



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ANA LUIZA RUSSO DUARTE

**MODELO DE SENSIBILIDADE NÃO CELÍACA AO GLÚTEN DE TRIGO:
EFEITOS SOBRE A MORFOFISIOLOGIA HEPÁTICA DE RATOS WISTAR**

Maringá – PR
2024

ANA LUIZA RUSSO DUARTE

**MODELO DE SENSIBILIDADE NÃO CELÍACA AO GLÚTEN DE TRIGO:
EFEITOS SOBRE A MORFOFISIOLOGIA HEPÁTICA DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Raquel Marçal Natali

Maringá – PR
2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

D812m

Duarte, Ana Luiza Russo

Modelo de sensibilidade não celíaca ao glúten de trigo : efeitos sobre a morfofisiologia hepática de ratos Wistar / Ana Luiza Russo Duarte. -- Maringá, PR, 2024.
48 f. : figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Raquel Marçal Natali.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2024.

1. Morfologia hepática. 2. Estresse oxidativo. 3. Fígado - Colágeno tecidual. 4. Fígado - Glicogênio tecidual. I. Natali, Maria Raquel Marçal, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 573.38

Síntique Raquel Eleutério - CRB 9/1641

ANA LUIZA RUSSO DUARTE

**MODELO DE SENSIBILIDADE NÃO CELÍACA AO GLÚTEN DE TRIGO:
EFEITOS SOBRE A MORFOFISIOLOGIA HEPÁTICA DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 23/05/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria Raquel Marçal Natali
Universidade Estadual de Maringá

Prof.^a Dr.^a Fernanda Losi Alves de Almeida
Universidade Estadual de Maringá

Prof.^a Dr.^a Anacharis Babeto de Sá-Nakanishi
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Ana Luiza Russo Duarte nasceu em 15 de novembro de 1999, na cidade de Maringá, estado do Paraná. Possui graduação, com título de Bacharel, em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá desde 2021. Manteve vínculo como bolsista CNPq pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC entre os anos de 2019 a 2021 no Laboratório de Histotécnica Animal no Departamento de Ciências Morfológicas (DCM/UEM) sob orientação da Prof.^a Dr.^a Maria Raquel Marçal Natali, onde desenvolveu três projetos de Iniciação Científica: Análise morfológica do fígado de ratos obesos tratados com *Moringa oleifera*; Efeitos da profilaxia e do tratamento com Goji berry (*Lycium barbarum*) sobre os parâmetros morfométricos do intestino delgado de ratos Wistar obesos; Efeitos da profilaxia e do tratamento com Goji berry (GB) sobre a histomorfometria do fígado de ratos Wistar obesos. Em 2022 ingressou no curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PBC/UEM) na área de concentração de Biologia Celular e Molecular, em nível de Mestrado, com ênfase em estudos sobre a morfologia do fígado de ratos Wistar alimentados com níveis crescentes de glúten.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter guiado meus passos e escolhas durante toda a minha vida, e por ter me concedido saúde e inteligência para superar todos os empecilhos.

À minha amada mãe, Ivone Russo. Obrigada por tanto, por sempre segurar minha mão e oferecer colo quando mais preciso, por ter sempre uma palavra acolhedora ou uma piada pronta. Eu te amo, você é minha vida e fortaleza. Eu por você e você por mim.

À minha querida orientadora, prof.^a Raquel Natali, que desde o dia que aceitou ser minha orientadora sempre me tratou como sua “filha científica”. Muito obrigada por confiar em meu trabalho e potencial. Além disso, um agradecimento especial por sempre ter paciência e acolher meus momentos mais difíceis, minhas necessidades e ansiedades.

Aos meus tios e primos que sempre torceram pelo meu sucesso e vibraram com as minhas conquistas. Agradecimento especial ao meu primo Eduardo Cunha que durante várias horas, pacientemente, me explicou conceitos de estatística e me ajudou em todas as análises.

Às minhas amadas amigas Camila Bernardini e Rafaela Godoy, que sempre estiveram do meu lado, me dando forças e me levantando. A vida é leve e alegre com vocês. Vocês duas e minha mãe formam o meu pilar de força.

À minha psicóloga Bruna Dantas. Com ela eu aprendo que a vida pode ser mais leve e menos ansiosa, sempre vivendo um dia de cada vez.

À minha colega de laboratório Gabriela Barone que enfrentou todos os perrengues no cuidado dos animais no período de biotério e confecção das rações. Obrigada pela parceria.

Às técnicas do laboratório de Histologia, Maria Ângela Moreira e Ana Paula Rampazzo e de Fisiologia, Márcia Fabrício e Valéria Romão. Obrigada por todas as ajudas e conversas, vocês foram essenciais.

Aos professores e alunos de graduação e pós-graduação do laboratório de Histologia pela convivência diária. Vocês, com certeza, tornam os dias leves e divertidos. Cada festa que organizamos é um lembrete da amizade criada.

Aos professores Jurandir Comar e Anacharis de Sá-Nakanishi, e aos alunos Gustavo Souza e Beatriz Paes do laboratório de Metabolismo Hepático, pela parceria na realização das técnicas bioquímicas de estresse oxidativo.

Às professoras que aceitaram fazer parte da banca examinadora deste trabalho. Membros titulares: Prof.^a Fernanda Losi e Prof.^a Anacharis de Sá-Nakanishi, e os membros

suplentes: Prof.^a Nilza Buttow e Prof.^a Francielle Ramalho. Tenho certeza que a contribuição de vocês será de grande valia.

À Universidade Estadual de Maringá pela estrutura que favoreceu o desenvolvimento deste trabalho e ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro. Também agradeço aos Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Biologia Celular e Molecular, pela oportunidade de cursar o mestrado.

DEDICATÓRIA

*“Andar com fé eu vou
Que a fé não costuma faiar”
- Gilberto Gil*

APRESENTAÇÃO

De acordo com a Resolução N°. 056/2019-PBC do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, esta dissertação de mestrado é composta de um artigo científico denominado: “**Modelo de sensibilidade não celíaca ao glúten de trigo: efeitos sobre a morfofisiologia hepática de ratos Wistar**” – “**Non-celiac sensitivity model to wheat gluten: effects on liver morphophysiology of Wistar rats**” redigido de acordo com as normas da revista Nutrients (Anexo B). ISSN: 2072-6643 e Fator de Impacto 5.9 (Disponível em: <https://www.mdpi.com/journal/nutrients/instructions>).

RESUMO GERAL

O glúten é uma proteína constituída por prolaminas e gluteninas e é comumente encontrado em grãos como trigo, aveia, centeio e cevada. A tolerância do organismo sobre a quantidade de glúten ingerida depende da presença de enzimas capazes de quebrar as porções proteicas vindas da alimentação. Desta forma, a ingestão de glúten pode interferir na mucosa intestinal, através de alterações na permeabilidade epitelial, aumento do número de linfócitos intraepiteliais e consequente produção de inflamações locais que podem atingir o tecido hepático. Considerado o segundo maior órgão do corpo e componente central do metabolismo, o fígado possui um papel fundamental como regulador da imunidade inata e adaptativa, visto que está exposto a uma grande e variada quantidade de moléculas estranhas provenientes do intestino. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de rações com níveis crescentes de glúten de trigo sobre a morfofisiologia do fígado de ratos Wistar. **Materiais e métodos:** Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela CEUA-UEM, protocolo nº 4375010922. Foram utilizados 50 *Rattus norvegicus* machos da linhagem Wistar com 21 dias de idade. Os animais foram divididos em 5 grupos (n=10) de acordo com o nível de glúten presente na ração e alimentados por 100 dias: G0 – grupo sem glúten: alimentação com ração isenta de glúten; G14 – grupo controle com glúten: alimentação com 14% de glúten de trigo (ração padrão); G42 – grupo com excesso de glúten: alimentação com 42% de glúten de trigo; G70 – grupo com sobrecarga de glúten: alimentação com 70% de glúten de trigo; e G70/0 – grupo com sobrecarga de glúten: alimentação com ração contendo 70% de glúten de trigo até os 91 dias de vida (70 dias de experimento), quando passaram a receber ração isenta de glúten até a eutanásia. Aos 121 dias os animais foram eutanasiados, após jejum noturno, por aprofundamento de anestesia (Ketamina 90 mg/kg de peso corporal + Xilazina 9 mg/kg de peso corporal). Foi mensurado o comprimento nasoanal para cálculo de índice de Lee (IL) e o índice de massa corporal (IMC). Amostras de sangue foram coletadas para dosagens plasmáticas de proteína total (PT), albumina, colesterol total (CT), triglicerídeos, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e gama glutamil transferase (GGT). Os depósitos de tecido adiposo mesentérico, retroperitoneal, periepídidimal e inguinal foram coletados e pesados. O fígado foi retirado, pesado e fixado para processamento histológico e análise do estado oxidativo. Foram realizadas análises morfológicas e morfométricas dos hepatócitos em Hematoxilina-Eosina. Através de reações histoquímicas foram quantificados: percentual de glicogênio tecidual em Ácido Periódico de Schiff; percentual de lipídeo intracelular em Sudan III; e percentual de colágeno tecidual em Picro Sirius Red. O estado

