

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

ISABELLA DE ARAÚJO ESTEVES DUARTE

BRASÍLIA
2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

ISABELLA DE ARAÚJO ESTEVES DUARTE

**ANÁLISE NUTRIGENÔMICA E BIOQUÍMICA DAS PROPRIEDADES CARDIO-
METABÓLICAS DO CONSUMO DE SUCO DE *PASSIFLORA SETACEA* EM INDI-
VÍDUOS COM SOBREPESO**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Nutrição Humana pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Universidade de Brasília.

Área de concentração:
Alimentos, Dietética e Bioquímica aplicada à Nutrição

Orientadora: Prof. Dra. Livia de Lacerda de Oliveira
Co-orientadora: Prof. Dra. Tatiana Karla dos Santos Borges

BRASÍLIA
2020

Aos meus pais e mentores por todo o suporte e guiança
nos momentos de alegria, dúvidas e desafios.
Ao Cerrado, pela sua riqueza e resistência.

AGRADECIMENTOS

Esta tese de doutorado representa a essência de um trabalho de 7 anos, que se iniciou no fim da minha graduação e que se estende até o momento presente. E momentos futuros também porque, afinal, a pesquisa nunca acaba. Ela ganha forma, novos direcionamentos e novas etapas a cada vez que surgem resultados, força de trabalho e verba.

Essa jornada contou com a participação de grupos de trabalho dos laboratórios de Ciência e Tecnologia dos Alimentos (Dep. Nutrição/UnB e Embrapa Cerrados), Imunologia Celular (Fac. Medicina/UnB), Microcard (INRA/França), Biologia Molecular (Int. Biologia/UnB) e Centro de Pesquisa em Alimentos FORC (USP). Com profundo amor e admiração, gostaria de agradecer a essas pessoas excepcionais pela parceria, vontade genuína de promover o avanço do conhecimento e esperança mesmo em períodos incertos... Esta tese não existiria sem elas.

Meus pais e irmãos, meu alicerce. Eles são aquela torcida que se mantém presente mesmo em dias de temporal.

Dra. Ana Maria Costa, minha eterna orientadora na pesquisa, e na vida !

Profa. Tatiana Borges, quem me orientou e me adentrou no mundo mágico da Imunologia com todo carinho, humor e sabedoria. E os professores eméritos Maria Imaculada Muniz Junqueira e Eduardo Tosta sempre com conselhos valiosos.

Profa. Livia de Oliveira, orientadora que me mostra como ter assertividade e garra para angariar verba e viabilizar as etapas da pesquisa.

Dr. Dragan Milenkovic, orientador e bioinformata de toda a etapa Nutrigenômica, quem sempre me traz novas ideias de pesquisa e está sempre disponível para discutir dados em uma reunião Skype. Merci beaucoup !

Dr. Artur Rosa, Profa. Ildinete Pereira e Dra. Calliandra pelos ensinamentos em Biologia Molecular.

Alunos de Iniciação Científica Larissa Veloso, Maria Carolina Silva, Rafaela Curinga e Henrique Mendonça, grandes parceiros com quem aprendi e ainda aprendo muito.

Meus amigos, amigas e colegas de pesquisa na ordem alfabética: André, Andreanne, Calliandra, Daniele, Danilo, Déia, Desterro, Isadora, Lorena, Lucas, Luciana, Mariângela e demais porque a lista de seres iluminados que me ajudaram em algum momento desta jornada é longa.

Capes, CNPq e FAPDF por todo o financiamento desses últimos 7 anos de pesquisa em compra de material, envio de amostras para o exterior, viagens e apresentações em congressos.

“Para desenvolver a mente completa:
Estude a arte da ciência;
Estude a ciência da arte.
Aprenda a enxergar.
Perceba que tudo se conecta com todo o resto.”
Leonardo da Vinci

Salvemos o Cerrado!
“A água de boa qualidade é como a saúde ou a liberdade: só tem valor quando acaba.”
Guimarães Rosa

RESUMO

A *Passiflora setacea* (PS) é uma espécie de maracujá silvestre encontrada no Cerrado brasileiro, popularmente conhecida como maracujá-do-sono, rica em compostos bioativos. Estudos recentes têm mostrado que a polpa do PS tem efeitos antiestresse e também promove melhora do sono noturno. Há correlações entre uma dieta rica em compostos bioativos e a modulação da inflamação e do estresse oxidativo na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, como Diabetes Tipo 2 e doenças cardiovasculares. Embora essas correlações ainda estejam sendo estudadas, a pesquisa atual sugere que esses efeitos estão relacionados à capacidade dos compostos bioativos de modular a expressão e produção de mediadores inflamatórios, como citocinas e de atuarem em certas vias de sinalização celular. Este estudo teve como objetivo investigar o efeito do consumo de suco de PS em biomarcadores metabólicos e inflamatórios, assim como o perfil de expressão gênica global de voluntários do sexo masculino com sobrepeso. Voluntários do sexo masculino com excesso de peso participaram de um estudo duplo cego controlado por placebo (PB) de quatro fases. Fase I, 12 voluntários com refeições brancas controladas ingeriram uma dose de 150g de suco PS e PB em um hotel para dosar marcadores bioquímicos; Fase II, 8 voluntários ingeriram uma dose de 150g de suco PS e PB em *crossover* para extração de RNAm de PBMC. Na fase III, 15 voluntários ingeriram uma dose de 50g, 150g de PS e PB em *crossover* para dosar marcadores bioquímicos; e Fase IV, 9 voluntários ingeriram 50g de PS e PB por 14 dias em *crossover*. Amostras de sangue foram coletadas antes (t0h) e 3h (t3h) (Fases I, II e III) e 15 dias após (Fase IV) ingestão do suco PS ou PB enquanto os voluntários estavam em jejum. Foram avaliados marcadores bioquímicos como glicose, insulina, HOMA IR, HOMA BETA, HDL e triglicerídeos e marcadores imunológicos como INF- γ , TNF, IL-6, IL-10, IL-2, IL-4 e IL-17A. Dados de IMC, circunferência da cintura e consumo de alimentos ricos em polifenóis também foram coletados. Observou-se que o consumo de uma única dose de suco PS reduziu estatisticamente os níveis de insulina basal, HOMA IR e IL-17A, enquanto aumentou os níveis de HDL após 3h. Após consumo prolongado por duas semanas, o suco de PS contribuiu para a redução dos níveis circulantes de IL-6. A dose única de suco de PS foi capaz de modular negativamente a expressão de 1327 genes e potenciais fatores de transcrição e miRNA podem estar envolvidos no processo. Existem poucos estudos na literatura que mostram o efeito de alimentos ricos em compostos bioativos sobre esses biomarcadores em humanos. A literatura indica que os flavonoides presentes na polpa do PS são responsáveis por melhorar a sinalização da via da insulina por diversos mecanismos, inclusive por meio de suas propriedades anti-inflamatórias. Os genes modulados negativamente decodificam proteínas envolvidas na redução da sensibilidade e secreção da insulina e no aumento da produção de quimiocinas, danos ao tecido vascular e distúrbios neuropsiquiátricos. O consumo de suco de PS tem demonstrado efeitos benéficos sobre marcadores potencialmente inflamatórios e sobre a expressão gênica de células mononucleares do sangue periférico em indivíduos com sobrepeso, sendo uma possível e importante ferramenta na prevenção de DT2 e DCV em grupos de risco. Mais estudos para elucidar os mecanismos de ação desses resultados são necessários para melhor compreensão desses efeitos.

Palavras-chave: *Passiflora setacea*, compostos fenólicos, resistência à insulina, doenças crônicas não transmissíveis, citocinas, IL-17A, IL-6, insulina, HDL, frutas nativas

ABSTRACT

Passiflora setacea (PS) is a wild passion fruit species found in the Brazilian savannah, popularly known as sleep-passion fruit, rich in bioactive compounds. Recent studies have shown that the pulp of PS has anti-stress effects and also improves nocturnal sleep. There are correlations between a diet rich in bioactive compounds and modulation of inflammation and oxidative stress in the prevention of chronic diseases, such as Diabetes Type 2 and cardiovascular diseases. Although these correlations are still being studied, the current research suggests that these effects are related to the ability of bioactive compounds to modulate the expression and production of inflammatory mediators, such as cytokines and to act in certain cell signaling pathways. This study aimed to investigate the effect of PS juice consumption on metabolic and inflammatory biomarkers, as well as the global gene expression profile of overweight male volunteers. Overweight male volunteers partook in a four-phase double blind placebo-controlled study. Phase I, 12 volunteers with controlled white meals ingested one dose of 150g of PS juice and placebo drink (PB) at a hotel to dose biochemical markers; Phase II, 8 volunteers ingested one dose 150g of PS juice and PB in crossover for mRNA extraction of PBMC. Phase III, 15 volunteers ingested one dose of 50g, 150g of PS and PB in crossover to dose biochemical markers; and Phase IV, 9 volunteers ingested 50g of PS and PB for 14 days. Blood samples were collected before (t0h) and 3h (t3h) (Phases I, II and III) or 15 days (Phase IV) after PS juice or PB ingestion while the volunteers were fasting. Biochemical markers such as glucose, insulin, HOMA IR, HOMA BETA, HDL and triglycerides and immune markers such as INF- γ , TNF, IL-6, IL-10, IL-2, IL-4 and IL-17A were evaluated. BMI, waist circumference and polyphenol rich food consumption data were also collected. It has been found that the consumption of a single dose of PS juice statistically reduced basal insulin, HOMA IR, and IL-17A levels while increased levels of HDL. After prolonged consumption for two weeks, PS contributed to the reduction of circulating levels of IL-6. The single dose of PS was capable of negatively modulate the expression of 1327 genes and potential transcription factors and miRNA may be involved in the process. There are a few studies in the literature that show the effect of food rich in bioactive compounds on those biomarkers in humans. The literature indicates that the flavonoids present in the PS pulp are responsible for improving the signaling of the insulin pathway by several mechanisms, including through their anti-inflammatory properties. The genes negatively modulated decode proteins involved in reducing insulin sensitivity and secretion and increasing chemokine production, vascular tissue damage and neuropsychiatric disorders. The consumption of PS juice has been shown to have beneficial effects on potentially inflammatory markers and gene expression of peripheral blood mononuclear cells in overweight individuals and may be an important tool in the prevention of DT2 and CVD in at-risk groups. More studies to elucidate the action mechanisms for said results are necessary to better understand these effects.

Key words: *Passiflora setacea*, phenolic compounds, insulin resistance, chronic noncommunicable diseases, cytokines, IL-17A, IL-6, insulin, HDL, native fruits

RESUMEN

La *Passiflora setacea* (PS) es una especie de maracuyá silvestre que se encuentra en el Cerrado brasileño, conocida popularmente como maracuyá dormida, rica en compuestos bioactivos. Estudios recientes han demostrado que la pulpa de PS tiene efectos antiestrés y también mejora el sueño nocturno. Existen correlaciones entre una dieta rica en compuestos bioactivo y la modulación de la inflamación y el estrés oxidativo en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles, como la Diabetes tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares. Aunque estas correlaciones aún se están estudiando, la investigación actual sugiere que estos efectos están relacionados con la capacidad de compuestos bioactivo para modular la expresión y producción de mediadores inflamatorios, como las citocinas, y para actuar en ciertas vías de señalización celular. Este estudio tuvo como objetivo investigar el efecto del consumo de jugo de PS sobre los biomarcadores metabólicos e inflamatorios, así como el perfil de expresión génica global de voluntarios masculinos con sobrepeso. Voluntarios varones con sobrepeso participaron en un estudio de cuatro fases, doble ciego, controlado con placebo. Fase I, 12 voluntarios con comidas blancas controladas ingirieron una dosis de 150 g de jugo de PS y PB en un hotel para medir marcadores bioquímicos; Fase II, 8 voluntarios ingirieron una dosis de 150 g de jugo de PS y PB en forma cruzada para extraer ARNm de PBMC; En la fase III, 15 voluntarios ingirieron una dosis de 50 g, 150 g de PS y PB en forma cruzada para medir marcadores bioquímicos; y Fase IV, 9 voluntarios ingirieron 50 g de PS y PB durante 14 días en forma cruzada. Se recogieron muestras de sangre antes (t0h) y 3h (t3h) (Fases I, II y III) y 15 días después (Fase IV) de la ingestión del jugo de PS o PB mientras los voluntarios estaban en ayunas. Se evaluaron marcadores bioquímicos como glucosa, insulina, HOMA IR, HOMA BETA, HDL y triglicéridos y marcadores inmunológicos como INF- γ , TNF, IL-6, IL-10, IL-2, IL-4 e IL-17A. También se recogieron datos sobre IMC, perímetro de cintura y consumo de alimentos ricos en polifenoles. Se encontró que el consumo de una sola dosis de jugo de PS redujo estadísticamente los niveles de insulina basal, HOMA IR e IL-17A, mientras aumentaba los niveles de HDL después de 3 horas. Después de un consumo prolongado durante dos semanas, el jugo de PS contribuyó a la reducción de los niveles circulantes de IL-6. La dosis única de jugo de PS fue capaz de modular negativamente la expresión de 1327 genes y los factores potenciales de transcripción y miARN pueden estar involucrados en el proceso. Existen pocos estudios en la literatura que demuestren el efecto de los alimentos ricos en CB sobre estos biomarcadores en humanos. La literatura indica que los flavonoides presentes en la pulpa del PS son los responsables de mejorar la señalización de la vía de la insulina mediante varios mecanismos, entre ellos sus propiedades antiinflamatorias. Los genes modulados negativamente decodifican las proteínas implicadas en la reducción de la sensibilidad y la secreción de insulina y en el aumento de la producción de quimiocinas, el daño al tejido vascular y los trastornos neuropsiquiátricos. El consumo de jugo de PS ha demostrado efectos beneficiosos sobre marcadores potencialmente inflamatorios y sobre la expresión génica de células mononucleares de sangre periférica en individuos con sobrepeso, siendo una posible e importante herramienta en la prevención de DT2 y ECV en grupos de riesgo. Se necesitan más estudios para dilucidar los mecanismos de acción de estos resultados para comprender mejor estos efectos.

Palabras clave: *Passiflora setacea*, compuestos fenólicos, resistencia a la insulina, citocinas, IL-17A, IL-6, insulina, HDL, frutos nativos.

LISTA DE FIGURAS

PARTE 1

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** 24
Percentual de homens e mulheres (≥ 18 anos) com excesso de peso no Brasil
- Figura 2.** 28
Esquema da interação direta entre as vias de sinalização inflamatória e da insulina
- Figura 3.** 32
Esquema de classificação dos compostos fenólicos
- Figura 4.** 35
Passiflora setacea BRS Pérola do Cerrado – (A) ramagem; (B) flores e fruto; (C) frutos; (D) casca, polpa e sementes.
- Figura 5.** 39
Esquema geral do metabolismo dos polifenóis

CAPÍTULO 2

- Figura 6.** 50
Fluxograma dos experimentos
- Figura 7.** 51
Diagrama CONSORT que demonstra o fluxo de participantes em cada etapa do ensaio clínico crossover randomizado da Fase III.
- Figura 8.** 57
Sangue com ficoll após centrifugação para separação de células mononucleares

PARTE 2**CAPÍTULO 1**

Figura 9. 65
Efeito agudo do consumo de suco de *Passiflora setacea* e bebida placebo sobre os marcadores do metabolismo de glicose (A) e lipídios (B)

Figura 10. 66
Efeito agudo do consumo de suco de *Passiflora setacea* e bebida placebo sobre os níveis séricos de citocinas

Figura 11. 67
Comparação dos perfis de expressão gênica global

Figura 12. 69
Redes de interação gênica enriquecidas com genes diferencialmente expressos

Figura 13. 71
Vias significativamente enriquecidas com genes diferencialmente expressos

Figura 14. 73
Análises de bioinformática de potenciais fatores de transcrição envolvidos

Figura 15. 75
Análises de bioinformática de potenciais miRNA envolvidos

CAPÍTULO 2

Figura 16. 80
Efeito agudo do consumo de 50g e 150g de polpa de *Passiflora setacea* e de bebida placebo em níveis séricos de glicose e insulina

Figura 17. 81
Efeito agudo do consumo de 50g e 150g de polpa de *Passiflora setacea* e de bebida placebo nos índices HOMA IR e HOMA beta

Figura 18. 82
Efeito agudo do consumo de 50g e 150g de polpa de *Passiflora setacea* e de bebida placebo nos níveis de triglicerídeos e HDL

Figura 19. 83
Taxa de variação intrapessoal dos marcadores séricos de glicose, insulina, triglicerídeos, HDL e nos índices HOMA IR e HOMA beta

Figura 20.	84
Análise de correlação da taxa de variação intrapessoal (delta %) dos marcadores bioquímicos de glicose, insulina, HOMA IR, HOMA beta, triglicerídeos e HDL	
Figura 21.	85
Efeito agudo do consumo de 50g e 150g de polpa de <i>Passiflora setacea</i> e de bebida placebo nos níveis séricos das citocinas IL-17A, INF- γ , TNF- α e IL-16	
Figura 22.	86
Efeito agudo do consumo de 50g e 150g de polpa de <i>Passiflora setacea</i> e de bebida placebo nos níveis séricos das citocinas IL-10, IL-4 e IL-2	
Figura 23.	87
Efeito do consumo prolongado de 50g de polpa de <i>Passiflora setacea</i> e de bebida placebo nos marcadores séricos de glicose, insulina, triglicerídeos, HDL e nos índices HOMA IR e HOMA beta	
Figura 24.	88
Taxa de variação intrapessoal do efeito do consumo prolongado de 50g de polpa de <i>Passiflora setacea</i> e de bebida placebo nos marcadores séricos de glicose, insulina, triglicerídeos, HDL e nos índices HOMA IR e HOMA beta	
Figura 25.	89
Efeito do consumo prolongado (14 dias) de 50g de polpa de <i>Passiflora setacea</i> e de bebida placebo nos marcadores séricos de citocinas	
Figura 26.	90
Taxa de variação intrapessoal do efeito do consumo prolongado de 50g de polpa de <i>Passiflora setacea</i> e de bebida placebo nos marcadores séricos de citocinas	
Figura 27.	91
Correlação dos valores absolutos de (A) todos os marcadores bioquímicos de glicose, insulina, HOMA IR, HOMA beta, triglicerídeos, HDL e das citocinas IL-17A, INF- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2; (B) marcadores bioquímicos sem as citocinas; e (C) apenas citocinas	
Figura 28.	92
Análise de correlação da taxa de variação intrapessoal (delta%) de todos os marcadores bioquímicos de glicose, insulina, HOMA IR, HOMA beta, triglicerídeos, HDL e das citocinas L17A, INF- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2; e os marcadores bioquímicos sem as citocinas	
Figura 29.	104
Possíveis mecanismos regulatórios celulares pelos quais os metabólitos presentes na polpa de <i>Passiflora setacea</i> atuam	

LISTA DE TABELAS**PARTE 1****CAPÍTULO 2**

Tabela 1.	53
Informações nutricionais da bebida placebo e da polpa de <i>Passiflora setacea</i>	

PARTE 2**CAPÍTULO 1**

Tabela 2.	64
Perfil bioquímico basal dos voluntários	

Tabela 3.	74
Lista dos potenciais microRNA envolvidos	

CAPÍTULO 2

Tabela 4.	78
Média de consumo de alimentos ricos em polifenóis e análise qualitativa por voluntário	

Tabela 5.	79
Perfil bioquímico basal dos voluntários das fases III e IV	

Tabela 6.	93
Comparação dos resultados observados entre o efeito agudo de uma dose de <i>Passiflora setacea</i> ou bebida placebo e o efeito do consumo prolongado de 14 dias.	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácidos graxos livres
AKT	Proteína quinase B
CB	Compostos Bioativos
DCV	Doenças cardiovasculares
DNAc	Fita de DNA complementar
DT2	Diabetes tipo 2
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ICBG	Inflamação crônica de baixo grau
IKkB	Quinase inibidora do NFkB
INF- γ	Interferon-gama
IRS	Insulin receptor substrate
MAPK	Quinases ativadas por mitógenos
miRNA	Micro RNA
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
PB	Placebo
PCR	Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PS	<i>Passiflora setacea</i>
RI	Receptor específico de insulina
RNAi	RNA de interferência
RNAm	RNA mensageiro
Th	Células T auxiliares
TLR	Toll-like receptors (Receptores do tipo Toll)
TNF- α	Fator de necrose tumoral - alfa
Treg	Células T regulatórias

SUMÁRIO

<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>ix</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>xii</i>
<i>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</i>	<i>xiii</i>
<i>INTRODUÇÃO</i>	<i>17</i>
<i>PARTE 1 - CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA DA PESQUISA E DOS</i>	<i>21</i>
<i>MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO</i>	<i>21</i>
<i>CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</i>	<i>23</i>
<i>1. Panorama de Saúde Mundial e Brasileiro</i>	<i>23</i>
<i>1.1 Incidência das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT)</i>	<i>23</i>
<i>1.2 Fatores de risco associados às DCNT</i>	<i>25</i>
<i>2. Desenvolvimento das DCNT e mecanismos envolvidos</i>	<i>25</i>
<i>2.1 Inflamação crônica de baixo grau (ICBG)</i>	<i>25</i>
<i>2.2 Insulina: mecanismos de ação e vias de sinalização</i>	<i>26</i>
<i>2.2.1 Distúrbios na cascata sinalizatória, Inflamação & Resistência insulínica</i>	<i>26</i>
<i>3. Alimentos funcionais</i>	<i>30</i>
<i>3.1 Conceito, histórico e legislação</i>	<i>30</i>
<i>3.2 Compostos fenólicos presentes nos alimentos funcionais: classes e estrutura química</i>	<i>31</i>
<i>3.3 Compostos fenólicos e efeitos na saúde humana</i>	<i>32</i>
<i>4. Biodiversidade brasileira e sua riqueza em compostos bioativos</i>	<i>33</i>
<i>4.1 O bioma Cerrado e seus frutos</i>	<i>33</i>
<i>4.2 Passifloras nativas e as propriedades de saúde associadas</i>	<i>34</i>
<i>4.2.1 Passiflora setacea: composição química e efeitos na saúde dos seus compostos</i>	<i>34</i>
<i>5. Biodisponibilidade</i>	<i>37</i>
<i>5.1 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos</i>	<i>37</i>
<i>5.2 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes na Passiflora setacea</i>	<i>39</i>
<i>6. Nutrigenômica</i>	<i>40</i>
<i>6.1 Marcadores e ferramentas ômicas na ciência da Nutrição</i>	<i>40</i>
<i>6.2 A tecnologia de Microarranjos de DNA (Microarrays)</i>	<i>42</i>
<i>7. Ensaios clínicos e métodos estatísticos</i>	<i>43</i>
<i>CAPÍTULO 2 – HIPÓTESE, OBJETIVOS, MATERIAL E MÉTODO DE</i>	<i>46</i>
<i>PESQUISA</i>	<i>46</i>
<i>2.1 HIPÓTESE DA PESQUISA</i>	<i>46</i>
<i>2.2 OBJETIVOS</i>	<i>47</i>
<i>2.2.1 Objetivo geral</i>	<i>47</i>

2.2.2	<i>Objetivos específicos</i>	47
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	49
2.3.1	<i>Delineamento experimental</i>	49
2.3.2	<i>Processamento e caracterização do suco de Passiflora setacea</i>	51
2.3.3	<i>Composição química das polpas</i>	52
2.3.3.1	<i>Preparo do extrato</i>	52
2.3.3.2 <i>Análise de Fenólicos Totais</i>	52
2.3.4	<i>Escolha da bebida placebo</i>	53
2.3.5	<i>Voluntários</i>	53
2.3.5.1	<i>Crítérios de inclusão e exclusão</i>	53
2.3.5.2	<i>Orientações gerais</i>	54
2.3.6	<i>Desenho do estudo</i>	55
2.3.7	<i>Tratamento das amostras</i>	56
2.3.8	<i>Separação das células mononucleares do sangue periférico</i>	56
2.3.9	<i>Parâmetros bioquímicos e análise de citocinas</i>	57
2.3.10	<i>Extração de RNA total</i>	58
2.3.11	<i>Análise de microarranjos de DNA e análise bioinformática</i>	59
2.3.12	<i>Análises Bioinformáticas</i>	59
2.3.13	<i>Análises Estatísticas</i>	59
	PARTE 2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
	CAPÍTULO 1 - RESULTADOS FASES I E II	64
1.1	<i>Fase I - Efeito agudo Placebo vs 150 g de polpa de Passiflora setacea em marcadores bioquímicos</i>	64
1.1.1	<i>Características básicas dos voluntários</i>	64
1.1.2	<i>Efeito do suco de Passiflora setacea no metabolismo glicídico e lipídico</i>	65
1.1.3	<i>Efeito da ingestão de suco de Passiflora setacea nos níveis de citocinas séricas</i>	66
1.2	<i>Fase II - Efeito agudo Placebo vs 150 g de polpa de Passiflora setacea no perfil de expressão gênica</i>	66
1.2.1	<i>Modulação da expressão gênica de células circulantes pela Passiflora setacea</i>	66
1.2.2	<i>Interação de Proteína-Proteína (Interactômica)</i>	72
1.2.3	<i>Reguladores transcricionais e pós-transcricionais do efeito nutrigenômico</i>	72
	Capítulo 2 - RESULTADOS FASES III E IV	77
2.1	<i>Fase III - Efeito agudo Placebo vs 50g vs 150 g de polpa de Passiflora setacea</i>	77
2.1.1	<i>Análise da frequência de consumo de alimentos ricos em polifenóis</i>	77

<i>2.1.2 Perfil nutricional e bioquímico dos indivíduos</i>	78
<i>2.1.3 Efeito agudo do suco de Passiflora setacea nos marcadores bioquímicos</i>	80
<i>2.1.3.1 Efeito no metabolismo glicídico e lipídico (valores absolutos)</i>	80
<i>2.1.3.1.1 Efeito no metabolismo glicídico e lipídico (Variação intrapessoal - delta %)</i>	82
<i>2.1.3.1.2 Análise de Componentes Principais (Variação intrapessoal - delta %)</i>	83
<i>2.1.3.2 Efeito nas concentrações de citocinas (Valores absolutos)</i>	84
<i>2.2 Fase IV - Efeito do consumo prolongado de Placebo vs 50g de polpa de Passiflora setacea</i>	87
<i>2.2.1 Efeito consumo prolongado do suco de Passiflora setacea nos marcadores bioquímicos</i>	87
<i>2.2.1.1 Efeito no metabolismo glicídico e lipídico (Valores absolutos)</i>	87
<i>2.2.1.2 Efeito no metabolismo glicídico e lipídico (Variação intrapessoal delta %)</i>	88
<i>2.2.1.2 Efeito nas concentrações de citocinas (Valores absolutos)</i>	88
<i>2.2.1.2.1 Efeito nas concentrações de citocinas (Variação intrapessoal - delta %)</i>	89
<i>2.2.1.2.2 Análise de Componentes Principais (Valores absolutos)</i>	90
<i>2.2.1.2.3 Análise de Componentes Principais (Variação intrapessoal – delta %)</i>	92
<i>2.2.2 Resumo dos resultados</i>	92
DISCUSSÃO	94
CONCLUSÕES	106
PERSPECTIVAS	107
LIMITAÇÕES	107
APÊNDICE	121
ANEXOS	146

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são responsáveis por 71% das mortes em todo o mundo, levando a óbito 15 milhões de pessoas com idades entre 30 e 69 anos. As doenças mais prevalentes são as cardiovasculares, seguidas de câncer, doenças respiratórias e diabetes (WHO, 2018). Ao mesmo tempo, o número total de pessoas que sofrem de depressão ou outros transtornos mentais comuns, como ansiedade, foi estimado em mais de 300 milhões de pessoas em 2015 (WHO, 2017). Esses transtornos são os maiores contribuintes para a desabilidade populacional e representam um custo importante para o sistema de saúde (WHO, 2006). Portanto, marcadores de estilo de vida estressantes, como estresse emocional, dieta pouco saudável (alto teor de açúcar, sódio, carne vermelha e ácidos graxos trans, mas baixa ingestão de frutas e vegetais), sobrepeso (MELAKU et al., 2018) e baixa atividade física (KOOLHAAS et al., 2017) aumentam a incidência de doenças cardiovasculares (DCV) e outras DCNT. Esses fatores de risco de estilo de vida contribuem para o quadro de hipertensão, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia (PEREIRA et al., 2018; WHO, 2018), obesidade (WHO, 2018), alta produção de citocinas inflamatórias (PELUSO et al., 2012) e perfil gênico pró-inflamatório (MILENKOVIC et al., 2011) e estão associados a doenças crônicas inflamação de baixo grau e inflamação vascular (KLÖTING; BLÜHER, 2014).

Uma maior ingestão de frutas e vegetais está associada a um menor risco de todas as causas de mortalidade associadas a DCV e DCNT, particularmente às doenças relacionadas com a inflamação (WANG et al., 2014). Alimentos à base de plantas são fontes de uma variedade de compostos bioativos, como terpenoides (carotenoides, componentes do óleo essencial, fitoesteróis), polifenóis (compostos de flavonoides e não flavonoides), compostos de enxofre (glucosinolatos e sulfinafos de aliados), alcaloides (DEL RIO et al., 2013) e poliaminas (MUÑOZ-ESPARZA et al., 2019), cujo nível de ingestão está ligado à proteção contra doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, cânceres e doenças neurodegenerativas (DENNY; BUTTRISS, 2007; MUÑOZ-ESPARZA et al., 2019). Vários efeitos benéficos têm sido relacionados ao consumo desses compostos como atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (MUÑOZ-ESPARZA et al., 2019; TURATI et al., 2015). Esses efeitos benéficos derivam da capacidade relatada de alguns compostos bioativos em modular a sinalização celular, a expressão de genes-chave e a produção de citocinas (BARBER-CHAMOUX et al., 2018). As espécies do gênero *Passiflora* têm sido estudadas devido aos seus efeitos sedativos, ansiolíticos, anti-inflamatórios, antioxidantes e anticancerígenos (APPEL et al., 2011; DHAWAN;

DHAWAN; SHARMA, 2004). *Passiflora setacea* D.C (PS) é uma espécie de maracujá silvestre do Cerrado brasileiro, popularmente conhecida como “maracujá do sono”. O consumo do seu fruto tem sido tradicionalmente associado à modulação do sono (BOMTEMPO et al., 2016). Polpa e sementes de PS foram recentemente identificadas como ricas em compostos bioativos particularmente em C-glicosídeos de flavonoides (GOMES et al., 2017), e também homoorientina, vitexina, isovitexina e orientina em teores mais elevados do que aqueles encontrados em *Passiflora edulis*, açaí (*Eurydema oleracea*), e suco de laranja (DE CARVALHO; DE OLIVEIRA; COSTA, 2018). Eles também revelaram propriedades antioxidantes e antimicrobianas *in vitro* (DE SANTANA et al., 2015; SANTANA, 2015). Esses efeitos são potencialmente associados à presença de vitamina E e outros compostos bioativos como terpenoides, poliaminas e polifenóis, especialmente orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina (BOMTEMPO et al., 2016; DE CARVALHO; DE OLIVEIRA; COSTA, 2018; GOMES et al., 2017; SANTANA, 2015). Foi relatado que esses compostos exercem efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, vasculares, neuroprotetores, ansiolíticos e antidepressivos e melhora da performance cognitiva em situações de estresse (KENNEDY et al., 2017; KU; KWAK; BAE, 2014; LEE; KU; BAE, 2014; MUHAMMAD et al., 2019; SOULIMANI et al., 1997; WANG et al., 2013).

As dietas à base de plantas são reconhecidas por seus efeitos benéficos na modulação de fatores de risco intermediários para distúrbios baseados em inflamação (TURNER-MCGRIEVEY et al., 2015), e as frutas constituem os principais contribuintes para esses efeitos (ZHAO et al., 2017). No entanto, estudos clínicos enfocando as propriedades de saúde dos frutos do Cerrado brasileiro, bem como os potenciais mecanismos moleculares subjacentes, incluindo a modulação da expressão de genes em humanos, permanecem escassos. Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito do consumo de polpa de PS sobre biomarcadores metabólicos e inflamatórios em voluntários do sexo masculino com excesso de peso, bem como avaliar o impacto no perfil de expressão gênica global em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), usando análises de microarranjos.

PARTE 1
CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA DA PESQUISA
E DOS MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO

PARTE 1 - CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA DA PESQUISA E DOS MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO

Na parte 1 da tese são apresentados dois capítulos, referentes à revisão de literatura e aos métodos de pesquisa científica adotados neste trabalho.

No capítulo 1 são apresentadas informações de relevância para a caracterização do problema da pesquisa: o panorama de saúde mundial e brasileiro, os fatores e mecanismos associados ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, o conceito e os aspectos históricos dos alimentos funcionais, o efeito biológico e a química dos compostos fenólicos bioativos, frutos da biodiversidade brasileira ricos nesses compostos, incluindo as espécies de passifloras. Ainda nesse contexto, são abordadas informações sobre a biodisponibilidade dos compostos presentes nas passifloras e na espécie de estudo, *Passiflora setacea*. Finalmente, discutem-se os avanços na ciência da nutrição com o estudo da nutrigenômica e os métodos estatísticos necessários em ensaios clínicos.

No capítulo 2, apresentam-se a justificativa, a hipótese do problema de pesquisa e os objetivos do trabalho. Também são descritos os procedimentos de montagem dos experimentos, o delineamento experimental, os métodos de análise dos marcadores bioquímicos e nutrigenômicos.

CAPÍTULO 1

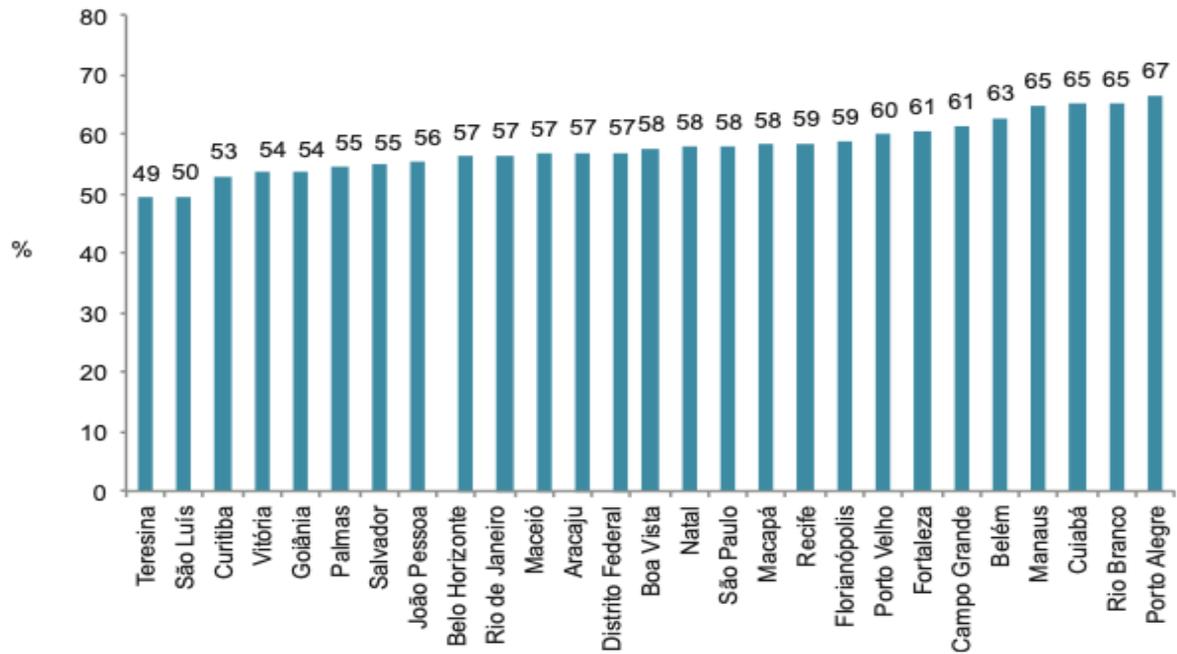
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Panorama de Saúde Mundial e Brasileiro

1.1 Incidência das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT)

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são responsáveis por 71% dos óbitos em todo o mundo, levando à morte de 15 milhões de pessoas com idades entre 30 e 69 anos. As doenças mais prevalentes são as doenças cardiovasculares, seguidas por cânceres, doenças respiratórias e diabetes (WHO, 2018). Segundo dados coletados em 2013 pela Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) realizado pelo Ministério da Saúde, cerca de 40% da população adulta brasileira possui pelo menos uma DCNT, o equivalente a 57,4 milhões de brasileiros. A hipertensão e a diabetes são as doenças de maior magnitude no território brasileiro, com maior incidência na população de baixa escolarização (FIOCRUZ, 2014). Ainda mais da metade de adultos acima de 18 anos estão com sobrepeso no Brasil, de acordo com a Figura 1 (BRASIL, 2020a). Considerando que o sobrepeso na meia-idade (50 anos) está associado com aumento de 20 a 40% de mortalidade por todas as causas (ADAMS et al., 2006) esses dados populacionais devem ser levados em consideração.

Percentual de homens (≥ 18 anos) com excesso de peso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$), segundo as capitais dos estados brasileiros e o Distrito Federal. Vigitel, 2018.



Percentual de mulheres (≥ 18 anos) com excesso de peso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$), segundo as capitais dos estados brasileiros e o Distrito Federal. Vigitel, 2018.

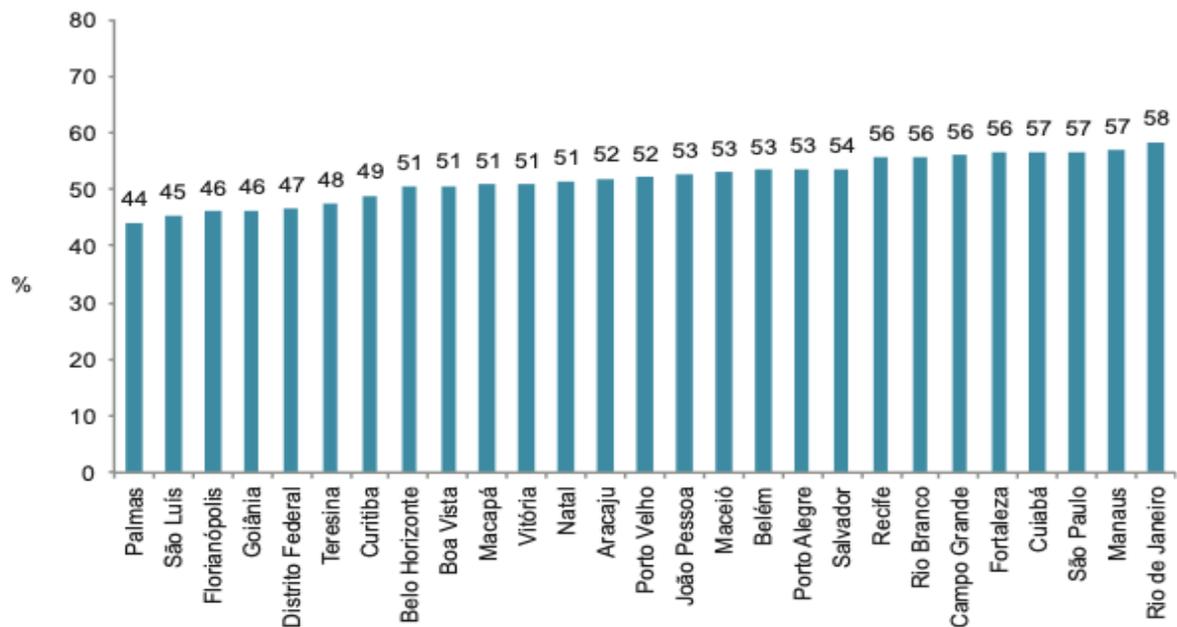


Figura 1. Percentual de homens (A) e mulheres (B) (≥ 18 anos) com excesso de peso ($\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$), segundo as capitais dos estados brasileiros e o Distrito Federal. Vigitel, 2018.

1.2 Fatores de risco associados às DCNT

Ao mesmo tempo, o número total de pessoas que sofrem de depressão ou outros transtornos mentais comuns, como a ansiedade, foi estimado em mais de 300 milhões em 2015. Esses transtornos são os maiores contribuintes para a incapacidade global e representam um importante custo (WHO, 2017). Um estilo de vida estressante marcado por estresse emocional (LEE et al., 2015), uma alimentação desbalanceada (rica em açúcar, sódio, carne vermelha e ácidos graxos trans-saturados associada a baixo consumo de frutas e hortaliças) (KUROTANI et al., 2016; MELAKU et al., 2018; TURATI et al., 2015), sobrepeso e baixa atividade física (KOOLHAAS et al., 2017) aumentam a incidência de doenças cardiovasculares (DCV) e outras DCNT. Esses fatores de risco promovem hipertensão, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia (PEREIRA et al., 2018; WHO, 2018; YAMAMOTO et al., 2019), obesidade (WHO, 2018), alta produção de citocinas inflamatórias, como IL-17A (PELUSO et al., 2012), perfil gênico pró-aterosclerótico (MILENKOVIC et al., 2011), disrupção do ciclo circadiano (MCALPINE; SWIRSKI, 2016; MORRIS et al., 2017; TAN; SCOTT, 2014) e alteração da expressão de neurotransmissores (REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2004). Tais marcadores estão associados à inflamação crônica de baixo grau (ICBG) e à inflamação vascular (KLÖTING; BLÜHER, 2014).

Visando reduzir a incidências dessas doenças, a ciência da nutrição tem buscado se aprofundar nos mecanismos de ação dos nutrientes e dos compostos bioativos dos alimentos, elucidando como eles atuam em nível molecular e como ocorre a interação desses compostos com os genes e as proteínas. Dessa forma, as pesquisas no campo da nutrição tem englobado os aspectos da biologia molecular, surgindo assim, a ciência da nutrigenômica (COMINETTI; ROGERO; HORST, 2017).

2. Desenvolvimento das DCNT e mecanismos envolvidos

2.1 Inflamação crônica de baixo grau (ICBG)

O padrão de estilo de vida moderno leva ao estresse oxidativo, à desregulação metabólica e à ativação de cascatas inflamatórias, aumentando a incidência de obesidade, diabetes tipo 2 (DT2), doenças cardiovasculares (DCV), esteatoses hepáticas e cânceres associados, além do

aumento de quadros de ansiedade e comportamentos depressivos, acentuando, assim, o desenvolvimento e o agravamento das outras comorbidades. Algumas dessas condições agrupadas são caracterizadas em um estado de “síndrome metabólica” e tem a inflamação crônica de baixo grau (ICBG) como denominador comum (CALDER et al., 2011; CATRYSSSE; VAN LOO, 2017).

2.2 Insulina: mecanismos de ação e vias de sinalização

A insulina é um hormônio peptídico anabólico secretado pelas células β pancreáticas e peça-chave no metabolismo dos carboidratos e dos lipídios. O seu estímulo principal para a sua produção é o aumento pós-prandial dos níveis de glicose e aminoácidos circulantes. A insulina atinge as suas células efetoras, como miócitos, adipócitos e hepatócitos, ativando a translocação dos portadores de glicose insulina-dependentes (GLUT), como o GLUT-4, aumentando a captação periférica de glicose, reduzindo assim, seus níveis no sangue. Os tecidos muscular esquelético e adiposo e o fígado são responsáveis por estocar o excesso de energia não utilizada na forma de glicogênio ou triglicerídeos (ŚWIDERSKA et al., 2020).

2.2.1 Distúrbios na cascata sinalizatória, Inflamação & Resistência insulínica

A insulina também estimula a lipogênese, inibe a lipólise e reprime a gliconeogênese no fígado (NEWSHOLME; DIMITRIADIS, 2001). Dessa forma, constantes altas concentrações de insulina levadas pelos constantes níveis elevados de glicose, aumentam a formação de gordura corporal e a longo prazo, visceral, além de gerar sobrecarga dos mecanismos de estoque energético nos tecidos e órgãos-alvo da insulina, no cérebro e no endotélio. Essa sobrecarga caracterizada por concentrações intracelulares supra fisiológicas de glicemia e outros nutrientes, favorece o estresse metabólico via estresse do retículo endoplasmático, a disfunção mitocondrial e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) com consequente disfunção celular. Esse estado oxidativo ativa a cascata inflamatória por ativação de macrófagos e produção de citocinas como IL-6, TNF- α , IL-17A, IL-1 β que por sua vez, ativam a via do NF- κ B, uma família de proteínas que atuam como fator de transcrição de diversos genes que retroalimentam a inflamação. Esse cenário inflamatório crônico de baixo grau afeta as vias de sinalização da insulina (CALDER et al., 2011; ODEGAARD; CHAWLA, 2013).

Em condições metabólicas normais, a insulina se liga ao seu receptor de membrana específico. O receptor de insulina (RI) é uma glicoproteína heterotetramérica com atividade quinase composta por duas subunidades extracelulares (α), e duas subunidades intracelulares (β). A ligação da insulina à subunidade α , gera alteração conformacional (dimerização) e a autofosforilação da subunidade β , ativando o RI. O RI ativado fosforila diversos substratos proteicos, conhecidos como IRS (*insulin receptor substrate*), em tirosina. A partir dessa etapa de fosforilação do IRS, inicia-se a transdução de sinal por meio das duas principais vias sinalizadoras: a Ras/MAPK, envolvida na regulação da expressão de genes que desempenham papel no crescimento e na diferenciação celular e a PI3K/AKT, a responsável pela ação metabólica da insulina - translocação do GLUT4 das vesículas citoplasmáticas para a membrana celular e influxo de glicose (via AKT) (ŚWIDERSKA et al., 2020), como demonstrado na Figura 2.

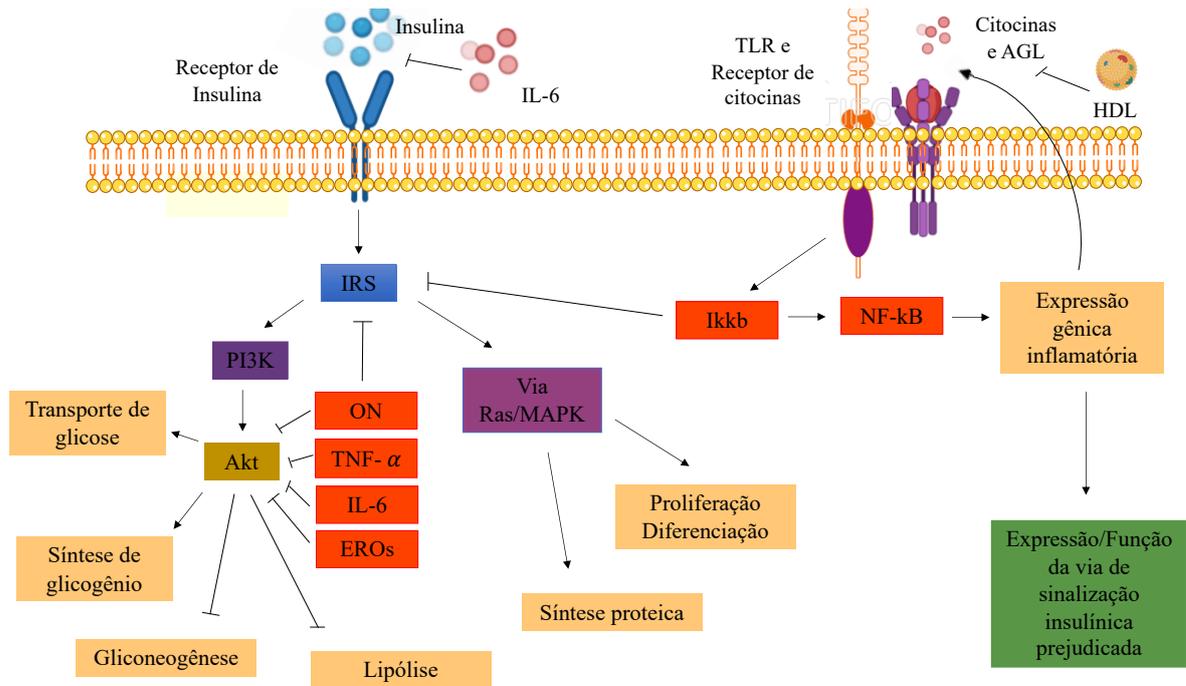


Figura 2. Esquema da interação direta entre as vias de sinalização inflamatória e da insulina. A cascata de sinalização da insulina se ramifica em duas vias principais. A via PI3K-Akt medeia a ação da insulina no metabolismo de nutrientes, incluindo a captação de glicose. A via da proteína quinase ativada por mitôgênio Ras (MAPK) medeia o efeito da insulina na expressão gênica, mas também interage com a via de PI3K-Akt para controlar o crescimento e a diferenciação celular. A ativação do receptor de insulina leva à fosforilação da tirosina do substrato do receptor de insulina (IRS) 1, iniciando assim a transdução do sinal. A estimulação da via inflamatória do NF- κ B, via ativação de receptores tipo Toll (TLR) por ácidos graxos livres (AGL), resulta na ativação de serina quinases, Ikkb, que reduz a capacidade de sinalização de IRS1. Os reguladores negativos relacionados de proteínas IRS incluem o óxido nítrico (ON), espécies reativas de oxigênio (EROs) e as citocinas IL-6 e TNF- α , que são induzidos pela inflamação e promovem a degradação de IRS. ON também reduz a atividade de PI3K-Akt por nitrosilação do Akt. Adaptado e traduzido de Calder et al. (CALDER et al., 2011).

