.; MAUER, J;

- OKAMURA, T; WUNDERLICH, F. T; MEDZHITOV, R; BRÜNING, J. C. MyD88 Signaling in the CNS Is Required for Development of Fatty Acid-Induced Leptin Resistance and Diet-Induced Obesity. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 249–259, 2009. DOI: 10.1016/j.cmet.2009.08.013.
- KNIP, M.; SILJANDER, H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, 12(3): 154-67, 2016. DOI: 10.1038/nrendo.2015.218. Epub 2016 Jan.
- KÖNNER, A. C; BRÜNING, J. C. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. **Cell Metabolism**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 144–152, 2012. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.07.004.
- KREZNAR, J. H.; KELLER, M. P.; TRAEGER, L. L.; RABAGLIA, M. E.; SCHUELER, K. L.; STAPLETON, D. S.; ZHAO, W.; VIVAS, E. I.; YANDELL, B. S.; BROMAN, A. T.; HAGENBUCH, B.; ATTIE, A. D.; REY, F. E. Host genotype and gut microbiome modulate insulin secretion and diet-induced metabolic phenotypes. **Cell Rep**. 18 (7): 1739-1750, 2017. DOI:10.1016/j.celrep.2017.01.062.
- LAGO, F; DIEGUEZ, C; GÓMEZ-REINO, J; GUALILLO, O. The emerging role of adipokines as mediators of inflammation and immune responses. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, [S. l.], v. 18, n. 3–4, p. 313–325, 2007. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2007.04.007.
- LAM, Y. Y. et al. Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 1–10, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0034233.
- LAM, Y. Y. et al. Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. **Obesity**, [S. l.], v. 23, n. 7, p. 1429–1439, 2015. DOI: 10.1002/oby.21122.
- LEVINE, Jonathan & HILLERISLAMBERS, J. The importance of niches for the maintenance of species diversity. **Nature**, [S. l.], v.461, n.7261, p. 254-7, 2009. DOI: 10.1038/nature08251.
- LEVINE, Jonathan & HILLERISLAMBERS, J. The Maintenance of Species Diversity. **Nature**, [S. l.], v.3 n.10, p.59, 2010.
- LEY, R. E.; BÄCKHED, F; TURNBAUGH, P; LOZUPONE, C. A.; KNIGHT, R. D.; GORDON, J. I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 102, n. 31, p. 11070–11075, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0504978102.
- LI, Q.; BURROUGH, E. R.; GABLER, N. K.; LOVING, C. L.; SAHIN, O.; GOULD, S. A. A soluble and highly fermentable dietary fiber with carbohydrases improved gut barrier integrity markers and growth performance in F18 ETEC challenged pigs. **J. Anim. Sci**, v. 97, p. 2139-2153, 2019. DOI: 10.1093/jas/skz093.
- LIU, S.; BENETT, D. C.; TUN, H. M.; KIM, J.; CHENG, K. M.; ZHANG, H.; LEUNG, F. C. The effect of diet and host genotype on ceca microbiota of japanese quail fed a cholesterol enriched diet. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1092, 2015. DOI:10.3389/fmicb.2015.01092.
- LIU, Z.; DAI, X.; ZHANG, H.; SHI, R.; HUI, Y.; JIN, X.; ZHANG, W.; WANG, L.; WANG, Q.; WANG, D.; WANG, J.; TAN, X.; REN, B.; LIU, X.; ZHAO, T.; WANG, J.; PAN, J.; YUAN, T.; CHU, C.; LIU, X. Gut microbiota mediates intermittent-fasting alleviation of diabetes-induced cognitive impairment, **Nature Communications**, 11(1), 2021. DOI:10.1038/s41467-020-14676-4.
- LOBIONDA, S; SITTIPO, P; KWON, H. Y; LEE, Y. K. The role of gut microbiota in intestinal inflammation with respect to diet and extrinsic stressors. **Microorganisms**, [S. l.], v. 7, n. 8, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7080271.
- MACDONALD, T. T.; MONTELEONE, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. **Science**, [S. l.], v. 307, n. 5717, p. 1920–1925, 2005. DOI: 10.1126/science.1106442.
- MANCHESTER, K. L. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. **BioTechniques**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 968–970, 1996. DOI: 10.2144/96206bm05.