oxidativo hepático foi caracterizado pelos níveis das proteínas carboniladas e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), além da atividade da catalase e superóxido dismutase (SOD). **Resultados e discussão:** O excesso de glúten elevou a massa corporal final, em relação ao G14, sem caracterizar obesidade, uma vez que não foi capaz de interferir no IL, no IMC e índice de adiposidade, entretanto diminuiu a massa do fígado em relação ao G0. Todas as rações produzidas, com presença ou ausência de glúten, apresentaram um comportamento diferenciado nos níveis de CT e triglicerídeos, diferindo dos parâmetros de referência para ratos Wistar. Os valores de PT e albumina se mantiveram semelhantes, pois as rações produzidas são normoproteicas. As transaminases (TGO e TGP) e GGT também apresentaram níveis semelhantes para todos os grupos e valores próximos aos de referência para ratos Wistar, indicando ausência de lesão hepática. A análise macroscópica do fígado revelou diferenças nos grupos G70 e G70/0, sendo observadas estriações e pontos esbranquiçados no órgão. A análise microscópica mostrou manutenção da sua organização histológica padrão e qualitativamente apresentou maior deposição lipídica nos grupos G42 e G70 em relação ao G0. Na análise morfométrica, a presença de glúten de trigo na ração aumentou o número de hepatócitos e diminuiu o perfil celular, podendo ser caracterizado como um mecanismo de compensação, onde a taxa de proliferação está aumentada devido a um desequilíbrio no processo de metabolização dos peptídeos ingeridos, atuando como um agente estressor. Houve diminuição do percentual de glicogênio tecidual, que possivelmente foi transformado em glicose pelo processo de gliconeogênese; aumento do percentual de lipídeos intracelular no fígado dos animais alimentados com glúten, sendo possível inferir que há relação direta entre a alimentação com glúten e o estoque de lipídeos que são armazenados nos hepatócitos; e ausência de fibrose tecidual em todos os grupos, corroborando com os resultados das análises sanguíneas. O glúten foi capaz de aumentar o estresse oxidativo tecidual, uma vez que houve acréscimo nos marcadores secundários de lesão tecidual (proteínas carboniladas e TBARS) e diminuição na atividade das enzimas antioxidantes (catalase e SOD). **Conclusão:** O Modelo de Sensibilidade não Celíaca ao Glúten (SNCG) tem efeito negativo sobre a morfofisiologia hepática gerando aumento do estresse oxidativo. Maior nível de glúten na ração (70%) resulta em fígados menores, com redução na área de hepatócitos, aumento no número de células e percentual de lipídios intracelulares.

Palavras-chave: Colágeno tecidual; estresse oxidativo; glicogênio tecidual; hepatócitos; lipídeo intracelular; morfometria.

GENERAL ABSTRACT

Gluten is a protein made up of prolamins and glutenins and is commonly found in grains such as wheat, oats, rye and barley. The body's tolerance to the amount of gluten ingested depends on the presence of enzymes capable of breaking down the protein portions coming from food. Therefore, gluten ingestion can interfere with the intestinal mucosa, through changes in epithelial permeability, an increase in the number of intraepithelial lymphocytes and the consequent production of local inflammation that can reach the liver tissue. Considered the second largest organ in the body and a central component of metabolism, the liver plays a fundamental role as a regulator of innate and adaptive immunity, as it is exposed to a large and varied amount of foreign molecules originating from the intestine. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effects of diets with increasing levels of wheat gluten on the morphophysiology of the liver of Wistar rats. **Materials and methods:** All experimental procedures were approved by CEUA-UEM, protocol n° 4375010922. 50 males *Rattus norvegicus* of the Wistar lineage aged 21 days were used. The animals were divided into 5 groups (n=10) according to the level of gluten present in the food and fed for 100 days: G0 – gluten-free group: fed with gluten-free food; G14 – gluten control group: fed with 14% wheat gluten (standard feed); G42 – gluten excess group: fed with 42% wheat gluten; G70 – gluten overload group: fed with 70% wheat gluten; and G70/0 – gluten overload group: fed with food containing 70% wheat gluten until 91 days of life (70 days of experiment), when they started receiving gluten-free food until euthanasia. At 121 days, the animals were euthanized, after overnight fasting, by deepening anesthesia (Ketamine 90 mg/kg of body weight + Xylazine 9 mg/kg of body weight). Nasoanal length was measured to calculate the Lee index (LI) and body mass index (BMI). Blood samples were collected for plasma measurements of total protein (TP), albumin, total cholesterol (TC), triglycerides, glutamic-oxalacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and gamma glutamyl transferase (GGT). Mesenteric, retroperitoneal, periepididymal and inguinal adipose tissue deposits were collected and weighed. The liver was removed, weighed and fixed for histological processing and oxidative status analysis. Morphological and morphometric analyzes of hepatocytes were performed in Hematoxylin-Eosin. Through histochemical reactions, the following were quantified: percentage of tissue glycogen in Periodic Acid-Schiff; percentage of intracellular lipid in Sudan III; and percentage of tissue collagen in Picro Sirius Red. The hepatic oxidative state was characterized by the levels of carbonyl proteins and thiobarbituric acid reactive substances

(TBARS), in addition to the activity of catalase and superoxide dismutase (SOD). **Results and discussion:** Excess gluten increased final body mass, in relation to G14, without characterizing obesity, since it was not able to interfere with IL, BMI and adiposity index, however, it reduced liver mass in relation to G0. All rations produced, with or without gluten, showed a different behavior in the levels of TC and triglycerides, differing from the reference parameters for Wistar rats. TP and albumin values remained similar, as the rations produced are normoprotein. Transaminases (GOT and GPT) and GGT also showed similar levels for all groups and values close to the reference values for Wistar rats, indicating the absence of liver damage. Macroscopic analysis of the liver revealed differences in the G70 and G70/0 groups, with striations and whitish spots on the organ. Microscopic analysis showed maintenance of its standard histological organization and qualitatively showed greater lipid deposition in groups G42 and G70 compared to G0. In the morphometric analysis, the presence of wheat gluten in the feed increased the number of hepatocytes and decreased the cellular profile, which can be characterized as a compensation mechanism, where the proliferation rate is increased due to an imbalance in the metabolization process of ingested peptides, acting as a stressor. There was a decrease in the percentage of tissue glycogen, which was possibly transformed into glucose by the gluconeogenesis process; increase in the percentage of intracellular lipids in the liver of animals fed gluten, making it possible to infer that there is a direct relationship between gluten feeding and the stock of lipids that are stored in hepatocytes; and absence of tissue fibrosis in all groups, corroborating the results of blood tests. Gluten was able to increase tissue oxidative stress, since there was an increase in secondary markers of tissue injury (carbonyl proteins and TBARS) and a decrease in the activity of antioxidant enzymes (catalase and SOD). **Conclusion:** The Non-Celiac Gluten Sensitivity Model (NCGS) has a negative effect on liver morphophysiology, generating increased oxidative stress. A higher level of gluten in the feed (70%) results in smaller livers, with a reduction in the area of hepatocytes, an increase in the number of cells and percentage of intracellular lipids.