A PI 3-quinase (PI3K) é uma molécula intracelular essencial para o transporte de glicose. A AKT é uma proteína quinase que, além de ativar a captação de glicose dependente de insulina a partir da ativação da PI3K, também estimula a síntese de glicogênio no fígado e no músculo esquelético. Esses distúrbios na cascata sinalizadora da insulina acometem o surgimento da resistência insulínica e de diversas doenças e essas disfunções estão muito relacionadas à alterações na via PI3K/AKT (ŚWIDERSKA et al., 2020). Os distúrbios da cascata sinalizadora desenvolvem-se a partir de diversos mecanismos. Um deles é a alta concentração circulante das citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β que se ligam a receptores, reduzindo a cascata sinalizadora e a função do RI (DE LUCA; OLEFSKY, 2008). Outro mecanismo é a ativação da fosforilação do IRS em resíduos de serina em vez de tirosina, resultando na redução da habilidade sinalizatória do substrato. Esse mecanismo ocorre através de enzimas como ERK, JNK, mTOR e IKkB (quinase inibidora do NFk κ B). Um terceiro mecanismo, decorrente da ativação

da I κ B β via ativação de receptores do tipo Toll (TLR) e a consequente ativação da via do NF κ B. O aumento da expressão e da produção intracelular de IL-6 e TNF- α resultante também interferem na via P13K/AKT (LI et al., 2007; ŚWIDERSKA et al., 2020).

Os TLR tem a suas expressões aumentadas na obesidade e os adipócitos e macrófagos em maior número, produzem mais ácidos graxos livres (AGL) via estimulação adrenérgica que por sua vez, ativam esses receptores (LIN et al., 2000; SUGANAMI et al., 2007). A reduzida expressão dos TLR está associada à proteção contra o desenvolvimento da resistência insulínica (SHI et al., 2006). Além disso, a lipoproteína de alto densidade (HDL) em bom número e qualidade, atua na metabolização e transporte reverso desses AGL, reduzindo assim, a ativação das cascatas de inflamação e na migração de macrófagos. Esse é um mecanismo importante também na prevenção da formação de placas ateroscleróticas que são formadas por quantidade excessiva de AGL fagocitados por macrófagos, transformados em células espumosas (JAIPERSAD et al., 2014; RADER; HOVINGH, 2014).

A IL-17A é uma citocina pró-inflamatória secretada por células-T auxiliares (Th17) na obesidade e nas patologias associadas, como inflamação do tecido adiposo (VEGA-CÁRDENAS et al., 2019). Por ativar a via do NF- κ B, a citocina induz o aumento da produção de outras citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β e IL-6, ajudando assim a retroalimentar a inflamação (BOSTEEN et al., 2014; MIOSSEC; KORN; KUCHROO, 2009).

A IL-2 é uma citocina comumente conhecida por promover a proliferação e a função das células T. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado o efeito de pequenas doses dessa citocina na melhora da tolerância da resposta imune inflamatória por alguns mecanismos. Primeiramente, essa citocina ativa a STAT 5, uma proteína adaptadora capaz de interferir na sinalização intracitoplasmática via receptor da IL-6 a partir do bloqueio da proteína adaptadora STAT 3. Essa cascata ativada por IL-2 promove, desta a forma, a redução da sinalização de IL-6. E a STAT 3, por sua vez, é uma proteína necessária para ativar a diferenciação das células TCD4 virgem em Th17 (PARK et al., 2005; ZHENG; WANG; HORWITZ, 2008). Ou seja, a produção de IL-2 é capaz de modular negativamente as vias da IL-6 e IL-17. Outro mecanismo de modulação das vias inflamatórias pela IL-2 é via expansão e ativação das células T reguladoras (Treg) (YE; BRAND; ZHENG, 2018).

Diferentemente de quadros infecciosos, a ICBG é um quadro metabólico silencioso que permeia mecanismos inflamatórios em níveis moderados que se perpetuam durante anos e décadas (ODEGAARD; CHAWLA, 2013).

3. Alimentos funcionais

3.1 Conceito, histórico e legislação

Uma alimentação rica em frutas e hortaliças e os componentes associados a esses alimentos como fibras, nutrientes e outros compostos bioativos, assim como a redução do consumo de produtos industrializados e de produtos animais é de extrema importância para a manutenção da saúde e a prevenção de DCNT (BRASIL, 2014).

O conceito de alimentos funcionais originou-se no Japão em meados da década de 1980, em referência a alimentos que, além de suas funções básicas nutricionais, demonstram benefícios fisiológicos ou que reduzam o risco de incidência de DCNT. Nos países da América do Norte, Europa e Oceania, começou-se a identificar e a definir como alimentos funcionais os gêneros alimentícios que contêm ingredientes naturais que promovem melhoras em certas vias metabólicas. Tais alimentos recebem um selo de aprovação do Ministério da Saúde do país e apresentam suas alegações de saúde, ou *claims*, de acordo com a regulamentação de cada país/região (COSTA; ROSA, 2016).

No Brasil, não é definido pela legislação o termo alimento funcional, mas avalia-se e aprova-se a alegação de propriedade funcional e propriedade de saúde. Também se estabelece as diretrizes para sua utilização e condições de registro (BRASIL, 1999). Para este objetivo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) conta com a contribuição de instituições como universidades (Departamento de Nutrição da UFMG e o Observatório de Políticas de Segurança Alimentar e Nutrição OPSAN da UnB), Organização Pan-americana de Saúde (OPAS), International Life Sciences Institute (ILSI) e a indústria de alimentos (COSTA; ROSA, 2016).

Esse arcabouço de parcerias entre instituições de pesquisa é extremamente importante, pois é necessário o robusto levantamento de evidências científicas para as solicitações de alegação de propriedade funcional, definida como “papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente desempenha no crescimento, no desenvolvimento, na manutenção e em outras funções normais do organismo humano” ou de propriedade de saúde, definida como “aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente e uma doença ou condição relacionada com saúde”. Para isso, estudos de composição química, ensaios bioquímicos, ensaios clínicos e estudos epidemiológicos são indispensáveis.

3.2 Compostos fenólicos presentes nos alimentos funcionais: classes e estrutura química

Os compostos fenólicos, ou polifenóis, fazem parte da família de compostos bioativos naturais e conferem cor e sabor às flores, frutas, folhas dos vegetais (MARZOCHELLA et al., 2011). Eles são compostos secundários sintetizados pelas plantas a partir do aminoácido fenilalanina com 8000 estruturas diversas já relatadas (HARBORNE, 1995). Estes compostos se caracterizam por uma estrutura química comum, derivada do benzeno, ligada a um grupo hidrofílico. Estes compostos compreendem uma grande variedade de compostos e são classificados em diferentes grupos de acordo com o número de anéis aromáticos e os elementos estruturais que ligam esses anéis (DEL RIO et al., 2013). Os compostos fenólicos não são essenciais para o crescimento mas atuam nos processos de pigmentação (frutas, flores, sementes e folhas), sinalização (entre plantas, agentes polinizadores e microorganismos) (YAMAGISHI et al., 2010), defesa (contra micro-organismos) e na proteção contra raios ultravioleta (CROZIER, 2007; WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Os polifenóis são classificados em dois grandes grupos, os flavonoides e os não flavonoides: ácidos fenólicos, estilbenos, taninos e cumarinas, vide Figura 3. Os flavonoides são compostos fenólicos de 15 carbonos com dois anéis aromáticos conectados a uma ponte de três carbonos e são divididos nas principais subclasses: flavonas, presentes na salsa, cebola, aipo; flavonóis, encontrados em alimentos como a cebola, tomate, cereja, maçã, chás e uva; flavan-3-óis, encontrados principalmente no cacau e vinho tinto; isoflavonas, encontradas em leguminosas, na soja e em seus derivados; antocianidinas, encontradas no vinho, tucum, açaí; e flavanonas, presentes nas frutas cítricas (MARIKO; HASSIMOTTO; LAJOLO, 2017; MARZOCHELLA et al., 2011; RATHEE et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2013). Essa última subclasse pode ser encontrada como apigenina-6-C-glucosídeo (isovitexina), apigenina-8-C-glucosídeo (vitexina), luteolina-8-C-glucosídeo (orientina), luteolina-6-C-glicosídeo (homooorientina) (DEL RIO et al., 2013).

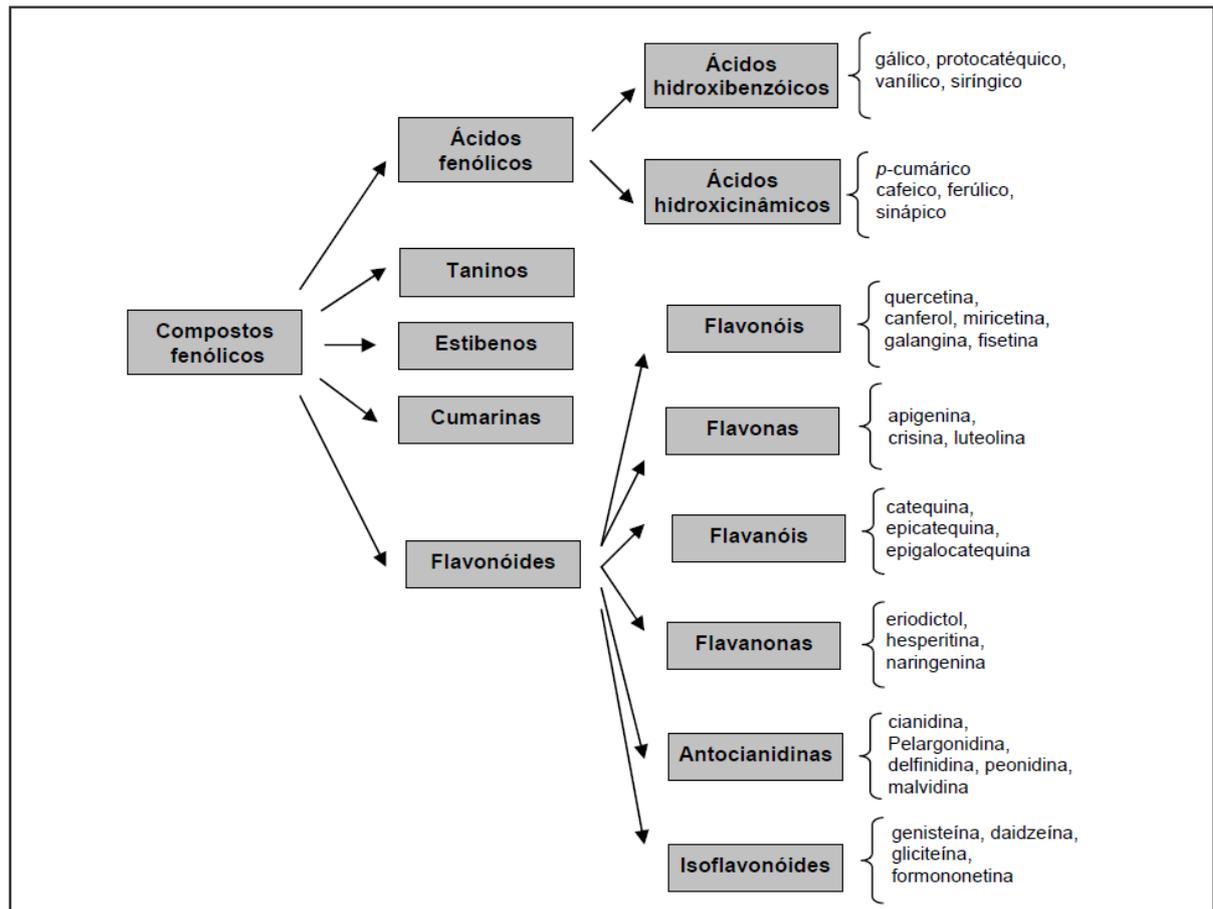


Figura 3. Esquema de classificação dos compostos fenólicos. Fonte: (FERREIRA; ABREU, 2007) (Adaptado).

3.3 Compostos fenólicos e efeitos na saúde humana

Há diversas evidências sobre o efeito dos polifenóis a médio e longo prazo na prevenção de DCNT como DCV, DT2 e nos distúrbios cognitivos (APPEL et al., 2011; NABAVI et al., 2015; SPENCER; CROZIER, 2016). Vários efeitos benéficos foram relacionados ao consumo desses compostos, como atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticancerígenas (FELICIANO et al., 2015; TURATI et al., 2015). Tais compostos são capazes de modular receptores, de ativar enzimas, e de atuar na sinalização celular e na expressão gênica (KURIYAMA et al., 2006; SERGENT et al., 2010).

Os mecanismos pelos quais os polifenóis previnem ou retardam o surgimento de DCNT são diversos. Esses compostos são capazes de reduzir ou inibir a ação de enzimas como a óxido nítrico sintase (iNOS), COX, LOX e PLA2 ou também de inibir a atividade do fator de transcrição NF- κ B, reduzido assim, a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas e a expressão de moléculas de adesão vascular e intracelular e de quimiocinas (BARBER-

CHAMOUX et al., 2018; DEL RIO et al., 2013; HABAUZIT et al., 2015; MARZOCHELLA et al., 2011; MILENKOVIC et al., 2011). Assim, os compostos fenólicos ajudam a controlar a hipertensão, a formação de placas ateroscleróticas e resistência à insulina, como descrito no item 2.2.1.

4. Biodiversidade brasileira e sua riqueza em compostos bioativos

4.1 O bioma Cerrado e seus frutos

A biodiversidade brasileira é uma das maiores do mundo, com cerca de 55.000 espécies de plantas catalogadas, sendo 46% endêmicas (FORZZA, 2010). Porém, relata-se investigação de apenas 0,4% da flora (BRASIL, 2012). Esses dados elencam o Brasil como abrigo de dois *hotspots* mundiais (áreas prioritárias de conservação) de biodiversidade: Mata Atlântica e Cerrado (BRASIL, 2020b).

Conhecido como “o berço das águas” por fornecer 40% da água doce do país, alimentando 8 das 12 principais bacias hidrográficas brasileiras, o Cerrado é também a savana mais biodiversa do mundo, e o segundo maior bioma do Brasil, ocupando quase 25% do território brasileiro (RIBEIRO; WALTER, 1998). Esse bioma abriga cerca de 200 espécies de plantas medicinais e de 400 outros tipos de produtos vegetais que podem ser utilizados para alimentação humana. Sob o olhar econômico, mais de 50 espécies de frutos típicos do Cerrado são fonte de renda de diversas comunidades, sendo o Cerrado morada de mais de 25 milhões de pessoas (REDE CERRADO, 2020).

Os frutos do Cerrado são amplamente utilizados na medicina popular (ROESLER; LORENCINI; PASTORE, 2010) são ricos em micro, macronutrientes e compostos bioativos que podem contribuir para prevenção de DCNT (MARIKO; HASSIMOTTO; LAJOLO, 2017; SIQUEIRA et al., 2013). Ainda assim, essa fonte única de frutos ainda é pouco explorada (INFANTE et al., 2016). O Cerrado já perdeu 1/3 em vegetação nativa em 35 anos, o que representa quase 30 milhões de hectares (MAPBIOMAS, 2019). Esse ecossistema sofre risco de extinção até 2030 devido ao desmatamento para a pecuária, que ocupa 44% de território cerradense e para o cultivo de *commodities* como a soja. Vale ressaltar que apenas 2,2% do Cerrado é oficialmente protegido (MARRIS, 2005). A pouca valorização dessas espécies e dos saberes populares oriundos das comunidades indígenas e quilombolas potencializam esse dízimo da nossa biodiversidade.

4.2 Passifloras nativas e as propriedades de saúde associadas

As espécies do gênero *Passiflora* são ricas em polifenóis, e possuem propriedades exploradas pela medicina popular local. Cerca de 96% das suas espécies estão distribuídas nas Américas, principalmente Brasil e Colômbia (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; KARPÍŃSKI*, 2020). Nos últimos anos, o Brasil gerou uma produção anual superior a 900.000 toneladas de maracujá da espécie *Passiflora edulis* Sims (CORRÊA et al., 2016; REDE CERRADO, 2020). Os extratos de maracujás das espécies *P. edulis* Sims *Passiflora alata* Curtis e *Passiflora incarnata* L, entre outras, possuem valor comercial em nível global por meio da indústria farmacêutica, nutracêutica, de autocuidado, e de alimentos e bebidas (INDUSTRY REPORT, 2019). A polpa de diversas espécies contém fibras e polifenóis, incluindo flavonoides (CAZARIN et al., 2016).

4.2.1 *Passiflora setacea*: composição química e efeitos na saúde dos seus compostos

As passifloras são muito estudadas devido a seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, ansiolíticos, antidepressivos e protetores vasculares e neuronais (APPEL et al., 2011; CAZARIN et al., 2014; DA SILVA et al., 2013; DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004; KU; KWAK; BAE, 2014; LEE; KU; BAE, 2014; MUHAMMAD et al., 2019; NAGAPRASHANTHA et al., 2011; SHAL et al., 2018; SOULIMANI et al., 1997; WANG et al., 2013). A espécie *Passiflora setacea* é um fruto silvestre do Cerrado, com 70% do peso em polpa e sementes, como visto na Figura 4, e também possui revelado propriedades antioxidantes e antimicrobianas contra bactérias Gram negativas *in vitro* (DE SANTANA et al., 2015; SANTANA, 2015). Esses efeitos potencialmente são devidos à presença de vitamina E e de compostos bioativos.

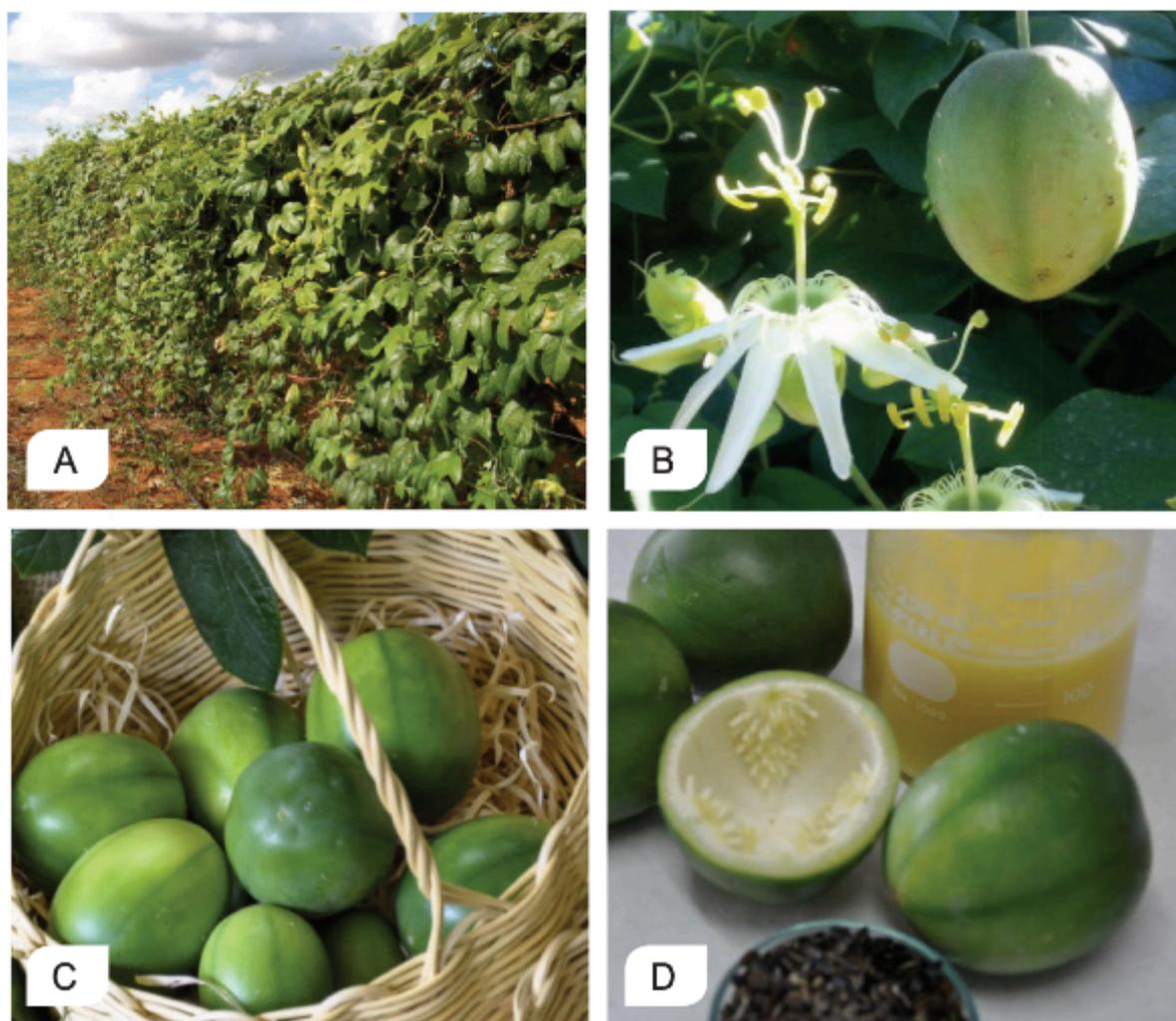


Figura 4. *Passiflora setacea* BRS Pérola do Cerrado – (A) ramagem; (B) flores e fruto; (C) frutos; (D) casca, polpa e sementes. Fonte: (COSTA et al., 2015).

Quanto aos efeitos validados na literatura dos flavonoides já identificados na polpa de *Passiflora setacea* (DE CARVALHO; DE OLIVEIRA; COSTA, 2018), a vitexina exibe efeitos antioxidante, anti-inflamatório, antimetastático, antitumoral (WEI et al., 2014; YANG et al., 2013), antidepressivo (CAN; DEMIR ÖZKAY; ÜÇEL, 2013) e anticonvulsivante (ESMAIL ABBASI et al., 2013). Orientina e isoorientina apresentam efeitos vasculares, citoprotetores e anti-inflamatórios (KU; KWAK; BAE, 2014; LEE; KU; BAE, 2014; ZUCOLOTTO et al., 2009). Devido ao seu poder de diminuir o estresse oxidativo, o tratamento com orientina e isoorientina demonstrou melhorar os déficits cognitivos em camundongos com modelo de doença de Alzheimer (YU et al., 2015). Foi demonstrado que orientina, isoorientina, vitexina e extrato de planta de isovitexina possuem propriedades ansiolíticas (SOULIMANI et al., 1997)

e inibem a expressão de iNOS, COX-2, IL-6, TNF- α *in vitro* (NAM et al., 2017). A hesperitina demonstrou atenuar a neuroinflamação induzida por LPS, reduzindo a expressão de citocinas inflamatórias e geração de espécies reativas de oxigênio como nível de Nrf2 melhorado no cérebro de camundongo (MUHAMMAD et al., 2019). Essa flavanona também apresentou efeitos anti-inflamatórios em ensaios *in vitro* (CHANG et al., 2016). Sua forma glicosídica, a hesperidina, tem demonstrado impacto na expressão gênica relacionada ao perfil anti-inflamatório e anti-aterogênico em humanos (MILENKOVIC et al., 2011) e apresenta efeito positivo na função vascular também em humanos (HABAUZIT et al., 2015; MORAND et al., 2011).

Os ácidos fenólicos, como os ácidos clorogênico e dihidroferúlico, são encontrados na polpa de PS e apresentam alta atividade antioxidante, embora não tenham sido capazes de proteger lipoproteína de baixa densidade (LDL) da oxidação induzida por ferro (GÓMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007). Metabólitos do ácido clorogênico também foram capazes de parcialmente reduzir hiper reatividade de plaquetas induzida por estresse oxidativo (RECHNER, 2004; STALMACH et al., 2009). Outro metabólito do ácido clorogênico, ácido dihidrocafeico, foi capaz de eliminar ROS intracelular (HUANG; DE PAULIS; MAY, 2004) e reduzir citotoxicidade e produção de IL-6 (POQUET; CLIFFORD; WILLIAMSON, 2008). Poliaminas também identificadas na PS (BOMTEMPO et al., 2016), apresentam efeitos antioxidantes e neuroprotetores (KALÁČ, 2014).

As sementes, a polpa e a casca de *Passiflora setacea* são fontes de vitamina E e compostos bioativos como carotenoides, terpenoides, poliaminas e polifenóis, especialmente as flavanonas. A hesperetina, um composto da classe das flavanonas típico de frutas cítricas também está presente na polpa (BOMTEMPO et al., 2016; DE CARVALHO; DE OLIVEIRA; COSTA, 2018; DE SANTANA et al., 2015; GADIOLI et al., 2018; GOMES et al., 2017; MORAIS et al., 2015; SANTANA, 2015). A polpa de *Passiflora setacea* contém maiores teores de orientina que os encontrados em suas folhas (0,48 mg/g b.s.) e nas folhas da *P. edulis* f. *edulis* (0,48 mg/g b.s.). Ela possui também maiores teores de orientina e vitexina que o suco de açaí (*E. oleracea*) (0,35-0,55 mg/g b.s. e 0,62 mg/g b.s., respectivamente) e maiores teores de isoorientina que os encontrados nas folhas de *P. edulis* f. *flavicarpa* (0,58 mg/g b.s.) e *P. edulis* f. *edulis* (0,46 mg/g b.s.) (GOMES et al., 2017). A polpa também possui um conteúdo de hesperetina maior que o encontrado em suco de laranja fresco (0,11 mg/g b.u.) e conteúdo similar ao do suco de limão fresco (0,14 mg/g b.u.), de acordo com o USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods (n.d.). Dados internos não publicados da Embrapa Cerrados mostram a presença dos

ácidos siríngico, ferúlico, p-cumárico, sináptico, o-cumárico e cafeico na polpa de *Passiflora setacea*.

O consumo de alimentos ricos nesses compostos tem demonstrado exercer atividades anti-inflamatórias e corroboram a menor incidência de doenças crônicas e cânceres (MARZOCHELLA et al., 2011; RATHEE et al., 2009). O metabolismo desses compostos é bastante conhecido e estudado em animais, porém há poucos dados robustos em seres humanos (COSTA; ROSA, 2016).

5. Biodisponibilidade

5.1 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos

A metabolização dos polifenóis presentes em alimentos começa na cavidade oral. A mastigação tem um papel importante na transformação de alimentos, uma vez que a ação mecânica perturba a estrutura do alimento e permite a liberação de compostos. O metabolismo de compostos fenólicos glicosilados iniciam-se assim que entram em contato com as enzimas glicosidases das bactérias na cavidade oral (VELDERRAIN-RODRÍGUEZ et al., 2014). A passagem do alimento pelo estômago é essencial para promover a degradação da matriz. Algumas substâncias podem sofrer hidrólise durante a passagem estomacal e uma pequena porção pode ser absorvida no intestino delgado, principalmente as agliconas que são formas menos complexas que as formas glicosiladas (GONTHIER et al., 2003). Ainda assim, alguns estudos *ex vivo* em ratos mostraram que a absorção de ácidos fenólicos pode ocorrer no nível gástrico ou em porções do intestino, como jejuno, íleo e cólon (LAFAY et al., 2006; ZHAO; MOGHADASIAN, 2010).

No entanto, grande parte dos compostos chega intacta ao intestino grosso, o que sugere que o processo mais importante para a modificação e a estabilidade dessas substâncias esteja relacionado às reações promovidas pela microbiota intestinal (CORREA-BETANZO et al., 2014). No cólon, os polifenóis sofrem a ação das β -glicosidases, enzimas bacterianas intestinais. Essas enzimas catalisam a hidrólise das ligações beta-glicosídicas, liberando agliconas que são absorvidas pelos enterócitos, antes de serem transportados para o fígado. Entretanto, existe ainda uma parcela que é degradada pela microbiota intestinal em diversos ácidos aromáticos simples, o que reduz a taxa de absorção dos polifenóis (MORAND, 2012), conforme o esquema geral do processo representado na Figura 5.

Embora o fígado seja reconhecido como o principal órgão das reações de biotransformação, a maioria das substâncias fenólicas glicosiladas é metabolizada no intestino delgado pela ação de hidrolases de membrana celular intestinal e de enzimas da microbiota do intestino. Essas reações de primeira passagem ocorrem no intestino, permitindo o metabolismo prévio das substâncias, que, por sua vez, promovem a absorção (SELMA; ESPÍN; TOMÁS-BARBERRÁN, 2009). Essas substâncias são absorvidas no cólon e distribuídas através da corrente sanguínea pelas proteínas plasmáticas ou transportadas para o fígado pela veia porta (SOUZA; CASANOVA; COSTA, 2015).

Após as reações de conjugações intestinais e hepáticas, os polifenóis são encontrados no plasma sob a forma de metabólitos sulfatados, glucuronidados ou metilados (MANACH; DONOVAN, 2004), com exceção das antocianinas que são encontradas na forma de glicosídeos no sangue por conta do seu mecanismo de absorção diferenciado no estômago. Os compostos fenólicos têm sido detectados no plasma humano entre uma e sete horas após o consumo de alimento-fonte (MANACH et al., 2005).

As formas circulantes são então transportadas no sangue ligadas à albumina sérica e liberadas nos tecidos-alvos. Todavia, não foi observado nenhum tipo de acúmulo de polifenóis nos tecidos, mesmo após exposição prolongada (MANACH et al., 2006), o que exige uma ingestão regular e contínua de produtos vegetais (MORAND, 2012).

A ação das beta-glicosidases no processo de absorção é determinante para a melhor biodisponibilidade e atividade biológica dos fenólicos no metabolismo humano (MAMMA; HATZINIKOLAOU; CHRISTAKOPOULOS, 2004). A molécula de açúcar (glicosídeo) é igualmente imprescindível na eficiência da absorção dos fenólicos pelo intestino (MORAND et al., 2000). Alguns estudos mostraram que glicosídeos de quercetina presentes em cebolas foram absorvidos de forma mais eficaz que na sua forma não-conjugada (aglicona pura) (HOLLMAN et al., 1999).

O restante dos compostos não absorvidos é excretado pelas fezes ou em menor proporção pela urina. O que é secretado pela bile, passa pelo duodeno e pode ser eventualmente reabsorvido graças à ação das enzimas bacterianas das partes distais do intestino, prolongando a ação desses compostos no organismo (TOMÁS-NAVARRO; VALLEJO; TOMÁS-BARBERRÁN, 2014).

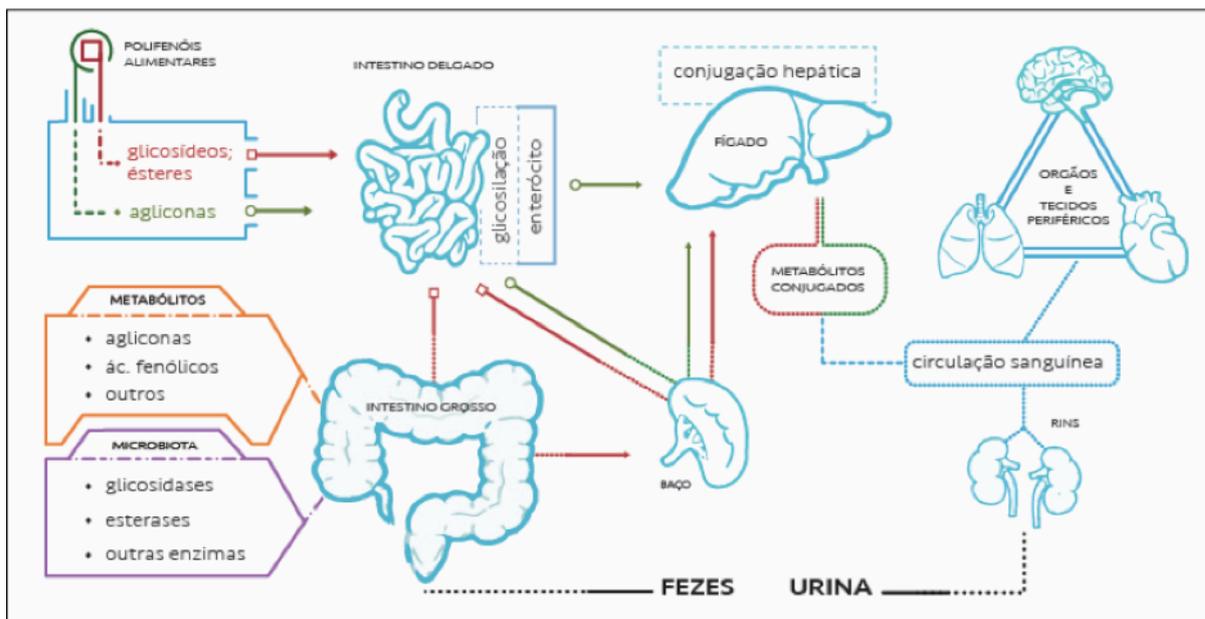


Figura 5. Esquema geral do metabolismo dos polifenóis. Fonte: (MORAND, 2012) (adaptado e traduzido).

Frente às informações trazidas, vê-se a importância do consumo do alimento fonte de polifenóis comparado com suas formas isoladas. O estado de saúde do indivíduo é importante para a sua menor ou maior metabolização e absorção dos compostos. Também é importante conhecer a cinética de metabolização dos polifenóis presentes no alimento de interesse.

5.2 Biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes na *Passiflora setacea*

Sobre os compostos conhecidamente presentes na polpa de PS, existem alguns estudos que norteiam o presente estudo. As flavanonas, como a hesperetina e naringenina são largamente encontradas nos cítricos, sendo a mais famosa a sua forma glicosilada, hesperetina-7-O-rutinosídeo (hesperedina) (DEL RIO et al., 2013). Mandal et al. (MANDAL et al., 2019) validaram um método bioanalítico para a estimativa de hesperitina em plasma humano por espectrometria de massa de ionização por cromatografia líquida de elétron spray. Detectou-se a presença da molécula em até 4 horas, sendo que ela já é encontrada no plasma em 20 minutos após o consumo (MANACH et al., 2003).

Em um estudo com indivíduos saudáveis que consumiram 250 mL de suco de laranja (*Citrus sinensis*) rico em hesperedina e naringenina e compostos de hesperedina, encontraram-

se metabólitos no plasma em até 4,4 horas (MULLEN et al., 2008). Já no estudo de Stalmach et al. (STALMACH et al., 2009), após consumo de chá de rooibos contendo vitexina, isovitexina, orientina e homoorientina, não foram detectados metabólitos no plasma nem na urina. Uma possível explicação é que são compostos que não são absorvidos no intestino delgado ou intestino grosso e a microbiota pode não ser capaz de clivar a ligação entre açúcar e carbono (DEL RIO et al., 2013). Os demais estudos de biodisponibilidade desses polifenóis, em camundongos ou ratos, apontam que a vitexina alcança seu pico plasmático em 2h e pode durar por até 4h. Já a isovitexina possui o pico de 1h30 com tempo de circulação de até 5h (BAI et al., 2017).

Devido à riqueza e complexidade molecular das plantas nativas brasileiras, é de extrema importância o investimento em pesquisas que objetivam a elucidação dos compostos presentes e a biodisponibilidade dos mesmos.

6. Nutrigenômica

6.1 Marcadores e ferramentas ômicas na ciência da Nutrição

Os alimentos que comemos regularmente têm um grande potencial de afetar nosso genoma e alterar as funções corporais (KASHANI et al., 2019). A nutrigenômica tem como objetivo investigar os efeitos dos nutrientes e dos compostos bioativos dos alimentos sobre a expressão gênica e suas repercussões na prevenção e tratamento de DCNT (HENDRIKS, 2013). Os estudos em nutrigenômica ajudam a nortear hipóteses científicas sobre como a alimentação pode modular diferentes vias metabólicas (NEEHA; KINTH, 2013), a monitorar a eficácia de intervenções nutricionais, a identificar genes e vias moleculares cruciais na prevenção/tratamento auxiliar, assim como a desenvolver alimentos funcionais ou com alegação de saúde (COMINETTI; ROGERO; HORST, 2017).

Os alimentos podem modular a expressão de genes de forma direta ou indireta. A primeira forma decorre quando a substância interage diretamente com receptores nucleares ou fatores de transcrição, alterando assim, a taxa de transcrição dos genes-alvo desses elementos regulatórios. Esse é o caso de alguns carotenoides, ácidos graxos e outros nutrientes (COUSINS, 1999). Grande parte dos nutrientes e dos compostos bioativos modulam indiretamente a expressão gênica, por meio da ativação de cascatas de sinalização que decorrerá na translocação de determinado fator de transcrição do citoplasma para o núcleo, regulando a taxa

de transcrição gênica (COMINETTI; ROGERO; HORST, 2017). Compostos fenólicos como o resveratrol podem intervir em vias de sinalização celular atuando nas etapas pós-transcricionais, modulando a estabilidade do RNAm ou bloqueando a fosforilação do inibidor de kappa B (I κ B) (RIST; WENZEL; DANIEL, 2006).

A atuação dos compostos fenólicos na via do fator nuclear κ B (NF- κ B) é um exemplo-chave na prevenção ou no retardo do desenvolvimento de DCNT. O NF- κ B refere-se a uma família de proteínas que exercem a função de fatores de transcrição e assim coordenam a expressão de muitos genes, dentre eles aqueles relacionados à apoptose, às respostas imunes inata e adaptativa, à adesão e proliferação celular, e à inflamação. No que diz respeito à inflamação, a via do NF- κ B exerce um papel central, sendo responsável pela expressão de genes que codificam, por exemplo, citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão endotelial, essenciais para a montagem da resposta inflamatória (PERKINS, 2007).

O NF- κ B tem suas subunidades mantidas no citoplasma em grande parte das células não-estimuladas e na forma de dímeros ligados a proteínas inibidoras kappa B (I κ Bs). A família de I κ Bs é composta por nove membros: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p100, p105, I κ B γ , I κ B ζ , BCL-3 e I κ BNS. Uma vez que a célula é estimulada, o complexo de I κ B quinases (IKK), formado por duas subunidades catalíticas (IKK α ou IKK1 e IKK β ou IKK2) e uma subunidade regulatória (IKK γ ou NEMO), é ativado, de modo que as subunidades catalíticas, formando homo ou heterodímeros, fosforilam uma I κ B, marcando-a para ubiquitinação e degradação no proteossoma. Assim, os dímeros de NF- κ B, separados da I κ B, translocam-se para o núcleo, onde se ligam a sequências de DNA responsivas nos diversos genes-alvo, inibindo a transcrição destes genes (KARIN; BEN-NERIAH, 2000; PERKINS, 2007).

Um mecanismo que regula negativamente a expressão gênica são os RNAs de interferência (RNAi), os quais possuem duas moléculas funcionais principais: siRNAs (pequenos ácidos ribonucleicos de interferência) e miRNAs ou microRNAs. Os microRNAs são ribonucleotídeos curtos de cadeia simples com um comprimento aproximado de 19–24 nucleotídeos (KASHANI et al., 2019). Eles podem regular a expressão do gene principalmente afetando os RNAs mensageiros (RNAm) (HUNTZINGER; IZAURRALDE, 2011).

O avanço na área de genômica nutricional foi beneficiado pelo desenvolvimento de ferramentas ômicas que facilitam a análise de milhares de variações de genes transcritos, proteínas e metabólitos simultaneamente. Diferentemente do genoma, que compreende o conjunto de regiões gênicas e não gênicas contidas em um cromossomo, a análise do transcriptoma, mostra

somente os genes que estão transcritos (sintetizando RNAs) no momento em que o tecido foi isolado. O perfil de genes expressos é dependente do tipo do tecido e do ambiente a que este está submetido. Da mesma forma, a proteômica e a metabolômica mostrarão um retrato do tecido em termos de expressão de proteína e de compostos metabólicos no momento de sua avaliação (COSTA; MARTINS, 2010). Portanto, de acordo com a alimentação, os níveis de estresse que o organismo está submetido, o perfil dos genes expressos pode não ser o mesmo, o que é percebido na análise do transcriptoma, do proteoma ou do metaboloma (RIST; WENZEL; DANIEL, 2006).

6.2 A tecnologia de Microarranjos de DNA (*Microarrays*)

A tecnologia de microarranjos de DNA (ou DNA-chip) é uma das principais ferramentas para a análise transcriptômica, pois possibilita a avaliação de milhares de transcritos simultaneamente (ZHANG; YOU; XIAO, 2015)(JALURIA et al., 2007). A metodologia consiste em quantificar os RNAm que estão diretamente envolvidos com o nível de expressão de genes específicos. Os microarranjos de DNA compreendem coleções de segmentos de DNA de regiões gênicas expressas, distribuídas em uma superfície sólida de forma ordenada. Cada DNA do arranjo tem um “endereço próprio”, uma posição individual, chamada *spot* (ou ponto). Cada spot contém, portanto, uma pequena quantidade de DNA devidamente imobilizada, denominada sonda. Os diferentes transcritos da amostra-alvo tende a se ligar somente à sua sonda devido à sequência complementar de nucleotídeos, que no caso, viria da expressão gênica do tecido estudado, sendo o processo chamado de “hibridização” (JALURIA et al., 2007).

O princípio do método de microarranjos visa a promover a hibridização dos cDNA – DNA complementar obtidos a partir do RNA mensageiro (RNAm) das amostras do estudo com as sondas imobilizadas no microarranjos que apresentam sequências similares aos genes da investigação. A etapa de conversão do RNAm para DNAc é necessária devido ao fato de o DNAc ser uma molécula mais estável que o RNAm, e portanto, com menor possibilidade de degradação das amostras no decorrer da análise. Uma vez obtido o DNAc, estes são amplificados por meio da reação de polimerização em cadeia (Polimerase Chain reaction – PCR) e marcados com corante fluorescente, normalmente que podem estar ligados a cianina 3 ou 5 (Cy3 ou Cy5).

Em geral, a análise de microarranjos é comparativa, ou seja, compara-se a taxa de transcrição dos genes obtidos de tratamentos diferentes, antes e depois de um determinado tratamento. Portanto, um dos tratamentos é marcado com Cy3, que emite a coloração verde, marcador usado, normalmente, nas amostras obtidas antes do tratamento ou em amostras do primeiro tratamento, quando a comparação é entre tratamentos. E o tratamento (ou conforme o caso, o segundo tratamento) é marcado com Cy5, que emite luz vermelha. Uma vez obtidas as amostras marcadas, realiza-se a etapa de hibridização com os DNAC dos tratamentos marcados com as correspondentes sondas. Após a etapa, remove-se os DNAC que não se ligaram às sondas e o microarranjo é exposto a um feixe de raios *laser*, que permite identificar a emissão da fluorescência dos corantes. A intensidade da fluorescência é captada por leitores (*scanners*) e conforme a cor apresentada pelo spot é possível identificar se há variação na expressão gênica do gene do spot (COMINETTI; ROGERO; HORST, 2017).

7. Ensaio clínico e métodos estatísticos

A grande maioria dos estudos sobre os efeitos das plantas nativas brasileiras encontrados na literatura são *in vitro* ou em animais. A realização de ensaios clínicos demanda altos investimentos e tempo. Esse tipo de estudo consiste na investigação sobre os efeitos da administração de um produto em grupos de seres humanos, com o objetivo de comprovar a sua segurança, eficácia, dose recomendada e possíveis efeitos adversos. Para isso, algumas etapas são necessárias como o recrutamento dos participantes de pesquisa, infraestrutura e ambiente ético-regulatório (GOMES et al., 2012).

Pesquisas com seres humanos envolvem muitas variáveis como parâmetros bioquímicos e antropométricos podem exigir uma demanda de complexidade de análise e correlações entre tais variáveis. Especialmente no Brasil, pela natureza genética populacional muito diversa. É necessário assim, um método estatístico que ajude a avaliar as relações entre as variáveis coletadas.

A Análise multivariada de Componentes Principais (ACP) analisa os dados de maneira reducionista, eliminando as sobreposições e escolhendo as melhores representações de dados, por meio de combinações lineares das variáveis originais. Essa análise é uma ferramenta importante quanto ao objetivo de reter ao máximo as informações de variação das variáveis e correlacionar com o efeito de cada tratamento analisado.

Nesta análise, cada componente principal é uma combinação linear de todas as variáveis originais e que são independentes entre si. A técnica agrupa os indivíduos de acordo com a sua variação, segundo suas variâncias, ou seja, segundo seu comportamento dentro da população (HONGYU; SANDANIELO; JUNIOR, 2016). Os gráficos são gerados a partir do propósito de redistribuir a variação observada nos eixos originais em um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados (THOMAS, 1988).

Os frutos da biodiversidade brasileira têm revelado um perfil rico em compostos bioativos ainda pouco explorado e identificado. Porém a literatura revela que o teor de fenólicos totais é significativamente superior ao de alimentos funcionais oriundos de outros países como a *cranberry*, maçã, chá verde, dentro outros. Além disso, são raros os ensaios clínicos que avaliem os efeitos funcionais de plantas nativas brasileiras na saúde humana. Efeitos que na maioria das vezes, são descritos pelos saberes populares, mas que não geram impacto nacional devido à escassez de dados científicos. Sendo assim, é inestimável para a população brasileira investimento em pesquisas clínicas sobre o efeito dessas plantas tanto na prevenção quanto como tratamento auxiliar de comorbidades.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2 – HIPÓTESE, OBJETIVOS, MATERIAL E MÉTODO DE PESQUISA

O presente capítulo tem por objetivo delimitar a hipótese da pesquisa e os objetivos, bem como descrever o material e os métodos utilizados para que estes fossem alcançados. Os protocolos detalhados das análises realizadas são apresentados no final do trabalho, na forma de anexos.

2.1 HIPÓTESE DA PESQUISA

A ingestão da polpa de *Passiflora setacea* (maracujá-do-sono), espécie nativa do Cerrado e rica em compostos fenólicos, é capaz de atuar em certas estruturas celulares e promover modulação do perfil de expressão gênica, da produção de biomarcadores e da ativação de cascatas de sinalização, resultando assim, na melhora do quadro de estresse e sono relatado pela cultura popular.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do consumo da polpa de *Passiflora setacea* em biomarcadores metabólicos e inflamatórios, assim como no perfil de expressão gênica global de células circulantes de voluntários do sexo masculino com sobrepeso.