- MARLOW, G.; ELLETT, S.; FERGUSON, I. R.; ZHU, S.; KARUNASINGHE, N.; JESUTHASAN, A. C.; HAN, D. Y.; FRASER, A. G.; FERGUSON, L. Transcriptomics to study the effect of a mediterranean-inspired diet on inflammation in Crohn's disease patients. **Human Genomics**, 7:24, 2013. <http://www.humgenomics.com/content/7/1/24>
- MARTIN, S; FERNANDEZ-ROJO, M. A.; STANLEY, A. C.; BASTIANI, M; OKANO, S; NIXON, S. J.; THOMAS, G; STOW, J. L.; PARTON, R. G. Caveolin-1 Deficiency Leads to Increased Susceptibility to Cell Death and Fibrosis in White Adipose Tissue: Characterization of a Lipodystrophic Model. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. 1–9, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0046242.
- MARTINEZ, N.; PRIETO, I.; HIDALGO, M.; MARTINEZ-RODRIGUES, A. M.; COBO, A.; RAMÍREZ, M.; GÁLVEZ, A.; MARTÍNEZ-CANÁMERO, M. Refined versus extra virgin olive oil high fat diet impact on intestinal microbiota of mice and its relation to different physiological variables. **Microorganisms**, 7, 61, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms7020061.
- MATTHEWS, D. R.; HOSKER, J. P.; RUDENSKI, A. S.; NAYLOR, B. A.; TREACHER, D. F.; TURNER, R. C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, [S. l.], v. 28, n. 7, p. 412–419, 1985. DOI: 10.1007/BF00280883.
- MEIJNIKMAN, A. S.; GERDES, V. E.; NIEUWDORP, M.; HERREMA, H. Evaluating causality of gut microbiota in obesity and diabetes in humans. **Endocrine reviews**, v.39, p.133-153, 2018.
- MESHKANI, R; ADELI, K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Clinical Biochemistry**, [S. l.], v. 42, n. 13–14, p. 1331–1346, 2009. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.05.018.
- MOEHLECKE, M; CANANI, L. H; E SILVA, L. O. J; TRINDADE, M. R. M; FRIEDMAN, R; LEITÃO, C. B. Determinants of body weight regulation in humans. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 152–162, 2016. DOI: 10.1590/2359-399700000129.
- MORAES, A. C. F; SILVA, I. T; PITITTO, B. A; FERREIRA, S. R. Intestinal microbiota and cardiometabolic risk: mechanisms and diet modulation. **Arq. Bras Endocrinol Metab**, [S. l.], v. 4, n. 58, 2014.
- MOREIRA, A. P. B; TEXEIRA, T. F. S; FERREIRA, A. B; DO CARMO G. P. M; DE CÁSSIA G. A. R. Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. **British Journal of Nutrition**, [S. l.], v. 108, n. 5, p. 801–809, 2012. DOI: 10.1017/S0007114512001213.
- MUIR, L. A. et al. Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity. **Obesity**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 597–605, 2016. DOI: 10.1002/oby.21377.
- MUJAWDIJA, P. V.; SHARMA, P.; SHARAD, S.; KAPUR, S. Reversal of increase in intestinal permeability by *Mangifera indica* seed kernel extract in high fat diet induced obese mice. **Pharmaceuticals**, 13(8), 190, 2020. DOI:10.3390/ph13080190.
- NETO, A. S; BOZZA, R; ULBRICH, A; MASCARENHAS, L. P. G; BOGUSZEWSKI, M. C. S; DE CAMPOS, W. Metabolic syndrome in adolescents of different nutritional status. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, [S. l.], v. 56, n. 2, p. 104–109, 2012. DOI: 10.1590/s0004-27302012000200003.
- O'DONOVAN, A. N. et al. Gut microbiome of a porcine model of metabolic syndrome and HF-pEF. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, [S. l.], v. 318, n. 3, p. H590–H603, 2020. DOI: 10.1152/ajpheart.00512.2019.
- OTERO, M; LAGO, R; LAGO, F; CASANUEVA, F. F.; DIEGUEZ, C; GÓMEZ-REINO, J. J; GUALILLO, O. Leptin, from fat to inflammation: Old questions and new insights. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 579, n. 2, p. 295–301, 2005. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.11.024.
- OUCHI, N; WALSH, K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. **Clinica Chimica Acta**, [S.

*l.*], v. 380, n. 1–2, p. 24–30, 2007. DOI: 10.1016/j.cca.2007.01.026.

PALACIOS-ORTEGA, S; VARELA-GURUCEAGA, M; MILAGRO, F. I; MARTÍNEZ, J. A; DE MIGUEL, C. Expression of caveolin 1 is enhanced by DNA demethylation during adipocyte differentiation. Status of insulin signaling. **PLoS ONE**, [*S. l.*], v. 9, n. 4, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0095100.