Keywords: Hepatocytes; intracellular lipid; morphometry; oxidative stress; tissue collagen; tissue glycogen.

MODELO DE SENSIBILIDADE NÃO CELÍACA AO GLÚTEN DE TRIGO: EFEITOS SOBRE A MORFOFISIOLOGIA HEPÁTICA DE RATOS WISTAR

Ana Luiza Russo Duarte^{1*}, Gabriela Barone Volce da Silva¹, Anne Caroline Santa Rosa¹,
Ghiovani Zanzotti Raniero², Antonio Roberto Giriboni Monteiro³, Gustavo Henrique de
Souza⁴, Jurandir Fernando Comar⁵, Maria Raquel Marçal Natali⁶

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, Zona 7, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, Zona 7, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil.

³ Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, Zona 7, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, Zona 7, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil.

⁵ Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, Zona 7, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil.

⁶ Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo, 5790, Zona 7, 87020-900 - Maringá, PR – Brasil.

* Autor correspondente: anaaluiza.rd@gmail.com

Resumo:

A intolerância ao glúten de trigo altera a permeabilidade intestinal e facilita o desenvolvimento de processos inflamatórios com possível repercussão sobre tecido o hepático, componente central do metabolismo. Ratos Wistar machos (n=50) com 21 dias de idade foram divididos em 5 grupos (n=10) conforme os níveis de glúten presentes na ração por 100 dias: G0 (0%), G14 (14%), G42 (42%), G70 (70%) e G70/0 (70% nos primeiros 70 dias e 0% até a eutanásia). Aos 121 dias os animais foram pesados, eutanasiados e amostras de sangue foram coletadas. Os depósitos de tecido adiposo foram pesados. O fígado foi pesado e fixado para análise morfológica e morfométrica de hepatócitos, percentual de glicogênio e colágeno tecidual e avaliação lipídica intracelular. O estado oxidativo hepático foi avaliado. A ingestão de rações com excesso de glúten (70%) aumentou a massa corporal final e reduziu a massa do fígado, entretanto não interferiu na adiposidade. Não houve injúria hepática. Colesterol e triglicerídeos apresentaram comportamento diferenciado em todos os grupos. O glúten na ração aumentou o número de hepatócitos e o percentual lipídico intracelular, diminuiu o perfil celular e o percentual de glicogênio tecidual. Não houve evidência de fibrose, entretanto o glúten elevou o estresse oxidativo tecidual.

Palavras-Chave: Colágeno tecidual; estresse oxidativo; glicogênio tecidual; hepatócitos; lipídeo intracelular; morfometria.

NON-CELIAC SENSITIVITY MODEL TO WHEAT GLUTEN: EFFECTS ON LIVER MORPHOPHYSIOLOGY OF WISTAR RATS

Ana Luiza Russo Duarte^{1*}, Gabriela Barone Volce da Silva¹, Anne Caroline Santa Rosa¹, Ghiovani Zanzotti Raniero², Antonio Roberto Giriboni Monteiro³, Gustavo Henrique de Souza⁴, Jurandir Fernando Comar⁵, Maria Raquel Marçal Natali⁶

¹ Postgraduate Program in Biological Sciences, State University of Maringa. Colombo Avenue, 5790, Zona 7, 87020-900 – Maringa, PR – Brazil.

² Postgraduate Program in Food Sciences, State University of Maringa. Colombo Avenue, 5790, Zona 7, 87020-900 – Maringa, PR – Brazil.

³ Department of Food Engineering, State University of Maringa. Colombo Avenue, 5790, Zona 7, 87020-900 – Maringa, PR – Brazil.

⁴ Postgraduate Program in Biochemistry, State University of Maringa. Colombo Avenue, 5790, Zona 7, 87020-900 – Maringa, PR – Brazil.

⁵ Department of Biochemistry, State University of Maringa. Colombo Avenue, 5790, Zona 7, 87020-900 - Maringa, PR – Brazil.

⁶ Department of Morphological Sciences, State University of Maringa. Colombo Avenue, 5790, Zona 7, 87020-900 - Maringa, PR – Brazil.

* Correspondence: anaaluiza.rd@gmail.com

Abstract:

Wheat gluten intolerance alters intestinal permeability and facilitates the development of inflammatory processes with possible repercussions on liver tissue, a central component of metabolism. Male Wistar rats (n=50) aged 21 days were divided into 5 groups (n=10) according to the levels of gluten present in the diet for 100 days: G0 (0%), G14 (14%), G42 (42 %), G70 (70%) and G70/0 (70% in the first 70 days and 0% until euthanasia). At 121 days the animals were weighed, euthanized and blood samples were collected. Adipose tissue deposits were weighed. The liver was weighed and fixed for morphological and morphometric analysis of hepatocytes, percentage of tissue glycogen and collagen and intracellular lipid assessment. Hepatic oxidative status was assessed. Ingestion of diets with excess gluten (70%) increased final body mass and reduced liver mass, however it did not affect adiposity. There was no liver injury. Cholesterol and triglycerides showed different behavior in all groups. Gluten in the feed increased the number of hepatocytes and the intracellular lipid percentage, decreased the cellular profile and the percentage of tissue glycogen. There was no evidence of fibrosis, however gluten increased tissue oxidative stress.

Keywords: Hepatocytes; intracellular lipid; morphometry; oxidative stress; tissue collagen; tissue glycogen.

SUMÁRIO

1. Introdução	17
2. Materiais e Métodos	19
2.1 <i>Delineamento experimental</i>	19
2.1.1 Animais	19
2.1.2 Preparação da ração	19
2.1.3 Consumo alimentar e massa corporal	20
2.2 <i>Coleta do material biológico</i>	21
2.3 <i>Análises bioquímicas</i>	21
2.4 <i>Processamento e análise histológica hepática</i>	22
2.5 <i>Estado Oxidativo</i>	23
2.5.1 Preparação do tecido	23
2.5.2 Parâmetros do estado oxidativo	23
2.6 <i>Análise Estatística</i>	24
3. Resultados	24
3.1 <i>Consumo alimentar e massa corporal</i>	24
3.2 <i>Parâmetros biométricos</i>	26
3.3 <i>Tecido adiposo</i>	26
3.4 <i>Parâmetros bioquímicos</i>	26
3.5 <i>Análises histológicas</i>	27
3.6 <i>Estado Oxidativo</i>	30
4. Discussão	32
5. Conclusão	37
Apoio Financeiro	38
Agradecimentos	38
Referências	38
Anexo A	43
Anexo B	44

1. Introdução

O glúten é constituído por dois principais componentes protéicos, as prolaminas e as gluteninas, e pode ser comumente encontrado em alguns tipos de grãos, como trigo, aveia, centeio e cevada [1]. A prolamina é conhecida como porção monomérica solúvel em álcool, responsável pela coesão e extensibilidade do glúten, sendo subclassificadas de acordo com o local onde são encontradas: gliadina, no trigo; hordeína, na cevada; avelina, na aveia; e secalina, no centeio [2,3]. A porção polimérica, chamada de glutenina, é insolúvel em álcool e se encontra presente em todos os cereais citados anteriormente, sendo responsável pela elasticidade e força do glúten [2].

A tolerância sobre a quantidade de glúten ingerida varia de acordo com cada organismo, pois está diretamente ligada a presença de enzimas específicas capazes de quebrar as porções de prolamina e glutenina vindas da alimentação, que na maioria das vezes são digeridas de forma incompleta pelas peptidases gástricas, pancreáticas e da borda em escova, acarretando na formação de peptídeos grandes que atravessam a barreira epitelial do intestino e entram na lâmina própria através de vias transcelulares ou paracelulares [4,5]. Diante disso, a intolerância ao glúten é um termo bastante abrangente que integra três principais tipos de distúrbios: doença celíaca (DC), alergia ao trigo e sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG) [2].