2.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar alterações séricas de marcadores do metabolismo glicídico e lipídico após 3h de consumo de dose única do suco e após 14 dias de consumo continuado
- Mensurar alterações séricas de citocinas pró e anti-inflamatórias após 3h de consumo de dose única do suco e após 14 dias de consumo continuado
- Determinar o perfil nutrigenômico de células mononucleares circulantes periféricas sanguíneas (PBMC) pós 3h de consumo de dose única do suco (Fase II)

MATERIAL E MÉTODOS

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Delineamento experimental

Este estudo é do tipo experimental duplo-cego *crossover* e foi realizado comparando o efeito de diferentes quantidades de polpa de *Passiflora setacea* com uma bebida placebo (item 2.3.4). Pela média do tempo de circulação dos compostos presentes na polpa de PS em humanos validados em estudos de biodisponibilidade de fenólicos apresentados no capítulo de revisão bibliográfica, estipulou-se o tempo de três horas para coleta das amostras de sangue. Para avaliação do efeito agudo, amostras de sangue foram coletadas pela manhã, em jejum, e três horas após o consumo das bebidas para quantificação plasmática de marcadores bioquímicos (Fases I e III) (2.3.7) e para isolamento das PBMC (item 2.3.8) para posterior extração do RNAm (item 2.3.10) (Fase II). Para avaliação do efeito do consumo prolongado de 14 dias, amostras de sangue foram coletadas no 15º dia pela manhã, em jejum. Aplicações de questionário de frequência de consumo de alimentos ricos em polifenóis e avaliação antropométrica foram realizadas no processo seletivo dos voluntários (item 2.3.5.1), como demonstrado na Figura 6. O n amostral variou em cada fase devido a desistências das fases I para II e III para IV e a entrada de novos participantes de pesquisa na Fase III.

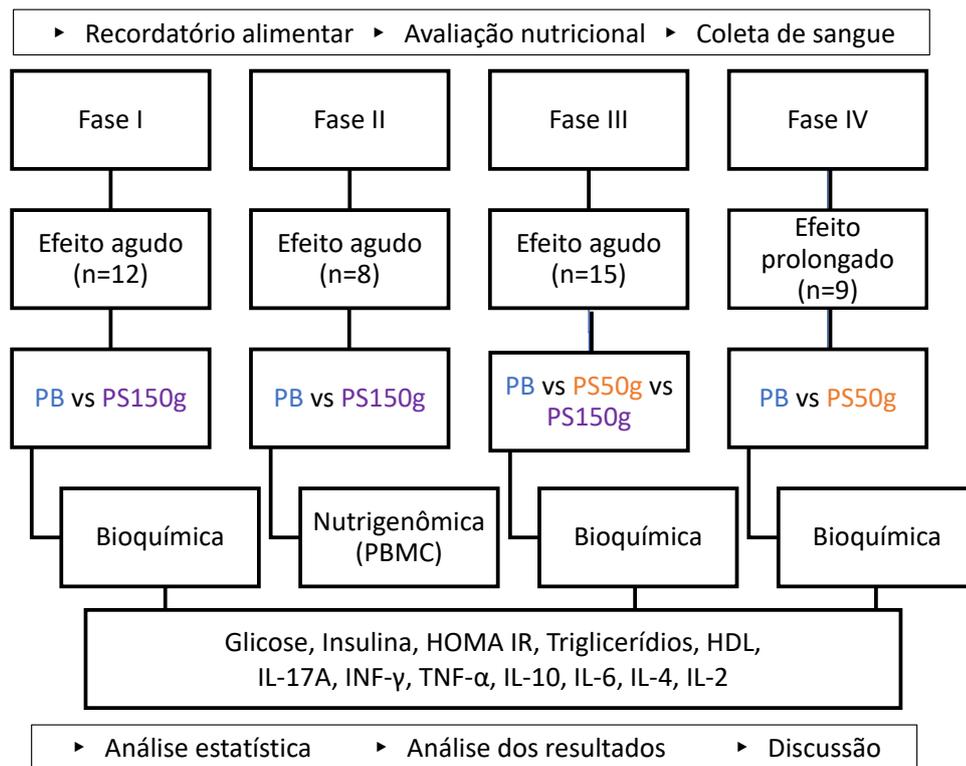


Figura 6. Fluxograma dos experimentos.

A fase III do estudo foi diagramada em CONSORT para demonstrar as etapas do ensaio clínico realizadas e o fluxo de participantes em cada uma. No total, 21 indivíduos foram selecionados por atenderem todos os critérios de inclusão (item 2.3.5.1) na etapa III. Dois participantes foram excluídos por iniciarem atividade física intensa após o processo seletivo e quatro participantes desistiram de participar devido à logística da pesquisa não ser compatível com outras atividades pessoais. Assim, primeiramente sete voluntários foram alocados para o consumo do suco de *Passiflora setacea* e oito para o consumo da bebida placebo (PB). Após sete dias de período de dessensibilização, efetuou-se a inversão dos grupos de tratamento. Não houve perda de material e assim, nenhum indivíduo foi excluído das análises, vide Figura 7.

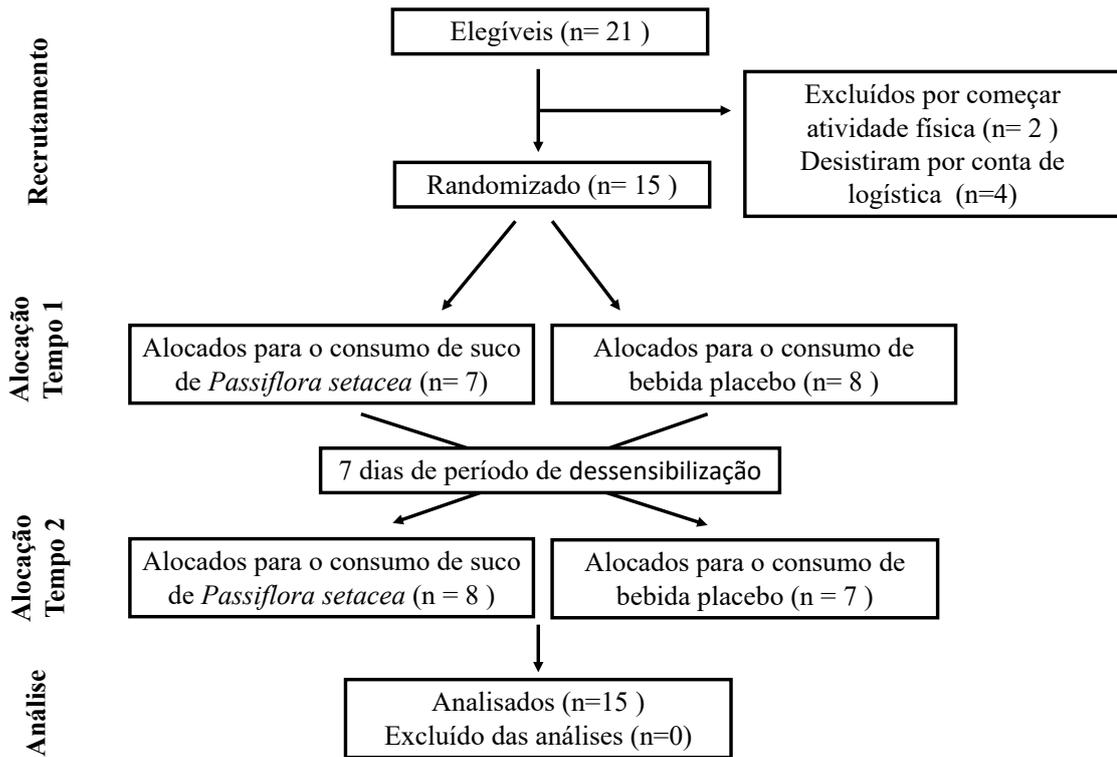


Figura 7. Diagrama CONSORT que demonstra o fluxo de participantes em cada etapa do ensaio clínico crossover randomizado da Fase III.

Todas as coletas foram realizadas no Laboratório Sabin do Brasília Shopping (DF). As análises de marcadores bioquímicos como glicose, insulina, HDL foram realizadas no próprio Laboratório Sabin. Os experimentos de análises de citocinas circulantes, isolamento de PBMC e extração de RNAm foram realizados no Laboratório de Imunologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e as análises nutrigenômicas em microarranjos foram realizadas no Laboratório Microcard do Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, França).

2.3.2 Processamento e caracterização do suco de *Passiflora setacea*

Os frutos utilizados nessa pesquisa foram de *Passiflora setacea*, variedade BRS PC, nome fantasia maracujá Pérola do Cerrado. Os frutos foram produzidos em sistema de espaldeira, na fazenda experimental da Embrapa Cerrados, localizada nas coordenadas 15°36'13.02"S;

47°43'17.34"O e altitude aproximada de 1050 m em Planaltina - DF. Os frutos maduros foram colhidos no período chuvoso de outubro a março, no estágio 6 de maturação (COSTA; MARTINS, 2010) que compreende os frutos recém excisados da planta seja por meio natural ou por derriça promovida pelo leve balançar da planta.

As polpas foram retiradas dos frutos e mixadas em despoldadeira profissional para a separação das sementes das polpas. Elas foram lacradas em sacos contendo 50 e 150 g, o equivalente a três e nove frutos respectivamente. Após os sacos foram vedados hermeticamente e as polpas estocadas a -80 °C.

2.3.3 Composição química das polpas

2.3.3.1 Preparo do extrato

A metodologia empregada para a obtenção dos extratos foi de acordo com Larrauri et al. (1997), com ajustes. Os extratos foram preparados com as amostras da polpa de PS, com quatro extrações. Primeiramente fez-se a extração com metanol 50%, seguido de três extrações com acetona 70%. Os extratos posteriormente foram filtrados e armazenados em vidro âmbar e mantidos a -80°C até o período das análises.

2.3.3.2 Análise de Fenólicos Totais

Os fenólicos totais foram determinados de acordo com o método Folin-Ciocalteu. Os compostos fenólicos possuem a capacidade de reduzir os ácidos que compõem o reagente Folin-Ciocalteu (ácido fosfotungstístico e fosfomolibdico) em óxido tungstênio e de molibdênio, que por sua vez, possuem a coloração azul, com absorvância máxima de 765 nm (SINGLETON; ROSSI, 1965).

Para esse procedimento, utilizou-se os respectivos reagentes: Folin Ciocalteu 1:3, carbonato de sódio 20% e extrato da PS 1:4. As amostras foram mantidas ao abrigo de luz e em temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, foi realizada uma leitura a 700 nm das amostras em microplacas no espectrofotômetro Spectramax M2 (Molecular devices, Califórnia, USA). Calculou-se a concentração de fenólicos totais na amostra inserindo as absorvâncias obtidas na equação da reta ($y=0,0198 + 0,0541 R^2=0,99628$) gerada a partir da curva padrão de ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente/100 g de matéria fresca (mg AGE/100 g MF).

2.3.4 Escolha da bebida placebo

A bebida placebo foi escolhida por possuir sabor e aroma idênticos ao suco de maracujá (*P. edulis*) e sem nenhuma quantidade da fruta presente. Sendo assim, escolheu-se a bebida isotônica sabor maracujá Gatorade®. A lista de ingredientes na ordem decrescente da bebida isotônica é: água, sacarose, maltodextrina, cloreto de sódio, citrato de sódio, fosfato de potássio monobásico, acidulante ácido cítrico, aromatizante artificial tartrazina e corante artificial amarelo crepúsculo. A Tabela 1 mostra as informações nutricionais de 100 mL da bebida placebo utilizada nos experimentos comparado aos 150g de polpa de *Passiflora setacea*. Ambas bebidas foram diluídas com 150 mL de água filtrada.

Tabela 1. Informações nutricionais da bebida placebo e da polpa de *Passiflora setacea*.

Composição	Polpa fresca de <i>Passiflora setacea</i> (150g/150mL)*	Bebida placebo (100mL)**
Carboidratos	4,13 g	6 g
- Açúcares	- 4,13 g	-3,5 g
Potássio	1898,36 mg	14 mg
Sódio	5,24 mg	49,5 mg
Fibras totais	2,25 g	***

* Fontes: (CAMPOS, 2010; VIEIRA, 2014). ** Dados do fabricante *** Valores não significativos

2.3.5 Voluntários

2.3.5.1 Critérios de inclusão e exclusão

Para participar deste estudo, foram selecionados indivíduos voluntários do sexo masculino, idade (40-64 anos), com sobrepeso ou levemente obesos (embasados em IMC entre 25 e 31 kg/m² ou com circunferência abdominal >94 cm), sedentários ou com baixo nível de atividade física (<3h/semana) e que tenham aceito e assinado o Termo de Consentimento Livre e

Eclarecido (TCLE). Estipulou-se o gênero masculino para participação da pesquisa para se obter uma padronização de resposta inflamatória. Isso é devido ao fato das fases do período menstrual nas mulheres influenciarem a resposta inflamatória de formas diferentes. Os critérios de exclusão foram embasados em histórico prévio de câncer ou severas doenças metabólicas, tabagismo, alergia a maracujá e produtos à base do fruto, uso de suplementação nos dois meses anteriores ao experimento (vitamina C, multivitamínico, cápsulas antioxidantes, etc.) ou de medicamentos para tratamentos crônicos (anti-hipertensivos, anti-hiperglicêmicos, anti-colesterol, antidepressivos, soníferos, tranquilizantes, etc.), tratamentos agudos nos 15 dias anteriores ao experimento (anti-inflamatórios, antibióticos, etc.) e tratamentos agudos nos dois dias anteriores ao experimento (analgésicos inflamatórios como aspirina, acetaminofeno, etc.).

Outro critério de exclusão foi alimentação rica em frutas e hortaliças (>5 porções diárias) ou vegetariana, avaliado por aplicação de questionário de frequência alimentar (QFA) (Anexo B). O QFA foi composto por 49 itens com porções de referência e oito categorias de frequência, considerando o período total de 1 mês, tendo as seguintes opções: 1x/dia, 2x/dia, 5-6x/semana, 2-4x/semana, 1x/semana, 1x/mês, menos de 1x/mês e nunca. A lista de alimentos foi composta por alimentos com maior conteúdo de polifenóis, tendo eles pelo menos 30 mg de polifenóis por 100g de alimento, como descrito por Vian et al. (VIAN et al., 2015).

Os participantes foram selecionados por e-mail enviado às associações, órgãos públicos e mídias sociais. No total foram enviados e-mail para três associações e seis órgãos públicos. Todos os procedimentos de experimentação com humanos desta pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CONEP) CAAE: 36348114.3.0000.0030 e todos os voluntários forneceram seu consentimento informado por escrito. A descrição do estudo pode ser encontrada em ensaiosclinicos.gov.br RBR-84z83n.

2.3.5.2 Orientações gerais

Os participantes de pesquisa foram orientados a realizarem uma dieta “branca” nas 72 horas prévias aos experimentos, ou seja, com baixa ingestão de compostos não nutrientes (polifenóis e carotenoides) (BRASIL, 1999) evitando principalmente os alimentos vegetais ricos em polifenóis: vegetais, frutas e sucos, chocolate amargo, café, chá ou vinho. O consumo de álcool também foi vetado neste período. Exemplos de cardápios possíveis foram disponibilizados aos participantes (Anexo C) e um recordatório alimentar de 24h foi realizado no dia de cada

experimento. Nos estudos de efeito agudo (Fases I, II e III), os voluntários foram instruídos a não consumirem alimentos ou bebidas, exceto água, e a não realizarem exercício físico durante as três horas entre as coletas de sangue.

2.3.6 Desenho do estudo

Todas as fases do estudo foram randomizadas, cruzadas e duplo cegas, com exceção da Fase I, em que eles foram alojados em um hotel por dois dias para terem a alimentação e atividades controladas. Nas demais fases, os voluntários que consumiriam o suco de PS ou bebida placebo eram selecionados por sorteio e a pessoa que preparava os sucos não era a mesma que entregava as bebidas para os participantes de pesquisa. Os copos eram padronizados, com tampa e canudo de coloração preta, para não serem detectadas diferenças de coloração e volume.

Amostras de sangue foram coletadas em jejum de 12h (t0h) e após 3 horas de consumo do suco PS ou PB (efeito agudo, dose única, Fases I, II e III). No estudo do consumo prolongado de 14 dias (Fase IV), os indivíduos foram orientados a consumir o suco à noite 15 minutos antes do jantar e a coleta de sangue e urina foi realizada no 15º dia em jejum pela manhã.

Assim, a última porção do suco de PS ou PB foi ingerida 12 horas antes da coleta, por conta do estimado tempo de excreção dos polifenóis (REIN et al., 2013; WILLIAMSON; MANACH, 2005), podendo-se assim, separar o efeito do consumo prolongado de um possível efeito agudo da última porção consumida.

Cada voluntário recebeu todos os tratamentos para a realização de comparações intrasujeito (ou intrapessoal). Assim, para cada voluntário, pôde-se calcular a taxa de variação intrapessoal (delta %) da seguinte forma:

$$\text{Delta \%} = \frac{\text{Final (T3h)} - \text{Inicial (T0h)}}{\text{Inicial (T0h)}} \times 100$$

O período de transição (ou *wash-out* ou período de dessensibilização) entre um tratamento e outro foi de 7 a 10 dias para consumo de dose única (Fases I, II e III) e 21 dias no consumo prolongado de duas semanas (Fase IV).

A etapa I do experimento ocorreu no Laboratório Sabin (Brasília Shopping) e na Eco Pousada Villa Triacca (PAD-DF) em outubro/2015. A etapa II ocorreu no Laboratório de Imunologia Celular, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília nos meses de fevereiro a

maio/2016. As etapas III e IV ocorreram nos laboratórios Sabin (Brasília Shopping) e Imunologia Celular (FM/UnB) entre janeiro/2018 a maio/2019; maio a julho/2019, respectivamente.

2.3.7 Tratamento das amostras

As amostras de sangue foram coletadas no Laboratório Sabin (Brasília - DF) com os voluntários em jejum de 12h (t0h) e após os tratamentos. Nas 24 horas prévias às coletas, os voluntários eram orientados a se manter em uma dieta branca (Anexo C) e o consumo de álcool era proibido nas 72 horas anteriores às coletas. As frações de soro e plasma foram preparadas para quantificação dos marcadores do metabolismo glicídico e lipídico (incluindo glicose, insulina, avaliação do modelo de homeostase da função das células β (HOMA-BETA), avaliação do modelo homeostático para resistência à insulina (HOMA-IR), colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos totais) e das citocinas pró e anti-inflamatórias. A coleta das amostras biológicas e as análises bioquímicas foram realizadas pelo laboratório Sabin no mesmo dia. Amostras de sangue também foram coletadas em tubos de heparina e armazenadas a -80°C para posterior quantificação de citocinas.

2.3.8 Separação das células mononucleares do sangue periférico

Para a fase II do estudo, amostras de sangue foram coletadas em tubos de heparina para a análise nutrigenômica das células mononucleares do sangue periférico (PBMC). A técnica utilizada foi a de centrifugação por gradiente de densidade para viabilizar a separação das células mononucleares, como linfócitos, monócitos, macrófagos e células *natural killer*, de células polimorfonucleares como neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Na separação por gradiente de densidade, utiliza-se solução de Ficoll-Hytopaque, uma solução de polissacarídeos com diatrizoato de sódio, um composto de alta densidade que permite separar os diferentes tipos celulares da amostra de acordo com a sua densidade. Para tal, em tubos de sangue heparinizados foram centrifugados à temperatura ambiente por 20 min a $1500\times g$. O sangue foi delicadamente vertido sobre a solução Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich), levando a agregação dos eritrócitos e granulócitos à polissacarose e com a leve hipertonía gerada, essas células se sedimentam no fundo do tubo. Os linfócitos e outras células mononucleares permanecem em um anel interfacial (creme leucocitário) entre o plasma (sobrenadante) e os sedimentos de glóbulos vermelhos e granulócitos (AROSA; CARDOSO; PACHECO, 2007), como visto na Figura 8. Essa camada

intermediária é transferida cuidadosamente para um novo tubo para as seguintes três lavagens com solução salina tamponada com fosfato (STF) estéril a pH 7.2 com centrifugação a $300 \times g$ por 10 min, cada. Resíduos de plaquetas são removidos por centrifugação a baixa velocidade durante as etapas de lavagem. Após a última lavagem, o sobrenadante é desprezado e o sedimento é ressuspenso em 2mL de meio Roswell Park Memorial Institute RPMI 1640 com pH 7,2 sem soro fetal bovino (RPMI incompleto) para a contagem do número de células totais em câmara de Neubauer. Para tal finalidade, diluiu-se parte da suspensão celular a 1:10 de solução de nigrosina (Merck, Alemanha), constituída de ácido acético a 6% e violeta de genciana utilizada para destruir possíveis eritrócitos existentes e corar os núcleos das células mononucleares de violeta. A suspensão celular obtida foi imediatamente utilizada para a etapa de extração de RNA total.

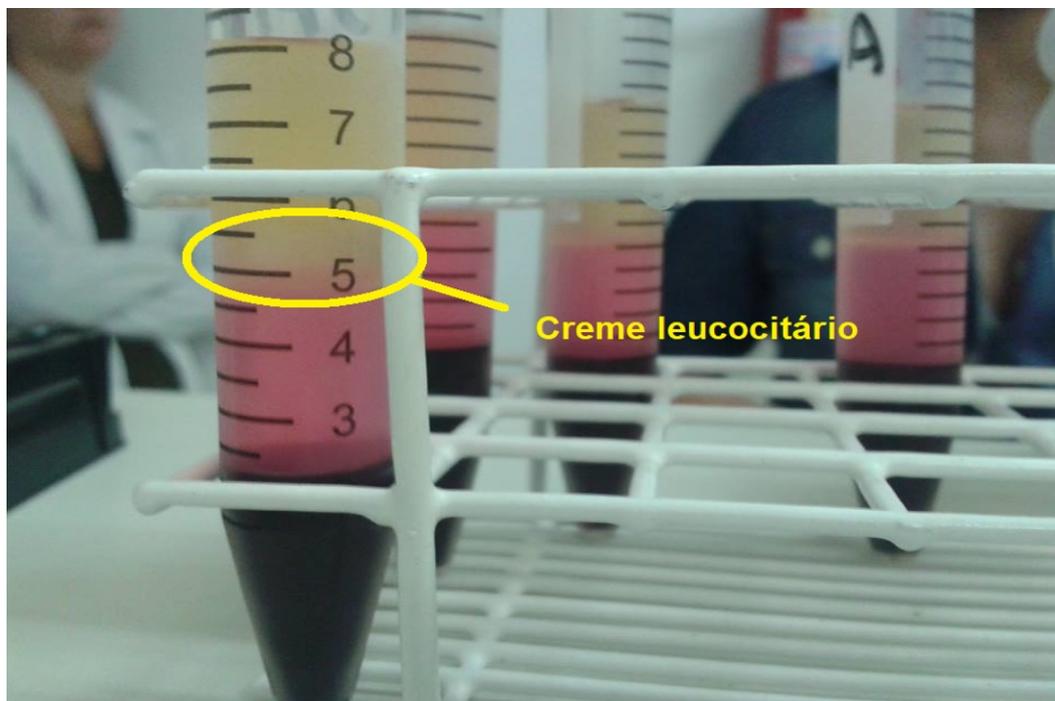


Figura 8. Sangue com Ficoll após centrifugação para separação de células mononucleares (PBMC).

2.3.9 Parâmetros bioquímicos e análise de citocinas

As análises bioquímicas foram realizadas pelo Laboratório Sabin, em Brasília. Para avaliação da glicose, foi utilizado o método da hexoquinase; quanto à insulina, foi aplicado o imunensaio de insulina quimioluminescente e, a seguir, calculados o HOMA BETA e o HOMA

IR. O colesterol total foi verificado por meio do método de esterase/oxidase de Allain (ALLAIN et al., 1974), HDL pelo método direto, LDL pelo cálculo de Martin-Hopkins e triglicerídeos totais por meio do método da oxidase/peroxidase. Essas metodologias são empregadas na rotina do Laboratório Sabin para a análise bioquímica de amostras biológicas. Os procedimentos laboratoriais são realizados em aparelhos automatizados, utilizando amostras controles nas corridas bioquímicas diárias.

Para quantificar as citocinas circulantes, amostras de soro foram utilizadas para medir a interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), interferon- γ (INF- γ) e níveis de proteína interleucina-17 (IL-17) usando o kit CBA Human T-cell TH1/TH2/TH17 Cytokine (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Este método usou a tecnologia de agrupamento de esferas (beads) para detectar simultaneamente várias citocinas nas amostras por citometria de fluxo. Todas as análises foram executadas de acordo com as orientações do fabricante. Brevemente, 25 μ L de beads de captura de citocinas foram misturadas com a mesma quantidade de soro e anticorpos de detecção conjugados com ficoeritrina (PE). O complexo beads de captura-citocinas-anticorpos de detecção PE geraram um sinal de fluorescência que foi detectado pelo citômetro de fluxo LSR Fortessa II utilizando o programa BD FACSDivis. Os dados gerados foram tratados pelo software FCAP Array versão 3 (BD Bioscience) utilizando uma curva padrão a partir da diluição $\frac{1}{2}$ de um padrão com 5.000 pg/mL de todas as sete citocinas. Cada ponto do padrão foi tratado assim como descrito para as amostras de soro acima. Os resultados foram expressos em pg/mL.

2.3.10 Extração de RNA total

A extração de RNA total de PBMC foi realizada usando RNeasy Mini Kit, conforme recomendado pelo fabricante (Qiagen, Hilden, Alemanha). A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, enquanto a quantidade e pureza foram avaliadas pela leitura das absorbâncias a 260 e 280 nm com um espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). As amostras de RNA foram armazenadas a -80°C até o uso. Essa etapa foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, sob orientação da Profa. Dra. Ildinete Pereira.

2.3.11 Análise de microarranjos de DNA e análise bioinformática

O RNA total (50 ng por amostra) foi amplificado e marcado com fluorescência para produzir RNA complementar Cy5 ou Cy3 (cRNA) usando o kit de duas cores de rotulagem de baixa entrada Quick Amp (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) na presença de um controle de pico de duas cores, conforme recomendado pelo fabricante. Após a purificação, 825 ng de cRNA marcado foi hibridizado no microarray G4845A Human GE 4x44K v2 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O microarray G4845A Human GE 4x44K v2 contém 27.958 sequências de RNA do gene Entrez. Após a hibridização, um scanner Agilent G2505 (Agilent, Santa Clara, CA, EUA) foi usado para escanear microarrays. Os dados de hibridização foram extraídos por meio do programa Feature Extraction versão 11.0 e analisados por meio do programa GeneSpring GX versão 14.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Os dados foram normalizados usando o desvio do 50º percentil e analisados com testes t moderados corrigidos pela permutação de Westfall-Young com valor de p corrigido definido como 0,05. Todos os transcritos que apresentaram $p < 0,05$ foram considerados expressos de forma alterada. Essa etapa foi realizada na Unidade de Nutrição Humana, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Clermont-Ferrand, França.

2.3.12 Análises Bioinformáticas

Para a interpretação biológica dos genes diferencialmente expressos, primeiro foram realizadas análises de Gene Ontology (GO) usando DAVID (banco de dados para anotação, visualização e descoberta integrada versão 6.7). Os resultados do GO foram agrupados com base em sua funcionalidade, usando o programa REVIGO online. O gráfico de análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLSDA) foi obtido por meio do MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>). Redes de genes foram construídas com uma abordagem de mineração de dados usando o programa Metacore, e análises de caminhos de genes da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) e de bancos de dados BioCarta foram realizadas usando a ferramenta online Genetrial2.

2.3.13 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram previamente analisados quanto à distribuição assimétrica e curtose pelo teste de normalidade D'Agostino e Pearson (WINDISH; DIENER-WEST, 2006) e, em seguida, realizou-se uma análise de comparações múltiplas pareadas não-paramétricas via testes de Friedman e Dunn. Os valores descritivos foram expressos como mediana \pm percentis 25 e 75. As diferenças entre as variáveis comparadas foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade bicaudal de sua ocorrência por acaso (erro tipo I) fosse inferior a 5% ($p < 0,05$).

Em análise complementar, realizaram-se análises também de comparações múltiplas não-paramétricas a partir da subdivisão de indivíduos na Fase III (N=15): indivíduos ≤ 1 marcador bioquímico fora dos valores de referência (n=10) e indivíduos com ≥ 2 marcadores alterados (n=5).

Para se avaliar a correlação de todas as variáveis (marcadores bioquímicos) e avaliar o efeito conjunto de tais variáveis nos três tratamentos distintos (PB, PS50g e PS150g) em dois diferentes tempos (T0h e T3h; Baseline e 14 dias) foi empregado o método multivariado da Análise de Componentes Principais (ACP). Foram gerados os gráficos contendo a redistribuição da variação observada nos eixos originais em um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados, com o uso do Programa R (THOMAS, 1988).

As análises não-paramétricas e os gráficos foram realizados com o programa GraphPad Prism 7 para Mac (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) e as Análises de Componentes Principais (ACP) foram realizadas com os pacotes “FactoMineR” e “factoextra” do software estatístico R, versão 3.5.1, 2018.

PARTE 2
RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE 2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nessa parte do trabalho, são apresentados dois capítulos compostos por:

Capítulo 1 - resultados gerados da Fase I e II e publicados na revista *Nutrients* - Duarte et al. (2020) *Nutrients* 2020, 12(4), 1104; <https://doi.org/10.3390/nu12041104> com o título “Acute Effects of the Consumption of *Passiflora setacea* Juice on Metabolic Risk Factors and Gene Expression Profile in Humans”. O artigo teve como objetivo investigar o efeito do suco de PS em marcados inflamatórios e no perfil de expressão gênica de PBMC, atingindo os objetivos expostos no capítulo 2, parte 1. A íntegra do artigo está no **Apêndice**.

Capítulo 2 – resultados gerados nas fases III e IV.

Em seguida, é feita a discussão de todas as fases do estudo e ao final da parte 2, a conclusão geral da pesquisa é apresentada.

CAPÍTULO 1 - RESULTADOS FASES I E II

CAPÍTULO 1 - RESULTADOS FASES I E II

1.1 Fase I - Efeito agudo Placebo vs 150 g de polpa de *Passiflora setacea* em marcadores bioquímicos

1.1.1 Características básicas dos voluntários

As características basais dos voluntários estão resumidas na Tabela 2. Os indivíduos participantes eram homens com idade média de $48,66 \pm 6,82$ anos com sobrepeso ou levemente obesos (IMC variando de 25,00 a 30,80 kg/m²) com circunferência abdominal média de $96,83 \pm 6,49$ cm. Os voluntários variaram de normais a levemente hiperglicêmicos ($n = 1,13$ mg/dL), bem como de normais a levemente hiperlipidêmicos ($n = 2$), conforme demonstrado pelos valores de triglicérides totais plasmáticos. Todos os outros parâmetros estavam dentro da faixa normal. Dois dos 12 voluntários apresentaram três a quatro fatores que podem defini-los como portadores de síndrome metabólica (circunferência da cintura ≥ 90 cm; triglicérides séricos ≥ 150 mg/dL mmol/l; colesterol HDL < 40 mg/dL; e glicose plasmática em jejum ≥ 100 mg/dL). Foram realizadas análises estatísticas sem esses voluntários e no entanto, as significâncias estatísticas não sofreram alterações. Assim, escolheu-se mantê-los no grupo de análise.

Tabela 2. Perfil bioquímico basal dos voluntários ($n = 12$).

Parâmetro	Média \pm DP (Faixa)	
Idade	$48,66 \pm 6,82$	(41–62)
IMC (kg / m ²)	$28,18 \pm 2,08$	(25,0–30,8)
Circunferência abdominal (cm)	$96,83 \pm 6,49$	(88–112)
Glicemia de jejum (mg / dL)	$90,83 \pm 5,54$	(83-103)
Insulina basal (μ UI / mL)	$11,14 \pm 3,58$	(5,5–17,7)
HOMA IR	$2,49 \pm 0,77$	(1,2–3,7)
HOMA BETA	$152,8 \pm 71,58$	(73–304)
Triglicérides (mg / dL)	$116,58 \pm 57,55$	(49–218)
Colesterol total (mg / dL)	$188,17 \pm 33,40$	(115–232)
Colesterol HDL (mg / dL)	$46,86 \pm 8,55$	(38-66)
Colesterol LDL (mg / dL)	$117,00 \pm 27,09$	(60–156)
Apolipoproteína A (mg / dL)	$133,67 \pm 20,95$	(107–172)
Apolipoproteína B (mg / dL)	$101,77 \pm 24,80$	(49–133)

Creatinina (mg / dL)	0,97 ± 0,14	(0,7–1,2)
TGO (U / L)	20,67 ± 2,87	(14–25)
TGP (U / L)	25,41 ± 6,97	(11–35)

1.1.2 Efeito do suco de *Passiflora setacea* no metabolismo glicídico e lipídico

Os níveis de glicose, insulina, triglicerídeos e HDL no plasma e o índice HOMA IR foram analisados antes (T0h) e 3 horas após (T3H) a ingestão do placebo e do suco de PS. Os dados revelam que os níveis de insulina e o índice HOMA IR diminuíram estatisticamente três horas após a ingestão de suco de PS ($p = 0,0068$ e $p = 0,001$, respectivamente), enquanto nenhuma mudança significativa foi observada após a ingestão do placebo (PB) (Figura 9A). As concentrações plasmáticas de glicose diminuíram de forma semelhante após a ingestão das duas bebidas. O nível de lipoproteína de alta densidade (HDL) aumentou significativamente após o consumo de suco de PS ($p = 0,0280$), enquanto nenhuma mudança foi observada após a bebida PB ($p = 0,3541$), como visto na Figura 9B. Nenhum efeito de PS ou PB foi detectado nos níveis de colesterol total e LDL.

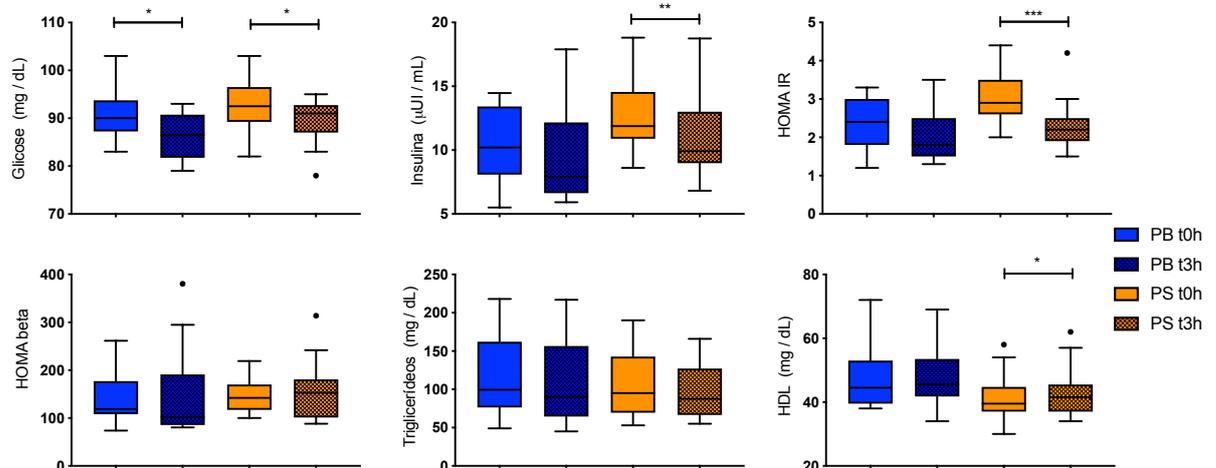


Figura 9. Efeito agudo do consumo de suco de *Passiflora setacea* e bebida placebo sobre os marcadores do metabolismo de glicose (A) e lipídios (B) em voluntários com sobrepeso ($n = 12$). Os resultados foram analisados por meio do teste t pareado não paramétrico (teste de Wilcoxon), medianas e DP. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

1.1.3 Efeito da ingestão de suco de *Passiflora setacea* nos níveis de citocinas séricas

Foi analisado o efeito da ingestão de suco de PS nos níveis séricos de citocinas. Os dados mostraram que o nível de IL-17A não aumentou após três horas de consumo de suco PS ($p = 0,2962$); no entanto, aumentou após o consumo de placebo ($p = 0,0124$) (Figura 10). Foi também observado que o TNF- α apresentou um padrão semelhante, mas não significativo, ao IL-17A. Ou seja, seu nível tendeu a aumentar após a bebida de PB ($p = 0,0645$), enquanto permaneceu inalterado após o suco de PS ($p = 0,5489$). Não houve alterações estatísticas nos valores das citocinas de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e INF- γ .

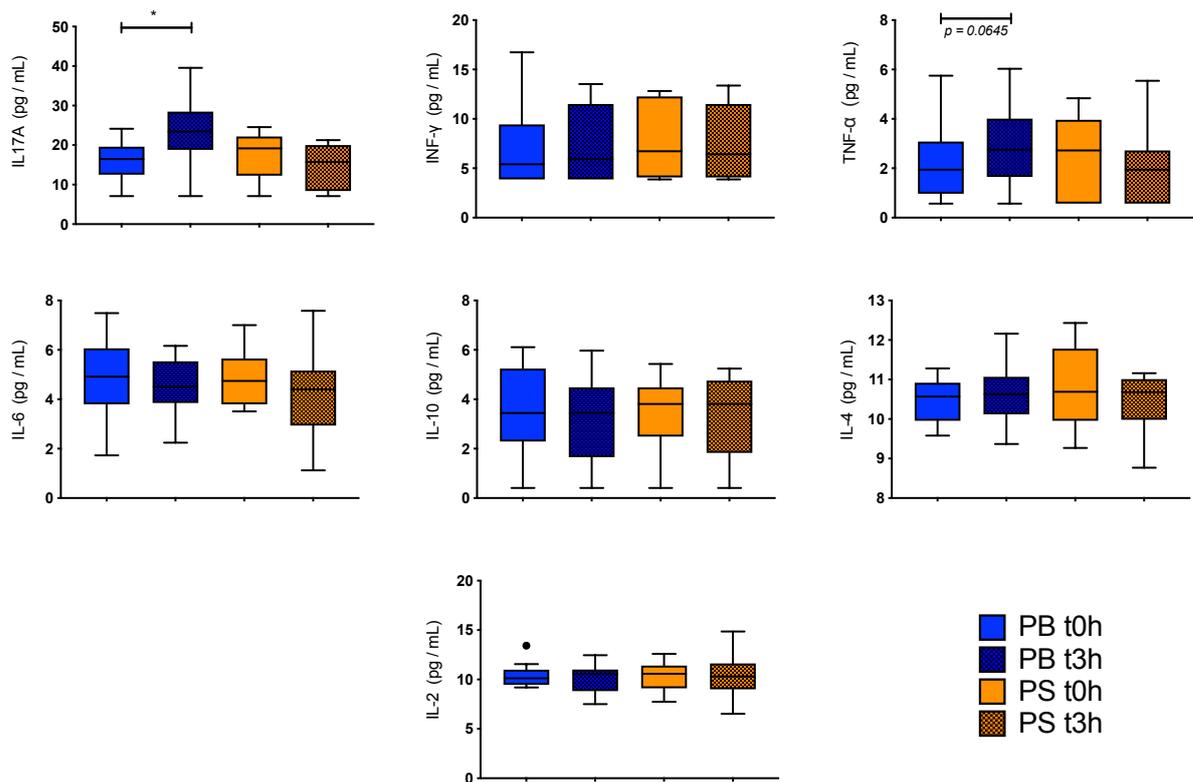


Figura 10. Efeito agudo do consumo de suco de *Passiflora setacea* sobre os níveis séricos de citocinas em voluntários com sobrepeso ($n = 12$). Resultados analisados por meio do teste t pareado não paramétrico (teste de Wilcoxon). * $p \leq 0,05$. • outlier testado pelo método de Tukey.

1.2 Fase II - Efeito agudo Placebo vs 150 g de polpa de *Passiflora setacea* no perfil de expressão gênica

1.2.1 Modulação da expressão gênica de células circulantes pela *Passiflora setacea*

Após a extração dos RNAm e o controle de qualidade de ambos RNA e hibridização dos microarranjos, obteve-se RNAm de boa qualidade de 8 dos 12 voluntários. Para acessar o efeito nutrigenômico de uma ingestão aguda de suco de PS em PBMC, foi realizada uma análise pan-genômica de expressão gênica três horas após o consumo de suco de PS e bebida placebo para os oito voluntários. A comparação dos perfis globais de expressão gênica obtidos dos voluntários por meio de Análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLSDA) mostrou a separação dos perfis entre os dois tratamentos, sugerindo diferentes perfis de expressão gênica quando os voluntários consumiram suco de PS e quando consumiram o placebo (Figura 11). Esta observação sugere modulação diferencial na expressão de genes após a ingestão de uma dose de suco PS em comparação com a bebida controle.

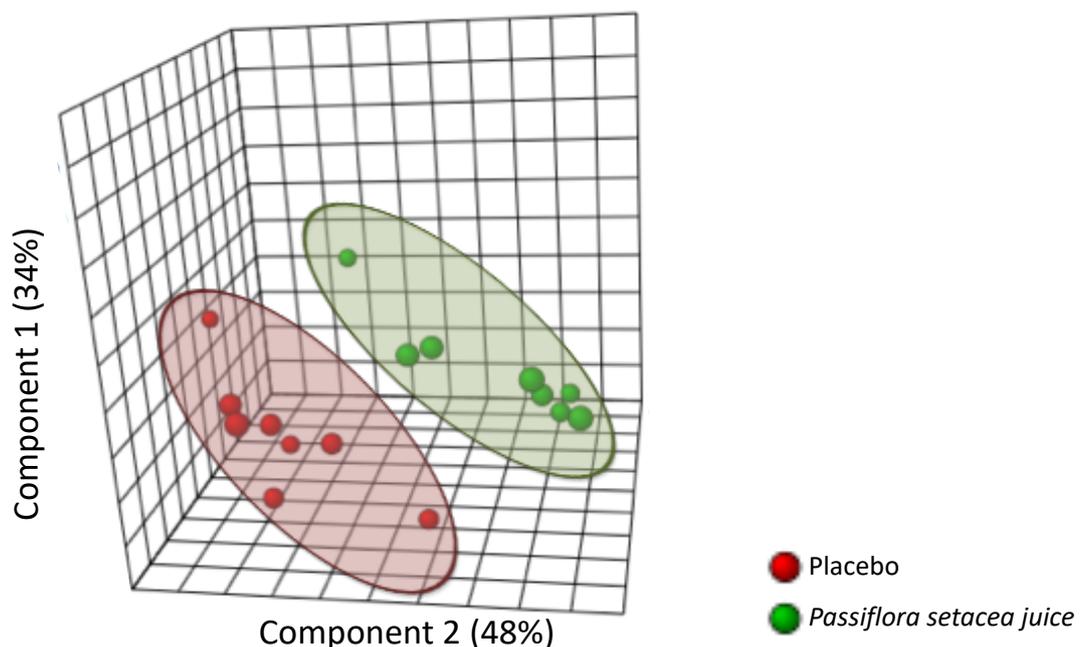


Figura 11. A comparação dos perfis de expressão gênica global obtidos dos voluntários usando análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLSDA) mostra a separação dos perfis entre os dois tratamentos e sugere perfis de expressão gênica diferentes de quando os voluntários consumiram suco de *Passiflora setacea* e quando consumiram placebo.

Após essa observação, uma análise estatística foi realizada para identificar quais genes tiveram sua expressão alterada após o consumo de PS em relação ao PB. Análises estatísticas identificaram 1327 genes que apresentaram alterações em sua expressão após o consumo de suco de PS. Entre eles, a maioria dos genes foi identificada como tendo sua expressão regulada

negativamente, com a alteração média para genes regulados positivamente de 2,48 e para genes regulados negativamente de -2,15. Entre os genes que apresentam as maiores modificações diferenciais estão *TMEM151A*, *MLPH*, *MYH2*, *SERPINA9* e *FNA21*.

Para a interpretação biológica dos genes diferencialmente expressos, primeiro foram realizadas análises de Gene Ontology (GO) usando o banco de dados DAVID, e o GO foi então agrupado em grupos de funções usando o programa REVIGO online. Essas análises mostraram que genes diferencialmente expressos estão envolvidos em vários processos biológicos, como transporte transmembrana de íons de cálcio (transporte de íons de potássio e efluxo de fosfolípidios), diferenciação celular (organização da matriz extracelular e metilação de lisina da histona), via de sinalização do receptor acoplado à proteína G (transmissão sináptica e via de sinalização de neuropeptídeos), adesão celular e transcrição do promotor da polimerase de RNA. Essa análise revelou que o consumo do suco PS modulou a expressão de genes com diferentes funções biológicas.

Para aprofundar a identificação das funções e processos celulares potencialmente afetados pelo consumo do suco PS, foram realizadas análises das redes de interação dos genes diferencialmente expressos. Redes de interação gênica, construídas por meio de mineração de dados usando o programa Metacore, sugeriram, assim como as análises pelo GO, que o consumo de suco PS alterou a expressão de genes envolvidos na função celular. Entre as redes mais representadas estão aquelas envolvidas no transporte de cálcio e potássio, adesão celular e interações célula-matriz, neurogênese e transmissão de impulso nervoso (Figura 12). Os genes identificados nessas redes foram receptor *NMDA*, *metaloproteinase de matriz (MMP) -7*, *ADAMTS9*, *mGluR*, *CaMKII* alfa, *CACNA1C* e *SLC24A2*. Esses genes decodificam proteínas envolvidas no dano ao tecido vascular, na redução da sensibilidade e secreção da insulina e nos distúrbios neuropsiquiátricos e na excitabilidade dos neurônios.

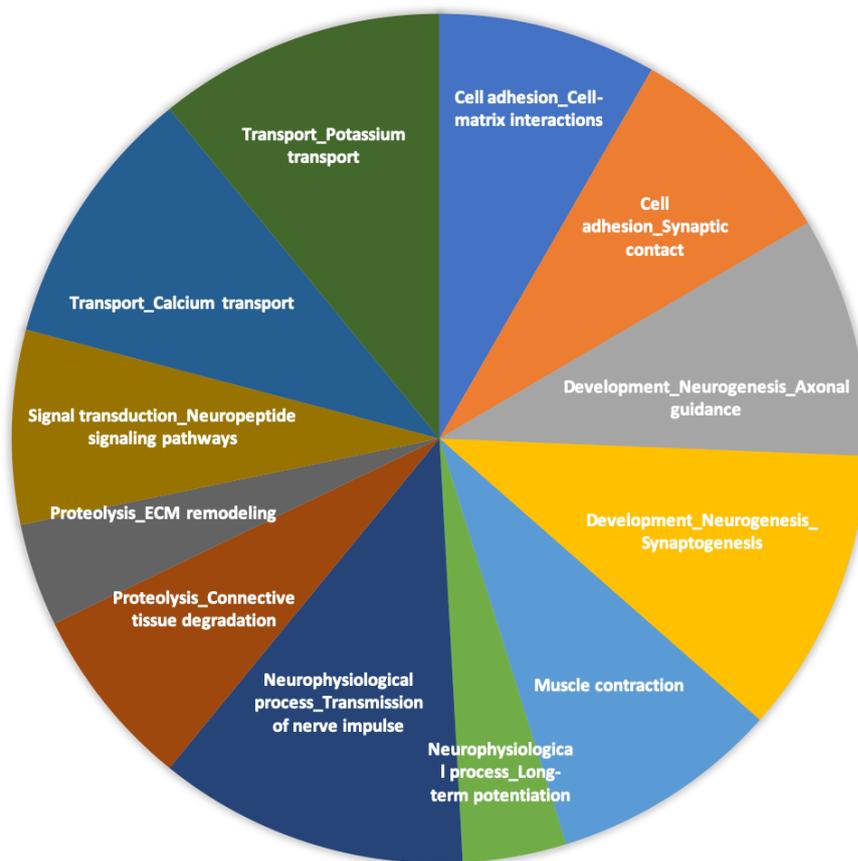


Figura 12. Redes de interação gênica enriquecidas com genes diferencialmente expressos em células mononucleares do sangue periférico de voluntários em resposta ao consumo de polpa de *Passiflora setacea*. Redes gênicas foram identificadas usando o programa MecaCore que usa abordagem de mineração de texto para construir interações gene-gene e identificar suas funções celulares.

