



IMPACTO DA SUPLEMENTAÇÃO COM POLPA DE MARACUJÁ (PASSIFLORA EDULIS) DURANTE A PUBERDADE PODE ATENUAR A SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA NA LACTAÇÃO

Thayla de Souza Fernandes¹, Leticia Ferreira Barbosa² Douglas Lopes de Almeida²,
Rafael Pereira Lopes², Paulo Cesar de Freitas Mathias², Isabelle Zanquetta³

¹Acadêmica do curso de Nutrição – Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar – UNICESUMAR. Bolsista PIBIC/ICETI- Unicesumar. thaylasouza007@gmail.com

²Pós graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual de Maringá-UEM. Bolsista CNPq/CAPES

³Orientadora, Doutora, Docente do Curso de Nutrição, Campus Maringá-PR, Universidade Cesumar - UNICESUMAR.

RESUMO

A exposição a dietas inadequadas nas fases iniciais da vida pode programar alterações metabólicas que aumentam o risco de obesidade, diabetes tipo 2 e dislipidemias na vida adulta, conforme o conceito DOHaD. Este estudo objetiva investigar se a suplementação com polpa fresca de maracujá (*Passiflora edulis*), alimento rico em flavonoides, durante a puberdade (30–60 dias), pode atenuar efeitos da dieta hiperlipídica materna (35% de gordura) ofertada na lactação. Para isso, filhotes machos de ratas Wistar serão divididos em quatro grupos experimentais (C-C, C-MARACUJÁ, HFD-C e HFD-MARACUJÁ). Serão avaliados parâmetros biométricos, bioquímicos, sensibilidade à insulina (ipITT), tolerância à glicose (oGTT) e gordura hepática aos 120 dias de vida. Espera-se que o maracujá contribua para melhorar marcadores metabólicos, reduzir adiposidade e restaurar a homeostase glicêmica, apontando seu potencial como estratégia preventiva em janelas críticas do desenvolvimento.

PALAVRAS-CHAVES: Adolescência; DOHaD; Maracujá; Obesidade; Rato wistar.

1 INTRODUÇÃO

Estudos desde a década de 1970 demonstram que a carência alimentar durante a gestação aumenta o risco de obesidade, doenças cardiovasculares e outras comorbidades na vida adulta, o que originou o conceito de DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) (RAVELLI et al., 1976; HALES; BARKER, 1992; ALMEIDA et al., 2019). Esse conceito mostra que condições ambientais, como nutrição inadequada, estresse e exposição a contaminantes, podem programar o organismo para maior risco de doenças crônicas, incluindo obesidade, diabetes, hipertensão, Alzheimer e até alguns tipos de câncer (ALMEIDA et al., 2019; DOI et al., 2022).

Embora grande parte da literatura se concentre na programação fetal e na lactação, estudos recentes indicam que a puberdade também é uma janela crítica para intervenções, representando oportunidade de mitigar efeitos de programações adversas ocorridas em fases anteriores (IBANEZ et al., 2017; ROSA et al., 2020; SOUZA et al., 2023).

Nesse cenário, destaca-se o potencial nutracêutico do maracujá (*Passiflora edulis*), fruta amplamente consumida no Brasil, rica em flavonoides com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antidiabéticas (CABRAL et al., 2022; SANTOS et al., 2021). Assim, supõe-se que sua suplementação na puberdade possa atenuar riscos cardiometabólicos programados precocemente.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os protocolos experimentais seguirão a legislação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e as diretrizes ARRIVE (Animal Research: Reporting



of In Vivo Experiments) (Percie Du Sert et al., 2020), e serão previamente submetidos à aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Serão adquiridas ratas Wistar fêmeas prenhas de 80 dias (N=16) junto ao Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e acondicionados no Biotério Setorial do LEx DOHaD – Laboratório Experimental de DOHaD. As matrizes serão mantidas em um ambiente climatizado e individual com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo fotoperíodo de 12 horas (7:00-19:00 horas, período claro), com livre acesso à água e ração (Nuvital®, Curitiba, Brasil) durante todo o período gestacional. O dia do nascimento será contabilizado como dia 0 (zero) e no dia 1 as ninhadas serão padronizadas para 8 filhotes por mãe, sendo priorizado 4 machos e 4 fêmeas a fim de se evitar o método de redução de ninhada. As mães lactantes serão divididas aleatoriamente em: grupo controle (N=8), alimentando-se de ração padrão (5% de gordura) e grupo HFD (N=8), que receberá uma dieta hiperlipídica (35% de gordura), produzida no laboratório, durante todo o período da lactação (até o dia 21). Durante todo esse período, serão avaliados consumo hídrico e alimentar das mães. Os animais serão padronizados após o desmame por 4 ratos machos por caixa com água e ração à vontade e os animais fêmeas serão eutanasiados por decapitação.