A DC é uma enteropatia imunomediada crônica caracterizada por inflamação do intestino delgado, hiperplasia e/ou atrofia das vilosidades, que tem como resultado interações complexas entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais, e a ausência de tratamento pode levar a graves complicações [6-8]. A alergia ao trigo, assim como a DC, também é mediada por respostas imunológicas, entretanto, além dos danos à mucosa intestinal e aumento da infiltração por linfócitos intraepiteliais, os principais sintomas incluem esofagite, gastroenterite e colite eosinofílica [2,9].

No entanto, o alvo deste estudo é a SNCG. Definida como um conjunto de sinais clínicos, a SNCG é causada pela ingestão do glúten, acarretando em sintomas intestinais (como dor e sensibilidade abdominal, hábitos intestinais irregulares: constipação ou diarreia, ou movimentos intestinais alternados) e/ou extraintestinais, como vômitos e cefaleia, que podem ser minimizados com a retirada de glúten da dieta. Ou seja, por não se tratar de uma condição alérgica e autoimune, pode ser considerado um autodiagnóstico ou diagnóstico feito por profissionais de saúde, após a negativa dos exames direcionados à doença celíaca e alergia ao trigo [5,10,11].

Dentro do contexto da SNCG, e tendo em vista que o glúten possui um alto caráter inflamatório, estudos comprovam que pode haver interferência na morfologia do trato gastrointestinal (TGI), que é responsável pela digestão e absorção dos nutrientes vindos da dieta. Por isso, seu contato constante com a mucosa intestinal, pode provocar alterações na permeabilidade epitelial, aumento do número de linfócitos intraepiteliais e consequente produção de inflamações locais e/ou sistêmicas, por meio de antígenos alimentares e bacterianos com propriedades imunoativadoras. Portanto, as possibilidades de desencadear um quadro de estresse oxidativo são altas, devido a formação e aumento das taxas de óxido nítrico nos tecidos e, consequentemente, de serem transportados para o fígado [12-15].

O fígado é considerado o segundo maior órgão do corpo. É tradicionalmente visto como componente central do metabolismo, pois é responsável pelo processamento e armazenamento de nutrientes e produção de proteínas plasmáticas, como a albumina. Sua constituição histológica envolve hepatócitos, células estreladas hepáticas e uma variedade de células apresentadora de antígenos, como as células de Kupffer (macrófagos), entre outras. Assim, o fígado está envolvido na desintoxicação, neutralização e degradação de fármacos e substâncias tóxicas, além de ter um papel fundamental como regulador da imunidade inata e adaptativa, visto que está exposto a uma grande quantidade de moléculas estranhas provenientes do intestino [16].

O eixo intestino-fígado, determinado pela circulação íntima e direta de sangue provenientes do intestino em direção ao fígado através da veia porta hepática, é responsável por transportar substâncias a serem metabolizadas, especialmente os peptídeos derivados do glúten, que sob condições específicas, como o rompimento da barreira intestinal, podem desencadear resposta imune hepática [13]. A desregulação do eixo intestino-fígado e a ativação de respostas imunes, podem promover dano hepático, através de processos inflamatórios, esteatose hepática não alcoólica, fibrose hepática e desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante celular, podendo afetar a proliferação celular, diferenciação ou respostas apoptóticas e perturbar a homeostase do tecido [13,14].

Levando em consideração os estudos que relacionam a ingestão do glúten com alterações morfofuncionais do TGI e, consequente desequilíbrio de outros órgãos do sistema, como o fígado, que se apresenta relevante nas respostas imunológicas e oxidativas, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de rações com níveis crescentes de glúten de trigo sobre a morfofisiologia do fígado de ratos Wistar.

2. Materiais e Métodos

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), pelo protocolo nº 4375010922 (Anexo A) e obedeceram aos princípios da experimentação animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.1 Delineamento experimental

2.1.1 Animais

Foram utilizados 50 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos (n=10 por grupo). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, com 21 dias de idade. Os ratos foram mantidos por 100 dias no biotério do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) sob ciclos regulares de iluminação (12h claro:12h escuro), temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e exaustão de ar.

Os grupos foram organizados conforme o nível de glúten de trigo presente na ração. Todos os animais foram eutanasiados aos 121 dias de idade:

- G0 – grupo sem glúten: alimentação com ração isenta de glúten.
- G14 – grupo controle com glúten: alimentação com 14% de glúten de trigo (ração padrão).
- G42 – grupo com excesso de glúten: alimentação com 42% de glúten de trigo.
- G70 – grupo com sobrecarga de glúten: alimentação com 70% de glúten de trigo.
- G70/0 – grupo com sobrecarga de glúten: alimentação com ração contendo 70% de glúten de trigo até os 91 dias de vida (70 dias de experimento), quando passaram a receber ração isenta de glúten até a eutanásia.

2.1.2 Preparação da ração

As rações foram produzidas no Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA/UEM), fabricadas em máquina extrusora monorosca (Inbramaq RX50) que funciona em alta velocidade (até 400 rpm) acoplada à uma matriz de saída e peça difusora responsável pelo formato da ração (pellets).

Todos os ingredientes em percentuais adequados para roedores foram moídos e transformados em farinha. Posteriormente, esse produto, foi umedecido e submetido a alta temperatura (110-160°C) e pressão, para cozinhar e expandir o produto. O grau de expansão foi

controlado pelo grau de umidade, correspondente a 25%. Em temperatura ambiente o extrusado foi resfriado e, por consequência, a expansão foi interrompida.

A ração foi submetida à secagem em estufa de circulação de ar à 50-60°C, por 24 horas, mantendo-se o grau de dureza adequado a roedores. O grau de refinamento dos ingredientes utilizados na ração teve como referência o *American Institute of Nutrition* AIN-93 [17]. Após confecção, a ração foi mantida sob refrigeração em recipientes separados, com a finalidade de não haver contaminação cruzada de glúten. Os valores nutricionais utilizados na ração padrão produzida estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Frações químicas e de calorias da ração com 14% de glúten de trigo (ração padrão) para roedores.

Valores Nutricionais	Dieta Padrão
(Kcal/100g de dieta)*	417
Carboidratos (%)	75.4
Proteínas (%)	14.1
Gorduras (%)	4
Água (%)	25

Composição bruta energética (Kcal/100g de dieta) * Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal, Departamento de Zootecnia – Universidade Estadual de Maringá – LANA-DZO-UEM

Para definir os níveis de glúten, foi utilizado como matéria prima a farinha de trigo e o farelo de arroz. Na ração padrão do grupo controle (G14) a fonte de glúten, como componente proteico, foi o trigo sendo substituído por arroz no grupo G0. Para os grupos com níveis de glúten acima de 14%, o percentual de trigo foi acrescido. Na composição da ração foi acrescentado Premix vitamínico e mineral para roedores (PX 1577 PREMIX-Nucleopar Nutrição Animal Ltda). Os ingredientes selecionados para produzir 1 kg da ração balanceada estão descritos na Tabela 2 e foram pesados em balança analítica (220g M214Ai Bel®) e balança digital Triunfo® (DST30/C-DM).

2.1.3 Consumo alimentar e massa corporal

Para avaliar o consumo alimentar dos animais, a ração oferecida e as sobras foram pesadas, a cada dois dias, durante todo período experimental. A oferta de ração foi calculada entre 30 a 60g por animal para garantir o consumo *ad libitum* [18].

Todos os animais foram pesados semanalmente e simultaneamente em um dia fixo, para avaliar o ganho de peso, em balança digital Filizola™ (modelo BP3). A evolução da massa corporal dos animais foi expressa em gramas (g).

Tabela 2. Componentes das rações para roedores com diferentes níveis de glúten (trigo) apresentados como 0% (G0), 14% (G14), 42% (G42) e 70% (G70).