Além das análises de rede de interação gênica, também foram realizadas análises de vias gênicas empregando o uso da ferramenta online Genetrial2, pesquisando nos bancos de dados KEGG e BioCarta. Conforme mostrado na Figura 13, os genes diferencialmente expressos identificados estão envolvidos nas vias celulares, incluindo inflamação, metabolismo, sinalização celular e processos relacionados à função neural. Sobre a via relacionada à inflamação, identificou-se um receptor de citocina-citocina, moléculas de adesão celular e vias de sinalização de quimiocinas, que incluem genes como *TNFSF18*, *IL36A*, *JAM2*, *ADCY8* e *CCL16*. Nas vias relacionadas ao metabolismo celular, identificou-se o ciclo circadiano, a secreção de insulina e as vias de sinalização de P13K-Akt, que incluem genes como *GRIN2A*, *PRKG1*, *CACNAID*, *GLP1R*, *G6PC2* e *LAMA1*. Vias de sinalização do cálcio e adrenérgicas também foram identificadas, contendo os genes *PTGER3*, *ADCY8* e *CACNAID*. Diversas vias relacionadas à função

neural também foram identificadas, como sinapse glutamatérgica, interação ligante-receptor neuroativa e vias de sinalização MAPK, nas quais genes como *GABRG1*; receptor de glutamato, ionotrópico, *NMDA1 (GRINI)*; *CACNA1D*; e *ADCY8* foram mapeados.

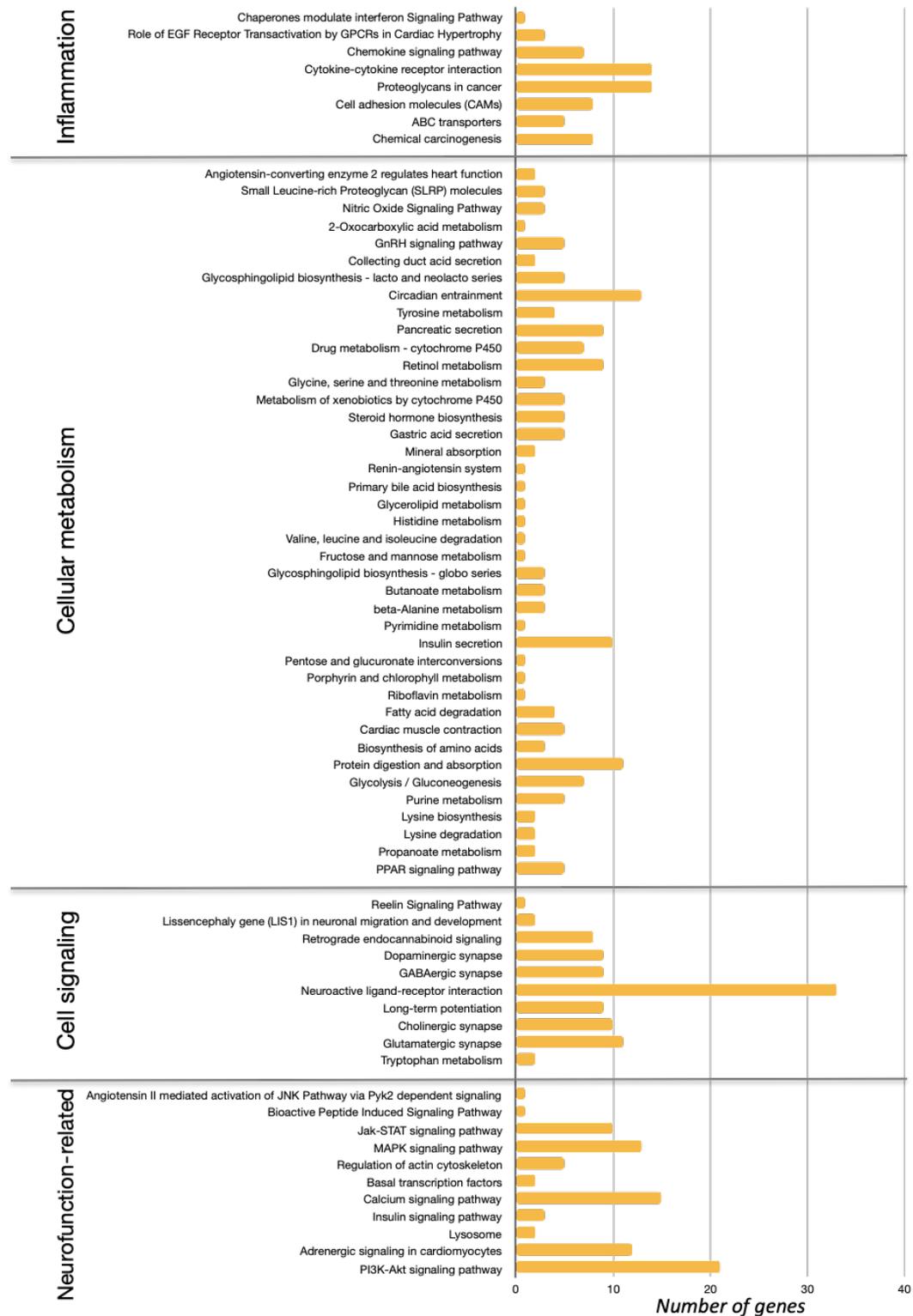


Figura 13. Vias significativamente enriquecidas com genes diferencialmente expressos de PBMC de voluntários em resposta ao consumo de polpa de *Passiflora setacea*. As vias foram identificadas por meio da ferramenta online Genetrial2 e do banco de dados KEGG, e agrupadas quanto às suas funções. O eixo x representa o número de genes em cada via.

1.2.2 Interação de Proteína-Proteína (Interactômica)

Além das análises de bioinformática em vias e redes de interação de genes diferencialmente expressos identificados, também pesquisaram-se interações proteína-proteína. Foram observadas interações entre os genes cuja expressão foi afetada pelo consumo de PS. Usando o banco de dados String online, identificaram-se 1013 nós e 3066 arestas com média de 6,05 nós (Material Suplementar). Entre eles, 39 genes mostraram mais de 15 interações com outras proteínas, tornando-os nodos importantes no interactoma proteína-proteína. Esses 39 genes revelaram mais de 700 interações, que são um quinto do número total verificado. Isso sugere que mudanças na expressão desses genes podem ter um impacto importante no interactoma da proteína e consequentemente na função celular. Esses genes estão envolvidos nos processos de regulação das vias celulares, como a via de sinalização do monofosfato de adenosina cíclica (cAMP), a via de sinalização do óxido nítrico, a sinapse dopaminérgica, a insulina ou as vias de sinalização PI3K-Akt. Proteínas interagindo com esses 32 genes foram pesquisadas e 256 genes foram identificados. As análises da via desses genes mostraram que eles estão envolvidos em vias como a via de sinalização de cAMP, via de sinalização PI3K-Akt, sinalização Ras/Rap1 (proteína relacionada a Ras 1), secreção de insulina, interação citocina-receptor de citocina, via de sinalização de quimiocina, sinalização endocanabinóide retrógrada ou regulação do citoesqueleto de actina.

1.2.3 Reguladores transcricionais e pós-transcricionais do efeito nutrigenômico

As análises bioinformáticas dos dados de expressão gênica foram posteriormente realizadas com o objetivo de identificar potenciais fatores de transcrição envolvidos na mediação do efeito nutrigenômico do suco PS observado. Os fatores de transcrição mais significativos (Figura 14) foram proteína 1 de ligação ao elemento responsivo cAMP (CREB1), fator nuclear kappa B (NF- κ B) e proteína de especificidade 1 (SP1). Esses fatores de transcrição estão envolvidos na regulação da gliconeogênese, metabolismo lipídico e vias de sinalização da insulina. Eles também estão associados com calcificação vascular, patogênese do diabetes tipo 2 (TD2) e doença cardiovascular diabética. Outros fatores de transcrição são Proto-Oncogene C-Jun (c-jun), Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3 (STAT3) e proteína tumoral P53 (p53).

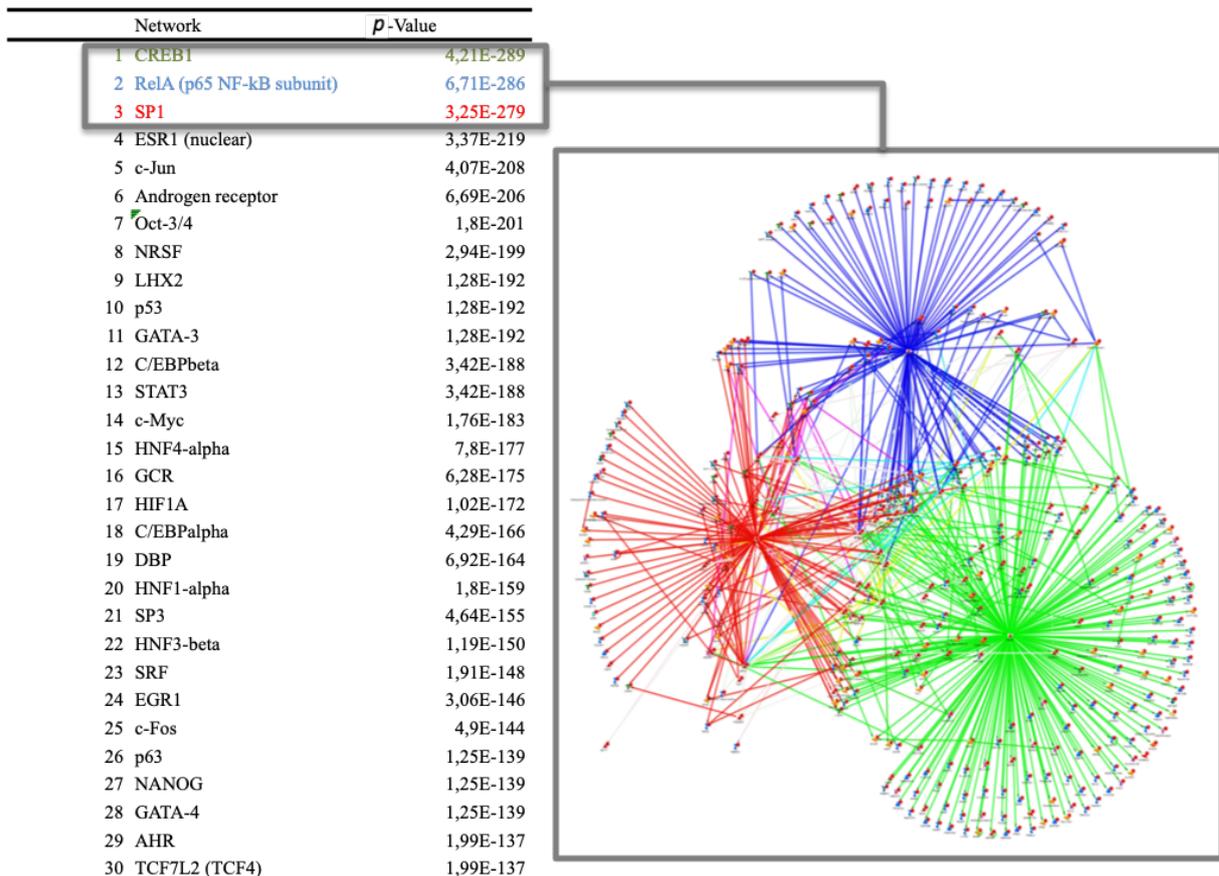


Figura 14. Análises de bioinformática de potenciais fatores de transcrição envolvidos na mediação do efeito nutrigenômico do suco de *Passiflora setacea* observado. Fatores de transcrição foram identificados usando o algoritmo MetaCore e os fatores de transcrição mais significativos listados foram proteína 1 de ligação a elemento responsivo CAMP (CREB1), fator nuclear kappa B (NF- κ B) e proteína de especificidade 1 (SP1). À direita, estão representadas as interações das redes com esses três fatores de transcrição identificados.

Além dos reguladores transcricionais potencialmente envolvidos no efeito nutrigenômico observado, também pesquisaram-se potenciais reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, particularmente microRNA. Usando a ferramenta online OmicsNet, foram identificadas mais de 30 microRNAs (miRNAs) que poderiam interagir com genes diferencialmente expressos e regular sua expressão no nível pós-transcricional (Tabela 3). Isso sugere que o consumo de suco de PS pode potencialmente regular a expressão de microRNAs e, conseqüentemente, afetar os níveis de mRNA de genes que foram identificados como diferencialmente expressos. Usando a mesma ferramenta online, foram realizadas análises integradas dos genes expressos diferencialmente identificados, dos fatores de transcrição potenciais e dos microRNAs potenciais (Figura 15). Observou-se uma rede de interação entre esses três níveis de regulação da função celular, sugerindo que o consumo de suco de *Passiflora setacea* pode impactar

significativamente as células imunológicas em nível molecular e, conseqüentemente, impactar suas funções.

Tabela 3. Lista dos potenciais microRNA envolvidos.

miRNA	Nº de identificação	Nº de genes-alvos
hsa-mir-335-5p	MIMAT0000765	228
hsa-mir-26b-5p	MIMAT0000083	193
hsa-mir-16-5p	MIMAT0000069	161
hsa-mir-92a-3p	MIMAT0000092	161
hsa-mir-124-3p	MIMAT0000422	152
hsa-mir-155-5p	MIMAT0000093	116
hsa-mir-93-5p	MIMAT0000646	116
hsa-mir-1-3p	MIMAT0000416	114
hsa-mir-17-5p	MIMAT0000070	113
hsa-mir-615-3p	MIMAT0003283	112
hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	104
hsa-mir-106b-5p	MIMAT0000680	101
hsa-mir-20a-5p	MIMAT0000075	99
hsa-mir-218-5p	MIMAT0000275	99
hsa-mir-1-1	MI0000651	98
hsa-mir-484	MIMAT0002174	90
hsa-mir-193b-3p	MIMAT0002819	89
hsa-mir-15b-5p	MIMAT0000417	88
hsa-mir-15a-5p	MIMAT0000068	81
hsa-mir-20b-5p	MIMAT0000076	80
hsa-mir-21-5p	MIMAT0001413	80
hsa-mir-30a-5p	MIMAT0000087	79
hsa-mir-186-5p	MIMAT0000456	78
hsa-mir-519d-3p	MIMAT0002853	77
hsa-mir-24-3p	MIMAT0000080	76
hsa-mir-320a	MIMAT0000510	75
hsa-mir-8485	MIMAT0033692	75
hsa-mir-192-5p	MIMAT0000222	74
hsa-mir-195-5p	MIMAT0000461	73

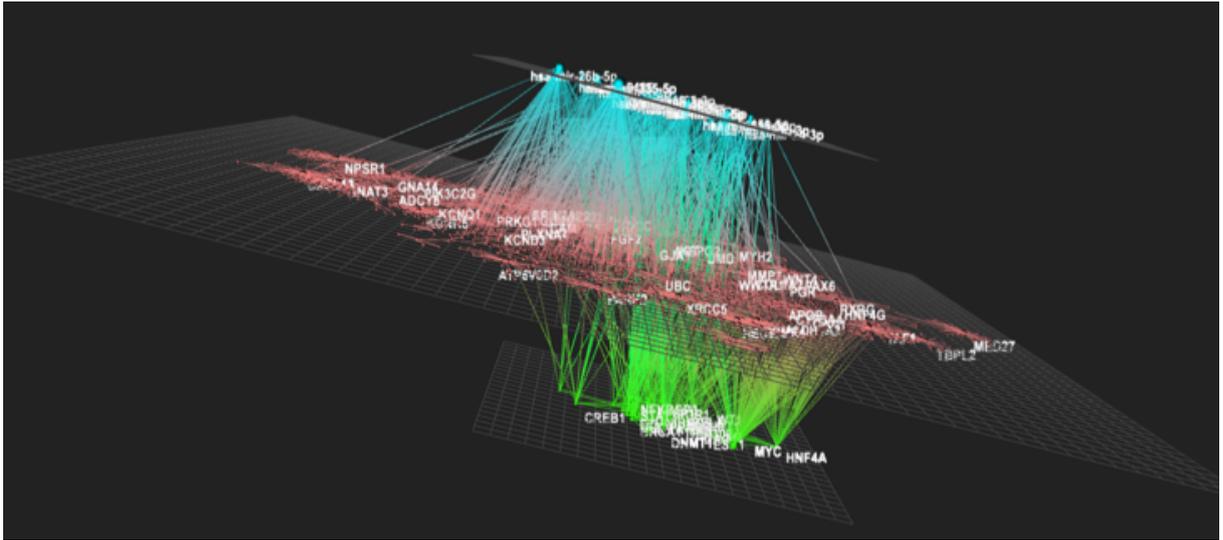


Figura 15. Análises de bioinformática de potenciais miRNA envolvidos na mediação do efeito nutrigenômico do suco de *Passiflora setacea* observado. A ferramenta online OmicsNet foi usada para identificar as interações entre os genes diferencialmente expressos identificados (em vermelho) com os fatores de transcrição potenciais identificados (em verde) e os potenciais miRNAs envolvidos (em azul).

CAPÍTULO 2 - RESULTADOS FASES III E IV

Capítulo 2 - RESULTADOS FASES III E IV

2.1 Fase III - Efeito agudo Placebo vs 50g vs 150 g de polpa de *Passiflora setacea*

2.1.1 Análise da frequência de consumo de alimentos ricos em polifenóis

A partir da análise do QFA, verificou-se que 80% dos voluntários tem por hábito o consumo médio de três porções de alimentos ricos em polifenóis por dia, sendo que os frequentes foram o café, azeite, temperos verdes (manjerição, alecrim, orégano), banana, cebola crua, folhas verdes escuras. O café preto, seguido de azeite e de temperos verdes estiveram presentes diariamente na dieta de 67%, 40% e 33% dos voluntários (n=15), respectivamente.

Descontando esses alimentos consumidos com mais frequência, apenas 53% dos voluntários (n=8) consomem outros tipos de alimentos como frutas, verduras, sucos naturais ou chás (Tabela 4). A Tabela 4 apresenta o total de porções e alimentos ricos em polifenóis consumidos diariamente por cada voluntário, assim como a média diária de consumo desses alimentos pelo grupo.

Tabela 4. Média de consumo de alimentos ricos em polifenóis e análise qualitativa por voluntário.

Volunt.	Total de porções/dia	Alimentos
1	2	azeite, café preto
2	2	temperos verdes ¹ , folhas verdes escuras ²
3	1	azeite
4	0	-
5	7	azeite, café preto, cebola crua; chocolate amargo, temperos verdes, folhas verdes escuras
6	0	-
7	3	Café preto, chá de camomila
8	6	banana, café preto, cebola crua, laranja
9	9	azeite, café preto, cebola crua, chocolate ao leite, temperos verdes, molho de tomate
10	0	-
11	5	azeite; banana; café preto; temperos verdes; suco de limão natural
12	1	café preto
13	1	café preto
14	3	banana, café preto, mamão papaya.
15	5	azeite, banana, café preto, temperos verdes
Média de porções/dia		3

Temperos verdes¹ = manjerição, alecrim, orégano; Folhas verdes escuras² = rúcula, agrião, couve, etc.

2.1.2 Perfil nutricional e bioquímico dos indivíduos

As características basais dos voluntários estão resumidas na Tabela 5. Os participantes de pesquisa selecionados para as Fases III e IV eram do sexo masculino, com idade média respectiva de $40,93 \pm 6,46$ e $41,00 \pm 7,98$ anos com sobrepeso ou levemente obesos (IMC variando de 24,70 a 32,79) com circunferência média abdominal de $99,68 \pm 5,54$ e $100,59 \pm 5,59$. Os sujeitos variaram de normal a levemente hiperglicêmico ($n = 1$, 111 mg/dL), de normal a hiperinsulinêmico ($n = 23,38 \mu\text{UI/mL}$), bem como de normal a hiperlipidêmico ($n = 5$ e 4, respectivamente), como mostrado pelos valores para triglicerídeos séricos totais. Todos os outros parâmetros estavam dentro da faixa normal.

Sendo assim, na Fase III, 10 indivíduos apresentaram todos os parâmetros bioquímicos dentro da faixa de normalidade e cinco apresentaram valores de triglicérides, HDL ou HOMA IR fora da normalidade. Portanto, os dados foram avaliados por (a) todos (n=15); (b) grupo sem alterações metabólicas (n=10); (c) grupo sem alterações metabólicas (n=5).

Na Fase IV, cinco indivíduos apresentavam parâmetros dentro da normalidade e quatro com dois marcadores ou mais fora da normalidade. Por ser um n relativamente pequeno, o grupo não foi clusterizado e analisado como um todo.

Tabela 5. Perfil bioquímico basal dos voluntários das fases III (n = 15) e IV (n=9).

Parâmetro	Média ± DP (Faixa)	
	Fase III	Fase IV
Idade	40,93 ± 6,46	(33-53)
IMC (kg / m ²)	27,92 ± 2,43	(24,70-32,79)
Circunferência da cintura (cm)	95,09 ± 6,15	(84-105)
Circunferência do abdômen (cm)	99,68 ± 5,54	(89-107,50)
Glicemia de jejum (mg / dL)	89,29 ± 9,74	(77-111)
Insulina basal (µUI / mL)	11,04 ± 5,30	(3,59-23,38)
HOMA IR	2,47 ± 1,26	(0,70-5,10)
HOMA BETA	166,29 ± 96,10	(82-345)
Hemoglobina glicada (%)	5,23 ± 0,44	(4,40-6,00)
Triglicérides (mg / dL)	146,86 ± 92,09	(49-413)
Colesterol HDL (mg / dL)	46,86 ± 8,55	(38-66)
Apolipoproteína A (mg / dL)	132,71 ± 12,52	(116-157)
Creatinina (mg / dL)	0,92 ± 0,13	(0,73-1,19)
TGO (U / L)	24,86 ± 7,45	(14-44)
TGP (U / L)	35,07 ± 15,66	(10-64)

2.1.3 Efeito agudo do suco de *Passiflora setacea* nos marcadores bioquímicos

2.1.3.1 Efeito no metabolismo glicídico e lipídico (valores absolutos)

Os resultados da análise de variância dos níveis de glicose, insulina, triglicerídeos, HDL e os índices HOMA IR e HOMA beta obtidos de amostras de sangue coletadas antes (T0h) e após três horas (T3h) do consumo da bebida placebo ou suco de polpa (50g e 150g) de *Passiflora setacea* mostram redução dos níveis de glicose apenas após o consumo da bebida placebo ($p=0,0184$; teste de Friedman; Figura 16A). No entanto, somente o tratamento com o suco de *Passiflora setacea* 50g promoveu a redução dos níveis de insulina em todos os voluntários ($p=0,0129$; teste de Friedman; Figura 16D) e essa diferença estatística se manteve no grupo sem alterações metabólicas ($p=0,0421$; teste de Friedman; Figura 16E). Esse perfil é semelhante ao observado em indivíduos com alterações metabólicas. Porém, em função do n reduzido, possivelmente, não foi possível observar a diferença estatística (Figura 16F).

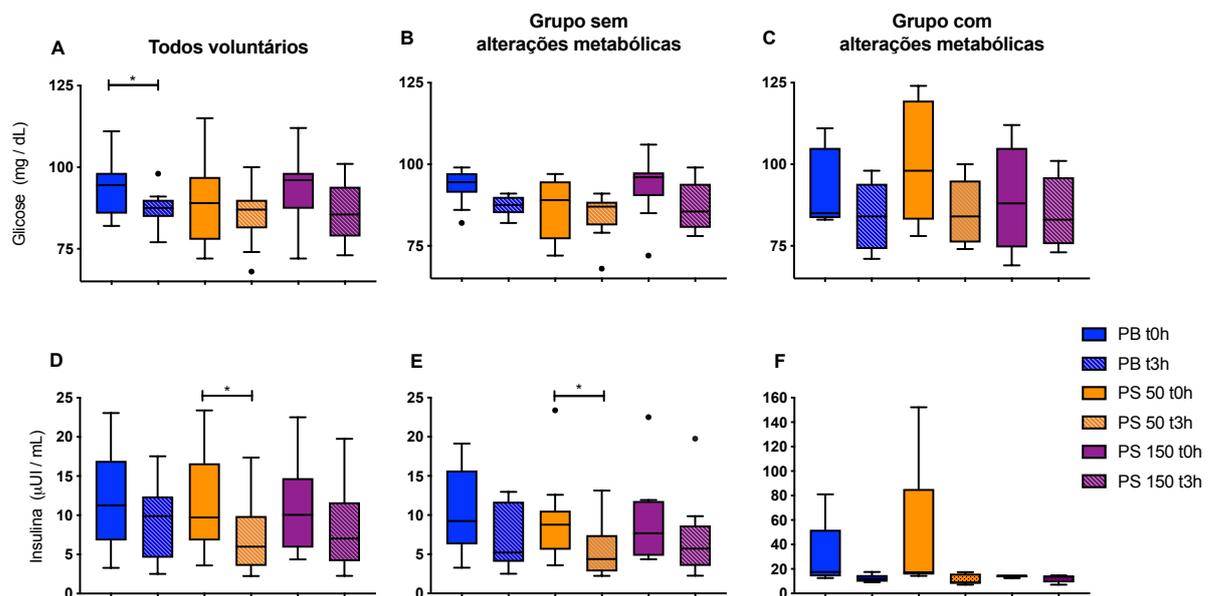


Figura 16. Efeito agudo do consumo de 50g e 150g de polpa de *Passiflora setacea* (PS) e de bebida placebo (PB) em níveis séricos de glicose e insulina de todos os voluntários ($n = 15$), de voluntários sem alterações bioquímicas ($n=10$) e com alterações bioquímicas ($n=5$). Resultados analisados por meio do teste de comparações múltiplas paradas não-paramétricas, valores expressos em medianas e percentis 25 e 75. * $p \leq 0,05$. • outlier testado pelo método de Tukey.

Corroborando com os achados da figura anterior, verificou-se também redução estatística no índice de resistência insulínica (HOMA IR) nos voluntários quando ingeriam o suco de

PS 50g ($p=0,0034$) e 150g ($p=0,0219$) (teste de Dunn; Figura 17A), enquanto o índice se manteve inalterado com o PB.

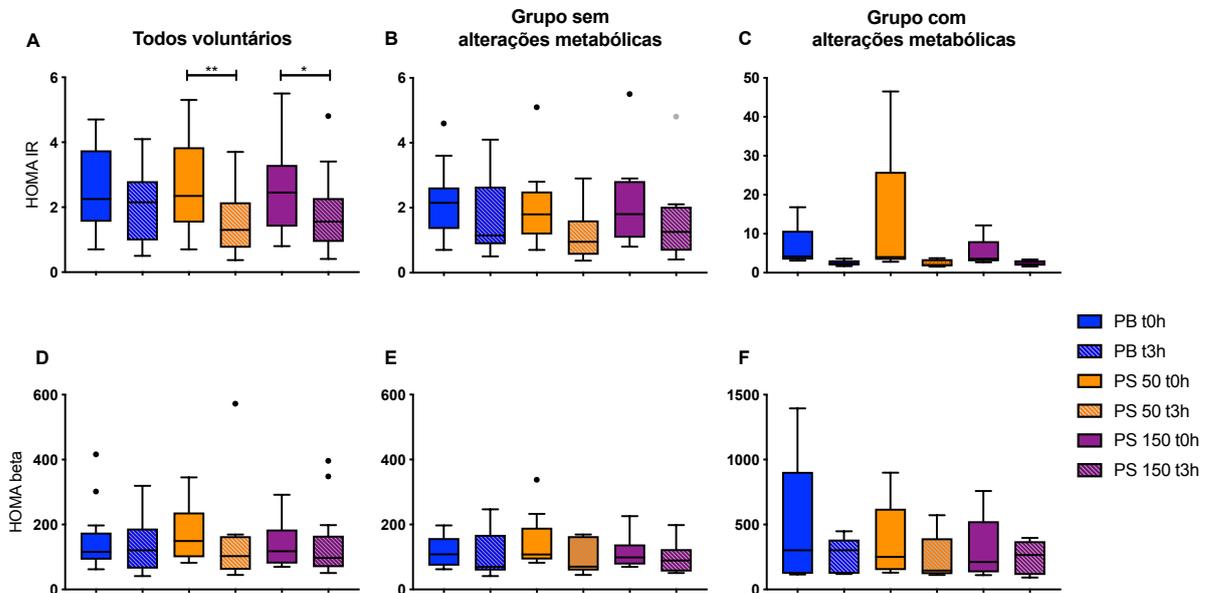


Figura 17. Efeito agudo do consumo de 50g e 150g de polpa de *Passiflora setacea* (PS) e de bebida placebo (PB) nos índices HOMA IR e HOMA beta de todos os voluntários ($n = 15$), de voluntários sem alterações bioquímicas ($n=10$) e com alterações bioquímicas ($n=5$). Resultados analisados por meio do teste de comparações múltiplas paradas não-paramétricas, valores expressos em medianas e percentis 25 e 75. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. • outlier testado pelo método de Tukey.

Não foram identificadas diferenças significativas nos níveis de triglicerídeos e HDL entre os grupos de tratamento. Entretanto, observa-se nos indivíduos com alterações metabólicas, uma redução da dispersão dos níveis séricos de triglicerídeos com o tratamento de PS 50g, em um perfil diferente do que ocorre com o tratamento placebo, como visto a Figura 18C.

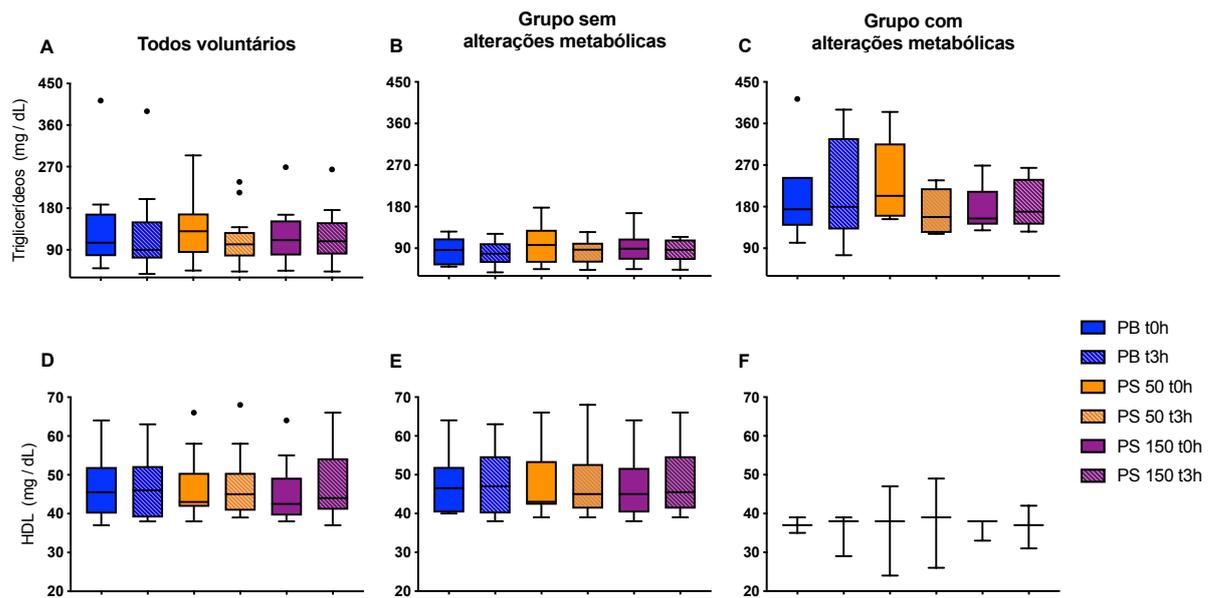


Figura 18. Efeito agudo do consumo de 50g e 150g de polpa de *Passiflora setacea* (PS) e de bebida placebo (PB) nos níveis séricos de triglicerídeos e HDL de todos os voluntários ($n = 15$), de voluntários sem alterações bioquímicas ($n=10$) e com alterações bioquímicas ($n=5$). Resultados analisados por meio do teste de comparações múltiplas paradas não-paramétricas, valores expressos em medianas e percentis 25 e 75. • outlier testado pelo método de Tukey.

2.1.3.1.1 Efeito no metabolismo glicídico e lipídico (Variação intrapessoal - delta %)

Ao se avaliar as taxas de variações intrapessoais (delta %), ou seja, o quanto os marcadores variaram em cada indivíduo em relação às suas taxas de base (T0h), a Figura 19 mostra que a PS 150g aumentou significativamente os níveis de HDL comparado à da bebida PB ($p=0,0367$) ou a uma dose menor da polpa de PS ($p=0,0367$) (teste de Holm-Sidak; Figura 19F). Os níveis de triglicerídeos no tratamento PS 150g aumentaram quando comparados ao PS 50g ($p=0,041$) e não à bebida PB ($p=0,2178$) (teste de Friedman; Figura 19E), tornando essa informação não significativa.

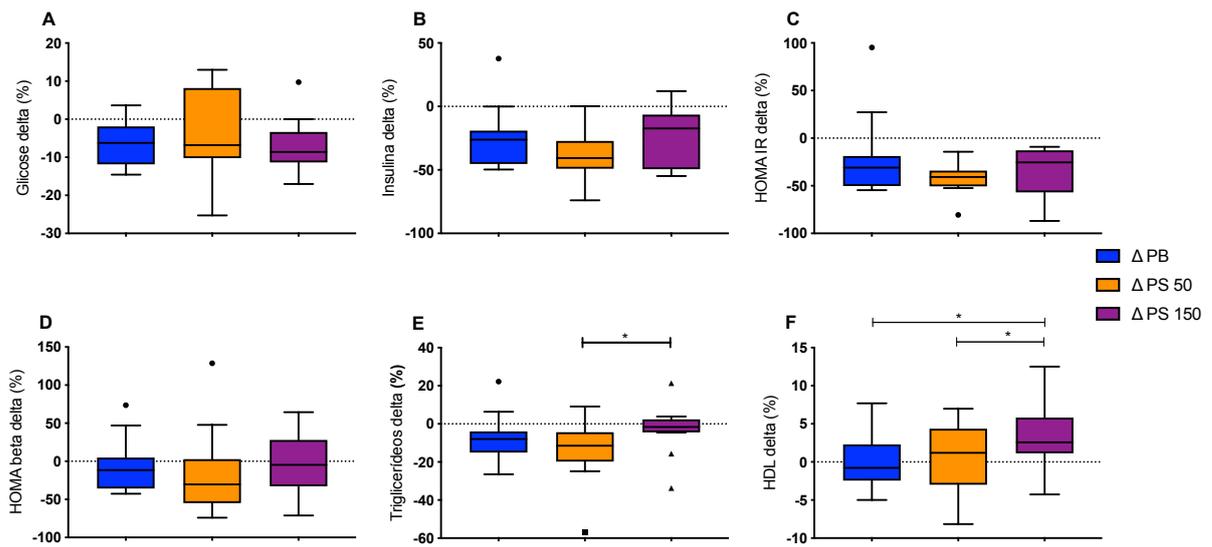


Figura 19. Taxa de variação intrapessoal dos marcadores séricos de glicose, insulina, triglicédeos, HDL e nos índices HOMA IR e HOMA beta de todos os voluntários ($n = 15$) – Efeito agudo. Resultados analisados por meio do teste de comparações múltiplas paradas não-paramétricas, valores expressos em medianas e percentis 25 e 75. * $p \leq 0,05$. • outlier testado pelo método de Tukey.

2.1.3.1.2 Análise de Componentes Principais (Variação intrapessoal - delta %)

A correlação da taxa de variação intrapessoal (delta %) de todos os marcadores bioquímicos foi comparada entre os três tratamentos. Os centroides, os pontos em maior evidência, representam a mediana das variações dos marcadores após ingestão da bebida placebo (círculo preto), do suco de *Passiflora setacea* 150g (triângulo vermelho) e 50g (quadrado verde). O posicionamento dos centroides situados em quadrantes diferentes do gráfico demonstra a diferença de comportamento (variação) dos marcadores bioquímicos em cada tratamento, tornando possível identificar diferenças não detectadas na análise não-paramétrica de cada marcador individualmente. As diferentes angulações das elipses revelam as diferenças de distribuição dos valores, inclusive a presença dos outliers, como demonstrado na Figura 20.

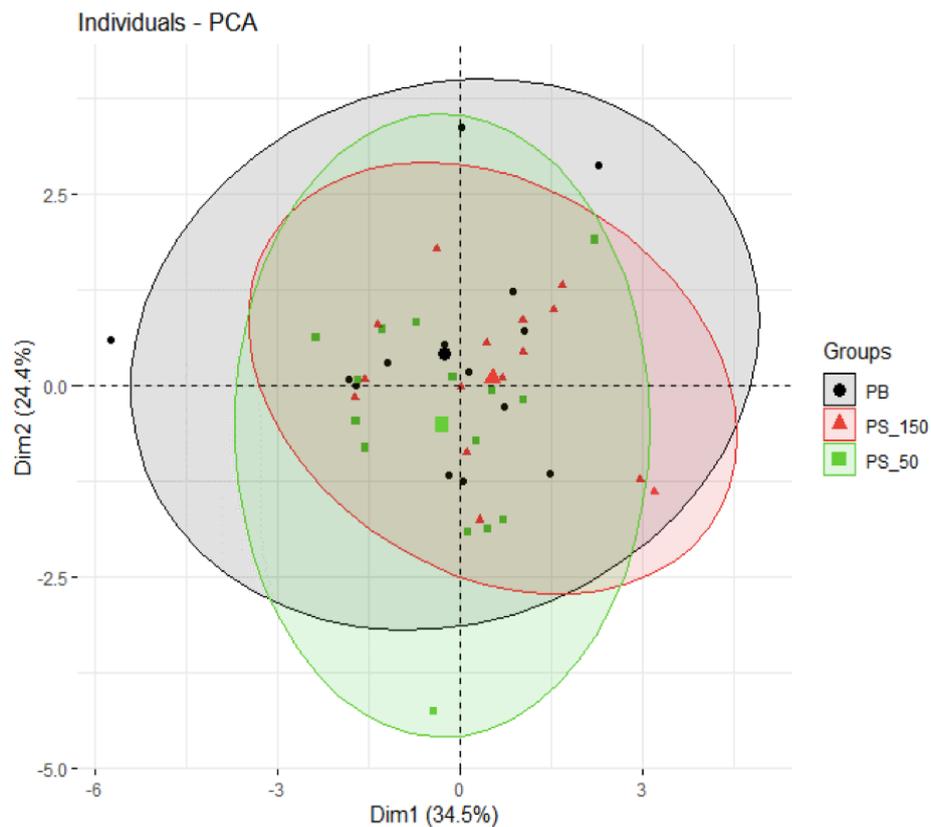


Figura 20. Análise de correlação da taxa de variação intrapessoal (delta %) dos marcadores bioquímicos de glicose, insulina, HOMA IR, HOMA beta, triglicérides e HDL dos três tratamentos: suco de *Passiflora setacea* (PS) 50g (verde) e 150g (vermelho) e bebida placebo (PB) (preto) de todos os voluntários (n = 15) por ACP.

2.1.3.2 Efeito nas concentrações de citocinas (Valores absolutos)

Os níveis das citocinas IL-17A, INF- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-4 e IL-2 foram analisados após três horas de consumo da bebida placebo, ou de suco com 50g (PS50g) ou 150g (PS150g) de polpa de PS (T3h). A mediana dos níveis de IL-17A indica uma possível redução com o consumo de PS50g comparada ao PB no grupo dos indivíduos com alterações metabólicas (Figura 21C), como visto na Fase I do estudo. Os resultados da Figura 22 mostram aumento significativo dos níveis de IL-2 após as 3h de consumo do tratamento PS50g ($p=0,0102$; teste de Friedman; Figura 22G) e essa diferença estatística se mantém no grupo sem alterações metabólicas ($p=0,0044$; teste de Friedman; Figura 22H).

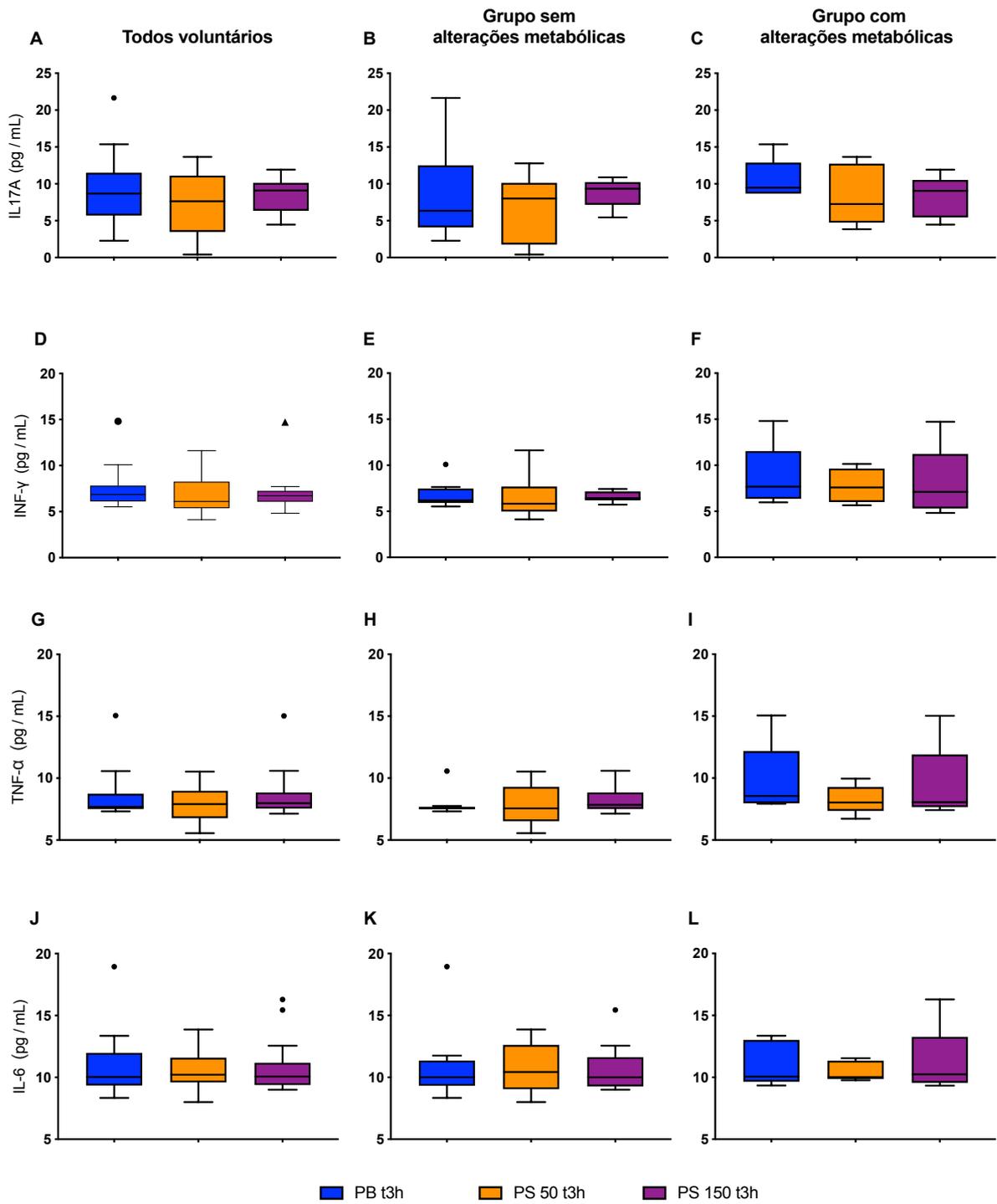


Figura 21. Efeito agudo do consumo de 50g e 150g de polpa de *Passiflora setacea* (PS) e de bebida placebo (PB) nos níveis séricos das citocinas IL-17A, INF- γ , TNF- α e IL-6 de todos os voluntários (n = 15), de voluntários sem alterações bioquímicas (n=10) e com alterações bioquímicas (n=5). Resultados analisados por meio do teste de comparações múltiplas paradas não-paramétricas, valores expressos em medianas e percentis 25 e 75. • outlier testado pelo método de Tukey.

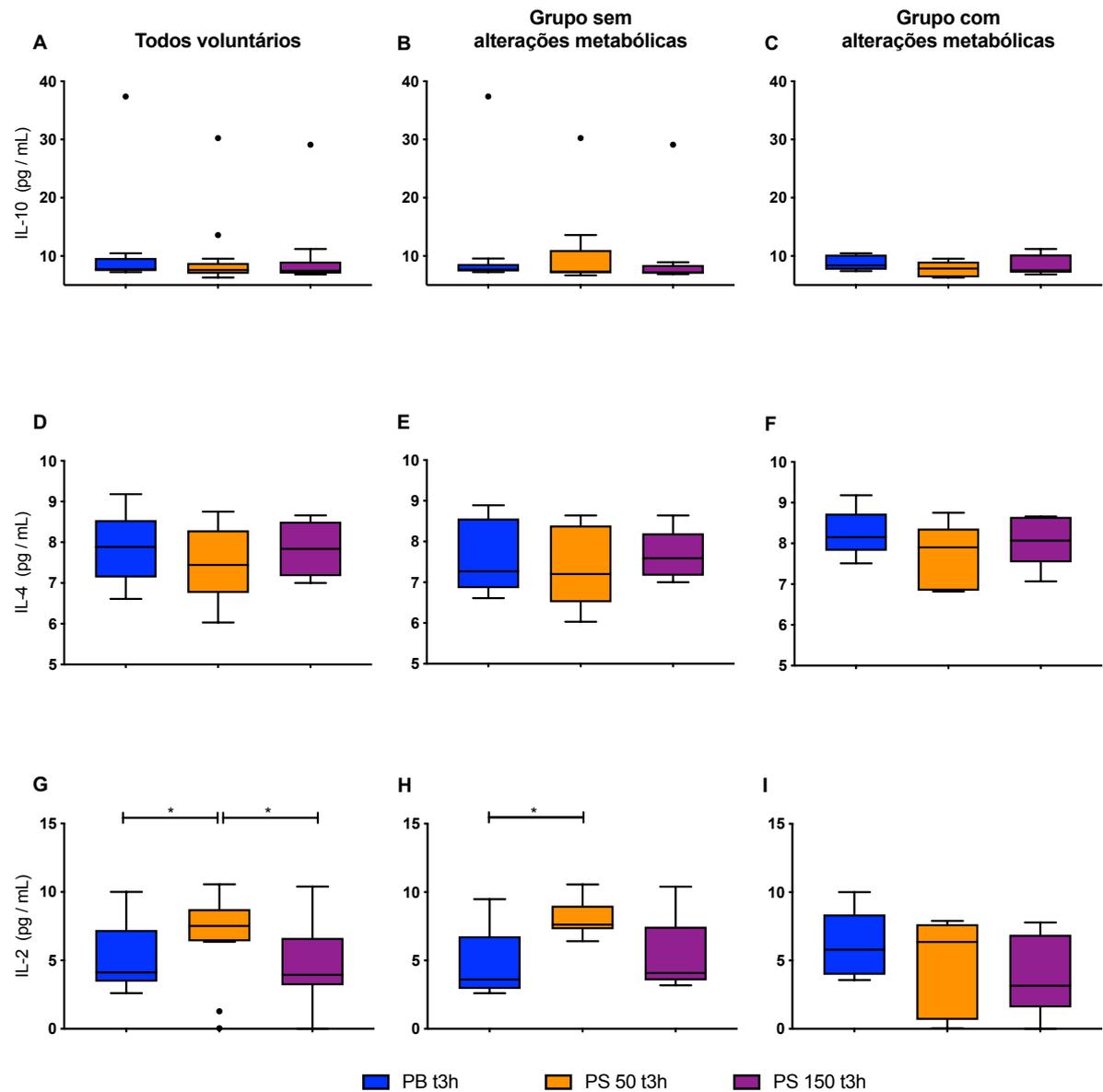


Figura 22. Efeito agudo do consumo de 50g e 150g de polpa de *Passiflora setacea* (PS) e de bebida placebo (PB) nos níveis séricos das citocinas IL-10, IL-4 e IL-2 de todos os voluntários (n = 15), de voluntários sem alterações bioquímicas (n=10) e com alterações bioquímicas (n=5). Resultados analisados por meio do teste de comparações múltiplas paradas não-paramétricas, valores expressos em medianas e percentis 25 e 75. * $p \leq 0,05$. • outlier testado pelo método de Tukey.