Dos 30 aos 60 dias, um grupo de animais receberá uma suplementação na dieta comercial de 30% de polpa fresca de maracujá em relação a massa total de dieta consumida por dia, dando origem aos grupos C-C, HFD-C, C-PASSION e HFD-PASSION). Durante esse período, será analisado também o dia da abertura prepuberal dos animais, marcando assim, o início da sua puberdade.

Após o período de tratamento, os animais serão mantidos sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo acima citadas e com ração comercial e água *ad libitum* até o dia 120, onde serão eutanasiados por decapitação para coleta das gorduras corporais e sangue para dosagens bioquímicas de colesterol, triglicerídeos e glicose. Nos dias 116 e 118 da vida destes animais, ocorrerão, respectivamente, os testes de intolerância à insulina e teste oral de tolerância à glicose

2.2 AVALIAÇÕES BIOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS

O peso corporal, consumo alimentar e ingestão hídrica, tanto das mães, como das ninhadas a partir do desmame, serão avaliados a cada 2 dias até o fim do protocolo experimental.

2.2.1 Teste de Tolerância à Insulina (IpITT)

Aos 116 dias de vida e após um jejum de 6 horas, os animais receberão uma injeção intraperitoneal de insulina (1U/kg PC). Amostras de sangue serão obtidas via caudal antes da injeção (basal tempo 0) 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração de insulina. Os níveis de glicose sanguínea serão avaliados pelo método enzimático-colorimétrico (GoldAnalisa®; Belo Horizonte, Brasil). A razão da constante de decaimento (coeficiente angular) da glicose (KITT) será calculada (BONORA et al., 1989).

2.2.2 Teste Oral de Tolerância à Glicose (oGTT)

Após dois dias de recuperação do IpITT, ou seja, no dia 118, os ratos serão deixados em jejum de 12 horas. Logo após, os ratos de todos os grupos receberão uma solução de glicose via oral através de gavagem (2g/Kg de massa corporal). Através da veia caudal amostras de sangue serão obtidas. As coletas de sangue serão feitas nos tempos de 0, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos. A glicemia sanguínea será avaliada pelo método enzimático-colorimétrico (GoldAnalisa®; Belo Horizonte, Brasil).



2.3 EUTANÁSIA

A eutanásia será realizada no dia 120. Os animais serão previamente pesados e submetidos a jejum alimentar de 12h, com água à vontade. O procedimento será padronizado pelo método de decapitação. Durante a eutanásia, serão coletadas amostras de sangue para análises bioquímicas (glicose, colesterol e triglicerídeos), armazenadas em eppendorfs contendo heparina e centrifugadas por 5 min para obtenção do plasma, posteriormente estocado a -20°C. Em seguida, os animais serão submetidos à laparotomia, sendo retirados e pesados gordura retroperitoneal, perigonadal e mesentérica (normalizados pelo peso corporal [g/100g peso corporal]) como estimativa da adiposidade. Além disso, serão coletados tecidos, incluindo fígado, para análises complementares.

2.4 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Valores plasmáticos e séricos basais de glicose, colesterol, triglicerídeos e colesterol HDL serão quantificados (com seus respectivos kits comerciais Gold Analisa®, Belo Horizonte/MG, Brasil) a partir das amostras de sangue total coletado após eutanásia, centrifugado a 3000 rpm por 5 min e armazenado à -20°C até o dia da análise.

2.5 QUANTIFICAÇÃO DE GORDURA HEPÁTICA

Amostras de fígado serão analisadas a partir de adaptações do método de Folch (1957). Para delinear o perfil lipídico a partir da dosagem de triglicerídeos e colesterol do fígado para cada animal, utilizando 50 µL isopropanol, será feita uma suspensão da gordura total obtida no método de Folch (1957) adaptado, descrito acima. Logo após, será agitado o tubo de ensaio em Vortex e, em seguida, colocado em banho maria a 37°C por 30 min. Durante esses 30 minutos, os tubos serão agitados 3x para ajudar a desgrudar a gordura do fundo. Após, esse líquido será pipetado em eppendorfs identificados para dosagem de triglicerídeos e colesterol fazendo uso de seus respectivos kits comerciais (Gold Analisa®, Belo Horizonte/MG, Brasil).