Ingredientes (g/kg)	G0	G14	G42	G70
Grão de milho	614	614	334	0
Farelo de soja	141	141	141	141
Farinha de trigo	0	140	420	700
Farelo de arroz	140	0	0	0
Óleo de soja	40	40	40	40
Cloreto de sódio	6,8	6,8	6,8	6,8
Carbonato de cálcio	25	25	25	25
Fosfato bicálcico	11.4	11.4	11.4	11.4
Premix vitamínico	10	10	10	10
Premix mineral	11.8	11.8	11.8	11.8
Total*	1 Kg	1 Kg	1 Kg	946g

* Laboratório de Cereais, Departamento de Engenharia e Alimentos – Universidade Estadual de Maringá

2.2 Coleta do material biológico

Aos 121 dias de vida os animais foram pesados e eutanasiados, após jejum noturno, por aprofundamento de anestesia (Ketamina 90 mg/kg de peso corporal + Xilazina 9 mg/kg de peso corporal). O comprimento nasoanal foi medido por fita métrica para posterior cálculo do índice de Lee [19] e índice de massa corporal (IMC) ($\text{massa corporal (g)} / \text{comprimento nasoanal}^2$). Foi realizada a coleta do sangue por punção cardíaca (aprofundamento de agulha 30x0,7m e seringa de 5mL) e a laparotomia vertical para a coleta e pesagem do fígado para posterior separação em lobos. Também, foram removidos e pesados os depósitos de tecidos adiposos (mesentérico, retroperitoneal, periepididimal e inguinal). Também foi realizado o índice de adiposidade, caracterizado pela soma das massas dos depósitos de tecido adiposo. As amostras de sangue foram centrifugadas para separação de soro e plasma e armazenadas em freezer -80°C para análises bioquímicas posteriores. As amostras de fígado com exceção daquelas destinadas a processamento histológico, foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C até o processamento.

2.3 Análises bioquímicas

O sangue coletado foi mantido em um tubo sem anticoagulante para obtenção do soro que foi utilizado para dosagens bioquímicas sanguíneas de proteína total, albumina, colesterol total, triglicerídeos, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e gama glutamil transferase (GGT).

As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. As análises foram realizadas no laboratório de Fisiologia, por meio de kits comerciais (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Minas Gerais, Brasil) de acordo com as especificações do fabricante em espectrofotômetro Bioplus 2000.

2.4 Processamento e análise histológica hepática

O lobo médio do fígado foi submetido ao processo de fixação em paraformaldeído 4% por 24 horas, sendo posteriormente transferido para solução de álcool 70%. Em seguida, ele foi cortado em pequenas amostras, que foram desidratadas por meio da utilização de álcool em concentrações crescentes, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Consecutivamente foram realizados cortes histológicos transversais semi-seriados, de 5µm de espessura, com auxílio de micrótomo rotativo (Leica® RM2245). Os cortes obtidos foram corados com Hematoxilina de Harris e Eosina (HE) e reações histoquímicas com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Picro Sirius Red.

Na análise morfométrica foi mensurada a área de 100 hepatócitos/animal (µm²), e avaliado o número de hepatócitos em 50 imagens/animal. A estas imagens foi adicionada uma tarja preta de área fixa, sobre a veia central, para padronização da área de contagem a qual foi denominada área útil (área do campo da imagem subtraído da medida da tarja preta de área fixa), medindo de 57510.05 µm², visto que as veias centrais podem ter tamanhos variados. Todos os hepatócitos presentes em cada imagem, exceto os cobertos pela tarja, foram quantificados. Os resultados foram expressos como número de hepatócitos.

A análise histoquímica para avaliação do percentual de glicogênio tecidual foi feita pela mensuração da área útil e área contendo glicogênio de 50 imagens/animal. A análise para avaliação do percentual de colágeno tecidual foi feita pela mensuração da área útil e área contendo a soma de colágeno do tipo I e III de 50 imagens/animal com auxílio de luz polarizada. Todas as análises foram realizadas por meio do programa Image Pró-Plus® 4.5 (Media Cybernetics).

O lobo lateral esquerdo do fígado foi congelado em nitrogênio líquido, armazenado em freezer -80°C e, posteriormente foi realizado cortes histológicos transversais semi-seriados, de 10µm de espessura, por meio de criostato (Leica® CM1850) a -20°C. Os cortes obtidos para esta análise foram submetidos à reação histoquímica com Sudan III, para avaliação do percentual intracelular de inclusões lipídicas. Foi mensurada a área de 100 hepatócitos/animal e das respectivas inclusões lipídicas com auxílio do programa Image Pró-Plus® 4.5 (Media Cybernetics).

Todas as imagens foram capturadas na região próxima à veia central, em microscópio óptico (Nikon Eclipse®, Shimjuku, Japão) (objetiva de 40X) acoplado à câmera de alta resolução (Nikon®, Ds-Fi1c, Shimjuku, Japão), acoplado a um computador com programa computacional Q-Capture®.

2.5 Estado Oxidativo hepático

2.5.1 Preparação do tecido

Os lobos posterior direito, inferior direito e caudado do fígado foram removidos, clampeados e congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas em homogeneizador van Potter-Elvehjem com dez volumes de tampão fosfato 0.1M gelado (pH7.4) e uma alíquota foi separada como homogenato total. O restante do homogenato foi centrifugado (11.000g/15min) e o sobrenadante separado como frações solúveis do homogenato. As análises foram realizadas no Laboratório de Metabolismo Hepático.

2.5.2 Parâmetros do estado oxidativo

Proteínas do grupo carbonil: os níveis de proteínas carboniladas foram medidos em espectrofotômetro usando 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) ($\epsilon_{370} = 22.103\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e os valores expressos como nmol/(mg de proteína) [20].

TBARS: os níveis de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foram determinados por espectrofotômetro (502nm) como descrito por Buege e Aust [22]. Curvas padrão foram preparadas com 1,1',3,3'-tetraetoxipropano e os valores foram expressos como nmol/(mg de proteína).

Atividades enzimáticas da catalase e superóxido dismutase (SOD): a atividade da catalase foi estimada medindo a mudança na absorbância a 240nm usando H_2O_2 como substrato e expressa como mmol (min x mg de proteína) [22]. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi estimada pela sua capacidade de inibir a auto oxidação do piragalol em meio alcalino. Esse último foi medido em 420nm [23]. Uma unidade de SOD foi considerada a quantidade de enzima capaz de promover 50% de inibição da oxidação do piragalol e os resultados foram expressos em unidade/(mg de proteína).

A proteína total foi avaliada no homogenato total e no sobrenadante usando o reagente Folin fenol [24].

2.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados em R (versão 4.3.1) utilizando os pacotes lme4, multcomp e car. Para todas as análises, foi aplicado a análise de variância *one-way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey e expressos em média $\pm$ desvio padrão. Em todos os casos, o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. Resultados

3.1 Consumo alimentar e massa corporal

A figura 1 apresenta uma linha temporal da média de consumo alimentar pelos animais durante o experimento. Cada cor representa um grupo, sendo elas: amarelo = G0; vermelho = G14; roxo = G42; verde = G70; rosa = G70/0.

Durante o período experimental, de 100 dias, é possível notar que todos os animais mantiveram uma taxa semelhante de consumo alimentar. Qualitativamente, o grupo que recebeu 0% de glúten apresentou maior consumo alimentar, seguido do grupo que recebeu alimentação com 70% de glúten de trigo por 70 dias e nos últimos 30 dias recebeu 0% de glúten. Nesse último grupo, o gráfico aponta que houve um possível período de adaptação entre a troca de ração, em que ocorreu um declínio no consumo e posterior reestabelecimento dos parâmetros anteriormente apresentados.

No início do experimento, o grupo que recebeu 14% de glúten foi o que apresentou a menor taxa de consumo. Entretanto, em torno dos 50 dias de experimento (70 dias de vida animal), os valores do grupo que recebeu 42% de glúten se ajustaram ao grupo controle até o final do experimento. Os valores apontados pelo grupo que recebeu 70% de glúten se manteve intermediário aos valores do conjunto G0 e G70/0, que indicaram maior consumo alimentar, e do conjunto G14 e G42 que indicaram menor consumo alimentar.