Não foi possível avaliar a taxa de variação interpessoal (% delta) das citocinas devido à falta de kit necessário para todas as análises de tempo 0h.

2.2 Fase IV - Efeito do consumo prolongado de Placebo vs 50g de polpa de *Passiflora setacea*

2.2.1 Efeito consumo prolongado do suco de *Passiflora setacea* nos marcadores bioquímicos

2.2.1.1 Efeito no metabolismo glicídico e lipídico (Valores absolutos)

Níveis de glicose, insulina, triglicerídeos, HDL e os índices HOMA IR e HOMA beta foram analisados após 14 dias de consumo de bebida placebo (PB) e suco 50g de polpa de *Passiflora setacea* (PS). O baseline foi estipulado utilizando valores de cada voluntário da Etapa III do estudo. Os resultados mostram aumento dos níveis de glicose com os dois tratamentos comparados ao baseline (Figura 23A), porém apenas com o tratamento placebo houve aumento significativo do índice de resistência insulínica (HOMA IR) quando comparado com o baseline ($p=0,04$; Figura 23C).

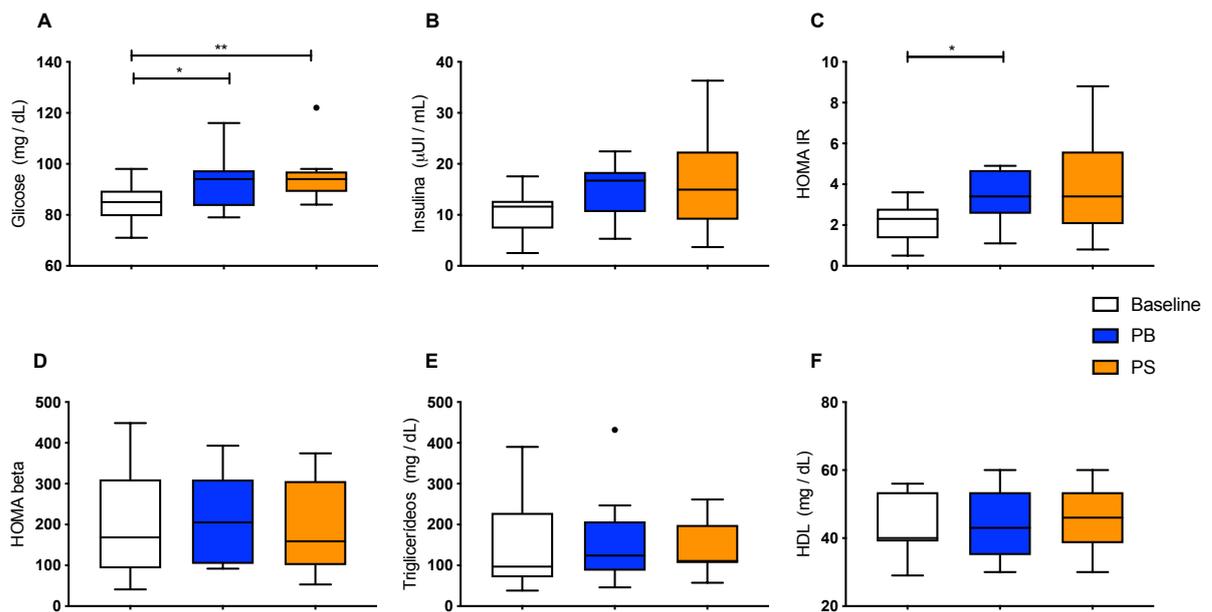


Figura 23. Efeito do consumo prolongado (14 dias) de 50g de polpa de *Passiflora setacea* (PS) e de bebida placebo (PB) nos marcadores séricos de glicose, insulina, triglicerídeos, HDL e nos índices HOMA IR e HOMA beta de todos os voluntários ($n = 9$). Resultados analisados por meio do teste de comparações múltiplas paradas não-paramétricas, valores expressos em medianas e percentis 25 e 75. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$. • outlier testado pelo método de Tukey.

2.2.1.2 Efeito no metabolismo glicídico e lipídico (Variação intrapessoal delta %)

Não foram identificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos quanto à taxa de variação intrapessoal (delta %) dos marcadores de glicose, insulina, triglicerídeos, HDL e nos índices HOMA IR e HOMA beta no consumo de 14 dias, conforme é demonstrado na Figura 24.

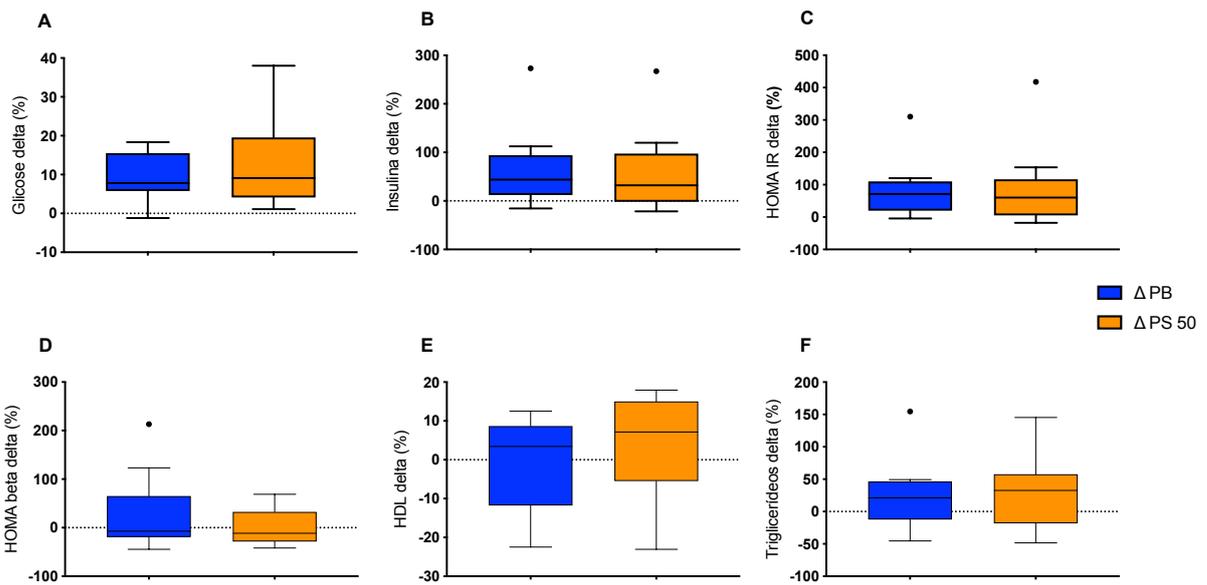


Figura 24. Taxa de variação intrapessoal do efeito do consumo prolongado (14 dias) de 50g de polpa de *Passiflora setacea* (PS) e de bebida placebo (PB) nos marcadores séricos de glicose, insulina, triglicerídeos, HDL e nos índices HOMA IR e HOMA beta de todos os voluntários (n=9). Resultados analisados por meio do teste de comparações múltiplas paradas não-paramétricas, valores expressos em medianas e percentis 25 e 75. • outlier testado pelo método de Tukey.

2.2.1.2 Efeito nas concentrações de citocinas (Valores absolutos)

Os níveis das citocinas IL-17A, INF- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-4 e IL-2 foram analisados após 14 dias de consumo da bebida placebo (PB) e 50g polpa de *Passiflora setacea* (PS). O baseline foi estipulado utilizando valores de cada voluntário da Etapa III do estudo. Os resultados apontam aumento estatístico dos níveis de IL-6 após os 14 dias de consumo do placebo (p=0,0286; Figura 25D), enquanto essa variação não ocorre quando os indivíduos consomem a PS. Assim como na Fase III, a mediana dos níveis de IL-17A infere uma redução não significativa com o tratamento PS comparado com o PB ao baseline (Figura 25A).

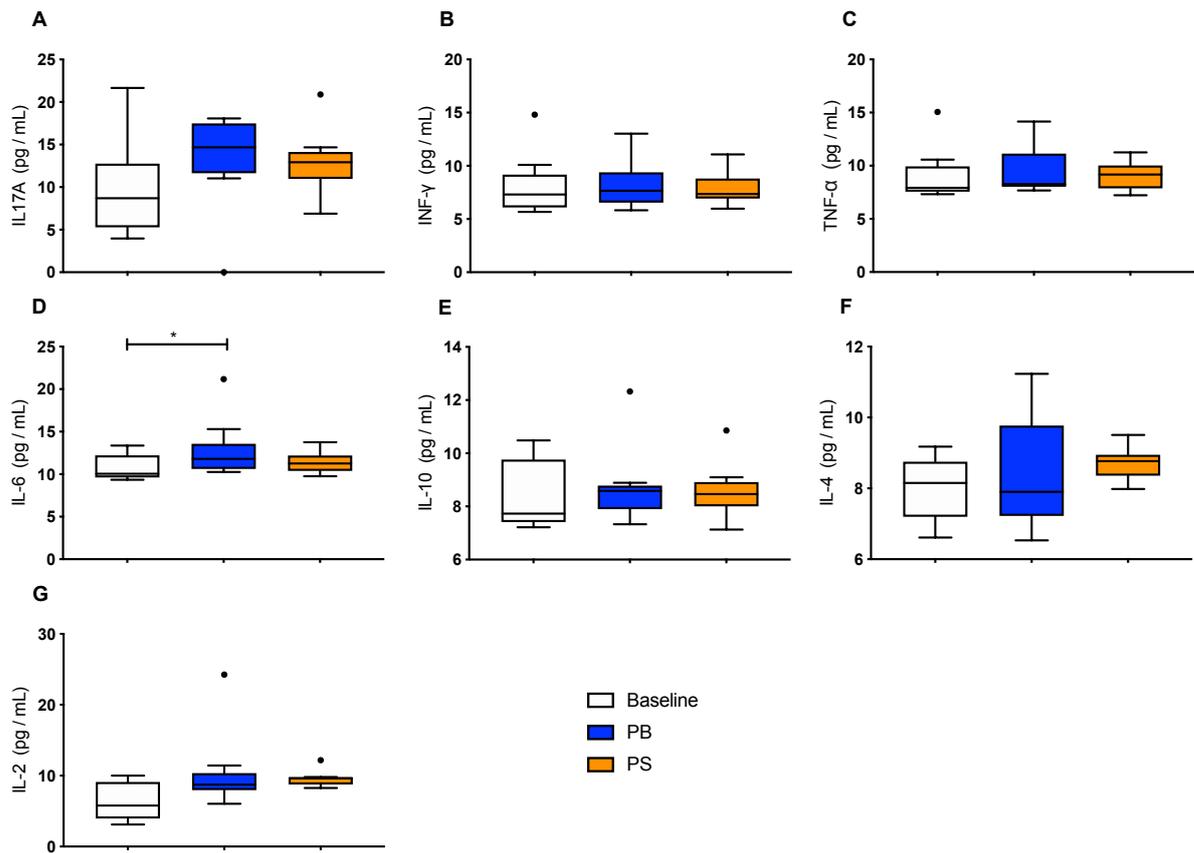


Figura 25. Efeito do consumo prolongado (14 dias) de 50g de polpa de *Passiflora setacea* (PS) e de bebida placebo (PB) nos marcadores séricos de citocinas de todos os voluntários (n = 9). Resultados analisados por meio do teste de comparações múltiplas paradas não-paramétricas, valores expressos em medianas e percentis 25 e 75. * $p \leq 0,05$. • outlier testado pelo método de Tukey.

2.2.1.2.1 Efeito nas concentrações de citocinas (Variação intrapessoal - delta %)

Não foram identificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos quanto à taxa de variação intrapessoal (delta %) das citocinas séricas no consumo de 14 dias, conforme é demonstrado na Figura 26.

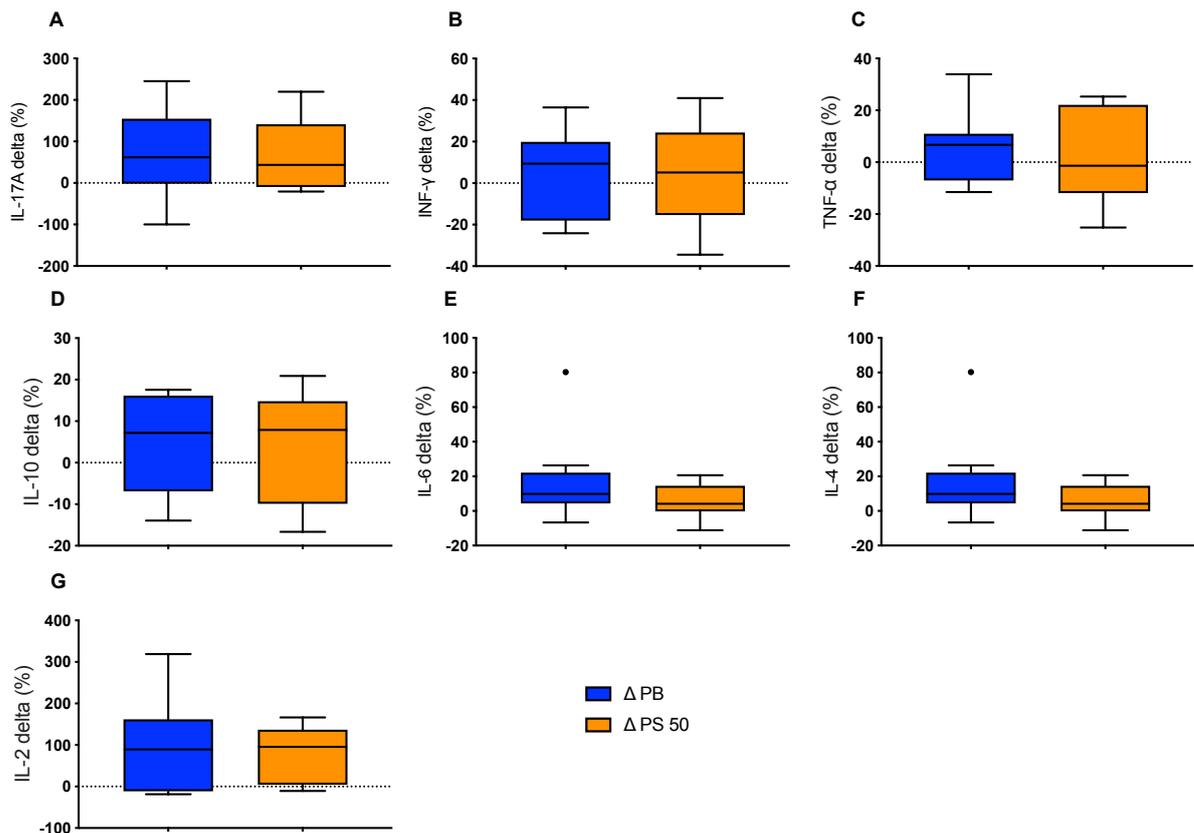


Figura 26. Taxa de variação intrapessoal do efeito do consumo prolongado (14 dias) de 50g de polpa de *Passiflora setacea* (PS) e de bebida placebo (PB) nos marcadores séricos de citocinas de todos os voluntários (n=9). Resultados analisados por meio do teste de comparações múltiplas paradas não-paramétricas, valores expressos em medianas e percentis 25 e 75. • outlier testado pelo método de Tukey.

2.2.1.2.2 Análise de Componentes Principais (Valores absolutos)

A análise de correlação por ACP de todos os marcadores bioquímicos foi realizada para comparar os dois tratamentos: 50g de polpa de *Passiflora setacea* e bebida placebo, comparados a um *baseline*. A Figura 27 mostra a correlação de todos os marcadores bioquímicos (A), dos marcadores, desconsiderando as citocinas (valores absolutos) (B) e apenas de citocinas (C), todos em valores absolutos. Pelos padrões de dispersão dos dados e pela consequente alteração das elipses, as variações dos marcadores após os 14 dias de consumo de PS se diferem das do PB. A diferença é mais notável quando se analisam as variações de glicose, insulina, HOMA IR, HOMA beta, triglicerídeos e HDL separadamente das citocinas (C).

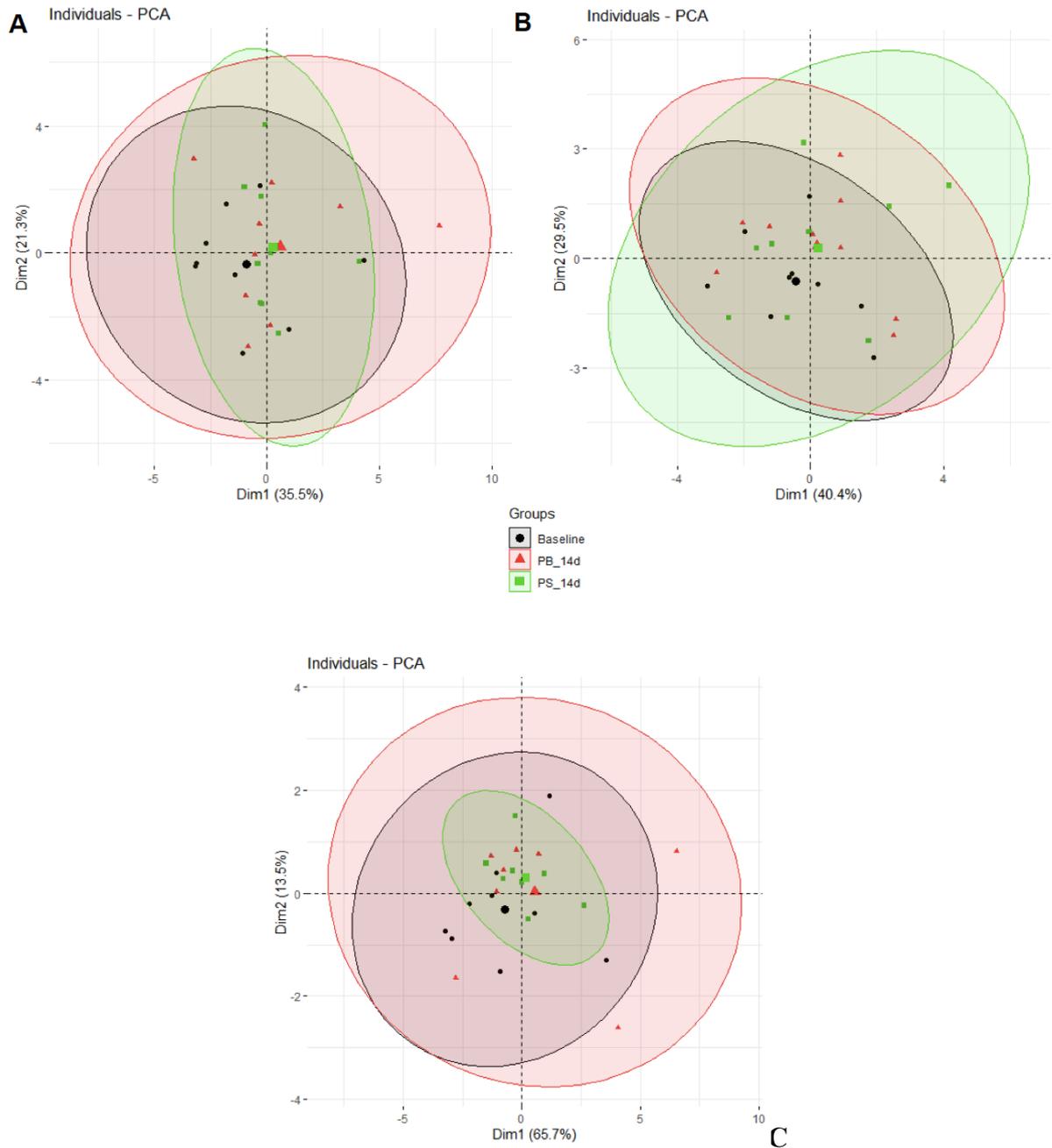


Figura 27. Correlação dos valores absolutos de (A) todos os marcadores bioquímicos de glicose, insulina, HOMA IR, HOMA beta, triglicérides, HDL e das citocinas IL-17A, INF- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2; (B) marcadores bioquímicos sem as citocinas; e (C) apenas citocinas; dos tratamentos 14 dias de suco de *Passiflora setacea* 50g (PS_14d) (em verde) e de bebida placebo (PB_14d) (em vermelho) comparados ao baseline (em preto) de todos os voluntários (n = 9) por ACP.

2.2.1.2.3 Análise de Componentes Principais (Variação intrapessoal – delta %)

A diferença entre os tratamentos torna-se ainda mais nítida ao se fazer a ACP com as taxas de variações intrapessoais (delta %) dos marcadores bioquímicos e das citocinas, como visto na Figura 28 à esquerda, ou também dos marcadores sem as citocinas (Figura 28 à direita).

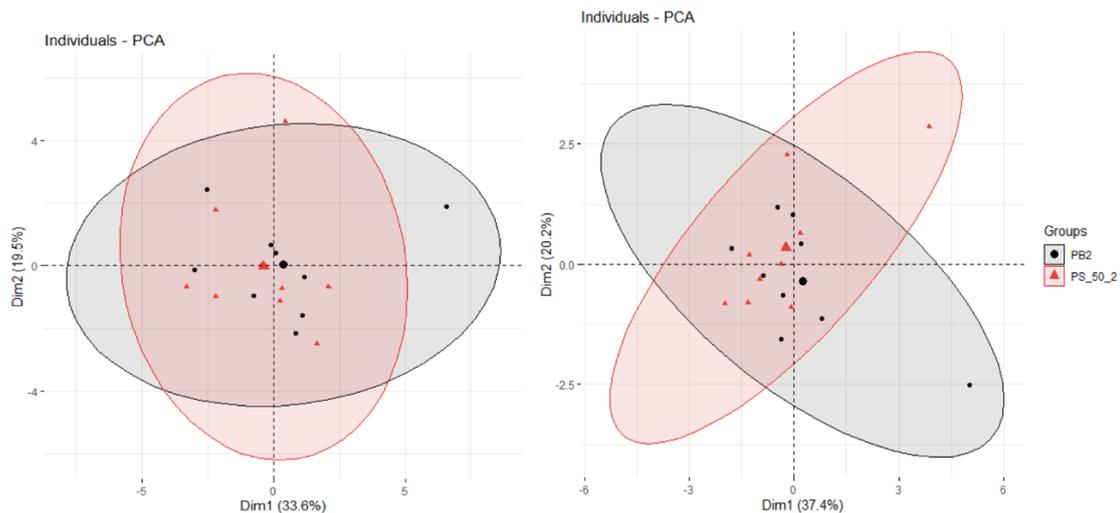


Figura 28. Análise de correlação da taxa de variação intrapessoal (delta%) de todos os marcadores bioquímicos de glicose, insulina, HOMA IR, HOMA beta, triglicérides, HDL e das citocinas L17A, INF- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2 (esq.); e os marcadores bioquímicos sem as citocinas (dir.) dos tratamentos 50g de polpa de *Passiflora setacea* (PS) em vermelho; e bebida placebo (PB) em preto de todos os voluntários (n = 9).

2.2.2 Resumo dos resultados

A Tabela 6 abaixo foi estruturada para melhor visualização dos resultados observados nas etapas do estudo, comparando o efeito agudo de uma dose de *Passiflora setacea* ou bebida placebo (Fases I e III) e o efeito do consumo prolongado de 14 dias (Fase IV).

Tabela 6. Comparação dos resultados observados entre o efeito agudo de uma dose de *Passiflora setacea* ou bebida placebo e o efeito do consumo prolongado de 14 dias. PB = bebida placebo; PS50 = 50g de *Passiflora setacea*; PS150 = 150g de *Passiflora setacea*; BL = Baseline; * resultados de delta %

Marcadores	Efeito Agudo (3h)		Efeito consumo prolongado (14 dias)
	Fase I	Fase III	Fase IV
Glicose	PB – PS150	PB < PS50 - PS150	BL < PB – PS50
Insulina	PB > PS150	PB – PS150 > PS50	BL – PB – PS50
HOMA IR	PB > PS150	PB > PS50 – PS150	BL – PS50 < PB
HDL	PB < PS150	PB – PS50 < PS150*	BL – PB – PS50
Triglicerídeos	PB – PS150	PB – PS50 < PS150*	BL – PB – PS50
IL-17A	PB > PS150	PB – PS50 – PS150	BL – PB – PS50
INF-γ	PB – PS150	PB – PS50 – PS150	BL – PB – PS50
TNF-α	PB – PS150	PB – PS50 – PS150	BL – PB – PS50
IL-10	PB – PS150	PB – PS50 – PS150	BL – PB – PS50
IL-6	PB – PS150	PB – PS50 – PS150	BL – PS50 < PB
IL-4	PB – PS150	PB – PS50 – PS150	BL – PB – PS50
IL-2	PB – PS150	PB – PS150 < PS50	BL – PB – PS50

DISCUSSÃO

Este é um dos raros estudos em que se avaliou o efeito de um fruto do cerrado brasileiro nos níveis séricos de insulina, HDL, IL-17A, IL-2, IL-6 e no perfil de expressão gênica em humanos. Os estudos de efeito agudo, ou seja, 3 horas após o consumo de uma única dose de suco de *Passiflora setacea* (Fases I, II e III), realizados com grupos de indivíduos diferentes e em épocas diferentes, revelaram resultados semelhantes e que corroboram a hipótese do estudo.

O fato de cada voluntário ter recebido todos os tratamentos para se avaliar as variações intrapessoais, permitiu que características como fatores genéticos pudessem ser eliminadas como variáveis confundidoras (HULLEY et al., 2006). Por ser um delineamento mais robusto que estudos paralelos (CLEOPHAS; DE VOGEL, 1998), possibilitou-se identificar diferenças estatísticas nos marcadores, mesmo com um n de 9-15 sujeitos. O período de *wash-out* foi fundamental para se evitar o efeito de *carry-over*, ou seja, o efeito do tratamento anterior sobre o subsequente. Para os estudos de efeito agudo, estipulou-se um período de 7 a 10 dias, e para o estudo de consumo prolongado de duas semanas, estipulou-se um período de cinco semanas. Esses períodos foram assim determinados para se obter uma margem de segurança na garantia da completa excreção dos compostos fenólicos do sistema dos indivíduos.

Os níveis de glicose com ambos os tratamentos tenderam a decair no decorrer das três horas, pelo fato de os participantes de pesquisa, em jejum de 12 horas, terem consumido apenas um copo (bebida placebo ou suco de PS). Porém, apenas o suco de PS foi capaz de modular negativamente os níveis de insulina e do índice de resistência insulínica (HOMA IR). Esses resultados foram avaliados tanto com o consumo de 150g da polpa, o equivalente a 9 frutos, quanto com uma quantidade três vezes menor, de 50g ou aproximadamente 3 frutos. Os resultados nutrigenômicos confirmaram essa modulação negativa da expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na redução da sensibilidade e da secreção insulínica, como ADCY8, GRIN2A, LAMA1, G6PC2.

Neste trabalho, foram observadas a redução dos níveis séricos de insulina e a modulação de genes envolvidos na sua via sinalizatória. Um possível agente participante nesses efeitos moduladores da via insulina são as flavanonas presentes na polpa de PS, isoorientina, orientina e hesperetina. A isoorientina provou reverter a resistência à insulina em adipócitos, estimulando a fosforilação adequada do IRS na via de sinalização da insulina. O efeito dessa flavanona na melhora da sensibilidade à insulina foi similar ao de uma droga comumente utilizada para este fim, mas que gera efeitos colaterais como o desenvolvimento da osteoporose e a redução da regeneração hepática (ALONSO-CASTRO et al., 2012). E as análises preditivas realizadas *in*

silico mostraram alta afinidade de ligação dos metabólitos glicosilados de orientina e sulfatados de hesperetina à Akt, proteína quinase-chave na cascata de sinalização da insulina (ŚWIDERSKA et al., 2020).

Estudos recentes revelam as vias pelas quais a orientina atua e que ajudam a corroborar os achados deste estudo. Este flavonoide é capaz de ativar P13K/Akt (XIAO et al., 2018), facilitando assim, a liberação do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), fator de transcrição vital na ativação da expressão de enzimas antioxidantes (LV et al., 2017). E essa flavanona também pode inibir a ativação da via do NF- κ B (XIAO et al., 2017), melhorando assim, o quadro inflamatório intra e extracelular. A hesperetina também tem revelado promover a ativação de Akt, não apenas colaborando na manutenção da cascata de sinalização da insulina, como também contribuindo na regulação das funções cerebrais (VAUZOUR et al., 2018). Portanto, pode ser sugerido que os compostos fenólicos presentes na *Passiflora setacea* são agentes-chaves na prevenção da resistência insulínica e dos distúrbios metabólicos consequentemente gerados.

Outros polifenóis em outros estudos *in vivo* provaram reduzir os níveis séricos de insulina em camundongos normais, como os presentes em uma castanha europeia (YASUDA et al., 2014), no chá verde (FORESTER; GU; LAMBERT, 2012) e na maçã (SHIN et al., 2016). O extrato da folha de uma outra espécie de maracujá (*Passiflora alata*), rico também em vitexina, isovitexina e isoorientina como a polpa de *P. setacea*, reduziu o número de células inflamatórias nas ilhotas de Langerhans no pâncreas de camundongos diabéticos (FIGUEIREDO et al., 2016) e em camundongos saudáveis (COLOMEU et al., 2014). No entanto, poucos estudos têm avaliado o efeito de alimentos no metabolismo da insulina em humanos. Nyambe-Silavwe e Williamson (NYAMBE-SILAVWE; WILLIAMSON, 2016) relataram o efeito de frutas secas associadas ao chá verde na diminuição dos níveis séricos de insulina em voluntários saudáveis.

Distúrbios no metabolismo da insulina e consequentemente no metabolismo da glicose resultam em estresse oxidativo e inflamação, que levam a disfunções micro e macrovasculares e ao desenvolvimento de diabetes, doenças cardiovasculares, hepáticas e neurodegenerativas. Também foi discutido que a inflamação crônica de baixo grau gerada no contexto de má alimentação, sobrepeso e inatividade física culminam no distúrbio da sinalização da insulina e no consequente quadro de resistência insulínica (CALDER et al., 2011; ODEGAARD; CHAWLA, 2013). Sendo assim, avaliar marcadores envolvidos na inflamação foi de extrema importância para a construção do raciocínio lógico da pesquisa.

Uma dose maior do suco de PS (150g) foi capaz de aumentar os níveis séricos de HDL, tanto no estudo não randomizado, quanto no estudo randomizado. Estudos recentes de intervenção nutricional em alimentos ricos em polifenóis, como azeite de oliva (SANCHEZ-RODRIGUEZ et al., 2018) e chocolate amargo (PETRILLI et al., 2016), mostraram afetar positivamente os níveis de HDL em humanos. Uma possível explicação é que esses alimentos ricos em polifenóis podem induzir alterações nas propriedades bioquímicas da lipoproteína que contribuem para sua principal função biológica, particularmente no aumento da capacidade de efluxo de colesterol e AGL (HERNÁEZ et al., 2014). Assim como o aumento da concentração e da qualidade do HDL favorecem a metabolização e o transporte reverso de AGL, observa-se a redução da ativação de TLR e a consequente redução da ativação da via do NF- κ B (CALDER et al., 2011; RADER; HOVINGH, 2014; SHI et al., 2006). Portanto, esses resultados revelam um outro mecanismo pelo qual o suco de *Passiflora setacea* ajuda a melhorar a via de sinalização da insulina. Possivelmente, essa manutenção sinalizatória da via da insulina ativaria o feedback negativo, gerando a queda da produção e dos níveis de insulina sérica identificado nas etapas do estudo. Esses fatores em conjunto clareiam os mecanismos regulatórios pelos quais a *Passiflora setacea* atua sobre a inflamação e por conseguinte, sobre a resistência insulínica.

Outros marcadores inflamatórios envolvidos na modulação da via da insulina são as citocinas. Na fase I do estudo, os níveis de IL-17A se mantiveram baixos com o suco de PS150g, diferentemente do ocorrido com o consumo da bebida PB. A IL-17A é uma citocina pró-inflamatória que estimula a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Suas atividades são amplamente aumentadas devido à sinergia com o TNF- α , que promove a indução de genes-alvo envolvidos em processos inflamatórios (BOSTEEN et al., 2014; MIOSSEC; KORN; KUCHROO, 2009). Estudos presentes na literatura têm demonstrado o efeito anti-inflamatório de alimentos via redução dessa citocina *in vivo*. A casca de *Passiflora edulis*, por exemplo, rica em isoorientina, orientina, vitexina e isovitexina, dentre outros flavonoides, foi capaz de reduzir níveis de IL-17 em camundongos do sexo feminino (CAZARIN et al., 2016). A cianidina, um flavonoide presente nas *berries*, demonstrou a capacidade de reduzir a inflamação em ratos através da ligação com o domínio extracelular de IL-17RA e, consequentemente, interrompendo a formação do complexo IL-17A/IL-17RA (LIU et al., 2017). A apigenina foi capaz de reduzir a infiltração de neutrófilos em tecidos inflamados e dos níveis de IL-17A em murinos (PANG et al., 2019). À vista desses achados científicos, o consumo de suco de PS, ao promover a redução dos níveis de IL-17A, sugere um efeito anti-inflamatório

dos compostos fenólicos presentes na polpa possivelmente via inibição da ligação da citocina ao seu receptor específico.

Entretanto, poucos estudos forneceram evidências sobre o papel da dieta na modulação dos níveis de IL-17A em humanos. Peluso et al. (PELUSO et al., 2012) observaram uma queda dessa citocina no plasma de 14 indivíduos com sobrepeso após o consumo de abacaxi, groselha preta e suco de ameixa. Em conjunto, essa observação sugere que o consumo de PS pode apresentar efeitos anti-inflamatórios importantes. Na fase III, o consumo de PS50g também indicou uma possível redução dos níveis dessa citocinas em indivíduos com alterações metabólicas, no entanto, novos estudos com n maior devem ser conduzidos para confirmarem.

Outra citocina pró-inflamatória que teve seus níveis reduzidos após o consumo de PS por 14 dias comparado à bebida PB foi a IL-6. A produção de IL-6 é ativada por IL-17. E o aumento das concentrações de IL-6 ativa a diferenciação das células TCD4 virgem em Th17 (ZHENG; WANG; HORWITZ, 2008), retroalimentando assim, a inflamação. Os compostos fenólicos presentes na polpa de PS e também na casca de *Passiflora edulis*, são capazes de reduzir níveis de IL-6 em camundongos (CAZARIN et al., 2016). A vitexina em um estudo *in vitro* inibiu a superexpressão da IL-6 em células endoteliais da veia humana (HUVEC) (ZHANG et al., 2017). Outros flavonoides encontrados nas passifloras foram capazes de inibir a via de sinalização da IL-6, como a crisina (WOO et al., 2004), a luteolina (LODHI et al., 2020) e a apigenina (ZHANG et al., 2019). Possivelmente, a PS atua primariamente na inibição da sinalização da IL-17, o que gera, por conseguinte, inibição ou diminuição da produção de IL-6 no decorrer dos dias de consumo. Dessa forma, ao reduzir a concentração sérica de ambas citocinas, a *Passiflora setacea* demonstra promover a integridade da via da insulina via atividade anti-inflamatória de forma aguda e também a médio prazo.

Os níveis séricos de IL-2 aumentaram após consumo de PS50g por todos os voluntários e também no grupo clusterizado de indivíduos saudáveis (sem marcadores alterados). Não foram detectados estudos que avaliem o efeito de alimentos ou polifenóis na regulação da inflamação via IL-2, sendo este estudo pioneiro em identificar o efeito de um fruto por esta via. A IL-2 tem papel regulatório da inflamação via ativação das células Treg (YE; BRAND; ZHENG, 2018), via redução da sinalização de IL-16 e ela atua indiretamente na redução da produção de IL-17 ao reduzir a diferenciação das células Th17 via bloqueio da STAT 3 (PARK et al., 2005; ZHENG; WANG; HORWITZ, 2008). Esses mecanismos promovidos por IL-2 corroboram

com os demais achados do papel da PS nas concentrações séricas de IL-17 e IL-6 nos participantes de pesquisa.

Os níveis do TNF- α demonstraram uma tendência biológica de manter o mesmo padrão da IL-17, ou seja, aumentar após a bebida PB ($p = 0,0645$) e se manter estável com o consumo do suco de PS. Esse dado é coerente com todos os achados deste estudo. Essa citocina pró-inflamatória atua de forma sinérgica à IL-17 (BOSTEEN et al., 2014), a redução da sua concentração melhora função do receptor de insulina (DE LUCA; OLEFSKY, 2008) e a via P13K/AKT (ŚWIDERSKA et al., 2020). Estudos apontam a habilidade dos compostos fenólicos em reduzir a sua expressão e produção (CAZARIN et al., 2016; NAM et al., 2017).

Nosso estudo é o primeiro a mostrar o efeito de uma espécie de *Passiflora* na modulação da expressão gênica em humanos. As análises em microarranjos de DNA (Fase II), mostraram que o consumo de uma dose única de suco de PS pelos voluntários afetou significativamente os perfis de expressão gênica de PBMC. Essas células foram escolhidas com o objetivo de avaliar a modulação do perfil de expressão gênica associado à inflamação e a diversas alterações clínicas e bioquímicas no desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis (BOUWENS et al., 2010; VAN ERK et al., 2006).

Outro estudo mostrou a capacidade de outra espécie de *Passiflora* em modular a expressão gênica em camundongos. Toda et al. (TODA et al., 2017) demonstraram que o extrato das partes aéreas de *Passiflora incarnata* Linnaeus podem modular a expressão de genes que podem estar envolvidos na prevenção da obesidade (KUBO et al., 2013) e da hiperglicemia (OYAMA et al., 2012). Em relação aos efeitos dos compostos encontrados na *Passiflora setacea* na expressão gênica, foi relatado que a isoorientina estimulou a transcrição de genes que codificam componentes da via de sinalização da insulina em adipócitos de murinos sensíveis à insulina e resistentes à insulina (ALONSO-CASTRO et al., 2012). A flavanona orientina presente na PS e na *Commelina communis* L. regulou negativamente a expressão do receptor ativado do proliferador de peroxissoma (PPAR) e os níveis de RNAm de genes envolvidos na adipogênese, lipogênese e síntese de triglicerídeos *in vitro* (NAGAI et al., 2018). Foi demonstrado que um extrato vegetal rico em orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina inibiu os níveis de RNAm de TNF- α também *in vitro* (WEBER; FRAEMOHS; DEJANA, 2007). Portanto, nosso estudo original sugere que os benefícios potenciais da *Passiflora setacea* à saúde

podem estar relacionados à sua capacidade de modular a expressão de genes em humanos, como se identificou neste estudo.

A análise bioinformática também revelou que o consumo de PS modulou a expressão de um grupo de genes envolvidos na regulação da inflamação e da resposta imune, particularmente a via de sinalização de quimiocinas e as interações citocina-receptor de citocina. Entre esses genes estão CXCL17, IL36A, CCL16, CCL21 e IL-25. O CCL16 é uma quimiocina pró-inflamatória que pode estar envolvida no desenvolvimento de doenças de base inflamatória como a síndrome do intestino irritável (HAYATBAKSH et al., 2019). As quimiocinas, um grupo de citocinas que atraem e ativam leucócitos para o tecido inflamado, foram associadas à patogênese de uma série de doenças, inclusive da aterosclerose (CHARO; RANSOHOFF, 2006). O gene CCL21, por exemplo, está envolvido na patogênese de vários distúrbios inflamatórios, incluindo artrite reumatoide, doenças inflamatórias do intestino e aterosclerose (FEVANG et al., 2009). A análise nutrigenômica também identificou a modulação negativa de diversas interleucinas, como a IL-36A, que têm propriedades pró-inflamatórias (ZHANG et al., 2017). Vários estudos têm demonstrado que alimentos ricos em polifenóis ou polifenóis isolados como a hesperidina podem regular a expressão de quimiocinas (MILENKOVIC et al., 2011). Em conjunto, os resultados sugerem que o consumo de *Passiflora setacea* pode apresentar efeitos anti-inflamatórios por meio da modulação da expressão de genes relacionados, o que justifica a redução sérica das citocinas avaliadas.

A fase II do estudo identificou mudanças na expressão de genes envolvidos em processos como adesão celular e interações células-matriz extracelular; sinalização de quimiocinas; secreção de insulina; transporte de cálcio e potássio; bem como inflamação, desenvolvimento de aterosclerose e neuroestimulação. Entre eles estão os genes que codificam metaloproteinases de matriz (MMP), desintegrinas e metaloproteases (ADAM), cuja expressão foi identificada como regulada negativamente. As MMP constituem uma família de enzimas de processamento extracelular responsáveis pela inflamação e imunidade adquirida (PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004). A expressão de genes que codificam MMP é frequentemente aumentada por citocinas, e espécies reativas de oxigênio estão frequentemente envolvidas neste mecanismo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A superexpressão de MMP-7 regula gradientes de quimiocinas que podem levar a danos graves ao tecido por meio do influxo transepitelial de neutrófilos (SWEE et al., 2008). Em um estudo *in vitro* e *in vivo*, o resveratrol reverteu a lesão de células epiteliais humanas e atenuou tal lesão em camundongos através da inibição da expressão

de MMP-7 (XIAO et al., 2016). O receptor de domínio de inserção de quinase (KDR) (ou receptor de fator de crescimento endotelial vascular-2, VEGFR2) é um receptor-chave que promove o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) para formar mitose e gerar vascularização. O VEGF promove a proliferação e migração de células e ativa a secreção da matriz metaloproteinase (UNEMORI et al., 1992), o que pode levar à exacerbação do dano tecidual durante a inflamação. O VEGF é altamente expresso em tecidos em crescimento ou remodelação em câncer e aterosclerose (PARK-WINDHOL; D'AMORE, 2016, p.). A expressão de KDR foi regulada negativamente com o consumo de suco de *Passiflora setacea*, bem como o gene JAM-2 (molécula de adesão juncional 2) envolvido no recrutamento e extravasamento de leucócitos sob condições inflamatórias (WEBER; FRAEMOHS; DEJANA, 2007). Poucos estudos têm demonstrado a capacidade de alimentos ou de polifenóis em modular a expressão desses genes. Uma formulação de ervas chinesas foi capaz de diminuir a expressão de KDR e VEGF em um camundongo com carcinoma hepatocelular (XINYUE et al., 2017). Monfoulet et al. (MONFOULET et al., 2017) revelaram a capacidade da curcumina de reduzir a permeabilidade da junção endotelial. Assim, a capacidade do suco de PS em regular negativamente a expressão desse gene sugere uma potencial menor interação das células imunológicas com as células endoteliais vasculares, que representam as etapas iniciais do desenvolvimento da aterosclerose. Como a aterosclerose está associada à gênese de outras doenças cardiovasculares, o consumo de suco de PS pode revelar mecanismos interessantes subjacentes às suas potenciais propriedades vaso-protetoras, possivelmente devido à presença de flavonoides com essas propriedades na sua formulação (KU; KWAK; BAE, 2014; LEE; KU; BAE, 2014; YANG et al., 2013; ZUCOLOTTI et al., 2009).

ADAM constituem uma família de proteases com potencial de adesão celular (GIEBELER; ZIGRINO, 2016) e outras funções, incluindo degradação da matriz extracelular (ECM), liberação de várias proteínas da superfície celular e influência nos padrões de sinalização celular (HOOPER; LENDECKEL, 2005). ADAM12 é uma protease ativa na ECM que causa mudanças na proliferação e diferenciação da maturação dos adipócitos e também no desenvolvimento da obesidade induzida por dieta rica em gordura (MASAKI et al., 2005). Foi demonstrado que afeta as vias de sinalização do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)/mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) e do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ), levando ao aumento do acúmulo de lipídeos em adipócitos maduros (COLES et al., 2018). ADAMTS9 é um gene de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo

2 e sua superexpressão está associada à sinalização deficiente da insulina em tecidos periféricos e também à resistência à insulina (ZEGGINI et al., 2008). Foi demonstrado que seu alelo de risco (rs4607103 C) diminui a função mitocondrial e altera o metabolismo da glicose e dos lipídios (GRAAE et al., 2019). Outro gene identificado como diferencialmente expresso após o consumo do suco de PS é a adenilato ciclase 8 (ADCY8), que está envolvida na secreção de insulina e na homeostase da glicose. Sung et al. (SUNG et al., 2016), em uma análise de associação de todo o genoma, associaram o gene ADCY8 à obesidade e ao depósito de gordura visceral abdominal. Considerando todos esses fatores, o perfil de expressão gênica obtido após a ingestão de suco de *Passiflora setacea* sugere um menor acúmulo de lipídios em PBMCs e um menor prejuízo na sinalização da insulina, apresentando potenciais alvos moleculares dos metabólitos presentes na *P. setacea* e suas propriedades benéficas à saúde e à prevenção do quadro de síndrome metabólica.

A proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII) é uma proteína quinase multifuncional que modula a excitabilidade da membrana, a homeostase do Ca^{2+} celular, o metabolismo, a secreção de vesículas, a transcrição de genes, o tráfego de proteínas e a sobrevivência celular (ERICKSON et al., 2011). A expressão excessiva deste gene ativa CaMKII no miocárdio, promove hipertrofia (ZHANG et al., 2003) e cardiomiopatia apoptótica (YANG et al., 2006). O consumo de iogurte de batata doce roxa fermentado com probióticos rico em GABA diminuiu os níveis de proteínas CaMKII em ratos hipertensos (LIN et al., 2012). Esses achados podem sugerir o efeito protetor cardiovascular do suco *Passiflora setacea*.

Além da modulação de genes relacionados às regulações cardiometabólicas, a análise nutrigenômica também identificou a modulação de diversos genes associados à função neuronal promovida pela *P. setacea*, como CACNA1C, GRIN1 e receptor acoplado à proteína G 50 (GPR50). A comunicação sistema imunológico-cérebro e cérebro-sistema imunológico tem sido recentemente estudada (WOHLEB et al., 2015). O Sistema Nervoso Central (SNC) pode se comunicar com monócitos periféricos, promovendo a modulação da expressão gênica, principalmente no que diz respeito à via de controle transcricional do NF- κ B (MILLER et al., 2008). O CACNA1C é um gene que contribui para a etiologia dos transtornos psiquiátricos e para os fenótipos afetados por essas condições, como memória e ritmos circadianos (HEYES et al., 2015). Esses sintomas estão presentes em uma proporção da população em geral e estão correlacionados a um desempenho cognitivo inferior e a resultados adversos à saúde (MCDONALD; SAUNDERS; GEDDES, 2017) como a aterosclerose (GOLDSTEIN et al., 2015). O gene

GRIN1 (receptor de glutamato, ionotrópico, NMDA1) desempenha um papel importante na neurotransmissão excitatória, e o aumento de sua expressão tem sido associado à ansiedade em resposta ao estresse em camundongos (MOZHUI et al., 2010). Outro gene cuja expressão foi modulada após o consumo de suco de PS foi o GPR50, gene envolvido na depressão tardia em certos subgrupos de indivíduos deprimidos (RYAN et al., 2015). Esses achados explicam o efeito já conhecido tradicionalmente da *P. setacea* em reduzir estados de estresse (dados internos Embrapa Cerrados) e promover melhora da qualidade do sono (BOMTEMPO et al., 2016), além de sugerir um efeito potencial para tratamento auxiliar em disfunções cognitivas e transtornos psiquiátricos.