PARK, S. Y., KIM, Y. W., KIM, J. Y., JANG, E. C., DOH, K. O., LEE, S. K. Effect of high fat diet on insulin resistance: Dietary fat versus visceral fat mass, **Journal of Korean Medical Science**, 16(4), 386–390, 2001. DOI:10.3346/jkms.2001.16.4.386.

PATTI, M. Intergenerational programming of metabolic disease: evidence from human populations and experimental animal models. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 70:1597-1608, 2013. DOI: 10.1007/s00018-013-1298-0.

PAZ-FILHO, G.; MASTRONARDI, C.; BERTOLDI, C. F.; WANG, K. B.; WONG, M.; LICINIO, J. Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 56/9, 2012.

PENTINAT, T; RAMON-KRAUEL, M; CEBRIA, J; DIAZ, R; JIMENEZ-CHILLARON, J. C. Transgenerational inheritance of glucose intolerance in a mouse model of neonatal overnutrition. **Endocrinology**, [*S. l.*], v. 151, n. 12, p. 5617–5623, 2010. DOI: 10.1210/en.2010-0684.

POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in *Tlr4* gene. **Science**, [*S. l.*], v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 1998. DOI: 10.1126/science.282.5396.2085.

PRIMEAU, V.; CODERRE, L.; KARELIS, A. D.; BROCHU, M.; LAVOIE, M. E.; MESSIER, V.; SLADEK, R.; RABASA-LHORET, R. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. **International Journal of Obesity**, [*S. l.*], v. 35, n. 7, p. 971–981, 2011. DOI: 10.1038/ijo.2010.216.

PURDHAM, Daniel M.; ZOU, Min Xu; RAJAPUROHITAM, Venkatesh; KARMAZYN, Morris. Rat heart is a site of leptin production and action. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, [*S. l.*], v. 287, n. 6 56-6, 2004. DOI: 10.1152/ajpheart.00499.2004.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, [*S. l.*], v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993. DOI: 10.1093/jn/123.11.1939.

REXRODE, K. M.; PRADHAN, A; MANSON, J. E.; BURING, J. E.; RIDKER, P. M. Relationship of total and abdominal adiposity with CRP and IL-6 in women. **Annals of Epidemiology**, [*S. l.*], v. 13, n. 10, p. 674–682, 2003. DOI: 10.1016/S1047-2797(03)00053-X.

RINCON-CHOLE, H.; VASYLYEVA, T. L.; PERGOLA, P. E.; BHANDARI, B.; BHANDARI, K.; ZHANG, J.; WANG, W.; GORIN, Y.; BARNES, J. L.; ABBOUD, H. E. ZO-1 expression and phosphorylation in diabetic nephropathy. **Diabetes**, 55, 2006.

SCHAUBECK, M.; CLAVEL, T.; CALASAN, J.; LAGKOUVARDOS, I.; HAANGE, S. B.; JEHMILICH, N.; BASIC, M.; DUPONT, A.; HORNEF, M.; BERGEN, M.; BLEICH, A.; HALLER, D. Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn’s disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. **Gut microbiota**, v. 65, n. 2, p. 225-237, 2016. DOI:10.1136/gutjnl-2015-309714.

SHELLER, J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v.1813, n. 5, p.878-888, 2011.

SCHIRMER, M. et al. Linking the human gut microbiome to inflammatory cytokine production capacity. **Cell**, [*S. l.*], v.167, p.1897, 2016.