A figura 2 apresenta o ganho de massa corporal semanal entre os grupos experimentais. Cada cor representa um grupo, sendo elas: amarelo = G0; vermelho = G14; roxo = G42; verde = G70; rosa = G70/0.

Os grupos G70 e G70/0 apresentaram maior ganho exponencial de massa corporal. Entretanto, nas últimas semanas de experimento, o grupo que recebeu ração com 70% de glúten durante os primeiros 70 dias e nos últimos 30 dias recebeu ração 0%, apontou que ocorreu um

grau de estabilização no ganho de massa corporal, possivelmente devido à troca de composição da ração.

Os animais que receberam ração com 42% e 0% de glúten obtiveram ganhos de massa semelhantes. Mesmo que o G42 comparado a G0 tenha mantido níveis um pouco mais elevados durante o período experimental, ao final, ambos finalizaram com a mesma média de massa corporal final (Tabela 3). Os animais do grupo controle, que receberam 14% de glúten de trigo, adquiriram durante todo o experimento menor ganho de massa corporal entre todos os grupos.

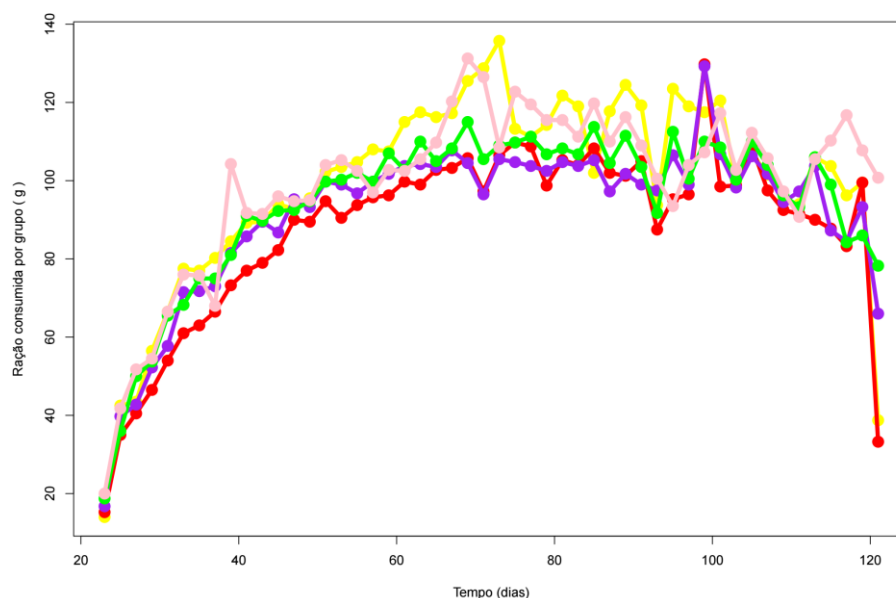


Figura 1. Evolução do consumo de ração (g) por grupo durante o período experimental, expresso em dias de vida, em ratos alimentados com diferentes níveis de glúten (trigo) apresentados como 0% (G0 - amarelo), 14% (G14 - vermelho), 42% (G42 - roxo), 70% (G70 - verde) e 70% por 70 dias e 0% por 30 dias (G70/0 - rosa). Resultados expressos em média. (n=9-10/grupo).

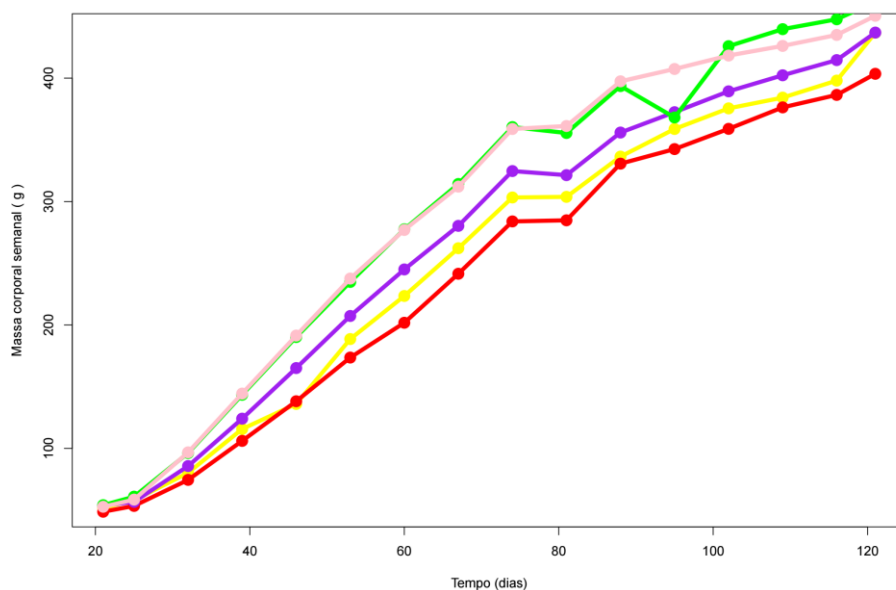


Figura 2. Evolução da massa corporal semanal (g) expresso em dias de vida, em ratos alimentados com diferentes níveis de glúten (trigo) apresentados como 0% (G0 - amarelo), 14% (G14 - vermelho), 42% (G42 - roxo), 70% (G70 - verde) e 70% por 70 dias e 0% por 30 dias (G70/0 - rosa). Resultados expressos em média. (n=9-10/grupo).

3.2 Parâmetros biométricos

A Tabela 3 apresenta os dados obtidos no último dia de experimento, para avaliação dos parâmetros biométricos dos ratos em jejum. A massa corporal final exibiu um aumento significativo nos grupos G70 e G70/0 em relação ao grupo G14, complementando o que foi ilustrado no Gráfico 2. Resultados semelhantes foram encontrados nos valores de comprimento nasoanal, onde houve aumento significativo nos grupos G70 e G70/0 em relação ao G14. Entretanto, também houve um decréscimo significativo do G14 em relação ao G0. A massa do fígado foi significativamente menor nos grupos que receberam sobrecarga de glúten (G70 e G70/0) em relação ao G0. O índice de Lee e o IMC não resultaram em diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Tabela 3. Parâmetros biométricos (g): massa corporal final (MCF), comprimento nasoanal (CNA), massa do fígado/100g de massa corporal (MF/100g), índice de Lee (IL) e índice de massa corporal (IMC) de ratos alimentados com diferentes níveis de glúten (trigo) apresentados como 0% (G0), 14% (G14), 42% (G42), 70% (G70) e 70% por 70 dias e 0% por 30 dias (G70/0).

	G0	G14	G42	G70	G70/0
MCF	436.78 ± 23.75	403.50 ± 29.84	436.90 ± 52.23	461.78 ± 39.73 ^b	450.50 ± 21.62 ^b
CNA	24.50 ± 0.35	23.60 ± 0.84 ^a	24 ± 0.58	24.39 ± 0.42 ^b	24.40 ± 0.52 ^b
MF/100g	3.78 ± 0.29	3.58 ± 0.18	3.54 ± 0.32	3.41 ± 0.21 ^a	3.38 ± 0.15 ^a
IL	3.09 ± 0.05	3.13 ± 0.06	3.16 ± 0.10	3.17 ± 0.09	3.14 ± 0.06
IMC	0.73 ± 0.03	0.73 ± 0.03	0.76 ± 0.08	0.78 ± 0.06	0.76 ± 0.04

One-way ANOVA seguido de pós teste de Tukey, expressos em média ± desvio padrão. (n=9-10/grupo). ^a p<0.05 vs. G0; ^b p<0.05 vs. G14.