Os três principais fatores de transcrição cujas atividades podem ser afetadas pelo consumo de PS e que estão possivelmente envolvidos no efeito nutrigenômico observado são CREB1, RELA Proto-Oncogene (RelA) e SP1. O CREB1 regula a gliconeogênese, o metabolismo lipídico e as vias de sinalização da insulina, e a atividade de seu promotor transcricional está associada à patogênese de TD2 (XU et al., 2018), adipogênese (RAMOS-LOPEZ et al., 2018) e transtorno depressivo maior (ZUBENKO et al., 2014). RelA é uma subunidade de NF- κ B, um fator de transcrição crítico para a expressão de citocinas pró-inflamatórias em monócitos humanos. Estudos sobre o efeito de compostos bioativos sobre esse fator de transcrição mostraram que orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina exercem ação supressora sobre a ativação do NF- κ B (LEE; KU; BAE, 2014; LIN et al., 2005; LV et al., 2016). O SP1 elevado desempenha um efeito pró-apoptótico e estimula a calcificação vascular (ZHANG et al., 2018). Foi observado que o composto (-) - epigallocatequina-3-galato pode modular negativamente a atividade desse fator de transcrição (FANG et al., 2015). Portanto, a capacidade dos metabólitos presentes na polpa de *P. setacea* em afetar a atividade desses fatores de transcrição pode apresentar importantes mecanismos regulatórios com propriedades benéficas para a saúde.

A literatura carece de dados sobre o efeito de passifloras na expressão de miRNA. No entanto, tem sido sugerido que bioativos presentes nos alimentos podem modular a expressão de miRNA (MILENKOVIC et al., 2018; MILENKOVIC; JUDE; MORAND, 2013). Entre os miRNA identificados a partir da análise de bioinformática como potencialmente envolvidos na regulação pós-transcricional de genes diferencialmente expressos identificados pelo consumo de suco de *P. setacea*, podemos listar os miRNA-16, -26 e -124. miRNA-16 é um microRNA que já demonstrou desempenhar um papel importante na inflamação (HEYN et al., 2012) e na

hipertensão (FERNANDES et al., 2012). Enquanto o miRNA-124 medeia efeitos anti-inflamatórios e está envolvido em mecanismos neuroprotetores (SUN et al., 2015). Portanto, ao modular potencialmente a expressão desses miRNAs, a ingestão do suco de *Passiflora setacea* pode regular genes envolvidos no desenvolvimento ou na prevenção de doenças cardiometabólicas e neurológicas. A figura 28 representa os mecanismos regulatórios celulares pelos quais os metabólitos da *Passiflora setacea* pode estar modulando nos indivíduos com sobrepeso participantes da pesquisa.

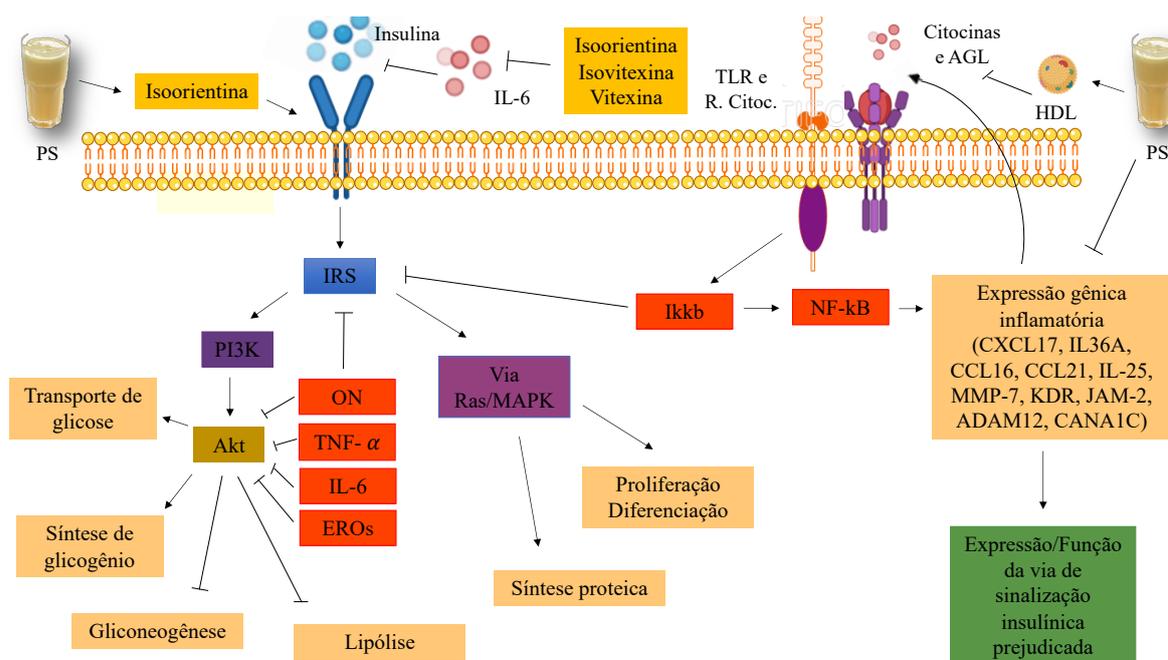


Figura 29. Possíveis mecanismos regulatórios celulares pelos quais os metabólitos presentes na polpa de *Passiflora setacea* atuam após ingestão por indivíduos com sobrepeso.

CONCLUSÕES

Este é um raro estudo encontrado na literatura no qual se avaliou o efeito de um fruto do cerrado brasileiro nos níveis séricos de insulina, HDL, IL-17A, IL-2, IL-6 e no perfil de expressão gênica em humanos. O suco de *Passiflora setacea* foi capaz de reduzir níveis séricos de insulina, o índice de resistência insulínica (HOMA IR), e níveis de IL-17A, além de aumentar concentrações plasmáticas de HDL após a ingestão de uma única dose. A *Passiflora setacea* também contribuiu para a redução dos níveis circulantes de IL-6 após consumo prolongado por duas semanas. A literatura indica que os flavonoides presentes na polpa de PS são responsáveis pela melhora da sinalização da via da insulina por diversos mecanismos, inclusive por suas propriedades anti-inflamatórias.

Os resultados nutrigenômicos corroboraram os achados clínicos ao se identificar a modulação negativa da expressão de genes envolvidos na redução da sensibilidade e da secreção insulínica e no aumento da produção de quimiocinas, do dano tecidual vascular e de distúrbios neuropsiquiátricos. As análises complementares de bioinformática levantam a possibilidade de fatores de transcrição de genes pró-inflamatórios estejam tendo sua atividade reduzida/inibida pela PS e que miRNAs envolvidos na redução da inflamação e com propriedades neuroprotetoras possam estar envolvidos na modulação pós-transcricional.

Este estudo abre perspectivas interessantes para futuros estudos clínicos de longo prazo utilizando a *Passiflora setacea* em tratamentos auxiliares com grupos de indivíduos com síndrome metabólica, diabetes tipo 2 ou com quadros de ansiedade. Análises de miRNA séricos nesses indivíduos podem melhor nortear a hipótese levantada. Além do mais, estudos *in vitro* são necessários para se avaliar o efeito dos metabólitos da *Passiflora setacea* na via do NF- κ B ou na produção intracelular de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio para melhor compreensão dos mecanismos intracelulares envolvidos.

O desenvolvimento desta linha de pesquisa é fundamental para ampliar o conhecimento sobre o papel das plantas da biodiversidade brasileira na prevenção e no tratamento auxiliar de doenças crônicas. À vista disso, apenas conhecendo as suas potencialidades, é possível valorizar e proteger o Cerrado, o segundo maior bioma do Brasil, o berço das águas da América Latina e a savana mais biodiversa do mundo.

PERSPECTIVAS

Para a identificação das vias efetivamente moduladas pelos compostos fenólicos presentes na polpa da *Passiflora setacea*, são necessárias novas etapas de pesquisa. Estudos preliminares *in silico* utilizando a técnica de Docking Molecular indicam uma alta possibilidade de ligação dos metabólitos de hesperetina e orientina à Akt. Assim, os metabólitos fenólicos presentes no plasma e na urina dos voluntários foram isolados ao fim da etapa IV para serem identificados e utilizados em estudos *in vitro*. Nesses experimentos, os metabólitos serão diluídos em meio de cultura contendo monócitos humanos estressados por TNF- α para então, avaliar-se a taxa de translocação do NF- κ B para o núcleo e também a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

LIMITAÇÕES

Os experimentos laboratoriais citados em Perspectivas, foram prorrogados devido à pandemia e que estão previstas para serem retomadas no ano de 2021.

Um fator especificamente limitante no decorrer desses anos de pesquisa foi reunir um número maior de voluntários acima de 40 anos sem comorbidades que não estivessem em uso de medicamentos ou suplementos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. et al. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ADAMS, K. F. et al. Overweight, Obesity, and Mortality in a Large Prospective Cohort of Persons 50 to 71 Years Old. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 8, p. 763–778, 24 ago. 2006.
- ALLAIN, C. C. et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 470–475, abr. 1974.
- ALONSO-CASTRO, A. J. et al. Isoorientin Reverts TNF- α -Induced Insulin Resistance in Adipocytes Activating the Insulin Signaling Pathway. **Endocrinology**, v. 153, n. 11, p. 5222–5230, nov. 2012.
- APPEL, K. et al. Modulation of the γ -aminobutyric acid (GABA) system by *Passiflora incarnata* L. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 6, p. 838–843, jun. 2011.
- AROSA, F. A.; CARDOSO, E. M.; PACHECO, F. C. **Fundamentos de imunologia**. Lisboa: Lidel, 2007.
- BAI, Y. et al. Plasma Pharmacokinetics, Bioavailability, and Tissue Distribution of Four C - Glycosyl Flavones from Mung Bean (*Vigna radiata* L.) Seed Extracts in Rat by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 27, p. 5570–5580, 12 jul. 2017.
- BARBER-CHAMOUX, N. et al. Substantial Variability Across Individuals in the Vascular and Nutrigenomic Response to an Acute Intake of Curcumin: A Randomized Controlled Trial. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 5, p. 1700418, mar. 2018.
- BOMTEMPO, L. L. et al. Bioactive amines in *Passiflora* are affected by species and fruit development. **Food Research International**, v. 89, p. 733–738, nov. 2016.
- BOSTEEN, M. H. et al. IL-17A potentiates TNF α -induced secretion from human endothelial cells and alters barrier functions controlling neutrophils rights of passage. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 466, n. 5, p. 961–972, maio 2014.
- BOUWENS, M. et al. Postprandial dietary lipid-specific effects on human peripheral blood mononuclear cell gene expression profiles. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 1, p. 208–217, 1 jan. 2010.
- BRASIL. **Práticas integrativas e complementares - Cadernos de Atenção Básica: programa saúde da família**. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde, Departamento de Atenção Básica, 2012.
- BRASIL, M. DA S. **Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999** ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, , 30 abr. 1999. Disponível em: <<https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjI0OQ%2C%2C>>
- BRASIL, M. DA S. Guia alimentar para a população brasileira. p. 158, 2014.
- BRASIL, M. DA S. **Vigitel Brasil 2018 : Saúde Suplementar : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico : estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas para beneficiários de planos de saúde nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018 [recurso eletrônico]**. Brasília: Agência Nacional de Saúde Suplementar., 2020a.
- BRASIL, M. DO M. A. **O Bioma Cerrado**. Disponível em: <<https://mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em: 18 out. 2020b.
- CALDER, P. C. et al. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. S3, p. S5–S78, dez. 2011.
- CAMPOS, A. V. S. **Características físico-químicas e composição nutricional da polpa de**

- Passiflora setacea.** Faculdade de Agronomia e Veterinária: Universidade de Brasília, 2010.
- CAN, Ö. D.; DEMIR ÖZKAY, Ü.; ÜÇEL, U. İ. Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 699, n. 1–3, p. 250–257, jan. 2013.
- CATRYSSSE, L.; VAN LOO, G. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF-κB. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 6, p. 417–429, jun. 2017.
- CAZARIN, C. B. et al. *Passiflora edulis* peel intake and ulcerative colitis: Approaches for prevention and treatment. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 5, p. 542–551, maio 2014.
- CAZARIN, C. B. B. et al. Intestinal anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* peel in the dextran sodium sulphate model of mouse colitis. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 565–576, out. 2016.
- CHANG, Y.-H. et al. Bioconverted Jeju Hallabong tangor (*Citrus kiyomi* × *ponkan*) peel extracts by cytolase enhance antioxidant and anti-inflammatory capacity in RAW 264.7 cells. **Nutrition Research and Practice**, v. 10, n. 2, p. 131, 2016.
- CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 6, p. 610–621, 9 fev. 2006.
- CLEOPHAS, T. J. M.; DE VOGEL, E. M. Crossover studies are a better format for comparing equivalent treatments than parallel-group studies. **Pharmacy World and Science**, v. 20, n. 3, p. 113–117, 1998.
- COLES, C. A. et al. Knockdown of a disintegrin A metalloprotease 12 (ADAM12) during adipogenesis reduces cell numbers, delays differentiation, and increases lipid accumulation in 3T3-L1 cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 29, n. 15, p. 1839–1855, ago. 2018.
- COLOMEU, T. C. et al. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). **International Immunopharmacology**, v. 18, n. 1, p. 106–115, jan. 2014.
- COMINETTI, C.; ROGERO, M. M.; HORST, M. A. **Genômica nutricional - dos fundamentos à Nutrição Molecular**. 1. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2017.
- CORRÊA, R. C. G. et al. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (passion fruit). **Trends in Food Science & Technology**, v. 58, p. 79–95, dez. 2016.
- CORREA-BETANZO, J. et al. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 165, p. 522–531, 15 dez. 2014.
- COSTA, A. M. et al. Produção de Mudanças de Maracujazeiro Silvestre (*Passiflora Setacea*). p. 6, 2015.
- COSTA, A. M.; MARTINS, C. **Estrutura e Evolução dos Genomas Embrapa | Vírus | ARN Mensageiro**. Embrapa Cerrados, Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2010.
- COSTA, N. M. B.; ROSA, C. DE O. B. **Alimentos Funcionais - Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016.
- COUSINS, R. J. Nutritional regulation of gene expression. **The American Journal of Medicine**, v. 106, n. 1, p. 20–23, jan. 1999.
- CROZIER, A. (ED.). **Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet**. Repr. ed. Oxford: Blackwell Publ, 2007.
- DA SILVA, J. K. et al. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 882–

890, out. 2013.

DE CARVALHO, M. V. O.; DE OLIVEIRA, L. DE L.; COSTA, A. M. Effect of training system and climate conditions on phytochemicals of *Passiflora setacea*, a wild *Passiflora* from Brazilian savannah. **Food Chemistry**, v. 266, p. 350–358, nov. 2018.

DE LUCA, C.; OLEFSKY, J. M. Inflammation and insulin resistance. **FEBS Letters**, v. 582, n. 1, p. 97–105, 9 jan. 2008.

DE SANTANA, F. C. et al. Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Brazilian *Passiflora* Seed Oils. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. C2647–C2654, dez. 2015.

DEL RIO, D. et al. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–1892, 10 maio 2013.

DENNY, A.; BUTTRISS, J. **Plant foods and health: focus on plant bioactives : synthesis report no. 4**. Norwich: European Food Information Resource Consortium (EuroFIR), 2007.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1–23, set. 2004.

ERICKSON, J. R. et al. CaMKII in the Cardiovascular System: Sensing Redox States. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 3, p. 889–915, jul. 2011.

ESMAIL ABBASI et al. Effects of Vitexin on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Rats. **The Chinese Journal of Physiology**, v. 56, n. 3, 30 jun. 2013.

FANG, C.-Y. et al. EGCG Inhibits Proliferation, Invasiveness and Tumor Growth by Up-Regulation of Adhesion Molecules, Suppression of Gelatinases Activity, and Induction of Apoptosis in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 2530–2558, 23 jan. 2015.

FELICIANO, R. P. et al. Flavonoid intake and cardiovascular disease risk. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 92–99, abr. 2015.

FERNANDES, T. et al. Exercise Training Prevents the Microvascular Rarefaction in Hypertension Balancing Angiogenic and Apoptotic Factors: Role of MicroRNAs-16, -21, and -126. **Hypertension**, v. 59, n. 2, p. 513–520, fev. 2012.

FERREIRA, I. C.; ABREU, R. M. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. p. 8, 2007.

FEVANG, B. et al. Chemokines and common variable immunodeficiency; possible contribution of CCL19, CCL21 and CCR7 to immune dysregulation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 158, n. 2, p. 237–245, nov. 2009.

FIGUEIREDO, D. A. F. et al. Effects of bark flour of *Passiflora edulis* on food intake, body weight and behavioral response of rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 595–600, out. 2016.

FIOCRUZ. **PNS - Pesquisa Nacional de Saúde**. Disponível em: <<https://www.pns.icict.fiocruz.br/>>. Acesso em: 11 out. 2020.

FORZZA, R. C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro : Andrea Jakobsson Estúdio, 2010.

GADIOLI, I. L. et al. A systematic review on phenolic compounds in *Passiflora* plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 785–807, 24 mar. 2018.

GIEBELER, N.; ZIGRINO, P. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 122, 23 abr. 2016.

GOLDSTEIN, B. I. et al. Major Depressive Disorder and Bipolar Disorder Predispose Youth to Accelerated Atherosclerosis and Early Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation**, v. 132, n. 10, p. 965–986, 8 set. 2015.

- GOMES, R. DE P. et al. Ensaaios clínicos no Brasil: competitividade internacional e desafios. Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, Rio de Janeiro. p. 41, 2012.
- GOMES, S. V. F. et al. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 28–35, maio 2017.
- GÓMEZ-RUIZ, J. Á.; LEAKE, D. S.; AMES, J. M. In Vitro Antioxidant Activity of Coffee Compounds and Their Metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 6962–6969, ago. 2007.
- GONTHIER, M.-P. et al. Microbial Aromatic Acid Metabolites Formed in the Gut Account for a Major Fraction of the Polyphenols Excreted in Urine of Rats Fed Red Wine Polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 2, p. 461–467, 1 fev. 2003.
- GRAAE, A.-S. et al. ADAMTS9 Regulates Skeletal Muscle Insulin Sensitivity Through Extracellular Matrix Alterations. **Diabetes**, v. 68, n. 3, p. 502–514, mar. 2019.
- HABAUZIT, V. et al. Flavanones protect from arterial stiffness in postmenopausal women consuming grapefruit juice for 6 mo: a randomized, controlled, crossover trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 66–74, 1 jul. 2015.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Fifth edition ed. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, 2015.
- HARBORNE, J. B. The Flavonoids: Advances in Research Since 1986 (Harborne, J. B.). **Journal of Chemical Education**, v. 72, n. 3, p. A73, mar. 1995.
- HAYATBAKHS, M. M. et al. The Serum Levels of CCL2 and CCL16 Expression in Patients with Irritable Bowel Syndrome. **Reports of Biochemistry & Molecular Biology**, v. 8, n. 1, p. 9–14, abr. 2019.
- HENDRIKS, H. F. J. Use of nutrigenomics endpoints in dietary interventions. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 72, n. 3, p. 348–351, ago. 2013.
- HERNÁEZ, Á. et al. Olive Oil Polyphenols Enhance High-Density Lipoprotein Function in Humans: A Randomized Controlled Trial. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 9, p. 2115–2119, set. 2014.
- HEYES, S. et al. Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and neurological disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 134, p. 36–54, nov. 2015.
- HEYN, J. et al. Adenosine A2A Receptor Upregulation in Human PMNs Is Controlled by miRNA-214, miRNA-15, and miRNA-16: **Shock**, v. 37, n. 2, p. 156–163, fev. 2012.
- HOLLMAN, P. C. et al. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. **Free Radical Research**, v. 31, n. 6, p. 569–573, dez. 1999.
- HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; JUNIOR, G. J. DE O. Análise de Componentes Principais: Resumo Teórico, Aplicação e Interpretação. **E&S Engineering and Science**, v. 5, n. 1, p. 83–90, 29 jun. 2016.
- HOOPER, N. M.; LENDECKEL, U. (EDS.). **The Adam family of proteases**. Dordrecht: Springer, 2005.
- HUANG, J.; DE PAULIS, T.; MAY, J. M. Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA.hy926 endothelial cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 15, n. 12, p. 722–729, dez. 2004.
- HULLEY, S. B. et al. **Delineando a pesquisa clínica uma abordagem epidemiológica**. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- HUNTZINGER, E.; IZAURRALDE, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 2, p. 99–110, fev. 2011.
- INDUSTRY REPORT. **Passion Flower Extracts Market Size & Trends** | Industry Report,

2025. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/passion-flower-extracts-market>>. Acesso em: 19 out. 2020.
- INFANTE, J. et al. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0152974, 6 abr. 2016.
- JAIPERSAD, A. S. et al. The Role of Monocytes in Angiogenesis and Atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 63, n. 1, p. 1–11, jan. 2014.
- JALURIA, P. et al. A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses. **Microbial Cell Factories**, v. 6, n. 1, p. 4, 2007.
- KALAIČ, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: a review for the period 2005-mid 2013. **Food Chemistry**, v. 161, p. 27–39, 15 out. 2014.
- KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. **Annual Review of Immunology**, v. 18, n. 1, p. 621–663, abr. 2000.
- KARPIŃSKI*, M. O. AND T. M. **Extracts and Flavonoids of Passiflora Species as Promising Anti-inflammatory and Antioxidant Substances**. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/182304/article>>. Acesso em: 19 out. 2020.
- KASHANI, B. et al. You are what you eat: Sequence analysis reveals how plant microRNAs may regulate the human genome. **Computers in Biology and Medicine**, v. 106, p. 106–113, mar. 2019.
- KENNEDY, D. O. et al. Acute effects of a wild green-oat (*Avena sativa*) extract on cognitive function in middle-aged adults: A double-blind, placebo-controlled, within-subjects trial. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 135–151, 7 fev. 2017.
- KLÖTING, N.; BLÜHER, M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 15, n. 4, p. 277–287, dez. 2014.
- KOOLHAAS, C. M. et al. Impact of physical activity on the association of overweight and obesity with cardiovascular disease: The Rotterdam Study. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 24, n. 9, p. 934–941, jun. 2017.
- KU, S.-K.; KWAK, S.; BAE, J.-S. Orientin Inhibits High Glucose-Induced Vascular Inflammation In Vitro and In Vivo. **Inflammation**, v. 37, n. 6, p. 2164–2173, dez. 2014.
- KUBO, T. et al. An Industry-Based Cohort Study of the Association Between Weight Gain and Hypertension Risk Among Rotating Shift Workers: **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 55, n. 9, p. 1041–1045, set. 2013.
- KURIYAMA, S. et al. Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 2, p. 355–361, 1 fev. 2006.
- KUROTANI, K. et al. Quality of diet and mortality among Japanese men and women: Japan Public Health Center based prospective study. **BMJ**, p. i1209, 22 mar. 2016.
- LAFAY, S. et al. Chlorogenic Acid Is Absorbed in Its Intact Form in the Stomach of Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 5, p. 1192–1197, 1 maio 2006.
- LEE, S. P. et al. The Effect of Emotional Stress and Depression on the Prevalence of Digestive Diseases. **Journal of Neurogastroenterology and Motility**, v. 21, n. 2, p. 273–282, 3 abr. 2015.
- LEE, W.; KU, S.-K.; BAE, J.-S. Vascular barrier protective effects of orientin and isoorientin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. **Vascular Pharmacology**, v. 62, n. 1, p. 3–14, jul. 2014.
- LI, L. et al. LCAT-null mice develop improved hepatic insulin sensitivity through altered regulation of transcription factors and suppressors of cytokine signaling. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 293, n. 2, p. E587–E594, ago. 2007.
- LIN, C.-M. et al. Isovitexin suppresses lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide

- synthase through inhibition of NF-kappa B in mouse macrophages. **Planta Medica**, v. 71, n. 8, p. 748–753, ago. 2005.
- LIN, P.-P. et al. Inhibition of cardiac hypertrophy by probiotic-fermented purple sweet potato yogurt in spontaneously hypertensive rat hearts. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, n. 6, p. 1365–1375, dez. 2012.
- LIN, Y. et al. The Lipopolysaccharide-activated Toll-like Receptor (TLR)-4 Induces Synthesis of the Closely Related Receptor TLR-2 in Adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 32, p. 24255–24263, 11 ago. 2000.
- LIU, C. et al. The flavonoid cyanidin blocks binding of the cytokine interleukin-17A to the IL-17RA subunit to alleviate inflammation in vivo. **Science Signaling**, v. 10, n. 467, p. eaaf8823, 21 fev. 2017.
- LODHI, S. et al. Protective effects of luteolin on injury induced inflammation through reduction of tissue uric acid and pro-inflammatory cytokines in rats. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 10, n. 1, p. 60–69, jan. 2020.
- LV, H. et al. Isovitexin Exerts Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Activities on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Inhibiting MAPK and NF- κ B and Activating HO-1/Nrf2 Pathways. **International Journal of Biological Sciences**, v. 12, n. 1, p. 72–86, 2016.
- LV, H. et al. Daphnetin-mediated Nrf2 antioxidant signaling pathways ameliorate tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced mitochondrial dysfunction and cell death. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 106, p. 38–52, 2017.
- MAMMA, D.; HATZINIKOLAOU, D. G.; CHRISTAKOPOULOS, P. Biochemical and catalytic properties of two intracellular β -glucosidases from the fungus *Penicillium decumbens* active on flavonoid glucosides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, n. 4, p. 183–190, 1 mar. 2004.
- MANACH, C. et al. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 235–242, fev. 2003.
- MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 230S-242S, 2005.
- MANACH, C. et al. Polyphénols: consommation et biodisponibilité des polyphénols. In: **Les polyphénols en agroalimentaire**. Paris: Lavoisiers, 2006.
- MANACH, C.; DONOVAN, J. L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. **Free Radical Research**, v. 38, n. 8, p. 771–785, 1 ago. 2004.
- MANDAL, P. et al. Simultaneous Determination and Quantitation of Diosmetin and Hesperetin in Human Plasma by Liquid Chromatographic Mass Spectrometry With an Application to Pharmacokinetic Studies. **Journal of Chromatographic Science**, v. 57, n. 5, p. 451–461, 1 maio 2019.
- MAPBIOMAS, B. **Mapbiomas Brasil**. Disponível em: <<https://mapbiomas.org/download>>. Acesso em: 18 out. 2020.
- MARIKO, N.; HASSIMOTTO, A.; LAJOLO, F. M. Brazilian Native Fruits as a Source of Phenolic Compounds. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. et al. (Eds.). **Global Food Security and Wellness**. New York, NY: Springer New York, 2017. p. 105–124.
- MARRIS, E. The forgotten ecosystem. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 944–945, out. 2005.
- MARZOCHELLA, L. et al. Dietary Flavonoids: Molecular Mechanisms of Action as Anti-Inflammatory Agents. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 5, n. 3, p. 200–220, 1 set. 2011.

- MASAKI, M. et al. Role of Meltrin α (ADAM12) in Obesity Induced by High- Fat Diet. **Endocrinology**, v. 146, n. 4, p. 1752–1763, abr. 2005.
- MCALPINE, C. S.; SWIRSKI, F. K. Circadian Influence on Metabolism and Inflammation in Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 119, n. 1, p. 131–141, 24 jun. 2016.
- MCDONALD, K. C.; SAUNDERS, K. E.; GEDDES, J. R. Sleep problems and suicide associated with mood instability in the Adult Psychiatric Morbidity Survey, 2007. **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 51, n. 8, p. 822–828, ago. 2017.
- MELAKU, Y. A. et al. Burden and trend of diet-related non-communicable diseases in Australia and comparison with 34 OECD countries, 1990–2015: findings from the Global Burden of Disease Study 2015. **European Journal of Nutrition**, 7 mar. 2018.
- MILENKOVIC, D. et al. Hesperidin Displays Relevant Role in the Nutrigenomic Effect of Orange Juice on Blood Leukocytes in Human Volunteers: A Randomized Controlled Cross-Over Study. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e26669, 16 nov. 2011.
- MILENKOVIC, D. et al. A systems biology network analysis of nutri(epi)genomic changes in endothelial cells exposed to epicatechin metabolites. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, dez. 2018.
- MILENKOVIC, D.; JUDE, B.; MORAND, C. miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 64, p. 40–51, set. 2013.
- MILLER, G. E. et al. A Functional Genomic Fingerprint of Chronic Stress in Humans: Blunted Glucocorticoid and Increased NF- κ B Signaling. **Biological Psychiatry**, v. 64, n. 4, p. 266–272, ago. 2008.
- MIOSSEC, P.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Interleukin-17 and Type 17 Helper T Cells. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 9, p. 888–898, 27 ago. 2009.
- MONFOULET, L.-E. et al. Curcumin modulates endothelial permeability and monocyte transendothelial migration by affecting endothelial cell dynamics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 112, p. 109–120, nov. 2017.
- MORAIS, D. R. et al. Antioxidant activity, phenolics and UPLC–ESI(–)–MS of extracts from different tropical fruits parts and processed peels. **Food Research International**, v. 77, p. 392–399, nov. 2015.
- MORAND, C. et al. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. **Free Radical Research**, v. 33, n. 5, p. 667–676, nov. 2000.
- MORAND, C. et al. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 1, p. 73–80, 1 jan. 2011.
- MORAND, C. Biodisponibilité et métabolisme des phytomicronutriments. In: **Les phytomicronutriments**. [s.l.] Lavoisiers, 2012. p. 49–65.
- MORRIS, C. J. et al. Circadian Misalignment Increases C-Reactive Protein and Blood Pressure in Chronic Shift Workers. **Journal of Biological Rhythms**, v. 32, n. 2, p. 154–164, abr. 2017.
- MOZHUI, K. et al. Strain Differences in Stress Responsivity Are Associated with Divergent Amygdala Gene Expression and Glutamate-Mediated Neuronal Excitability. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 15, p. 5357–5367, 14 abr. 2010.
- MUHAMMAD, T. et al. Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF- κ B Signaling. **Nutrients**, v. 11, n. 3, p. 648, 17 mar. 2019.
- MULLEN, W. et al. Bioavailability and Metabolism of Orange Juice Flavanones in Humans: Impact of a Full-Fat Yogurt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 23, p.

11157–11164, 10 dez. 2008.

MUÑOZ-ESPARZA, N. C. et al. Polyamines in Food. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, 11 jul. 2019.

NABAVI, S. F. et al. Neuroprotective effects of chrysin: From chemistry to medicine. **Neurochemistry International**, v. 90, p. 224–231, nov. 2015.

NAGAI, S. et al. Suppression of Fatty Acid and Triglyceride Synthesis by the Flavonoid Orientin through Decrease of C/EBP δ Expression and Inhibition of PI3K/Akt-FOXO1 Signaling in Adipocytes. **Nutrients**, v. 10, n. 2, p. 130, 26 jan. 2018.

NAGAPRASHANTHA, L. D. et al. Anti-cancer effects of novel flavonoid vicienin-2 as a single agent and in synergistic combination with docetaxel in prostate cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 9, p. 1100–1109, nov. 2011.

NAM, T. G. et al. Comparison of Anti-Inflammatory Effects of Flavonoid-Rich Common and Tartary Buckwheat Sprout Extracts in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 and Peritoneal Macrophages. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–12, 2017.

NEEHA, V. S.; KINTH, P. Nutrigenomics research: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 3, p. 415–428, jun. 2013.

NEWSHOLME, E.; DIMITRIADIS, G. Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 109, n. Suppl 2, p. S122–S134, 23 nov. 2001.

NYAMBE-SILAVWE, H.; WILLIAMSON, G. Polyphenol- and fibre-rich dried fruits with green tea attenuate starch-derived postprandial blood glucose and insulin: a randomised, controlled, single-blind, cross-over intervention. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 3, p. 443–450, 14 ago. 2016.

ODEGAARD, J. I.; CHAWLA, A. Pleiotropic Actions of Insulin Resistance and Inflammation in Metabolic Homeostasis. **Science**, v. 339, n. 6116, p. 172–177, 11 jan. 2013.

OYAMA, I. et al. Retrospective cohort study of the risk of impaired glucose tolerance among shift workers. **Scandinavian Journal of Work, Environment & Health**, v. 38, n. 4, p. 337–342, jul. 2012.

PANG, L. et al. Apigenin attenuates PM2.5-induced airway hyperresponsiveness and inflammation by down-regulating NF- κ B in murine model of asthma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 12, n. 10, p. 3700–3709, 2019.

PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133–1141, 1 nov. 2005.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 8, p. 617–629, ago. 2004.

PARK-WINDHOL, C.; D'AMORE, P. A. Disorders of Vascular Permeability. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 11, n. 1, p. 251–281, 23 maio 2016.

PELUSO, I. et al. High Fat Meal Increase of IL-17 is Prevented by Ingestion of Fruit Juice Drink in Healthy Overweight Subjects. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 1, p. 85–90, 1 jan. 2012.

PEREIRA, C. A. et al. Bonus Effects of Antidiabetic Drugs: Possible Beneficial Effects on Endothelial Dysfunction, Vascular Inflammation and Atherosclerosis. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 123, n. 5, p. 523–538, nov. 2018.

PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 1, p. 49–62, jan. 2007.

PETRILLI, A. et al. Effect of Chocolate and Yerba Mate Phenolic Compounds on Inflammatory and Oxidative Biomarkers in HIV/AIDS Individuals. **Nutrients**, v. 8, n. 5, p. 132, 23

maio 2016.

POQUET, L.; CLIFFORD, M. N.; WILLIAMSON, G. Effect of dihydrocaffeic acid on UV irradiation of human keratinocyte HaCaT cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 196–204, ago. 2008.

RADER, D. J.; HOVINGH, G. K. HDL and cardiovascular disease. **The Lancet**, v. 384, n. 9943, p. 618–625, ago. 2014.

RAMOS-LOPEZ, O. et al. Circadian gene methylation profiles are associated with obesity, metabolic disturbances and carbohydrate intake. **Chronobiology International**, v. 35, n. 7, p. 969–981, 3 jul. 2018.

RATHEE, P. et al. Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 229–235, 1 jul. 2009.

RECHNER, A. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 2, p. 212–225, 15 jan. 2004.

REDE CERRADO. **Rede Cerrado**. Disponível em: <<https://redecerrado.org.br>>. Acesso em: 18 out. 2020.

REICHE, E. M. V.; NUNES, S. O. V.; MORIMOTO, H. K. Stress, depression, the immune system, and cancer. **The Lancet Oncology**, v. 5, n. 10, p. 617–625, out. 2004.

REIN, M. J. et al. Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bio-efficacy: Bioavailability of bioactive food compounds. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 3, p. 588–602, mar. 2013.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. **Fitofisionomias do bioma cerrado. - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/554094/fitofisionomias-do-bioma-cerrado>>. Acesso em: 3 nov. 2020.

RIST, M. J.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Nutrition and food science go genomic. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 172–178, abr. 2006.

ROESLER, R.; LORENCINI, M.; PASTORE, G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 814–821, set. 2010.

RYAN, J. et al. Involvement of GPR50 polymorphisms in depression: independent replication in a prospective elderly cohort. **Brain and Behavior**, v. 5, n. 3, p. n/a-n/a, mar. 2015.

SANCHEZ-RODRIGUEZ, E. et al. Effects of Virgin Olive Oils Differing in Their Bioactive Compound Contents on Metabolic Syndrome and Endothelial Functional Risk Biomarkers in Healthy Adults: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. **Nutrients**, v. 10, n. 5, p. 626, 16 maio 2018.

SANTANA, F. C. DE. **Evaluation of bioactive compounds present in Passiflora spp. seed and its influence on oxidative stress and inflammation in a high fat-fed mice**. Thesis (Doctorate)—São Paulo: University of São Paulo, 2015.

SERGENT, T. et al. Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an in vitro model of inflamed human intestinal epithelium. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, n. 3, p. 659–667, dez. 2010.

SHAL, B. et al. Anti-neuroinflammatory Potential of Natural Products in Attenuation of Alzheimer's Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 548, 29 maio 2018.

SHI, H. et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 11, p. 3015–3025, 1 nov. 2006.

SHIN, S.-K. et al. Phlorizin Supplementation Attenuates Obesity, Inflammation, and Hyperglycemia in Diet-Induced Obese Mice Fed a High-Fat Diet. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 92, 16 fev. 2016.

- SINGLETON, V.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. v. 16, n. 3, p. 144–158, 1965.
- SIQUEIRA, E. M. DE A. et al. Brazilian Savanna Fruits Contain Higher Bioactive Compounds Content and Higher Antioxidant Activity Relative to the Conventional Red Delicious Apple. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72826, 21 ago. 2013.
- SOULIMANI, R. et al. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 57, n. 1, p. 11–20, jun. 1997.
- SOUZA, J. E. DE; CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Biodisponibilidade de compostos fenólicos: um importante desafio para o desenvolvimento de fármacos? **Revista Fitos**, v. 9, n. 1, 2015.
- SPENCER, J. P. E.; CROZIER, A. (EDS.). **Flavonoids and related compounds**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2016.
- STALMACH, A. et al. Bioavailability of C-Linked Dihydrochalcone and Flavanone Glucosides in Humans Following Ingestion of Unfermented and Fermented Rooibos Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 15, p. 7104–7111, 12 ago. 2009.
- SUGANAMI, T. et al. Role of the Toll-like Receptor 4/NF- κ B Pathway in Saturated Fatty Acid-Induced Inflammatory Changes in the Interaction Between Adipocytes and Macrophages. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 1, p. 84–91, jan. 2007.
- SUN, Y. et al. An updated role of microRNA-124 in central nervous system disorders: a review. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, 20 maio 2015.
- SUNG, Y. J. et al. Genome-wide association studies suggest sex-specific loci associated with abdominal and visceral fat. **International Journal of Obesity**, v. 40, n. 4, p. 662–674, abr. 2016.
- SWEE, M. et al. Matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) controls neutrophil egress by generating chemokine gradients. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 6, p. 1404–1412, 19 mar. 2008.
- ŚWIDERSKA, E. et al. Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. In: SZABLEWSKI, L. (Ed.). **Blood Glucose Levels**. [s.l.] IntechOpen, 2020.
- TAN, E.; SCOTT, E. M. Circadian rhythms, insulin action, and glucose homeostasis: **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 17, n. 4, p. 343–348, jul. 2014.
- THOMAS, E. Manly, Bryan F. J.: **Multivariate Statistical Methods: A Primer**. Chapman and Hall, London – New York 1986, 159 S. ISBN 0-412-28610-6, ISBN 0-412-28620-3 (Paperback-Ausgabe). **Biometrical Journal**, v. 30, n. 7, p. 159, 1988.
- TODA, K. et al. Passionflower Extract Induces High-amplitude Rhythms without Phase Shifts in the Expression of Several Circadian Clock Genes in Vitro and in Vivo. **International journal of biomedical science: IJBS**, v. 13, n. 2, p. 84–92, jun. 2017.
- TOMÁS-NAVARRO, M.; VALLEJO, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Chapter 40 - Bioavailability and Metabolism of Citrus Fruit Beverage Flavanones in Humans. In: WATSON, R. R.; PREEDY, V. R.; ZIBADI, S. (Eds.). **Polyphenols in Human Health and Disease**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 537–551.
- TURATI, F. et al. Fruit and vegetables and cancer risk: a review of southern European studies. **British Journal of Nutrition**, v. 113, n. S2, p. S102–S110, abr. 2015.
- TURNER-MCGRIEVY, G. M. et al. Randomization to plant-based dietary approaches leads to larger short-term improvements in Dietary Inflammatory Index scores and macronutrient intake compared with diets that contain meat. **Nutrition Research**, v. 35, n. 2, p. 97–106, fev. 2015.

- UNEMORI, E. N. et al. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 153, n. 3, p. 557–562, dez. 1992.
- VAN ERK, M. J. et al. High-protein and high-carbohydrate breakfasts differentially change the transcriptome of human blood cells. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 5, p. 1233–1241, 1 nov. 2006.
- VAUZOUR, D. et al. Inhibition of PP2A by hesperetin may contribute to Akt and ERK1/2 activation status in cortical neurons. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 650, p. 14–21, 15 2018.
- VEGA-CÁRDENAS, M. et al. Increased levels of adipose tissue-resident Th17 cells in obesity associated with miR-326. **Immunology Letters**, v. 211, p. 60–67, jul. 2019.
- VELDERRAIN-RODRÍGUEZ, G. R. et al. Phenolic compounds: their journey after intake. **Food Funct.**, v. 5, n. 2, p. 189–197, 2014.
- VIAN, I. et al. Development and validation of a food frequency questionnaire for consumption of polyphenol-rich foods in pregnant women: Food frequency questionnaire in pregnant. **Maternal & Child Nutrition**, v. 11, n. 4, p. 511–524, out. 2015.
- VIEIRA, G. P. **Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de Passifloras spp.** Mestrado em Bromatologia—São Paulo: Universidade de São Paulo, 10 mar. 2014.
- WANG, C. et al. Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their antidepressant-like effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, n. 3, p. 812–817, jul. 2013.
- WANG, X. et al. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. **BMJ**, v. 349, n. jul29 3, p. g4490–g4490, 29 jul. 2014.
- WEBER, C.; FRAEMOHS, L.; DEJANA, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 6, p. 467–477, jun. 2007.
- WEI, W. et al. Effects of vitexin-2"- *O* -rhamnoside and vitexin-4"- *O* -glucoside on growth and oxidative stress-induced cell apoptosis of human adipose-derived stem cells: Oxidative stress-induced cell apoptosis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 7, p. 988–997, jul. 2014.
- WHO, W. H. O. **Neurological disorders: public health challenges**. Geneva: World Health Organization, 2006.
- WHO, W. H. O. **Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates**. Geneva: [s.n.].
- WHO, W. H. O. **Noncommunicable diseases**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>>. Acesso em: 16 set. 2018.
- WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 243S-255S, 1 jan. 2005.
- WINDISH, D. M.; DIENER-WEST, M. A clinician-educator's roadmap to choosing and interpreting statistical tests. **Journal of General Internal Medicine**, v. 21, n. 6, p. 656–660, jun. 2006.
- WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. **Plant Physiology**, v. 126, n. 2, p. 485–493, 1 jun. 2001.
- WOHLEB, E. S. et al. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, 21 jan. 2015.

- WOO, K. J. et al. Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 325, n. 4, p. 1215–1222, dez. 2004.
- XIAO, Q. et al. Orientin Ameliorates LPS-Induced Inflammatory Responses through the Inhibitory of the NF- κ B Pathway and NLRP3 Inflammasome. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–8, 2017.
- XIAO, Q. et al. Orientin-mediated Nrf2/HO-1 signal alleviates H₂O₂-induced oxidative damage via induction of JNK and PI3K/AKT activation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 747–755, out. 2018.
- XIAO, Z. et al. Resveratrol attenuates renal injury and fibrosis by inhibiting transforming growth factor- β pathway on matrix metalloproteinase 7. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 2, p. 140–146, jan. 2016.
- XINYUE, Z. et al. Efficacy of Ciji Hua'ai Baosheng formula on the expressions of vascular endothelial growth factor, kinase insert domain-containing receptor and basic fibroblast growth factor in mouse models of H 22 hepatocellular carcinoma. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 37, n. 1, p. 88–95, fev. 2017.
- XU, Y. et al. CREB1 functional polymorphisms modulating promoter transcriptional activity are associated with type 2 diabetes mellitus risk in Chinese population. **Gene**, v. 665, p. 133–140, jul. 2018.
- YAMAGISHI, M. et al. Two R2R3-MYB genes, homologs of Petunia AN2, regulate anthocyanin biosyntheses in flower Tepals, tepal spots and leaves of asiatic hybrid lily. **Plant & Cell Physiology**, v. 51, n. 3, p. 463–474, mar. 2010.
- YAMAMOTO, M. et al. Endothelial Adora2a activation promotes blood-brain barrier breakdown and cognitive impairment in mice with diet-induced insulin resistance. **The Journal of Neuroscience**, p. 2506–18, 18 mar. 2019.
- YANG, S.-H. et al. The Novel p53-Dependent Metastatic and Apoptotic Pathway Induced by Vitexin in Human Oral Cancer OC2 Cells: p53-DEPENDENT METASTATIC AND APOPTOTIC PATHWAYS INDUCED BY VITEXIN. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1154–1161, ago. 2013.
- YANG, Y. et al. Calmodulin kinase II inhibition protects against myocardial cell apoptosis in vivo. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 6, p. H3065–H3075, dez. 2006.
- YASUDA, M. et al. Inhibitory effects of polyphenols from water chestnut (*Trapa japonica*) husk on glycolytic enzymes and postprandial blood glucose elevation in mice. **Food Chemistry**, v. 165, p. 42–49, dez. 2014.
- YE, C.; BRAND, D.; ZHENG, S. G. Targeting IL-2: an unexpected effect in treating immunological diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 3, n. 1, p. 2, dez. 2018.
- YU, L. et al. Orientin alleviates cognitive deficits and oxidative stress in A β 1–42-induced mouse model of Alzheimer's disease. **Life Sciences**, v. 121, p. 104–109, jan. 2015.
- ZEGGINI, E. et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. **Nature Genetics**, v. 40, n. 5, p. 638–645, maio 2008.
- ZHANG, J. et al. IL-36 induces cytokine IL-6 and chemokine CXCL8 expression in human lung tissue cells: Implications for pulmonary inflammatory responses. **Cytokine**, v. 99, p. 114–123, nov. 2017.
- ZHANG, J. et al. Apigenin Protects Against Renal Tubular Epithelial Cell Injury and Oxidative Stress by High Glucose via Regulation of NF-E2-Related Factor 2 (Nrf2) Pathway. **Med-**

ical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, v. 25, p. 5280–5288, 16 jul. 2019.

ZHANG, T. et al. The δ_c Isoform of CaMKII Is Activated in Cardiac Hypertrophy and Induces Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 912–919, 2 maio 2003.

ZHANG, X. et al. Sp1 Plays an Important Role in Vascular Calcification Both In Vivo and In Vitro. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 6, 20 mar. 2018.

ZHANG, X.; YOU, L.; XIAO, K. Novel Omics Technologies in Food Nutrition. In: BAGCHI, D.; SWAROOP, A.; BAGCHI, M. (Eds.). . **Genomics, Proteomics and Metabolomics in Nutraceuticals and Functional Foods**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. p. 1–13.

ZHAO, C.-N. et al. Fruits for Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 598, 13 jun. 2017.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 1, p. 133–145, mar. 2010.

ZHENG, S. G.; WANG, J.; HORWITZ, D. A. Cutting Edge: Foxp3⁺ CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Induced by IL-2 and TGF- β Are Resistant to Th17 Conversion by IL-6. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7112–7116, 1 jun. 2008.

ZUBENKO, G. S. et al. Differential hippocampal gene expression and pathway analysis in an etiology-based mouse model of major depressive disorder. **American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 165, n. 6, p. 457–466, set. 2014.