- SCHRÖDER, J. M.; HARDER, J. Antimicrobial skin peptides and proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 63, n. 4, p. 469–486, 2006. DOI: 10.1007/s00018-005-5364-0.
- SETHI, J. K.; HOTAMISLIGIL, G. S. Article No. scdb. **Cell & Dev Elopmental Bi Ology**, [S. l.], v. 10, 1999. Disponível em: <http://rrwww.idealibrary.comon>.
- SINGH, P; PETERSON, T. E.; SERT-KUNIYOSHI, F. H.; GLENN, J. A.; DAVISON, D. E; ROMERO-CORRAL, A; PUSALAVIDYASAGAR, S; JENSEN, M. D.; SOMERS, V. K. Leptin signaling in adipose tissue: Role in lipid accumulation and weight gain. **Circulation Research**, [S. l.], v. 111, n. 5, p. 599–603, 2012. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.273656.
- SPELMAN, K; BURNS, J. J.; NICHOLS, D; WINTERS, N; OTTERSBERG, S; TENBORG, M. Factores Mediadores De Citocinas.Pdf. [S. l.], v. 11, n. 2, 2006.
- STEFFENS, S; MACH, F. Adiponectin and adaptive immunity: Linking the bridge from obesity to atherogenesis. **Circulation Research**, [S. l.], v. 102, n. 2, p. 140–142, 2008. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.170274.
- SUZUKI, T; HARA, H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. **Nutrition and Metabolism**, [S. l.], v. 7, p. 1–17, 2010. DOI: 10.1186/1743-7075-7-19.
- TAKEDA, K; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–14, 2005. DOI: 10.1093/intimm/dxh186.
- TSUKUMO, D. M. L.; CARVALHO-FILHO, M. A.; CARVALHEIRA, B. C.; PRADA, O.; HIRABARA, S. M.; SCHENKA, A.; ARAU, E. P.; CURI, R. Prevents Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. **Diabetes**, [S. l.], 2007. DOI: 10.2337/db06-1595.CLS.
- TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; MAHOWALD, M. A.; MAGRINI, V; MARDIS, E. R.; GORDON, J. I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, [S. l.], v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, 2006. DOI: 10.1038/nature05414.
- ULRIKE ERBEN, CHRISTOPH LODDENKEMPER, K. D; , SIMONE SPIECKERMANN, D. H; MARKUS; HEIMESAAT, M.; ZEITZ1, M; , BRITTA SIEGMUND, A. A. K. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. **International journal of clinical and experimental pathology**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. 4557–4576, 2014.
- VERHAAR, B. J. H.; COLLARD, D.; PRODAN, A.; LEVELS, J. H. M.; ZWINDERMAN, A. H.; BÄCKHED, F.; VOGT, L.; PETERS, M. J. L.; MULLER, M.; NIEUWDORP M.; VAN DEN BORN, B. J. H. Associations between gut microbiota, fecal short-chain fatty acids, and blood pressure across ethnic groups: the HELIUS study, **European Heart Journal**, 41(44), 4259–4267, 2020. DOI:10.1093/eurheartj/ehaa704.
- VISHVANATH, L; GUPTA, R. K. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 129, n. 10, p. 4022–4031, 2019. DOI: 10.1172/JCI129191.
- VOLPATO, A. M; SCHULTZ, A; MAGALHÃES-DA-COSTA, E; CORREIA, M. L. De G; ÁGUILA, M. B; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Maternal high-fat diet programs for metabolic disturbances in offspring despite leptin sensitivity. **Neuroendocrinology**, [S. l.], v. 96, n. 4, p. 272–284, 2012. DOI: 10.1159/000336377.
- WANG, J; OBICI, S; MORGAN, K; BARZILAI, N; FENG, Z; ROSSETTI, L. **Resistance**, [S. l.], n. September, 2001.
- WANG, H.; WANG, A. X.; AYLOR, K.; BARRETT, E. J. Caveolin-1 phosphorylation regulates vascular endothelial insulin uptake and is impaired by insulin resistance in rats, **Diabetologia**, 58(6), 1344–1353, 2015. DOI:10.1007/s00125-015-3546-3.
- WANG, P. X; DENG, X. R; ZHANG, C. H; YUAN, H. J. Gut microbiota and metabolic syndrome. **Chinese Medical Journal**, [S. l.], v. 133, n. 7, p. 808–816, 2020. DOI:

10.1097/CM9.0000000000000696.

WANKHADE, U. D.; ZHONG, Y.; KANG, P.; ALFARO, M.; CHINTAPALLI, S. V.; PICCOLO, B. D.; MERCER, K. E.; ANDRES, A.; THAKALI, K. M.; SHANKAR, K. Maternal High-Fat Diet Programs Offspring Liver Steatosis in a Sexually Dimorphic Manner in Association with Changes in Gut Microbial Ecology in Mice. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15, 2018. DOI:10.1038/s41598-018-34453-0.

WATERLAND, R. A.; MICHELS, K. B. Epigenetic epidemiology of the developmental origins hypothesis. *Annual Review of Nutrition*, [S. l.], v. 27, p. 363–388, 2007. DOI: 10.1146/annurev.nutr.27.061406.093705.

WHITE, P. A. S.; CERCATO, L. M.; ARAÚJO, J. M. D.; SOUZA, L. A.; SOARES, A. F.; BARBOSA, A. P.O.; NETO, J. M.; MARÇAL, A. C.; MACHADO, U. F.; CAMARGO, E. A.; SANTOS, M. R. V.; BRITO, L. C. Model of high-fat diet induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 57/5, 2013.