3.3 Tecido adiposo

Embora tenham sido obtidas diferenças significativas entre as massas corporais finais e comprimentos nasoanais nos diferentes grupos, não houve diferença significativa, independente do grupo experimental, sobre a massa do tecido adiposo mesentérico, retroperitoneal, periepididimal, inguinal e no índice de adiposidade (Tabela 4).

3.4 Parâmetros bioquímicos

Os resultados obtidos a partir das análises bioquímicas sanguíneas estão descritos na Tabela 5. O valor das proteínas totais e da albumina se mantiveram constantes em todos os

grupos, indicando que independentemente do nível de glúten estabelecido na ração, todas foram caracterizadas como normoproteicas.

O colesterol total apresentou um decréscimo significativo nos grupos G14 e G70/0 em relação ao grupo que recebeu apenas ração com 0% de glúten. Na análise do triglicerídeos, foi possível observar um aumento significativo nos níveis do grupo G42 em relação ao grupo controle. Os indicadores de lesão hepática, transaminases (TGO e TGP) e gama glutamil transferase (GGT), não diferiram significativamente entre os grupos, indicando que não houve lesão tecidual.

Tabela 4. Tecido adiposo (g/100g de massa corporal): mesentérico (ME), retroperitoneal (RP), periepídidimo (PE), inguinal (IG) e índice de adiposidade (IA) de ratos alimentados com diferentes níveis de glúten (trigo) apresentados como 0% (G0), 14% (G14), 42% (G42), 70% (G70) e 70% por 70 dias e 0% por 30 dias (G70/0).

	G0	G14	G42	G70	G70/0
ME	0.90 ± 0.22	1.09 ± 0.34	1.13 ± 0.29	0.96 ± 0.31	1.04 ± 0.26
RP	2.95 ± 0.31	3.03 ± 0.33	3.11 ± 0.48	3.24 ± 0.20	3.13 ± 0.35
PE	2.11 ± 0.33	2.63 ± 0.54	2.62 ± 0.50	2.18 ± 0.55	2.61 ± 0.44
IG	2.85 ± 0.41	2.55 ± 0.68	2.70 ± 0.51	2.72 ± 0.44	2.73 ± 0.55
IA	8.81 ± 0.98	9.32 ± 1.76	9.56 ± 1.50	9.10 ± 1.06	9.51 ± 1.36

One-way ANOVA seguido de pós teste de Tukey, expressos em média ± desvio padrão. (n=9-10/grupo).

Tabela 5. Parâmetros bioquímicos sanguíneos: proteína total (PT) (g/dL), albumina (g/dL), colesterol total (CT) (mg/dL), triglicerídeos (TG) (mg/dL), transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) (U/L), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) (U/L) e gama glutamil transferase (GGT) (U/L) de ratos alimentados com diferentes níveis de glúten de trigo apresentados como 0% (G0), 14% (G14), 42% (G42), 70% (G70) e 70% por 70 dias e 0% por 30 dias (G70/0).

	G0	G14	G42	G70	G70/0
PT	5.68 ± 0.42	5.59 ± 0.34	5.63 ± 0.24	5.82 ± 0.92	5.65 ± 0.23
Albumina	2.62 ± 0.21	2.43 ± 0.22	2.48 ± 0.23	2.41 ± 0.19	2.54 ± 0.22
CT	140 ± 38.78	107.38 ± 11.38 ^a	119.46 ± 34.40	115.26 ± 24.34	100.70 ± 14.33 ^a
TG	209.50 ± 50.17	179.29 ± 68.31	268.71 ± 81.27 ^b	244.50 ± 102.92	241.50 ± 72.07
TGO	81.29 ± 11.80	96 ± 22.63	93.86 ± 11.98	88.29 ± 35.90	78.57 ± 11.44
TGP	45 ± 13.56	61.29 ± 13.03	54.57 ± 15.06	48.71 ± 16.06	61 ± 17.74
GGT	2.14 ± 1.46	2.14 ± 1.46	1.14 ± 1.07	2.29 ± 2.06	1.43 ± 0.98

One-way ANOVA seguido de pós teste de Tukey, expressos em média ± desvio padrão. (n=7/grupo). ^a p<0.05 vs. G0; ^b p<0.05 vs. G14.

3.5 Análises morfológicas e morfométricas

Macroscopicamente o fígado de animais alimentados com rações contendo sobrecarga nos níveis de glúten de trigo (G70 e G70/0) apresentaram estriações e pontos esbranquiçados.

Microscopicamente mantiveram a organização histológica padrão, não sendo observado indícios de fibrose, agregados inflamatórios ou necrose tecidual (Figuras 3b e 3d), contudo a deposição lipídica (vacuolização) se apresentou acentuada nos grupos com excesso e sobrecarga de glúten (G42, G70 e G70/0).

Os valores para o número de hepatócitos foram obtidos em uma área útil de 57510.05 μm^2 em 50 imagens/animal, capturadas próximo a veia central. Houve aumento significativo do número de hepatócitos em todos os grupos que receberam glúten (G14, G42, G70 e G70/0) em relação ao G0 e redução do número médio de hepatócitos nos grupos G42 e G70 com relação ao controle (G14). O grupo que recebeu 70% de glúten de trigo até 91 dias de vida e ração isenta de glúten até a eutanásia revela aumento significativo com relação ao G42 (Figura 3a).

De maneira oposta aos resultados obtidos para o número, a área celular dos hepatócitos apresentou redução significativa em todos os grupos que receberam glúten (G14, G42, G70 e G70/0) em relação ao G0; aumentou no grupo G42 em relação ao G14; e obteve decréscimo nos grupos G70 e G70/0 em relação ao G42 (Figura 3c). Assim, níveis crescentes de glúten na ração promovem aumento no número de hepatócitos e redução na área celular (perfil).

O percentual de glicogênio tecidual e percentual lipídico intracelular obtidos nos diferentes grupos estão apresentados nas Figuras 3e e 3g, respectivamente. Os resultados obtidos para glicogênio são diretamente proporcionais aos obtidos na área celular hepática. Houve redução significativa em todos os grupos que receberam glúten (G14, G42, G70 e G70/0) em relação ao G0; aumento no grupo alimentado com 42% de glúten em relação ao grupo controle; e decréscimo nos grupos G70 e G70/0 em relação ao G42. A Figura 3f evidencia a presença de glicogênio tecidual por meio da reação histoquímica PAS.

As inclusões lipídicas presentes em hepatócitos foram estimadas por meio da reação histoquímica Sudan III em cortes congelados (Figura 3h). Quanto maior a concentração de glúten presente na ração, maior foi a concentração de lipídios presente nos hepatócitos. Houve aumento significativo dos grupos G14, G42, G70 e G70/0 em relação ao G0; em relação ao grupo controle também houve aumento significativo nos grupos G42, G70 e G70/0; e, por fim, nos grupos G70 e G70/0 houve acréscimo significativo em relação ao grupo que foi alimentado com 42% de glúten. Qualitativamente, a maior deposição de lipídeos foi observada nos fígados dos grupos com 42% e 70% de concentração de glúten na ração em relação ao G0 e G14. Entre os grupos G70 e G70/0 não houve diferença significativa (Figura 3g).