ZUCOLOTTO, S. et al. Bioassay-Guided Isolation of Anti-Inflammatory C -Glucosylflavones from *Passiflora edulis*. **Planta Medica**, v. 75, n. 11, p. 1221–1226, set. 2009.

APÊNDICE

Artigo “Acute Effects of the Consumption of *Passiflora setacea* Juice on Metabolic Risk Factors and Gene Expression Profile in Humans” publicado na revista *Nutrients*, 16 de Abril de 2020. *Nutrients* 2020, 12(4), 1104; <https://doi.org/10.3390/nu12041104>

Abstract: Background: *Passiflora setacea* (PS) is a passionfruit variety of the Brazilian savannah and is a rich source of plant food bioactives with potential anti-inflammatory activity. This study aimed to investigate the effect of an acute intake of PS juice upon inflammation, metabolic parameters, and gene expression on circulating immune cells in humans. Methods: Overweight male volunteers ($n = 12$) were enrolled in two double-blind placebo-controlled studies. Blood samples were collected from fasting volunteers 3 hours after the consumption of 250 mL of PS juice or placebo (PB). Metabolic parameters (insulin, glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), and total triglycerides) and circulating cytokines were evaluated (study 1). Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from the same subjects were isolated and RNA was extracted for transcriptomic analyses using microarrays (study 2). Results: Insulin and homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR) levels decreased statistically after the PS juice intake, whereas HDL level increased significantly. Interleukin (IL)-17A level increased after placebo consumption, whereas its level remained unchanged after PS juice consumption. Nutrigenomic analyses revealed 1327 differentially expressed genes after PS consumption, with modulated genes involved in processes such as inflammation, cell adhesion, or cytokine–cytokine receptor. Conclusion: Taken together, these clinical results support the hypothesis that PS consumption may help the prevention of cardiometabolic diseases.

Keywords: *Passiflora setacea*; bioactive compounds; phenolic compounds; cardiovascular diseases; nutrigenomics; gene expression; immune system; cytokines; insulin; HDL

1. Introduction

According to the World Health Organization (WHO), noncommunicable diseases (NCDs) are responsible for 71% of deaths worldwide, leading to the death of 15 million people aged between 30 and 69 years old. The most prevalent diseases are cardiovascular diseases, followed by cancers, respiratory diseases, and diabetes [1]. At the same time, the total number of people suffering from depression or other common mental disorders such as anxiety was estimated as exceeding 300 million people in 2015. These disorders are the biggest contributors to global disability and represent an important cost burden [2]. Therefore, stressful lifestyle markers such as emotional stress, an unhealthy diet (high in sugar, sodium, red meat, and trans fatty acids, but low intake of fruits and vegetables), overweight [3], and poor physical activity [4] increase the incidence of cardiovascular diseases (CVD) and NCDs. These lifestyle risk factors promote high blood pressure, hyperglycemia, hyperinsulinemia, hypertension, hyperlipidemia [1,5], obesity [1], high inflammatory cytokine production [6], and pro-atherogenic gene profile [7], and are associated with chronic low-grade inflammation and vascular inflammation [8].

A higher intake of fruit and vegetables is associated with a lower risk of all causes of mortality, particularly inflammation-related diseases [9]. Plant-based foods are sources of a variety of bioactive compounds (BC) such as terpenoids (carotenoids, essential oil components, phytosterols), polyphenols

(flavonoids and non-flavonoids compounds) [10], sulfur compounds (glucosinolates and ally sulfonates), alkaloids [11], and polyamines [12], whose level of total intake is connected with the protection from chronic diseases, including cardiovascular diseases, cancers, and neurodegenerative diseases [11,12]. Several beneficial effects have been related to the consumption of these compounds such as antioxidant and anti-inflammatory activities [12,13]. These beneficial effects derive from the reported capacity of some BC to modulate cell signaling and consequently the expression of key genes [14]. The species of *Passiflora* genus have been studied due to their sedative, anxiolytic, anti-inflammatory, antioxidant, and anti-carcinogenic effects [15,16]. *Passiflora setacea* D.C (PS) is a wild passionfruit species of the Brazilian savannah, popularly known as “maracujá do sono” (“sleep passionfruit”). The consumption of these fruits has been traditionally associated with sleep modulation [17]. PS pulp and seeds have recently been identified as rich in BC, particularly in C-glycosides of flavonoids [18], and also homoorientin, vitexin, isovitexin, and orientin at higher contents than those found in *Passiflora edulis*, açai (*Eurydema oleracea*), and orange juice [19]. They have also revealed antioxidant and antimicrobial properties in vitro [20,21]. These effects are potentially due to the presence of vitamin E and BC such as terpenoids, polyamines, and polyphenols, especially orientin, isoorientin, vitexin, and isovitexin [17–19,21]. These compounds have been reported to exert antioxidant, anti-inflammatory, vascular, neuroprotective, anxiolytic, and antidepressant-like effects [22–26]. Plant-based diets are recognized for their beneficial effects on the modulation of intermediate risk factors for inflammation-based disorders [27,28], and fruits constitute major contributors to these effects [29]. However, clinical studies focusing on the health properties of fruits of the Brazilian savannah, as well as on the potential underlying molecular mechanisms, including the modulation of expression of genes in humans, remain scarce. Therefore, the aim of our study was to evaluate the effect of acute consumption of PS pulp on metabolic and inflammatory biomarkers in overweight male volunteers, as well as to assess the impact on global gene expression profile in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) by using microarray analyses.

2. Materials and Methods

2.1. Processing and Characteristics of *Passiflora setacea* Juice

The fruit used in this study was the PS, the BRS *Pérola do Cerrado* (BRS Pearl of the Brazilian savannah), which is cultivated at the experimental field of Embrapa Cerrados, Brasilia, Brazil, affiliated with the Brazilian Ministry of Agriculture. This study is part of a larger program called the Passitec Network, developed to improve fruit size and production. PS plants were cultivated in a vertical espalier system and the ripe fruits were harvested at their full maturity level during the rainy season, corresponding to the stage where the phenolics compounds were in their highest concentrations [19].

The pulps used in this experiment were prepared all at once and were aliquoted, thus allowing us to use the same batch of pulp throughout the study. The pulps were removed from the fruits and blended for 30 s to separate the seeds from the pulps by sieving. After that, they were aliquoted into portions of 150 g and placed into plastic bags, hermetically sealed, and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. The batch of pulp used in this study contained 2.75 g/100 g in fresh weight (FW) of carbohydrates, 10.1 mg/100 g FW of vitamin C, 55.4 mg/100 g of proanthocyanidins, 86 mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g FW of total phenolics, and 3.02 mg quercetine equivalents (QE)/100 g FW of total flavonoids in which we have results for the four main flavone C-glycosides (1.07 mg/g dry weight (DW) of orientin, 0.99 mg/g DW of isoorientin, 0.84 mg/g DW of vitexin, 1.13 mg/g DW of isovitexin) and for the flavanone glycoside (0.14 mg g⁻¹ FW of hesperetin equivalent) [19]. The isocaloric placebo drink (PB) was obtained by mixing 100 mL of a passionfruit-flavored isotonic drink of the brand Gatorade with 150 mL of water to achieve the same final volume and sugar content of the PS juice (List S1).

2.2. Subjects and Study Design

Male volunteers ($n = 12$) were recruited by interviews after advertisements were published in the media (newspaper, website, etc.) from February to June 2015. Men, ranging from 40 to 64 years old, who were overweight or slightly obese (based on body mass index (BMI) between 25 and 31 kg/m² or waist circumference >94 cm), non-smokers, and engaged in a low to moderate level (<5 h/week) of physical activity were eligible for inclusion. The exclusion criteria included a medical history of cancer or severe metabolic diseases, special dietary habits (e.g., vegetarians and vegans), use of dietary supplementation 2 months prior to the experiment (vitamin C, multivitamin, antioxidant capsules, etc.), chronic medication (anti-hypertensives, anti-hyperglycemic, anti-cholesterol, anti-depressants, anxiolytics, etc.), acute treatments 15 days prior to the experiment (anti-inflammatory drugs, antibiotics, etc.), and acute treatments 2 days prior to the experiment (inflammatory pain relievers such as aspirin, acetaminophen, etc.). A physical evaluation was performed to obtain measurements of weight, BMI, waist circumference, and percentage of body weight by applying the seven skinfold sites Jackson–Pollock method [30].

The study was performed in two phases. In both phases, the volunteers were asked to consume a “white meal”, which is a meal without foods rich in BC (vegetables, fruits, cocoa, and plant-based drinks) the day before the experiment (Table S1). Seventy-two hours before the experiment, volunteers were asked not to consume alcohol or perform any kind of intense physical activity such as cycling and running. Study phase 1 aimed to set a controlled environment in which all volunteers would be offered the same food menu at the same time. For this, the volunteers ($n = 12$) were hosted for 2 days in a hotel. At day 1, blood samples were collected at fasting (T0) and 3 hours after (T3) the consumption of 250 mL of placebo drink (PB). Similarly, on day 2, blood samples were collected at fasting and 3 hours after the consumption of 250 mL of PS juice. Blood sampling and further biochemical analyses were performed by the Sabin clinical analysis laboratory, Brasilia. The results of the data obtained in study phase 1 are reported in Sections 3.2 and 3.3.

After the first intervention, the study phase 2 aimed to investigate the effect of the consumption of PS juice on gene expression in the volunteers. The same volunteers were asked to consume the same “white meal” as in study phase 1 (Table S1). The volunteers were invited to participate in a randomized crossover trial in which they had to acutely consume the same two beverages (250 mL PB or PS) in an interval of a 10-day washout period for the nutrigenomic study. This phase was performed at the Laboratory of Cellular Immunology, Faculty of Medicine, University of Brasilia, Brasilia. The results of the data obtained in study phase 2 are reported in Sections 3.4–3.6. For each experimental period, the fasting volunteers consumed either 250 mL of placebo drink (PB) or of *P. setacea* (PS) at the moment of their arrival in the morning, and blood samples were collected 3 hours later.

This study was performed with the approval of the National Health Research Ethics Committee (CONEP, Brasilia, Brazil), protocol number 36348114.3.0000.0030, and all the volunteers provided their written informed consent. Description of the study can be found on ensaiosclinicos.gov.br RBR-84z83n.

2.3. Blood Sampling and Treatment

From the blood sampled in study phase 1, serum and plasma fractions were prepared to quantify metabolic markers (including glucose, insulin, homeostasis model assessment of β -cell function (HOMA-BETA), homeostatic model assessment for insulin resistance (HOMA-IR), total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoproteins (LDL) and total triglycerides) and cytokines. The collection of biological samples and the biochemical analysis were conducted by Sabin laboratory on the same day. Blood sampling was also collected in heparin tubes and stored at -80°C for the later quantification of cytokines. In study phase 2 (Laboratory of Cellular Immunology), blood samples were collected in heparin tubes for further nutrigenomics analysis on isolated PBMC. A total of 8 mL of venous blood was collected from volunteers using BD Vacutainer tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), and PBMCs were isolated. Briefly, the tubes were immediately centrifuged at room temperature for 20 min at $1500 \times g$. After centrifugation, the cell layer containing PBMCs was collected and washed twice with sterile phosphate-buffered saline (PBS) with centrifugation at $300 \times g$ for 10 min after each washing step. The cell pellet obtained was immediately frozen at -80°C and kept at this temperature until use.

2.4. Biochemical Parameters and Cytokines Analysis

The biochemical analyzes were conducted by Sabin Laboratory, Brasilia. To evaluate glucose, the hexokinase method was used; as for insulin, the insulin chemiluminescent immunoassay was applied, then HOMA BETA and HOMA IR were calculated. Total cholesterol was verified by means of the Al-lain's method of esterase/oxidase [31], HDL by using the direct method, LDL through the Martin-Hopkins's calculation, and total triglycerides by means of the oxidase/peroxidase method.

To quantify the circulating cytokines, serum samples were used to measure interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor (TNF), interferon- γ (INF- γ), and interleukin-17 (IL-17) protein levels by using the CBA Human T-cell TH1/TH2/TH17 Cytokine kit (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). This method used bead array technology to simultaneously detect multiple cytokine proteins in the samples by flow cytometry. All the analyses were executed according to the manufacturer's guidelines. Shortly, cytokine capture beads were mixed with the plasma samples and incubated with phycoerythrin (PE)-conjugated detection antibodies to form sandwich complexes. The FCAP Array software was used to generate results in graphical and tubular format.

2.5. Total RNA Extraction

Total RNA extraction from PBMC was performed by using RNeasy Mini Kit, as recommended by the manufacturer (Qiagen, Hilden, Germany). The RNA quality was checked by means of 1% agarose gel electrophoresis, whereas the quantity was checked through absorbencies at 260 and 280 nm on NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The RNA samples were stored at -80°C until use.

2.6. Microarray Analyses and Bioinformatic Analysis

Total RNA (50 ng per sample) was amplified and fluorescently labeled to produce Cy5 or Cy3 complementary RNA (cRNA) by using the Low Input Quick Amp Labeling Two-Color Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) in the presence of a two-color spike-in control, as recommended by the manufacturer. After purification, 825 ng of labeled cRNA was hybridized onto G4845A Human GE 4x44K v2 microarray (Agilent, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The G4845A Human GE 4x44K v2 microarray contains 27,958 Entrez Gene RNA sequences. After hybridization, an Agilent G2505 scanner (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used to scan microarrays. The hybridization

data were extracted by means of the Feature Extraction software version 11.0 and analyzed through the GeneSpring GX software version 14.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Data were normalized using 50th percentile shift and analyzed with moderated *t*-tests corrected by Westfall–Young permutation with corrected *p*-value cut-off set to 0.05. All transcripts presenting *p* < 0.05 were considered differently expressed.

2.7. Bioinformatic Analyzes

For biological interpretation of the differentially expressed genes, we first performed Gene Ontology (GO) analyses using DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.7). The GO results were grouped on the basis of their functionality by using the online REVIGO software. The partial least squares discriminant analysis (PLSDA) plot was obtained through MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>). Gene networks were built with a data-mining approach using the Metacore software, and gene pathway analyses of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and BioCarta databases were conducted by using the Genetrial2 online tool.

2.8. Statistical Analyses

The data obtained were previously analyzed for normality through D'Agostino's and Pearson's tests. The outlier values were calculated by means of the Tukey test and excluded from the analyses only when interfering with normality values. For two independent groups, paired Student's *t*-test was applied to samples that had a normal distribution, and for those without normal distribution, Wilcoxon's *t*-student test was applied. Descriptive values were expressed as mean \pm SD corrected. The differences between the variables compared were considered statistically significant when the bi-tailed probability of their occurrence due to chance (type I error) was less than 5% (*p* < 0.05). Analyses and graphs were performed by using the GraphPad Prism 7 software for Mac (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Volunteers' Baseline Characteristics

The baseline characteristics of the volunteers are summarized in Table 1. The subjects enrolled were men with a mean age of 48.66 ± 6.82 years that were overweight or slightly obese (BMI ranging from 25.00 to 30.80) with a mean waist circumference of 96.83 ± 6.49 cm. The subjects ranged from normal to slightly hyperglycemic (*n* = 1, 103 mg/dL), as well as from normal to mildly hyperlipidemic (*n* = 2), as shown by the values for plasma total triglycerides (Table 1). All the other parameters were within normal range. Two of the 12 volunteers presented three to four factors that may define them as having a metabolic syndrome (waist circumference ≥ 90 cm; serum triglycerides ≥ 150 mg/dL mmol/l; HDL cholesterol < 40 mg/dL; and fasting plasma glucose (FPG) ≥ 100 mg/dL). Statistical tests without these volunteers were therefore remade and the statistical significances did not change.

Table 1. Volunteers' baseline characteristics (*n* = 12).

Parameter	Mean \pm SD (Range)
Age, years	48.66 ± 6.82 (41–62)
BMI, kg/m ²	28.18 ± 2.08 (25.0–30.8)
Waist circumference, cm	96.83 ± 6.49 (88–112)
Fasting glucose, mg/dL	90.83 ± 5.54 (83–103)
Basal insulin, μ UI/mL	11.14 ± 3.58 (5.5–17.7)
HOMA IR	2.49 ± 0.77 (1.2–3.7)

HOMA BETA	152.8 ± 71.58 (73–304)
Triglycerides, mg/dL	116.58 ± 57.55 (49–218)
Total cholesterol, mg/dL	188.17 ± 33.40 (115–232)
HDL cholesterol, mg/dL	47.91 ± 10.67 (38–72)
LDL cholesterol, mg/dL	117.00 ± 27.09 (60–156)
Apolipoprotein A, mg/dL	133.67 ± 20.95 (107–172)
Apolipoprotein B, mg/dL	101.77 ± 24.80 (49–133)
Creatinin, mg/dL	0.97 ± 0.14 (0.7–1.2)
TGO, U/L	20.67 ± 2.87 (14–25)
TGP, U/L	25.41 ± 6.97 (11–35)

3.2. Effect of *Passiflora setacea* Juice on Glucose and Lipid Metabolism (Phase 1)

Glucose, insulin, HOMA IR, triglycerides and HDL in plasma were analyzed before (T0) and 3 hours after (T3) the intake of placebo and PS juice. The data show that insulin and HOMA IR levels decreased statistically 3 hours after PS juice intake ($p = 0.0068$ and $p = 0.001$, respectively), whereas no significant change was observed after the placebo intake (Figure 1A). The plasma glucose concentrations decreased in a similar way after the intake of the two drinks. The high-density lipoprotein (HDL) level increased significantly after PS juice consumption ($p = 0.0280$), whereas no change was observed after PB drink ($p = 0.3541$), as seen in Figure 1B. No effects of PS or PB were detected on total and LDL cholesterol levels.

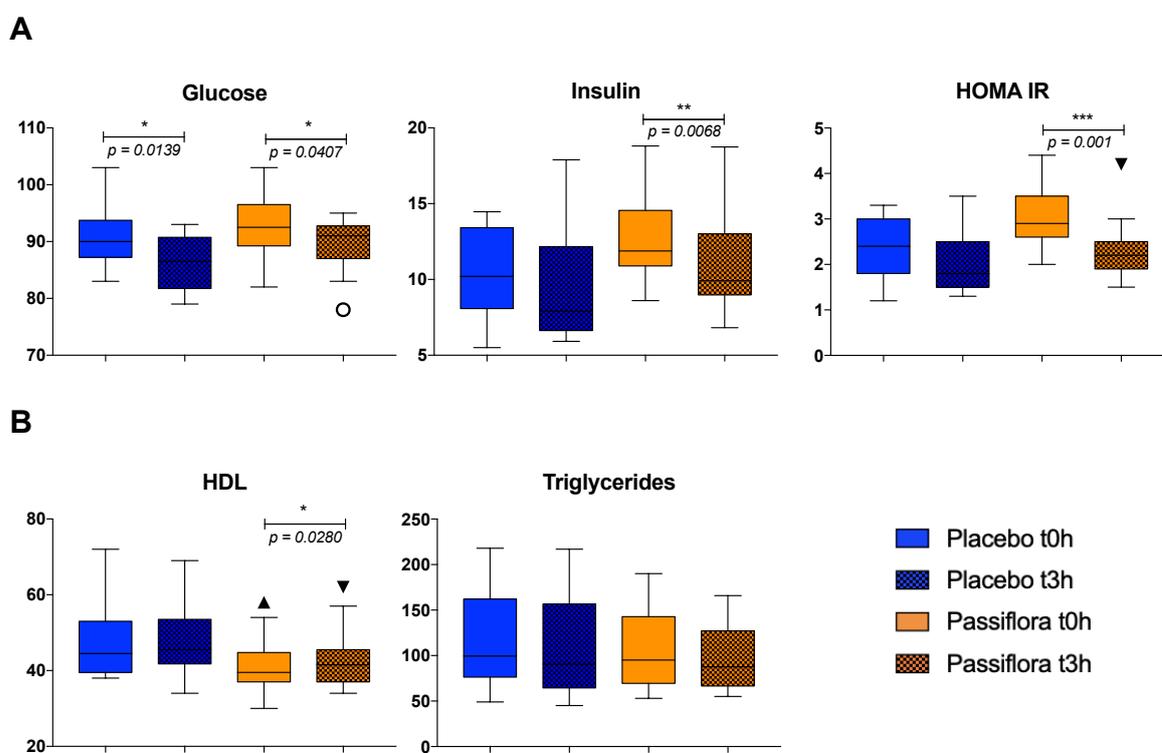


Figure 1. Acute effect of *Passiflora setacea* juice and placebo drink consumption on glucose (A) and lipid (B) metabolism markers in overweight volunteers ($n = 12$). Results analyzed by means of the non-parametric paired t -test (Wilcoxon's test), medians, and SD.

3.3. Effect of *Passiflora setacea* Juice Intake on Cytokine Serum Levels (Phase 1)

We determined the effect of PS juice intake on cytokine serum levels. Data showed that the IL-17A level did not increase after 3 hours of PS juice consumption ($p = 0.2962$); however, it increased after placebo consumption ($p = 0.0124$) (Figure 2). We also observed that TNF- α presented a similar but not significant pattern as IL-17A, that is, its level tended to increase after PB drink ($p = 0.0645$), whereas it remained unchanged after PS juice ($p = 0.5489$) (Figure 2). There were no statistical changes in the other cytokine measures of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and INF- γ (Figure 2).

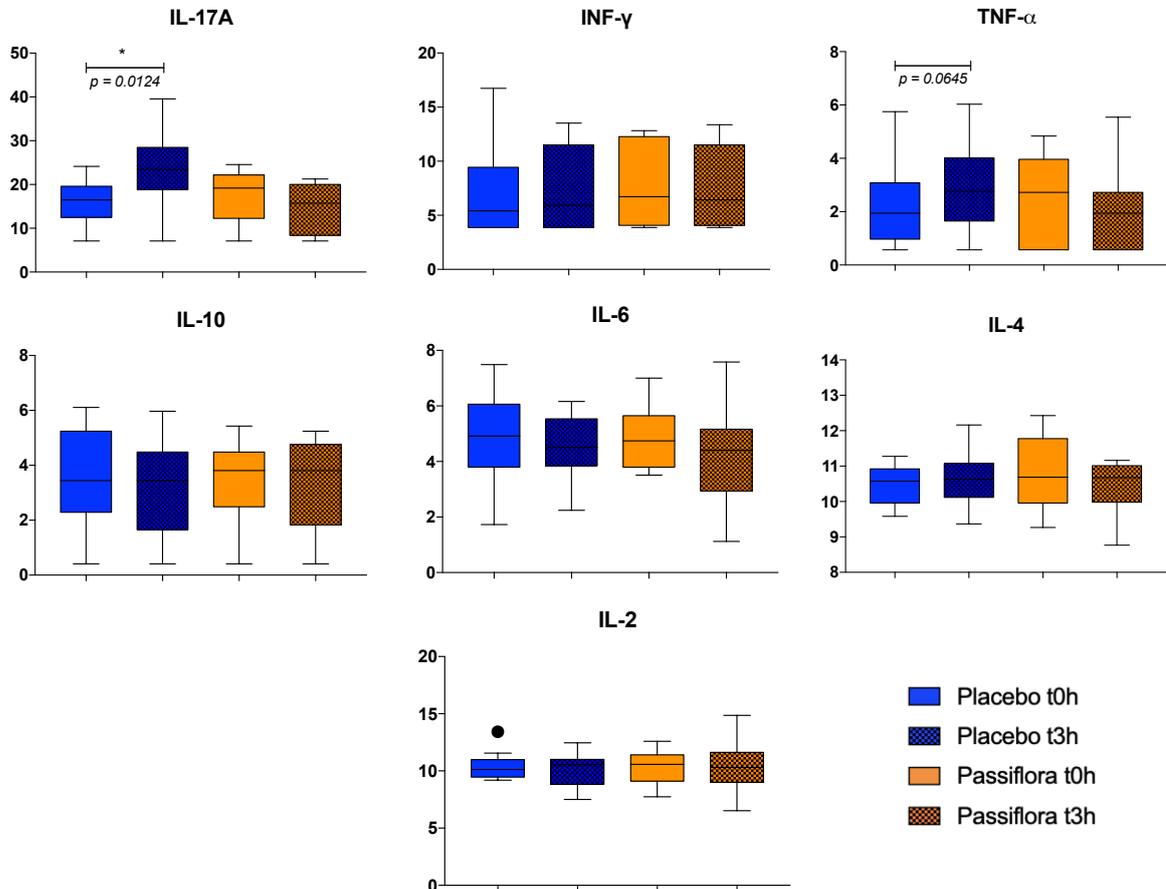


Figure 2. Acute effect of *Passiflora setacea* juice consumption on cytokine serum levels in overweight volunteers ($n = 12$). Results analyzed by means of the non-parametric paired t -test (Wilcoxon's test). Medians and standard deviations are represented in Supplementary Materials.

3.4. *Passiflora setacea* Modulated Gene Expression in Circulating Cells (Phase 2)

Following RNA extraction and quality control of both RNA and microarray hybridization, we obtained good quality RNA from 8 out of 12 volunteers. To access the nutrigenomic effect of an acute intake of PS juice in PBMCs, we performed a pangenomic gene expression analysis 3 hours after PS juice and PB drink consumption for the eight volunteers. Comparison of global gene expression profiles obtained for the volunteers by using PLSDA showed the separation of profiles between the two groups, suggesting different gene expression profiles between the volunteers that consumed PS and the volunteers that consumed PB (Figure 3). This observation suggests differential modulation in expression of genes after an acute intake of PS juice compared to the control drink.

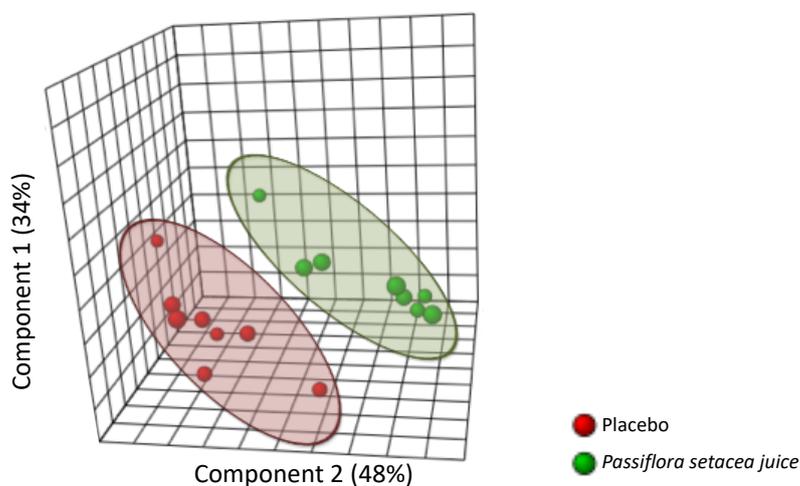


Figure 3. The comparison of the global gene expression profiles obtained for the volunteers using partial least squares discriminant analysis (PLSDA) shows the separation of profiles between the two groups, and suggests different gene expression profiles between the volunteers that consumed *Passiflora setacea* juice (PF) and the volunteers that consumed placebo (PB; placebo).

Following this observation, we performed a statistical analysis to identify which genes had their expression altered after the consumption of PS compared to PB. Statistical analyses identified 1327 genes presenting changes in their expression after PS consumption. Among them, most genes were identified as having their expression down-regulated with the average fold-change for up-regulated genes being 2.48 and for down-regulated genes being -2.15 . Among the genes showing the highest differential modifications were *TMEM151A*, *MLPH*, *MYH2*, *SERPINA9*, or *FNA21*.

For the biological interpretation of the differentially expressed genes, we first performed Gene Ontology (GO) analyses using DAVID database, and the GO were then clustered into function groups by using the online REVIGO software. This showed that differentially expressed genes are involved in various biological processes such as calcium ion transmembrane transport (potassium ion transport and phospholipid efflux), cell differentiation (extracellular matrix organization and histone lysine methylation), G-protein-coupled receptor signaling pathway (chemical synaptic transmission and neuropeptide signaling pathway), cell adhesion, and transcription from RNA polymerase promoter (Figure S1). This analysis revealed that the consumption of PS juice modulated the expression of genes presenting different biological functions.

To deepen the identification of the functions and cellular processes potentially affected by the consumption of PS juice, we performed gene network analyses of the differentially expressed genes. Gene networks, built through data-mining using the Metacore software, suggested, as did the GO analyses, that the consumption of PS juice changed the expression of genes involved in cellular function. Among the most over-represented networks were those involved in calcium and potassium transport, cell adhesion and cell-matrix interactions, neurogenesis, or transmission of nerve impulse (Figure 4). The genes identified in these networks were NMDA receptor, matrix metalloproteinase (MMP)-7, ADAMTS9, mGluR, CaMKII alpha, CACNA1C, and SLC24A2. These genes code proteins involved in vascular tissue damage, in the reduction of insulin sensitivity and secretion, and in neuropsychiatric disorders and neuron excitability.

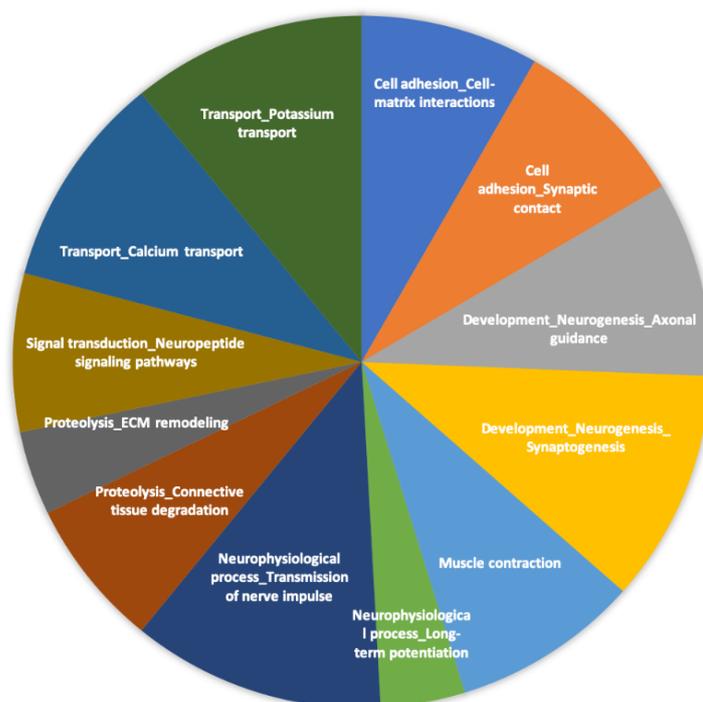


Figure 4. Networks enriched with differentially expressed genes in volunteers' peripheral blood mononuclear cells in response to *Passiflora setacea* pulp consumption. Gene networks were identified using MecaCore software that uses text mining approach to build gene–gene interactions and identify their cellular functions.

Besides the network analyses, we also performed gene pathway analyses employing the use of the Genetrial2 online tool by searching the KEGG and BioCarta databases. As shown in Figure 5, the differentially expressed genes identified are involved in cellular pathways including inflammation, metabolism, cell signaling, and neurofunction-related processes. Regarding the pathway related to inflammation, we identified a cytokine–cytokine receptor, cell adhesion molecules, and chemokine signaling pathways, which include genes such as *TNFSF18*, *IL36A*, *JAM2*, *ADCY8*, or *CCL16*. In pathways related to cellular metabolism, we identified circadian entrainment, insulin secretion, and *P13K-Akt* signaling pathways, which include genes such as *GRIN2A*, *PRKG1*, *CACNA1D*, *GLP1R*, *G6PC2*, and *LAMA1*. Calcium and adrenergic signaling pathways were also identified, containing *PTGER3*, *ADCY8*, and *CACNA1D* genes. Several pathways related to neurofunction were also identified such as glutamatergic synapse, neuroactive ligand-receptor interaction, and *MAPK* signaling pathways, in which genes such as *GABRG1*; *glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (GRIN1)*; *CACNA1D*; and *ADCY8* were mapped.

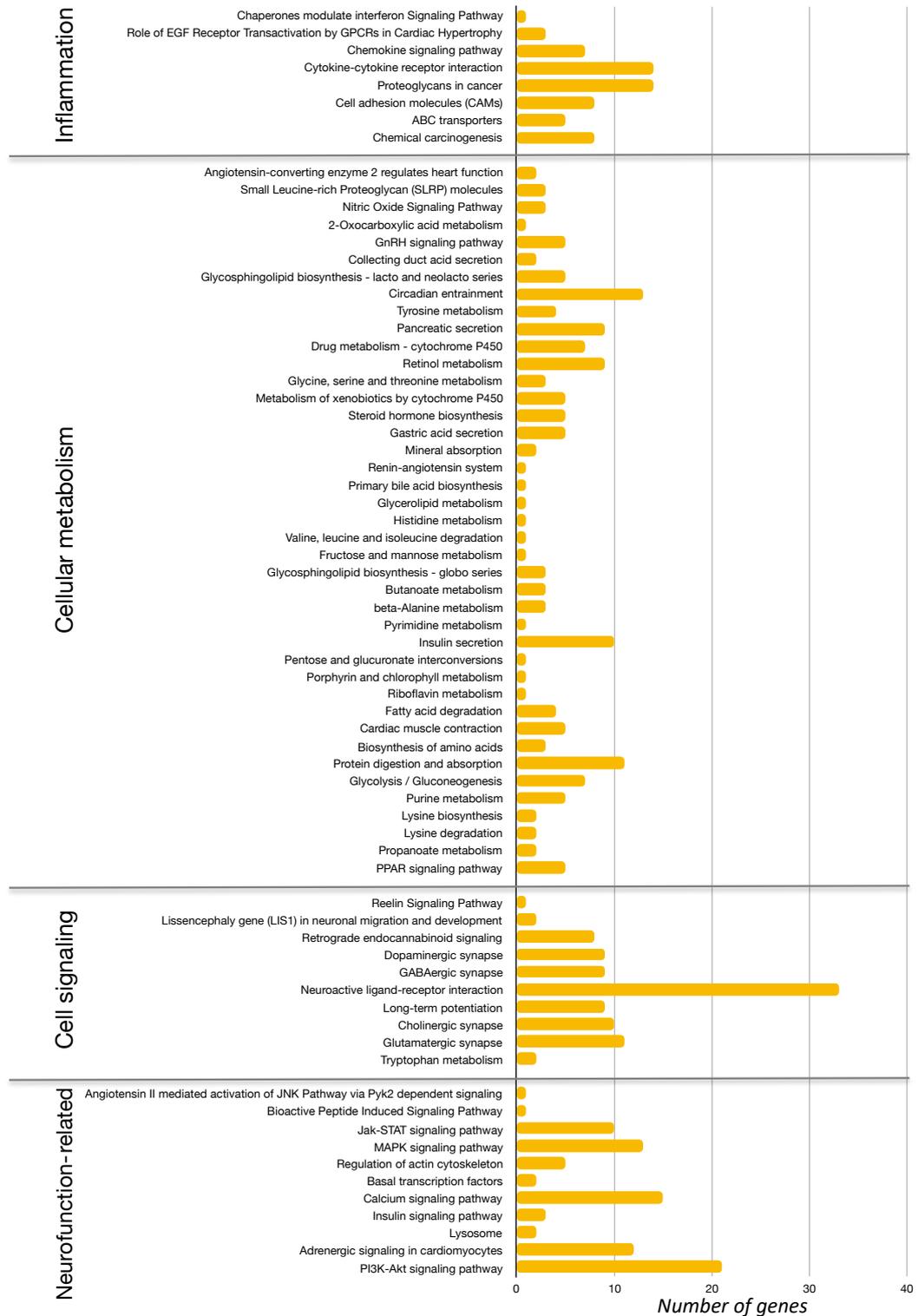


Figure 5. Significantly enriched pathways with differentially expressed genes in volunteers' PBMC in response to PS pulp consumption. Pathways were identified using Genetrial2 online tool and KEGG database, and were grouped regarding their functions. *x*-axis represents the number of genes in each pathway.

3.5. Protein–Protein Interaction (Phase 2)

Apart from the bioinformatics analyses on cellular networks and pathways of differentially expressed genes identified, we also searched for protein–protein interactions. We observed interactions among the genes whose expression were affected by the consumption of PS. By using the online String database, we identified 1013 nodes and 3066 edges with 6.05 nodes on average (Figure S2). Among them, 39 genes showed over 15 interactions with other proteins, making them important nodes in the protein–protein interactome. These 39 genes revealed over 700 interactions, which are a fifth of the total number verified. This suggests that changes in the expression of these genes can have an important impact on protein interactome and consequently on cell function. These genes are involved in the cellular pathways regulating processes such as cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway, nitric oxide signaling pathway, dopaminergic synapse, insulin, or PI3K-Akt signaling pathways. Proteins interacting with these 32 genes have been searched and 256 genes have been identified. Pathway analyses of these genes showed that they are involved in pathways such as the cAMP signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, Ras/Rap1 (Ras-related protein 1) signaling, insulin secretion, cytokine–cytokine receptor interaction, chemokine signaling pathway, retrograde endocannabinoid signaling, or regulation of actin cytoskeleton.

3.6. Transcriptional and Post-Transcriptional Regulators of the Nutrigenomic Effect (Phase 2)

The bioinformatics analyses of gene expression data were further performed with the aim to identify potential transcription factors involved in the mediation of the PS juice nutrigenomic effect observed. The most significant transcription factors (Figure 6) were cAMP Responsive Element Binding Protein 1 (CREB1), nuclear factor-kappa B (Nf-kB), and specificity protein 1 (SP1). These transcription factors are involved in gluconeogenesis regulation, lipid metabolism, and insulin signaling pathways. They are also associated with vascular calcification, pathogenesis of type 2 diabetes (TD2), and diabetic cardiovascular disease. Other transcription factors are Proto-Oncogene C-Jun (c-jun), Signal Transducer And Activator Of Transcription 3 (STAT3), and tumor protein P53 (p53).

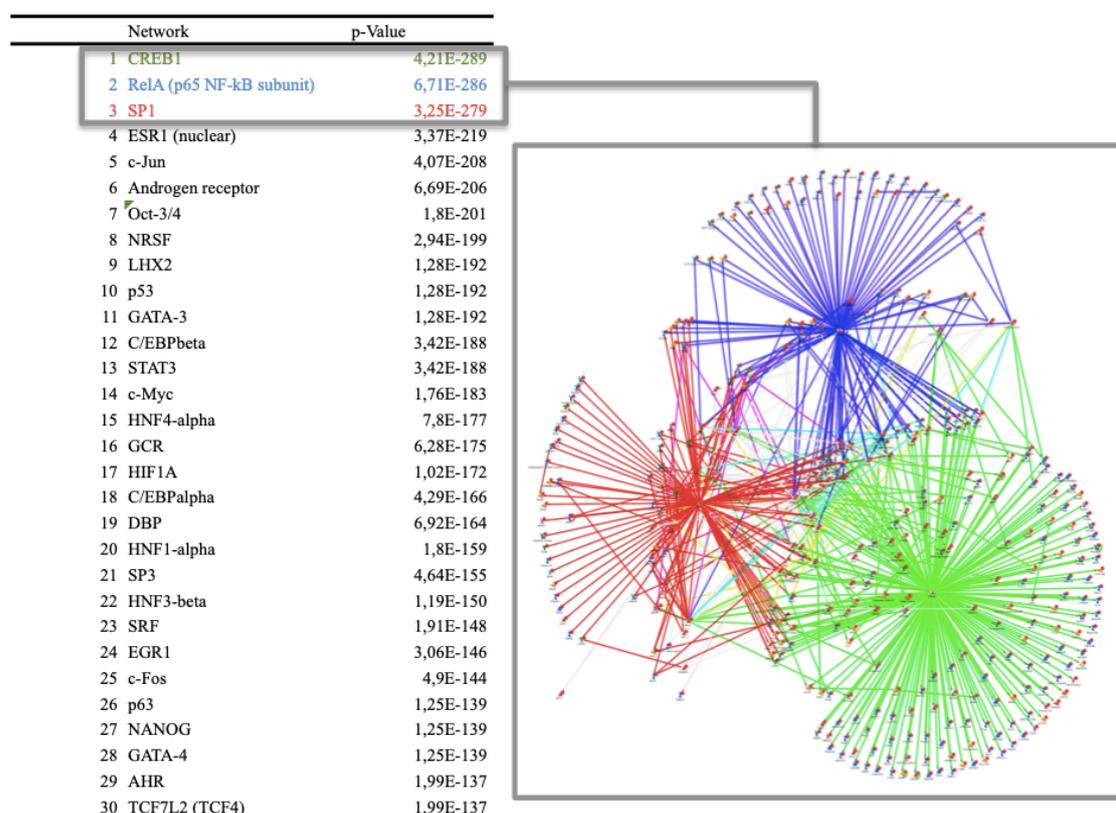


Figure 6. Bioinformatics analyses of potential transcription factors involved in the mediation of the PS juice's nutrigenomic effect observed. Transcription factors were identified using MetaCore algorithm and the most significant transcription factors listed were CAMP Responsive Element Binding Protein 1 (CREB1), nuclear factor-kappa B (Nf-kB), and specificity protein 1 (SP1). On the right, the interactions of the networks with these three transcription factors identified are represented.

Besides the transcriptional regulators potentially involved in the nutrigenomic effect observed, we also searched for potential post-transcriptional regulators of the gene expression, particularly microRNA. Using the online OmicsNet tool, we identified over 30 microRNAs (miRNAs) that could interact with differentially expressed genes and regulate their expression at the post-transcriptional level (Table 2). This suggests that PS juice consumption could potentially regulate the expression of microRNAs and consequently affect levels of mRNA of genes we identified as differentially expressed. Using the same online tool, we then performed integrated analyses of the identified differentially expressed genes, potential transcription factors, and potential microRNAs (Figure 7). We observed a network of interaction among these three levels of regulation of cell function, suggesting that PS juice consumption can significantly impact immune cells at the molecular level and consequently impact their functions.

Table 2. microRNA list.

hsa-mir-335-5p	MIMAT0000765	228
hsa-mir-26b-5p	MIMAT0000083	193
hsa-mir-16-5p	MIMAT0000069	161
hsa-mir-92a-3p	MIMAT0000092	161
hsa-mir-124-3p	MIMAT0000422	152
hsa-mir-155-5p	MIMAT0000093	116
hsa-mir-93-5p	MIMAT0000646	116
hsa-mir-1-3p	MIMAT0000416	114
hsa-mir-17-5p	MIMAT0000070	113
hsa-mir-615-3p	MIMAT0003283	112
hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	104
hsa-mir-106b-5p	MIMAT0000680	101
hsa-mir-20a-5p	MIMAT0000075	99
hsa-mir-218-5p	MIMAT0000275	99
hsa-mir-1-1	MI0000651	98
hsa-mir-484	MIMAT0002174	90
hsa-mir-193b-3p	MIMAT0002819	89
hsa-mir-15b-5p	MIMAT0000417	88
hsa-mir-15a-5p	MIMAT0000068	81
hsa-mir-20b-5p	MIMAT0000076	80
hsa-mir-21-5p	MIMAT0001413	80
hsa-mir-30a-5p	MIMAT0000087	79
hsa-mir-186-5p	MIMAT0000456	78
hsa-mir-519d-3p	MIMAT0002853	77
hsa-mir-24-3p	MIMAT0000080	76
hsa-mir-320a	MIMAT0000510	75
hsa-mir-8485	MIMAT0033692	75
hsa-mir-192-5p	MIMAT0000222	74
hsa-mir-195-5p	MIMAT0000461	73

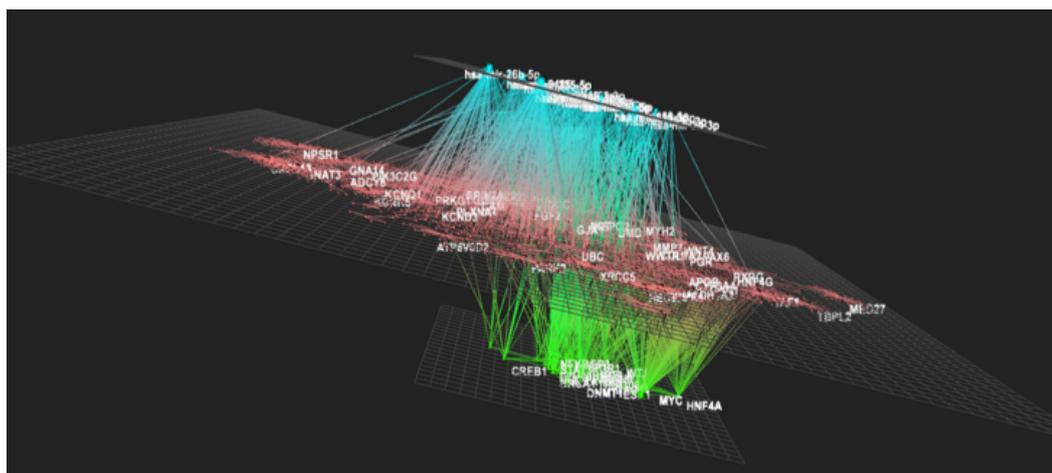


Figure 7. Bioinformatics analyses of potential miRNA involved in the mediation of the *Passiflora setacea* juice's nutrigenomic effect observed. OmicsNet online tool was used to identify interactions between the differentially expressed genes identified (in pink) with the potential transcription factors identified (in green), and potential miRNAs involved (in blue).

4. Discussion

This is the first time that the effect of a Brazilian savannah fruit was described on IL-17A blood levels and on gene expression profile in humans. We found that the consumption of one serving of PS juice (similar composition of a whole fruit but without its seeds) statistically decreased the levels of insulin and HOMA IR while increasing HDL levels.

It is known that disorders in insulin metabolism and consequently in glucose metabolism result in oxidative stress and inflammation, which lead to micro- and macrovascular dysfunctions and to the further development of diabetes and cardiovascular diseases [5]. These complications are associated with endothelial dysfunction, pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species formation, and adhesion molecule production [32]. This process results in the increase in the adhesion of immune cells to endothelial cells, as well as in their transendothelial migration into the vascular wall, which are the initial steps to the development of atherosclerosis, the origin of all vascular-related diseases. Therefore, by changing the insulin, HOMA IR, and HDL levels, PS juice could exert anti-inflammatory and vasculo-protective properties and consequently prevent or delay the onset of associated diseases. This observation could be related to the results of other *in vivo* and *in vitro* studies that have shown the potential of dietary polyphenols on insulin response. For example, isoorientin, a flavonoid found in PS, has proven to revert insulin resistance in adipocytes by stimulating the proper phosphorylation of proteins in the insulin signaling pathway [33]. Another path of action may be explained by the inhibition of the key enzymes involved in starch digestion (alpha-amylase and alpha-glucosidase) by polyphenols [34]. The caffeic acid, a phenolic acid also present in PS has shown the capacity to inhibit these enzymes [35]. Polyphenols from water chestnut husk [36], green tea [37], and apple [38] have been reported to reduce serum insulin levels in normal mice. However, few studies have also shown the effect of whole food on human insulin metabolism. Nyambe-Silavwe and Williamson [39] reported the effect of dried fruits with green tea in the decrease of insulin serum levels in healthy volunteers.

We also observed an increase of blood HDL concentrations after PS juice intake that was not detected within the PB condition. Recent nutrition intervention studies on polyphenol-rich foods such as olive oil [40] or dark chocolate [41] have been shown to positively affect HDL levels in humans. One possible explanation is that these polyphenol-rich foods may induce changes in the biochemical properties of the lipoprotein that contribute to its main biological function, particularly in the enhancement

of the cholesterol efflux capacity [42]. It can therefore be suggested that PS consumption modulates risk factors of cardiometabolic diseases.