WOODS, S. C.; SEELEY, R. J.; PORTE, D; SCHWARTZ, M. W. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, [S. l.], v. 280, n. 5368, p. 1378–1383, 1998. DOI: 10.1126/science.280.5368.1378.

XIE, R.; SUN, Y.; WU, J.; HUANG, S.; JIN, G.; GUO, Z.; ZHANG, Y.; LIU, T.; LIU, X.; CAO, X.; WANG, B.; CAO H. Maternal high fat diet alters gut microbiota of offspring and exacerbates dss-induced colitis in adulthood, *Frontiers in Immunology*, 9, 1–17, 2018. DOI:10.3389/fimmu.2018.02608.

YANG, N., YING, C., XU, M., ZUO, X., YE, X., LIU, L., NARA, Y., SUN, X. (2007). High-fat diet up-regulates caveolin-1 expression in aorta of diet-induced obese but not in diet-resistant rats, *Cardiovascular Research*, 76(1), 167–174, 2007. DOI:10.1016/j.cardiores.2007.05.028.

YU, C. G; HUANG, Q. Recent progress on the role of gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of Digestive Diseases*, [S. l.], v. 14, n. 10, p. 513–517, 2013. DOI: 10.1111/1751-2980.12087.

ZAK-GOŁĄB, A; KOCEŁAK, P; APTEKORZ, M; ZIENTARA, M; JUSZCZYK, Ł; MARTIROSIAN, G; CHUDEK, J; OLSZANECKA-GLINIANOWICZ, M. Gut microbiota, microinflammation, metabolic profile, and zonulin concentration in obese and normal weight subjects. *International Journal of Endocrinology*, [S. l.], v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/674106.

ZHANG, X.; ZHU, X.; CHEN, B. Inhibition of colar-induced carotid atherosclerosis by recombinant apoA-I cysteine mutants in apoE-deficient mice. *Journal of lipid research*, v.51, p.3434-3442, 2010. DOI:10.1194/jlr.M008573.

## 11. ANEXO I



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370  
Email: [ceua@ufop.edu.br](mailto:ceua@ufop.edu.br)



### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2016/49, intitulado "*Efeitos da exposição de ratas à dieta hiperlipídica e hipercalórica durante a gestação e amamentação sobre parâmetros hemodinâmicos da prole na vida adulta.*", que tem como responsável o/a Prof(a). Dr(a). **Andréia Carvalho Alzamora**, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP - CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/Inhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Fisher	332	12 semanas	Macho e fêmeas	CCA

Restrição de dieta: ( x ) sim ( ) não

Especificar a dieta:

Este Certificado expira em: 11/01/2021

Ouro Preto, 12 de Dezembro de 2016.

**Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker**  
Coordenadora da CEUA/UFOP

## ANEXO II

Network access provided by: Universidade Federal de Ouro Preto



From the journal:

**Food & Function**

### **Progenitor with cardiometabolic disorders increases food intake, systemic inflammation and gut microbiota alterations in the second generation offspring**

 Check for updates

[Claudiane Maria Barbosa](#), [Taynara Carolina Lima](#), [Maria Andrea Barbosa](#), [Andressa Rezende](#), [Claudia Martins Carneiro](#), [Silvana de Queiroz Silva](#), [Yasmine Antonini Itabalana](#) and [Andréia Carvalho Alzamora](#)

#### **Abstract**

This work presents the effects of the high-fat diet (H) consumed by the progenitor (G0) on cardiometabolic disorders and on intestinal microbiota in the second generation offspring (F2). Rats submitted to H (G0H) or control (C) (G0C) diets, during mating, gestation and lactation, generated the F2 offspring (F2-G0H and F2-G0C, respectively), which received only C diet. Both, G0H and F2-G0H, showed changes in the intestinal microbiota, increased MAP, plasma TAG levels, adiposity index and inflammatory process in retroperitoneal fat and in the colon shown by increased of TNF- $\alpha$ , MCP-1, MyD88 and CAV-1 gene expression. In addition, the F2-G0H showed increased food intake, leptin resistance, total cholesterol and plasma levels of MCP-1 and reduced adiponectin. Regarding to the microbial communities, a greater diversity was observed with 5 unique families of bacteria that have been correlated with cardiometabolic disorders. Overall, progenitor with cardiometabolic disorders induces increase in food intake, systemic inflammation and microbiota alterations in the F2-G0H offspring.

About

Cited by

Related

#### **DOI**

<https://doi.org/10.1039/D1FO02838C>