2.6 LEITURAS

Todas as análises bioquímicas serão feitas por leitura de absorbância das amostras após reação bioquímica dos kits comerciais em Leitora de Microplaca Elisa Tela 5.7" Colorida (DR-200BS-NM-BI, KASUAKI).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados serão apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M) e submetidos ao Teste de normalidade de D'Agostino Pearson para avaliar a Distribuição Gaussiana. Dados serão submetidos à análise de variância por ANOVA de duas vias, ou teste T de Student quando necessário. As diferenças entre as médias serão avaliadas pelo post hoc teste de Tukey. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Os testes serão feitos usando GraphPad Prism versão 9.0 para Windows.

3 RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se que a administração da dieta hiperlipídica (HFD) durante o período de lactação induza um fenótipo obeso com impacto negativo no metabolismo da prole. A suplementação com polpa fresca de maracujá deverá reverter os efeitos adversos induzidos pela programação metabólica precoce causada pela exposição à HFD, promovendo a redução do acúmulo de lipídios hepáticos e controle da homeostase glicêmica, do ganho de peso corporal (GOSS et al., 2018), da deposição de gordura e do perfil lipídico em jejum



(PANELLI et al., 2018). Assim, espera-se comprovar que a intervenção nutricional foi eficaz na atenuação dos efeitos da programação metabólica precoce.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição a uma dieta hiperlipídica (HFD) durante a lactação é um modelo eficaz para induzir obesidade em roedores. Espera-se que a suplementação com polpa de maracujá na puberdade atue como estratégia nutracêutica capaz de atenuar alterações metabólicas associadas a essa programação precoce.

REFERÊNCIA

ALMEIDA, D. L.; PAVANELLO, A.; SAAVEDRA, L. P.; PEREIRA, T. S.; CASTRO-PRADO, M. A. A.; MATHIAS, P. C. F. Environmental monitoring and the developmental origins of health and disease. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, Cambridge, v. 10, n. 6, p. 608-615, 2019.

CABRAL, B. et al. Cardiovascular effects induced by fruit peels from *Passiflora edulis* in hypertensive rats and fingerprint analysis by HPLC-ESI-MSn spectrometry. **Planta Medica**, v. 88, n. 5, p. 356-366, abr. 2022.

DOI, M.; USUI, N.; SHIMADA, S. Prenatal environment and neurodevelopmental disorders. **Frontiers in Endocrinology** (Lausanne), v. 13, p. 860110, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.860110>.

GOSS, M. J. et al. Peel flour of *Passiflora edulis* var. *Flavicarpa* supplementation prevents the insulin resistance and hepatic steatosis induced by low-fructose-diet in young rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 1-8, 2018.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595-601, jul. 1992.

IBANEZ, C. A. et al. A high fat diet during adolescence in male rats negatively programs reproductive and metabolic function which is partially ameliorated by exercise. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 807, 2017.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

PANELLI, M. F. et al. Bark of *Passiflora edulis* treatment stimulates antioxidant capacity, and reduces dyslipidemia and body fat in db/db mice. **Antioxidants**, v. 7, n. 9, p. 120, 2018.

PERCIE DU SERT, N. et al. Diretrizes ARRIVE 2.0: diretrizes atualizadas para relato de pesquisas com animais. **PLOS Biology**, v. 18, n. 7, p. e3000410, jul. 2020.

RAVELLI, G. P.; STEIN, Z. A.; SUSSER, M. W. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 7, p. 349-353, 1976.



ROSA, G. B. et al. High salt intake during puberty leads to cardiac remodelling and baroreflex impairment in lean and obese male Wistar rats. **British Journal of Nutrition**, v. 123, n. 6, p. 642-651, mar. 2020.

SANTOS, J. et al. Brazilian native passion fruit (*Passiflora tenuifila* Killip) is a rich source of proanthocyanidins, carotenoids, and dietary fiber. **Food Research International**, v. 147, p. 110521, set. 2021.

SOUZA, A. C. et al. Protein restriction during peripubertal period impairs endothelial aortic function in adult male Wistar rats. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 14, n. 4, p. 451-458, ago. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1017/S2040174423000198>.

TOHI, M.; TU'AKOI, S.; VICKERS, M. H. A systematic review exploring evidence for adolescent understanding of concepts related to the developmental origins of health and disease. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 14, n. 6, p. 755-762, dez. 2023.