This study also revealed that an acute intake of PS juice kept IL-17A at a basal level and indicated a tendency to decrease TNF-alpha levels ($p = 0.0645$) when compared to PB condition. The IL-17A is a pro-inflammatory cytokine that stimulates neutrophil inflammatory response [43] and the production of other pro-inflammatory cytokines such as TNF-alpha, IL-1 β , and IL-6 [44], as well as the expression of adhesion molecules such as Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) [45]. Its activities are vastly increased due to synergy with TNF-alpha that promotes the induction of target genes involved in inflammatory processes [46]. Cyanidin, a key flavonoid present in red berries, has shown the capacity to reduce inflammation in mice through binding with the extracellular domain of IL-17RA and consequently disrupting the IL-17A/IL-17RA complex formation [47]. Few studies have provided evidence regarding the role of diet in modulating IL-17 levels in humans. Peluso et al. [6] observed a drop of this cytokine in the plasma of 14 overweight subjects after a pineapple, blackcurrant, and plum juice consumption. Taken together, this observation suggests that PS consumption could present anti-inflammatory effects during the post-prandial period.

In the present study, using microarray analysis, we showed that the consumption of one single cup of PS juice by volunteers significantly affected PBMC gene expression profiles. Our study is the first to show the effect of a *Passiflora* species on the modulation of gene expression in humans. Another study has shown the capacity of another species of *Passiflora* in modulating gene expression in mice. Toda et al. [48] demonstrated that the aerial parts of the *Passiflora incarnata* Linnaeus extract can modulate the expression of genes that may be involved in the prevention of obesity [49] and hyperglycemia [50]. Regarding the effects of BC found in PS on gene expression, it has been reported that isoorientin stimulated the transcription of genes encoding components of insulin signaling pathway in murine insulin-sensitive and insulin-resistant adipocytes [33]. Orientin from *Commelina communis* L. down-regulated the expression of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) and mRNA levels of genes involved in adipogenesis, lipogenesis, and triglyceride synthesis in vitro [51]. A plant extract rich in orientin, isoorientin, vitexin, and isovitexin has been shown to inhibit the mRNA levels of TNF- α also in vitro [52]. Therefore, our original study suggests that potential health benefits of PS could be related to its capacity to modulate the expression of genes in vivo in humans.

Bioinformatic analysis also revealed that PS consumption modulated the expression of a group of genes, 25, involved in the regulation of inflammation and immune response, particularly chemokine signaling pathway and cytokine–cytokine receptor interactions. Among these genes are CXCL17, IL36A, CCL16, CCL21, and IL-25. CCL16 is a pro-inflammatory chemokine that may be involved in the development of diseases such as irritable bowel syndrome [53]. Chemokines, a group of cytokines that attract and activate leucocytes into inflamed tissue, have been associated with the pathogenesis of a number of diseases, ranging from atherosclerosis to human immunodeficiency virus (HIV) infection [54], and CCL21 has been suggested as being involved in the pathogenesis of various inflammatory disorders including rheumatoid arthritis, inflammatory bowel diseases, and atherosclerosis [55]. Nutri-genomic analysis also identified several interleukins such as IL-36A that have pro-inflammatory properties and have been described as being involved in pulmonary inflammatory responses [56]. Several studies have shown that foods rich in BC or isolated BC such as hesperidin can regulate the expression of chemokines [7]. Taken together, the results suggest that the acute consumption of PS can present anti-inflammatory effects by modulating the expression of related genes.

This nutrigenomic study identified changes in the expression of genes involved in processes such as cell adhesion and cell–matrix interactions; chemokine signaling; insulin secretion; calcium and potassium transport; as well as inflammation, atherosclerosis development, and neurostimulation. Among them are genes encoding matrix metalloproteinases (MMPs), desintegrins, and metalloproteases (AD-AMs), for which expression was identified as down-regulated. MMPs constitute a family of extracellular

processing enzymes responsible for inflammation and acquired immunity [57]. Expression of genes encoding MMPs is frequently increased by cytokines, and reactive oxygen species are often involved in this mechanism [58]. MMP-7 over-expression regulates chemokine gradients that can lead to severe tissue damage through transepithelial influx of neutrophils [59]. In an *in vitro* and *in vivo* study, resveratrol reversed the injury of human epithelial cells and attenuated such injury in mice through the inhibition of MMP-7 expression [60]. Kinase Insert Domain Receptor (KDR) (or Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2, VEGFR2) is a key receptor that promotes Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) to form mitosis and generate vascularization. VEGF promotes proliferation and migration of cells and activates matrix metalloproteinase secretion [61], which can lead to exacerbation of tissue damage during inflammation. VEGF is highly expressed in tissues undergoing growth or remodeling in cancer and atherosclerosis [62]. KDR's expression was down-regulated with PS juice consumption, as well as JAM-2's (junctional adhesion molecule 2) gene involved in leukocyte recruitment and extravasation under inflammatory conditions [52]. Few studies have suggested the capacity of foods or BC to modulate the expression of these genes. A formulation of Chinese herbs was capable of downregulating the expression of KDR and VEGF in a mouse with hepatocellular carcinoma [63]. Monfoulet et al. [64] revealed the capacity of curcumin to reduce endothelial junctional permeability. Thus, the capacity of PS to down-regulate the expression of this gene suggests a potential lower interaction of immune cells with vascular endothelial cells, which represent the initial steps of atherosclerosis development. As atherosclerosis is associated with the genesis of others cardiovascular diseases, PS juice consumption may reveal interesting mechanisms underlying its potential vasculo-protective properties.

ADAMs constitute a family of proteases with cell adhesive potential [65] and other functions, including extracellular matrix (ECM) degradation, shedding of various cell surface proteins, and influence on cell signaling patterns [66]. ADAM12 is an active protease in ECM that causes changes in proliferation and differentiation of adipocyte maturation and also in the development of obesity induced by high-fat diet [67]. It has been shown to affect the insulin-like growth factor (IGF)/mTOR (mammalian target of rapamycin) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) signaling pathways, leading to increased lipid accumulation in mature adipocytes [68]. ADAMTS9 is a risk gene for type 2 diabetes development and its over-expression is associated with impaired insulin signaling in peripheral tissues and also with insulin resistance [69]. Its risk allele (rs4607103 C) has been demonstrated to decrease mitochondrial function and to alter glucose and lipid metabolism [70]. Another gene identified as differentially expressed after PS juice consumption is adenylate cyclase 8 (ADCY8), which is involved in insulin secretion and glucose homeostasis. Sung et al. [71], in a genome-wide association analysis, associated the ADCY8 gene with obesity and abdominal visceral fat depot. Considering all these previous factors, the gene expression profile obtained after an acute consumption of PS suggests a lower accumulation of lipids in PBMCs and a lower impairment in insulin signaling, presenting potential molecular targets of PS juice consumption and their potential health properties.

Besides the modulation of genes related to cardiometabolic regulations, our nutrigenomic analysis also identified the fact that several genes modulated by the acute consumption of PS were associated with neurofunction, such as CACNA1C, GRIN1, and G protein-coupled receptor 50 (GPR50). The immune-to-brain and brain-to-immune communication has been recently studied [72]. The central nervous system can communicate with peripheral monocytes, promoting gene expression modulation, particularly with regards to the NF- κ B transcriptional control pathway [73]. The CACNA1C is a gene contributes to the etiology of psychiatric disorders and to phenotypes affected by those conditions such as memory and circadian rhythms [74]. Such symptoms are present in a proportion of the general population and are correlated with poorer cognitive performance and with adverse health outcomes [75] such as atherosclerosis [76]. The GRIN1 (glutamate receptor, ionotropic, NMDA1) gene plays an important role in excitatory neurotransmission, and the increase of its expression has been associated with anxiety in response to stress in mice [77]. Another gene whose expression has been modulated after PS juice

consumption was GPR50, a gene involved in late-life depression in certain subgroups of depressed individuals [78]; its down-regulation is associated with torpor enhancement [79]. Acute consumption of PS juice decreased the expression of these genes, which suggests that PS consumption may affect torpor, a hypothesis that can explain PS's popular name "sleep passionfruit". These observations suggest the potential effect of PS consumption as an auxiliary treatment for cognitive functions and for psychiatric disorders.

The three major transcription factors whose activities might be affected by PS consumption and that are possibly involved in the nutrigenomic effect observed are CREB1, RELA Proto-Oncogene (RelA), and SP1. CREB1 regulates gluconeogenesis, lipid metabolism, and insulin signaling pathways, and the activity of its transcriptional promoter is associated with the pathogenesis of TD2 [80], adipogenesis [81], and major depressive disorder [82]. RelA is a sub-unit of NF- κ B, a transcription factor critical for the expression of proinflammatory cytokines in human monocytes. Studies on the effect of bioactive compounds (BC) on this transcription factor showed that orientin, isoorientin, vitexin, and isovitexin exert suppressive action of these compounds upon NF- κ B activation [24]. Elevated SP1 plays a pro-apoptotic effect and stimulates vascular calcification [83]. It has been observed that the BC (-)-epigallocatechin-3-gallate can modulate the activity of this transcription factor [84]. Therefore, the capacity of PS juice consumption to affect the activity of these transcription factors could present major regulatory mechanisms observed in nutrigenomic modifications underlying their health properties.

Literature lacks data about the effect of *Passiflora* on miRNA expression. However, it has been suggested that plant food bioactives can modulate the expression of miRNA [85,86]. Among the miRNA identified from bioinformatic analysis as potentially involved in the post-transcriptional regulation of identified differentially expressed genes by PS juice consumption, we can list miRNA-16, -26, and -124. miRNA-16 has shown to play a role in inflammation [87] and hypertension [88], whereas miRNA-124 mediates anti-inflammatory effects and is involved in neuroprotective mechanisms [89]. Therefore, by potentially modulating the expression of these miRNAs, PS consumption can regulate genes involved in the development or the prevention of cardiometabolic and neurological diseases.

5. Conclusions

This acute study has provided the first clinical data supporting an interest in PS pulp consumption for human health. The positive changes we observed in some inflammatory and metabolic biomarkers as well as in the PBMC gene expression profile after an acute intake of one serving of PS pulp by overweight, middle-age volunteers suggest potential anti-inflammatory and anti-diabetic effects. These results, originating from an acute study, cannot be directly extrapolated to chronic consumption of PS pulp. However, it opens interesting perspectives for future long-term clinical studies using PS products in order to better characterize their health properties and identify the compounds/components responsible for these biological effects. Furthermore, developing this research line is important to increase knowledge on the role of plant foods derived from Brazilian biodiversity in the prevention or delay of the onset of chronic diseases.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1: List S1: Placebo ingredients. Table S1: "White meal" menu.

Author Contributions: Conceptualization, A.M.C., I.d.A.E.D., D.M., C.M., T.K.d.S.B., and L.d.L.d.O.; methodology, A.M.C., I.d.A.E.D., D.M., C.M., and T.K.d.S.B.; software, D.M. and I.d.A.E.D.; validation, I.d.A.E.D., A.M.C., D.M., A.J.d.M.R., and T.K.d.S.B.; formal analysis, I.d.A.E.D., A.M.C., D.M., and T.K.d.S.B.; investigation, I.d.A.E.D., A.M.C., D.M., T.K.d.S.B., and A.J.d.M.R.; resources, A.M.C., T.K.d.S.B., and L.d.L.d.O.; data curation, I.d.A.E.D., A.M.C., D.M., and T.K.d.S.B.; writing—original draft preparation, I.d.A.E.D. and D.M.; writing—review and editing, I.d.A.E.D., A.M.C., D.M., T.K.d.S.B., L.d.L.d.O., A.J.d.M.R., and C.M.; visualization, I.d.A.E.D. and D.M.; supervision, A.M.C. and I.d.A.E.D.; project administration, A.M.C., I.d.A.E.D., T.K.d.S.B., and L.d.L.d.O.; funding acquisition, A.M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financed in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—Brasil (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES), Finance Code 001.

Acknowledgments: We are indebted to all the subjects who volunteered in the clinical trial. We also thank the team from Sabin Laboratory for the biochemical analyses. We thank Calliandra Maria de Souza Silva for technical assistance for RNA extraction and Celine Bobby for microarray experiment technical assistance at the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) “Metabolism Exploration Platform: from genes to metabolites”. We also thank Decanato de Pesquisa e Inovação (DPI) and Decanato de Pós-graduação (DPG) from University of Brasilia for the resources for publishing this paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO, W.H.O. Noncommunicable Diseases Available online: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases> (accessed on 16 September 2018).
2. World Health Organization. *Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017.
3. Melaku, Y.A.; Renzaho, A.; Gill, T.K.; Taylor, A.W.; Dal Grande, E.; de Courten, B.; Baye, E.; Gonzalez-Chica, D.; Hyppönen, E.; Shi, Z.; et al. Burden and trend of diet-related non-communicable diseases in Australia and comparison with 34 OECD countries, 1990–2015: Findings from the Global Burden of Disease Study 2015. *Eur. J. Nutr.* **2018**, *58*, 1299–1313.
4. Koolhaas, C.M.; Dhana, K.; Schoufour, J.D.; Ikram, M.A.; Kavousi, M.; Franco, O.H. Impact of physical activity on the association of overweight and obesity with cardiovascular disease: The Rotterdam Study. *Eur. J. Prev. Cardiol.* **2017**, *24*, 934–941.
5. Pereira, C.A.; Carneiro, F.S.; Matsumoto, T.; Tostes, R.C. Bonus Effects of Antidiabetic Drugs: Possible Beneficial Effects on Endothelial Dysfunction, Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2018**.
6. Peluso, I.; Raguzzini, A.; V Villano, D.; Cesqui, E.; Toti, E.; Catasta, G.; Serafini, M. High Fat Meal Increase of IL-17 is Prevented by Ingestion of Fruit Juice Drink in Healthy Overweight Subjects. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 85–90.
7. Milenkovic, D.; Deval, C.; Dubray, C.; Mazur, A.; Morand, C. Hesperidin Displays Relevant Role in the Nutrigenomic Effect of Orange Juice on Blood Leukocytes in Human Volunteers: A Randomized Controlled Cross-Over Study. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26669.
8. Klötting, N.; Blüher, M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2014**, *15*, 277–287.
9. Wang, X.; Ouyang, Y.; Liu, J.; Zhu, M.; Zhao, G.; Bao, W.; Hu, F.B. Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: Systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *BMJ* **2014**, *349*, g4490–g4490.
10. Del Rio, D.; Rodriguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1818–1892.
11. Denny, A.; Buttriss, J. *Plant. Foods and Health: Focus on Plant Bioactives : Synthesis Report no. 4*; European Food Information Resource Consortium (EuroFIR): Norwich, UK, 2007; ISBN 978-0-907667-62-9.
12. Muñoz-Esparza, N.C.; Latorre-Moratalla, M.L.; Comas-Basté, O.; Toro-Funes, N.; Veciana-Nogués, M.T.; Vidal-Carou, M.C. Polyamines in Food. *Front. Nutr.* **2019**, *Jul 11*;6:108
13. Turati, F.; Rossi, M.; Pelucchi, C.; Levi, F.; La Vecchia, C. Fruit and vegetables and cancer risk: A review of southern European studies. *Br. J. Nutr.* **2015**, *113*, S102–S110.
14. Barber-Chamoux, N.; Milenkovic, D.; Verny, M.-A.; Habauzit, V.; Pereira, B.; Lambert, C.; Richard, D.; Bobby, C.; Mazur, A.; Lusson, J.R.; et al. Substantial Variability Across Individuals in the Vascular and Nutrigenomic

- Response to an Acute Intake of Curcumin: A Randomized Controlled Trial. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, *62*, 1700418.
15. Dhawan, K.; Dhawan, S.; Sharma, A. *Passiflora*: A review update. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 1–23.
 16. Appel, K.; Rose, T.; Fiebich, B.; Kammler, T.; Hoffmann, C.; Weiss, G. Modulation of the γ -aminobutyric acid (GABA) system by *Passiflora incarnata* L. *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 838–843.
 17. Bomtempo, L.L.; Costa, A.M.; Lima, H.; Engeseth, N.; Gloria, M.B.A. Bioactive amines in *Passiflora* are affected by species and fruit development. *Food Res. Int.* **2016**, *89*, 733–738.
 18. Gomes, S.V.F.; Portugal, L.A.; dos Anjos, J.P.; de Jesus, O.N.; de Oliveira, E.J.; David, J.P.; David, J.M. Accelerated solvent extraction of phenolic compounds exploiting a Box-Behnken design and quantification of five flavonoids by HPLC-DAD in *Passiflora* species. *Microchem. J.* **2017**, *132*, 28–35.
 19. de Carvalho, M.V.O.; de Oliveira, L.; Costa, A.M. Effect of training system and climate conditions on phytochemicals of *Passiflora setacea*, a wild *Passiflora* from Brazilian savannah. *Food Chem.* **2018**, *266*, 350–358.
 20. de Santana, F.C.; Shinagawa, F.B.; Araujo, E.; Costa, A.M.; Mancini-Filho, J. Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Brazilian *Passiflora* Seed Oils. *J. Food Sci.* **2015**, *80*, C2647–C2654.
 21. Santana, F.C. de Evaluation of bioactive compounds present in *Passiflora* spp. seed and its influence on oxidative stress and inflammation in a high fat-fed mice. Ph.D. Thesis, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 2015.
 22. Wang, C.; Xu, F.-Q.; Shang, J.-H.; Xiao, H.; Fan, W.-W.; Dong, F.-W.; Hu, J.-M.; Zhou, J. Cycloartane triterpenoid saponins from water soluble of *Passiflora edulis* Sims and their antidepressant-like effects. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *148*, 812–817.
 23. Ku, S.-K.; Kwak, S.; Bae, J.-S. Orientin Inhibits High Glucose-Induced Vascular Inflammation In Vitro and In Vivo. *Inflammation* **2014**, *37*, 2164–2173.
 24. Lee, W.; Ku, S.-K.; Bae, J.-S. Vascular barrier protective effects of orientin and isoorientin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. *Vasc. Pharmacol.* **2014**, *62*, 3–14.
 25. Muhammad, T.; Ikram, M.; Ullah, R.; Rehman, S.; Kim, M. Hesperetin, a Citrus Flavonoid, Attenuates LPS-Induced Neuroinflammation, Apoptosis and Memory Impairments by Modulating TLR4/NF- κ B Signaling. *Nutrients* **2019**, *11*, 648.
 26. Soulimani, R.; Younos, C.; Jarmouni, S.; Boustia, D.; Misslin, R.; Mortier, F. Behavioural effects of *Passiflora incarnata* L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *57*, 11–20.
 27. Turner-McGrievy, G.M.; Wirth, M.D.; Shivappa, N.; Wingard, E.E.; Fayad, R.; Wilcox, S.; Frongillo, E.A.; Hébert, J.R. Randomization to plant-based dietary approaches leads to larger short-term improvements in Dietary Inflammatory Index scores and macronutrient intake compared with diets that contain meat. *Nutr. Res.* **2015**, *35*, 97–106.
 28. Satija, A.; Bhupathiraju, S.N.; Spiegelman, D.; Chiuve, S.E.; Manson, J.E.; Willett, W.; Rexrode, K.M.; Rimm, E.B.; Hu, F.B. Healthful and Unhealthful Plant-Based Diets and the Risk of Coronary Heart Disease in U.S. Adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *70*, 411–422.
 29. Zhao, C.-N.; Meng, X.; Li, Y.; Li, S.; Liu, Q.; Tang, G.-Y.; Li, H.-B. Fruits for Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases. *Nutrients* **2017**, *9*, 598.
 30. Rocha, P.E.C.P. da *Medidas e Avaliação em Ciências do Esporte*; 4th. ed.; Sprint: Rio de Janeiro, Brazil, 2000; ISBN 85-85031-87-5.
 31. Allain, C.C.; Poon, L.S.; Chan, C.S.; Richmond, W.; Fu, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **1974**, *20*, 470–475.
 32. Shah, M.S.; Brownlee, M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 1808–1829.
 33. Alonso-Castro, A.J.; Zapata-Bustos, R.; Gómez-Espinoza, G.; Salazar-Olivo, L.A. Isoorientin Reverts TNF- α -Induced Insulin Resistance in Adipocytes Activating the Insulin Signaling Pathway. *Endocrinology* **2012**, *153*, 5222–5230.
 34. Sun, L.; Miao, M. Dietary polyphenols modulate starch digestion and glycaemic level: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, 1–15.

35. Sun, L.; Chen, W.; Meng, Y.; Yang, X.; Yuan, L.; Guo, Y. Interactions between polyphenols in thinned young apples and porcine pancreatic α -amylase: Inhibition, detailed kinetics and fluorescence quenching. *Food Chem.* **2016**, *208*, 51–60.
36. Yasuda, M.; Yasutake, K.; Hino, M.; Ohwatari, H.; Ohmagari, N.; Takedomi, K.; Tanaka, T.; Nonaka, G. Inhibitory effects of polyphenols from water chestnut (*Trapa japonica*) husk on glycolytic enzymes and postprandial blood glucose elevation in mice. *Food Chem.* **2014**, *165*, 42–49.
37. Forester, S.C.; Gu, Y.; Lambert, J.D. Inhibition of starch digestion by the green tea polyphenol, (–)-epigallocatechin-3-gallate. *Mol. Nutr. Food Res.* **2012**, *56*, 1647–1654.
38. Shin, S.-K.; Cho, S.-J.; Jung, U.; Ryu, R.; Choi, M.-S. Phlorizin Supplementation Attenuates Obesity, Inflammation, and Hyperglycemia in Diet-Induced Obese Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients* **2016**, *8*, 92.
39. Nyambe-Silavwe, H.; Williamson, G. Polyphenol- and fibre-rich dried fruits with green tea attenuate starch-derived postprandial blood glucose and insulin: A randomised, controlled, single-blind, cross-over intervention. *Br. J. Nutr.* **2016**, *116*, 443–450.
40. Sanchez-Rodriguez, E.; Lima-Cabello, E.; Biel-Glesson, S.; Fernandez-Navarro, J.; Calleja, M.; Roca, M.; Espejo-Calvo, J.; Gil-Extremuera, B.; Soria-Florido, M.; de la Torre, R.; et al. Effects of Virgin Olive Oils Differing in Their Bioactive Compound Contents on Metabolic Syndrome and Endothelial Functional Risk Biomarkers in Healthy Adults: A Randomized Double-Blind Controlled Trial. *Nutrients* **2018**, *10*, 626.
41. Petrilli, A.; Souza, S.; Teixeira, A.; Pontilho, P.; Souza, J.; Luzia, L.; Rondó, P. Effect of Chocolate and Yerba Mate Phenolic Compounds on Inflammatory and Oxidative Biomarkers in HIV/AIDS Individuals. *Nutrients* **2016**, *8*, 132.
42. Hernández, Á.; Fernández-Castillejo, S.; Farràs, M.; Catalán, Ú.; Subirana, I.; Montes, R.; Solà, R.; Muñoz-Aguayo, D.; Gelabert-Gorgues, A.; Díaz-Gil, Ó.; et al. Olive Oil Polyphenols Enhance High-Density Lipoprotein Function in Humans: A Randomized Controlled Trial. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2014**, *34*, 2115–2119.
43. Lin, A.M.; Rubin, C.J.; Khandpur, R.; Wang, J.Y.; Riblett, M.; Yalavarthi, S.; Villanueva, E.C.; Shah, P.; Kaplan, M.J.; Bruce, A.T. Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 through Extracellular Trap Formation in Psoriasis. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 490–500.
44. Jovanovic, D.V.; Di Battista, J.A.; Martel-Pelletier, J.; Jolicoeur, F.C.; He, Y.; Zhang, M.; Mineau, F.; Pelletier, J.P. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 3513–3521.
45. Kharwar, N.K.; Prasad, K.N.; Singh, K.; Paliwal, V.K.; Modi, D.R. Polymorphisms of IL-17 and ICAM-1 and their expression in Guillain-Barré syndrome. *Int. J. Neurosci.* **2017**, *127*, 680–687.
46. Bosteen, M.H.; Tritsaris, K.; Hansen, A.J.; Dissing, S. IL-17A potentiates TNF α -induced secretion from human endothelial cells and alters barrier functions controlling neutrophils rights of passage. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2014**, *466*, 961–972.
47. Liu, C.; Zhu, L.; Fukuda, K.; Ouyang, S.; Chen, X.; Wang, C.; Zhang, C.; Martin, B.; Gu, C.; Qin, L.; et al. The flavonoid cyanidin blocks binding of the cytokine interleukin-17A to the IL-17RA subunit to alleviate inflammation in vivo. *Sci. Signal.* **2017**, *10*, eaaf8823.
48. Toda, K.; Hitoe, S.; Takeda, S.; Shimizu, N.; Shimoda, H. Passionflower Extract Induces High-amplitude Rhythms without Phase Shifts in the Expression of Several Circadian Clock Genes in Vitro and in Vivo. *Int J. Biomed. Sci* **2017**, *13*, 84–92.
49. Kubo, T.; Fujino, Y.; Nakamura, T.; Kunimoto, M.; Tabata, H.; Tsuchiya, T.; Kadowaki, K.; Odoi, H.; Oyama, I.; Matsuda, S. An Industry-Based Cohort Study of the Association Between Weight Gain and Hypertension Risk Among Rotating Shift Workers: *J. Occup. Environ. Med.* **2013**, *55*, 1041–1045.
50. Oyama, I.; Kubo, T.; Fujino, Y.; Kadowaki, K.; Kunimoto, M.; Shirane, K.; Tabata, H.; Sabanai, K.; Nakamura, T.; Matsuda, S. Retrospective cohort study of the risk of impaired glucose tolerance among shift workers. *Scand. J. Work. Health* **2012**, *38*, 337–342.
51. Nagai, S.; Matsumoto, C.; Shibano, M.; Fujimori, K. Suppression of Fatty Acid and Triglyceride Synthesis by the Flavonoid Orientin through Decrease of C/EBP δ Expression and Inhibition of PI3K/Akt-FOXO1 Signaling in Adipocytes. *Nutrients* **2018**, *10*, 130.

52. Weber, C.; Fraemohs, L.; Dejana, E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nature Reviews Immunology* **2007**, *7*, 467–477.
53. Hayatbakhsh, M.M.; Gowhari Shabgah, A.; Pishgouyi, S.; Tavakol Afshari, J.; Zeidabadi, H.; Mohammadi, M. The Serum Levels of CCL2 and CCL16 Expression in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Rep Biochem Mol Biol* **2019**, *8*, 9–14.
54. Charo, I.F.; Ransohoff, R.M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *New England Journal of Medicine* **2006**, *354*, 610–621.
55. Fevang, B.; Yndestad, A.; Damås, J.K.; Halvorsen, B.; Holm, A.M.; Beiske, K.; Aukrust, P.; Frøland, S.S. Chemokines and common variable immunodeficiency; possible contribution of CCL19, CCL21 and CCR7 to immune dysregulation. *Clinical & Experimental Immunology* **2009**, *158*, 237–245.
56. Zhang, J.; Yin, Y.; Lin, X.; Yan, X.; Xia, Y.; Zhang, L.; Cao, J. IL-36 induces cytokine IL-6 and chemokine CXCL8 expression in human lung tissue cells: Implications for pulmonary inflammatory responses. *Cytokine* **2017**, *99*, 114–123.
57. Parks, W.C.; Wilson, C.L.; López-Boado, Y.S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **2004**, *4*, 617–629.
58. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*; Fifth edition.; Oxford University Press: Oxford, United Kingdom, 2015; ISBN 978-0-19-871747-8.
59. Swee, M.; Wilson, C.L.; Wang, Y.; McGuire, J.K.; Parks, W.C. Matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) controls neutrophil egress by generating chemokine gradients. *Journal of Leukocyte Biology* **2008**, *83*, 1404–1412.
60. Xiao, Z.; Chen, C.; Meng, T.; Zhang, W.; Zhou, Q. Resveratrol attenuates renal injury and fibrosis by inhibiting transforming growth factor- β pathway on matrix metalloproteinase 7. *Experimental Biology and Medicine* **2016**, *241*, 140–146.
61. Unemori, E.N.; Ferrara, N.; Bauer, E.A.; Amento, E.P. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* **1992**, *153*, 557–562.
62. Park-Windhol, C.; D'Amore, P.A. Disorders of Vascular Permeability. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **2016**, *11*, 251–281.
63. Xinyue, Z.; Shengyan, X.; Yanhui, W.; Yangxinzi, X.; Galia, P.; Yu, S.; Yao, C.; Guanjie, L.; Pei, L. Efficacy of Ciji Hua'ai Baosheng formula on the expressions of vascular endothelial growth factor, kinase insert domain-containing receptor and basic fibroblast growth factor in mouse models of H 22 hepatocellular carcinoma. *Journal of Traditional Chinese Medicine* **2017**, *37*, 88–95.
64. Monfoulet, L.-E.; Mercier, S.; Bayle, D.; Tamaian, R.; Barber-Chamoux, N.; Morand, C.; Milenkovic, D. Curcumin modulates endothelial permeability and monocyte transendothelial migration by affecting endothelial cell dynamics. *Free Radical Biology and Medicine* **2017**, *112*, 109–120.
65. Giebler, N.; Zigrino, P. A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions. *Toxins* **2016**, *8*, 122.
66. *The Adam family of proteases*; Hooper, N.M., Lendeckel, U., Eds.; Proteases in biology and disease; Springer: Dordrecht, 2005; ISBN 978-0-387-25149-3.
67. Masaki, M.; Kurisaki, T.; Shirakawa, K.; Sehara-Fujisawa, A. Role of Meltrin α (ADAM12) in Obesity Induced by High-Fat Diet. *Endocrinology* **2005**, *146*, 1752–1763.
68. Coles, C.A.; Maksimovic, J.; Wadson, J.; Fahri, F.T.; Webster, T.; Leyton, C.; McDonagh, M.B.; White, J.D. Knockdown of a disintegrin A metalloprotease 12 (ADAM12) during adipogenesis reduces cell numbers, delays differentiation, and increases lipid accumulation in 3T3-L1 cells. *Molecular Biology of the Cell* **2018**, *29*, 1839–1855.
69. Zeggini, E.; Scott, L.J.; Saxena, R.; Voight, B.F.; Marchini, J.L.; Hu, T.; de Bakker, P.I.; Abecasis, G.R.; Almgren, P.; Andersen, G.; et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nature Genetics* **2008**, *40*, 638–645.
70. Graae, A.-S.; Grarup, N.; Ribel-Madsen, R.; Lystbæk, S.H.; Boesgaard, T.; Staiger, H.; Fritsche, A.; Wellner, N.; Sulek, K.; Kjolby, M.; et al. ADAMTS9 Regulates Skeletal Muscle Insulin Sensitivity Through Extracellular Matrix Alterations. *Diabetes* **2019**, *68*, 502–514.

71. Sung, Y.J.; Pérusse, L.; Sarzynski, M.A.; Fornage, M.; Sidney, S.; Sternfeld, B.; Rice, T.; Terry, J.G.; Jacobs, D.R.; Katzmarzyk, P.; et al. Genome-wide association studies suggest sex-specific loci associated with abdominal and visceral fat. *International Journal of Obesity* **2016**, *40*, 662–674.
72. Wohleb, E.S.; McKim, D.B.; Sheridan, J.F.; Godbout, J.P. Monocyte trafficking to the brain with stress and inflammation: a novel axis of immune-to-brain communication that influences mood and behavior. *Frontiers in Neuroscience* **2015**, *8*.
73. Miller, G.E.; Chen, E.; Sze, J.; Marin, T.; Arevalo, J.M.G.; Doll, R.; Ma, R.; Cole, S.W. A Functional Genomic Fingerprint of Chronic Stress in Humans: Blunted Glucocorticoid and Increased NF- κ B Signaling. *Biological Psychiatry* **2008**, *64*, 266–272.
74. Heyes, S.; Pratt, W.S.; Rees, E.; Dahimene, S.; Ferron, L.; Owen, M.J.; Dolphin, A.C. Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and neurological disorders. *Progress in Neurobiology* **2015**, *134*, 36–54.
75. McDonald, K.C.; Saunders, K.E.; Geddes, J.R. Sleep problems and suicide associated with mood instability in the Adult Psychiatric Morbidity Survey, 2007. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry* **2017**, *51*, 822–828.
76. Goldstein, B.I.; Carnethon, M.R.; Matthews, K.A.; McIntyre, R.S.; Miller, G.E.; Raghuvver, G.; Stoney, C.M.; Wasiak, H.; McCrindle, B.W. Major Depressive Disorder and Bipolar Disorder Predispose Youth to Accelerated Atherosclerosis and Early Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **2015**, *132*, 965–986.
77. Mozhui, K.; Karlsson, R.M.; Kash, T.L.; Ihne, J.; Norcross, M.; Patel, S.; Farrell, M.R.; Hill, E.E.; Graybeal, C.; Martin, K.P.; et al. Strain Differences in Stress Responsivity Are Associated with Divergent Amygdala Gene Expression and Glutamate-Mediated Neuronal Excitability. *Journal of Neuroscience* **2010**, *30*, 5357–5367.
78. Ryan, J.; Carrière, I.; Ritchie, K.; Ancelin, M.-L. Involvement of GPR50 polymorphisms in depression: independent replication in a prospective elderly cohort. *Brain and Behavior* **2015**, *5*, n/a-n/a.
79. Bechtold, D.A.; Sidibe, A.; Saer, B.R.C.; Li, J.; Hand, L.E.; Ivanova, E.A.; Darras, V.M.; Dam, J.; Jockers, R.; Luckman, S.M.; et al. A Role for the Melatonin-Related Receptor GPR50 in Leptin Signaling, Adaptive Thermogenesis, and Torpor. *Current Biology* **2012**, *22*, 70–77.
80. Xu, Y.; Song, R.; Long, W.; Guo, H.; Shi, W.; Yuan, S.; Xu, G.; Zhang, T. CREB1 functional polymorphisms modulating promoter transcriptional activity are associated with type 2 diabetes mellitus risk in Chinese population. *Gene* **2018**, *665*, 133–140.
81. Ramos-Lopez, O.; Samblas, M.; Milagro, F.I.; Riezu-Boj, J.I.; Crujeiras, A.B.; Martinez, J.A.; Project, M. Circadian gene methylation profiles are associated with obesity, metabolic disturbances and carbohydrate intake. *Chronobiology International* **2018**, *35*, 969–981.
82. Zubenko, G.S.; Hughes, H.B.; Jordan, R.M.; Lyons-Weiler, J.; Cohen, B.M. Differential hippocampal gene expression and pathway analysis in an etiology-based mouse model of major depressive disorder. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* **2014**, *165*, 457–466.
83. Zhang, X.; Li, R.; Qin, X.; Wang, L.; Xiao, J.; Song, Y.; Sheng, X.; Guo, M.; Ji, X. Sp1 Plays an Important Role in Vascular Calcification Both In Vivo and In Vitro. *Journal of the American Heart Association* **2018**, *7*.
84. Fang, C.-Y.; Wu, C.-C.; Hsu, H.-Y.; Chuang, H.-Y.; Huang, S.-Y.; Tsai, C.-H.; Chang, Y.; Tsao, G.; Chen, C.-L.; Chen, J.-Y. EGCG Inhibits Proliferation, Invasiveness and Tumor Growth by Up-Regulation of Adhesion Molecules, Suppression of Gelatinases Activity, and Induction of Apoptosis in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16*, 2530–2558.
85. Milenkovic, D.; Jude, B.; Morand, C. miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. *Free Radical Biology and Medicine* **2013**, *64*, 40–51.
86. Milenkovic, D.; Berghe, W.V.; Morand, C.; Claude, S.; van de Sandt, A.; Gorressen, S.; Monfoulet, L.-E.; Chirumamilla, C.S.; Declerck, K.; Szic, K.S. et al. A systems biology network analysis of nutri(epi)genomic changes in endothelial cells exposed to epicatechin metabolites. *Scientific Reports* **2018**, *8*.
87. Heyn, J.; Ledderose, C.; Hinske, L.C.; Limbeck, E.; Möhnle, P.; Lindner, H.A.; Kreth, S. Adenosine A2A Receptor Upregulation in Human PMNs Is Controlled by miRNA-214, miRNA-15, and miRNA-16: *Shock* **2012**, *37*, 156–163.

88. Fernandes, T.; Magalhães, F.C.; Roque, F.R.; Phillips, M.I.; Oliveira, E.M. Exercise Training Prevents the Microvascular Rarefaction in Hypertension Balancing Angiogenic and Apoptotic Factors: Role of MicroRNAs-16, -21, and -126. *Hypertension* **2012**, *59*, 513–520.
89. Sun, Y.; Luo, Z.-M.; Guo, X.-M.; Su, D.-F.; Liu, X. An updated role of microRNA-124 in central nervous system disorders: a review. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2015**, *9*.



© 2020 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Data

List S1: Ingredients, in descending order, of the isotonic drink: water, sucrose, maltodextrin, sodium chloride, sodium citrate, potassium phosphate monobasic, citric acid acidulant, tartrazine artificial flavoring and FD&C Yellow 6 (dye).

Table S1: *White meal* composition:

Meal	Menu
Breakfast	French bread, cheese, ham and milk.
Snack	Cake made from flour, eggs, milk, sugar and yeast.
Lunch	Rice, beans, toasted cassava flour, meat and soda.
Snack	French bread, cheese, ham and milk or soda.
Dinner	Rice, beans, toasted cassava flour and meat.

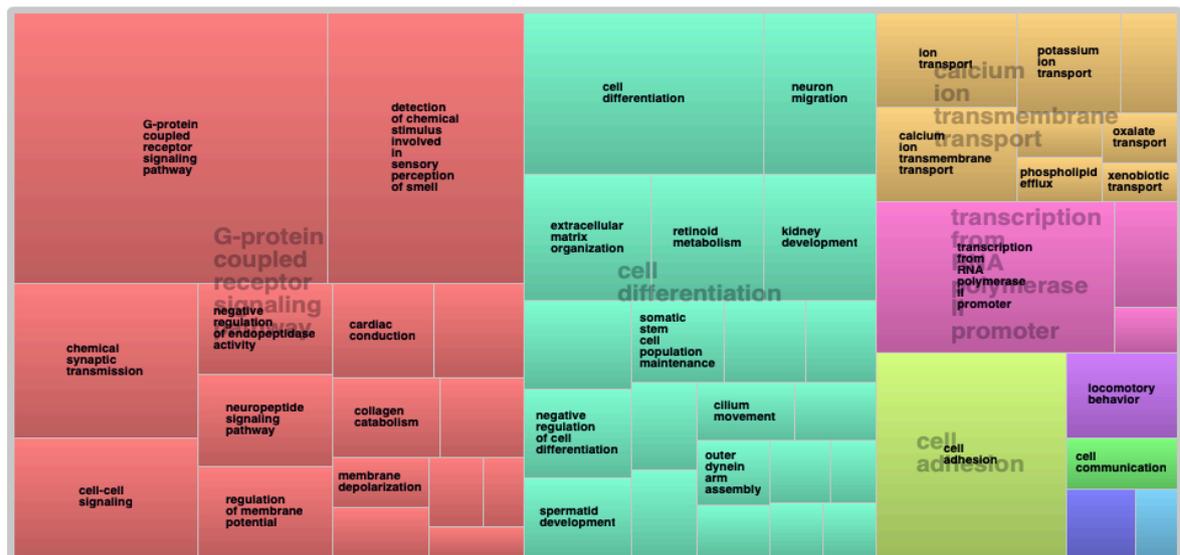


Figure S1. Gene Ontology terms grouped by REVIGO. The mRNA of PBMC's subjects was submitted to microarray analyses after their intake of the *Passiflora setacea* juice and the placebo drink. Differentially expressed genes based on gene ontology (GO) and grouped by REVIGO revealed biological processes (calcium ion transmembrane transport, cell differentiation, G-protein coupled receptor signaling pathway, cell adhesion and transcription from RNA polymerase promoter) clusters of down-regulated genes.

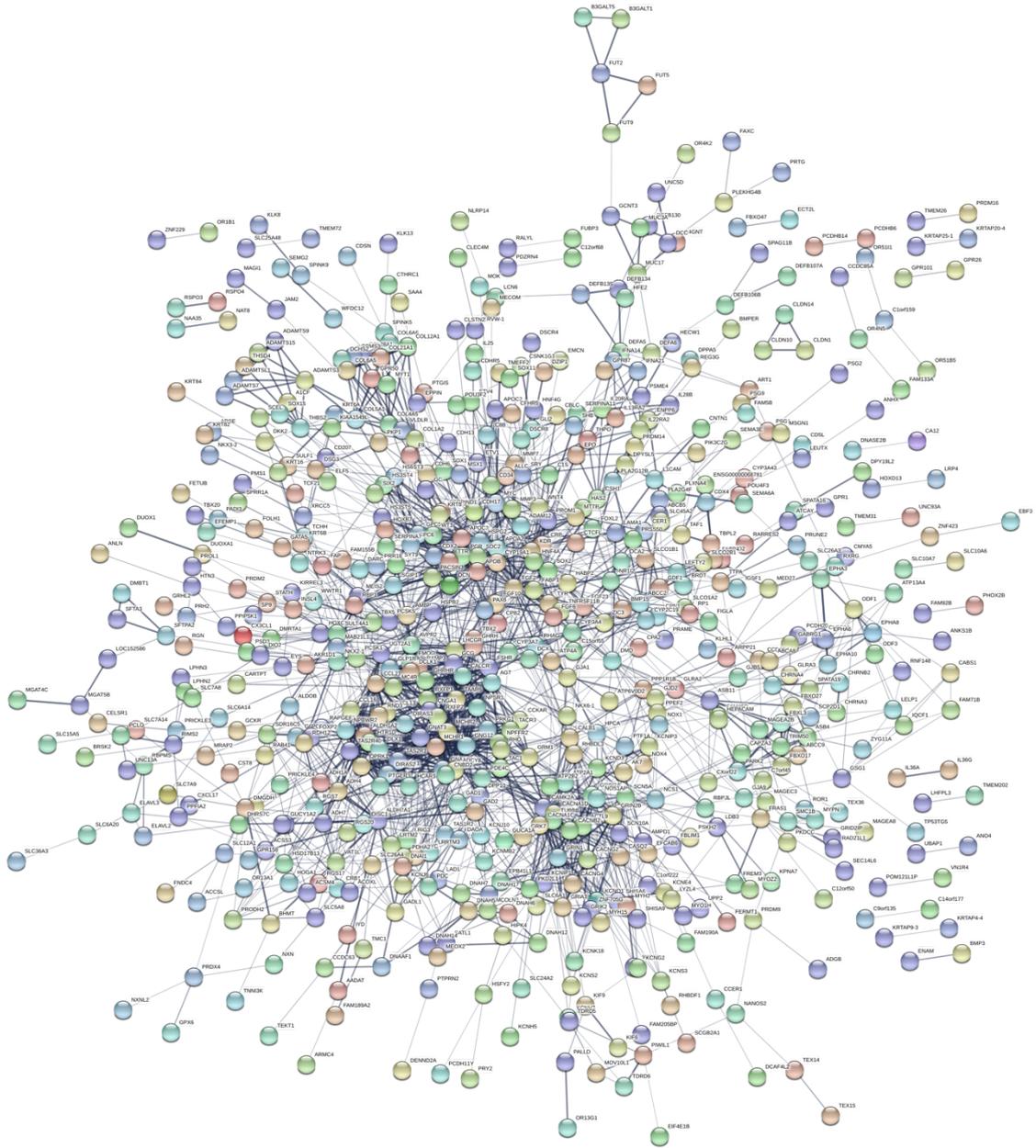
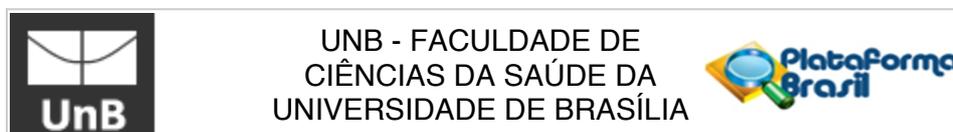


Figure S2. Bioinformatics analyses of protein-protein interactions of the genes whose expression have been affected by the consumption of *Passiflora setacea* (Online String database).

ANEXOS

ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Resposta imunomodulatória sobre parâmetros inflamatórios relacionados à saúde vascular e neuronal em indivíduos saudáveis e com sobrepeso após consumo de polpa de Passiflora setacea: uma abordagem ex vivo.

Pesquisador: Isabella de Araújo Esteves Duarte

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 91690318.9.1001.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.908.571

Apresentação do Projeto:

Segundo os pesquisadores no PB Informações Básicas do Projeto:

"Existe na atualidade, grande demanda da sociedade brasileira e internacional por alimentos saudáveis, nutritivos e que apresentem propriedades benéficas para a saúde, de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA, 2009). Para que a biodiversidade brasileira seja valorizada e se transforme em alimentos e produtos disponíveis para a população urbana, faz-se necessária a geração de tecnologias e informações em diversas áreas do conhecimento (PASSITEC, 2012). (...)"

"Dentre as espécies silvestres que tem uso popular associado a benefícios a saúde, se destacam as pertencentes ao gênero Passiflora. As espécies de passiflora, dentre elas, a Passiflora setacea, são ricas em compostos fenólicos, substâncias conhecidas por seu efeito funcional. Estudos preliminares tem avaliado o efeito do consumo da polpa dessa espécie silvestre em melhora de quadros de enxaqueca, stress e sonolência diurna. O atual estudo objetiva avaliar efeito agudo e prolongado do consumo de polpa de Passiflora setacea em marcadores inflamatórios relacionados a saúde vascular e neuronal em indivíduos saudáveis e com sobrepeso. Etapa I: Avaliação da concentração de citocinas circulantes e da taxa de adesão de monocitos THP1 a células endoteliais HUVEC expostas ao plasma de participantes de pesquisa com sobrepeso 3h após consumo de suco de Passiflora setacea ou bebida placebo. Etapa II: Avaliação da concentração de citocinas

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

28. Mamão pa- paya	½ und								
29. Molho de tomate	4 csp								
30. Morango	1 copo								
31. Repolho cru	4 csp								
32. Soja	1 csp								
33. Suco de abacaxi de cai- xinha	1 copo (250mL)								
34. Suco de abacaxi natu- ral	1 copo (250mL)								
35. Suco de la- ranja de caixi- nha	1 copo (250mL)								
36. Suco de la- ranja natural	½ copo (130mL)								
37. Suco de li- mão de caixi- nha	2 copos (500mL)								
38. Suco de li- mão natural	2 copos (500mL)								
39. Suco de maçã de caixi- nha –	1 copo (250mL)								
40. Suco de maçã natural	1 copo (250mL)								
41. Suco de ma- racujá de caixi- nha	2 copos (500mL)								
42. Suco de ma- racujá natural	2 copos (500mL)								
43. Suco de mo- rango de caixi- nha	1 copo (250mL)								
44. Suco de mo- rango natural	1 copo (250mL)								
45. Suco de uva de caixinha	½ copo (130mL)								
46. Suco de uva natural	½ copo (130mL)								
47. Tangerina (mexerica)	1 und grande								
48. Uva	15 und								
49. Açaí (suco ou creme)	200 mL								

Csp = colher de sopa; Und = unidade; Xc = xícara; Qdr = quadradinhos.

ANEXO C – CARDÁPIO DE REFEIÇÕES BRANCAS SUGERIDAS

Refeição	Cardápio
Café-da-manhã	Pão francês, queijo e presunto. Bebida opcional: leite
Lanche	Bolo simples de farinha, ovos, leite, açúcar e fermento ou bolacha água e sal
Almoço	Rice, beans, toasted cassava flour, meat and soda. Arroz, feijão, farofa, carne. Bebida opcional: refrigerante
Lanche da tarde	Idem café-da-manhã ou lanche
Jantar	Idem almoço ou macarrão com carne sem molho de tomate ou cachorro-quente ou pizza ou hambúrguer sem salada