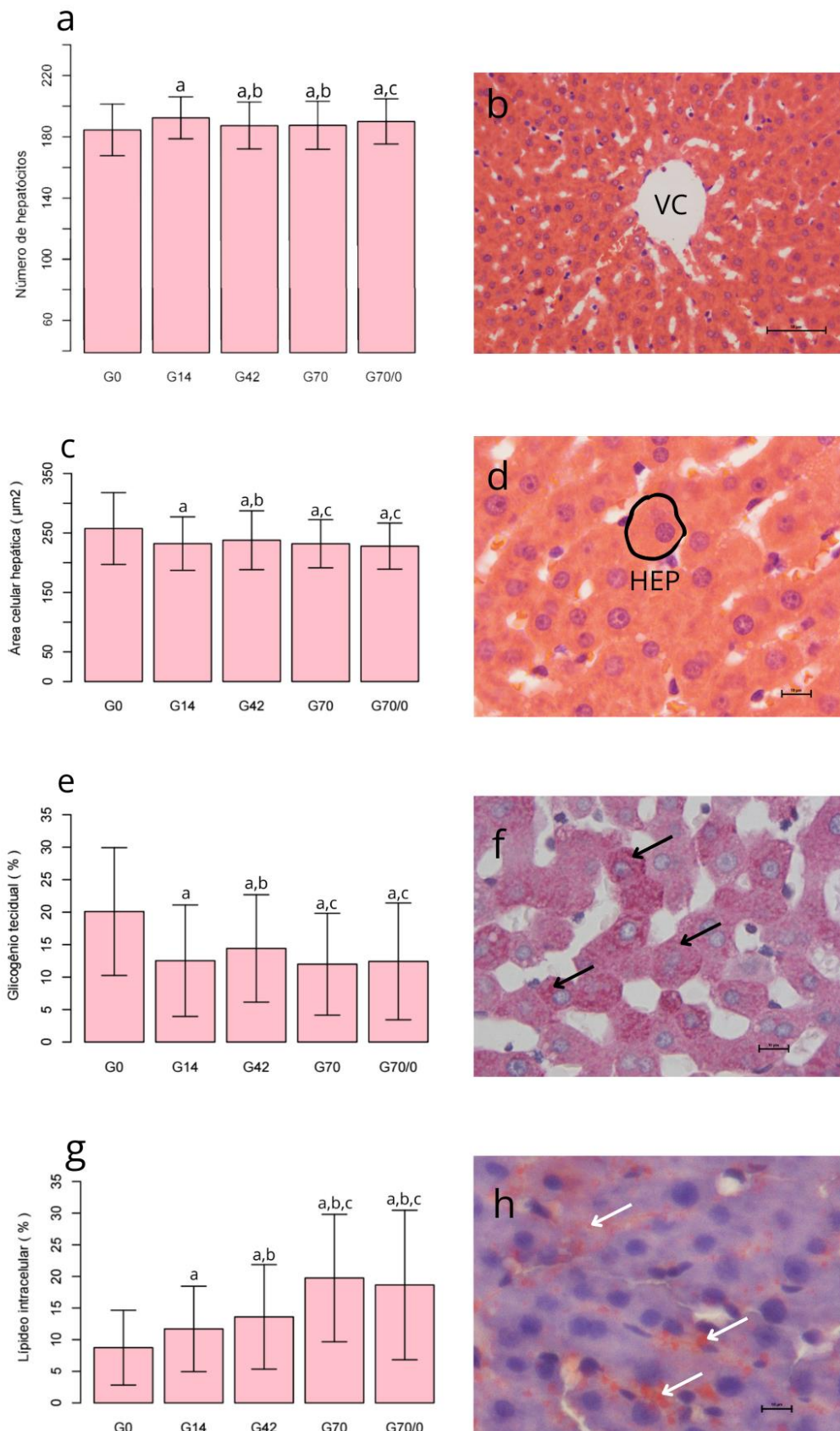


Figura 3. Análises histológicas e fotomicrografias do fígado: **(a)** Número de hepatócitos avaliados em uma área útil de $57510.05 \mu\text{m}^2$ em 50 imagens/animal. **(b)** Cordões de hepatócitos e sinusoides convergindo em direção à veia central (VC), coloração HE, objetiva de 40X, barra= $50\mu\text{m}$. **(c)** Área celular hepática mensurada em 100 hepatócitos/animal, expresso em μm^2 . **(d)** Demarcação da área dos hepatócitos (HEP), coloração HE, objetiva de

100X, barra= 10 μ m. (e) Glicogênio hepático avaliado em uma área útil de 57510.05 μ m² em 50 imagens/animal, expresso em %. (f) Reação histoquímica PAS evidenciando o glicogênio tecidual (seta preta), objetiva de 100X, barra=10 μ m. (g) Lipídeo intracelular mensurado em 100 hepatócito/animal, expresso em %. (h) Reação histoquímica Sudan III para evidênciação de lipídeo intracelular (seta branca), objetiva de 100X, barra= 10 μ m, de ratos alimentados com diferentes níveis de glúten (trigo) apresentados como 0% (G0), 14% (G14), 42% (G42), 70% (G70) e 70% por 70 dias e 0% por 30 dias (G70/0). Dados submetidos à análise de variância *one-way* ANOVA seguido de pós teste de Tukey, expressos em média $\pm$ desvio padrão. (n=8-10/grupo). ^a p<0.05 vs. G0; ^b p<0.05 vs. G14; ^c p<0.05 vs. G42.

O estroma hepático foi analisado pela reação histoquímica Picro Sirius Red com o auxílio de luz polarizada, sendo diferenciado o colágeno tipo I (vermelho) e colágeno III (verde) (Figura 4b). O percentual total de fibras colágenas (tipo I + tipo III) obtido na mesma área útil no tecido hepático resulta em redução significativa no grupo controle (G14) em relação ao demais grupos (Figura 4a).

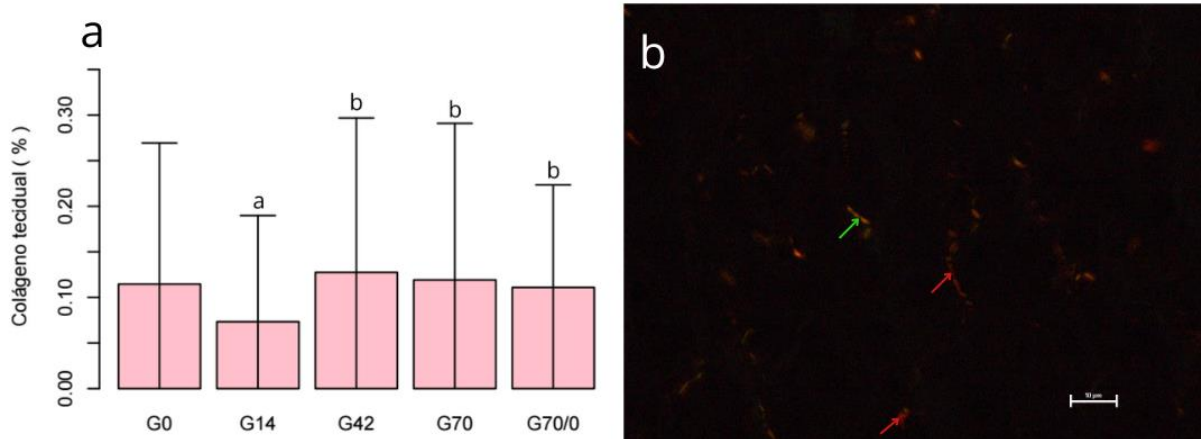


Figura 4. Colágeno tecidual total: (a) Colágeno tecidual avaliado em uma área útil de 57510.05 μ m² sob luz polarizada em 50 imagens/animal, expresso em % (b) Fotomicrografia de fígado, reação histoquímica Picro Sirius Red evidenciando fibras colágenas tipo I (seta vermelha) e colágeno tipo III (seta verde), objetiva de 100X, barra= 10 μ m de ratos alimentados com diferentes níveis de glúten (trigo) apresentados como 0% (G0), 14% (G14), 42% (G42), 70% (G70) e 70% por 70 dias e 0% por 30 dias (G70/0). Dados submetidos à análise de variância *one-way* ANOVA seguido de pós teste de Tukey, expressos em média $\pm$ desvio padrão. (n=9-10/grupo). ^a p<0.05 vs. G0; ^b p<0.05 vs. G14.

3.6 Estado Oxidativo

Os indicadores de estresse oxidativo tecidual hepático, proteínas carboniladas e TBARS, nos diferentes grupos estão apresentados nas Figuras 5a e 5b, respectivamente. Para as proteínas carboniladas (Figura 5a) constatou-se aumento significativo em todos os grupos que continham glúten na ração (G14, G42, G70 e G70/0) em relação ao grupo isento (G0). A ração com maior nível de glúten (G70) também foi a que apresentou maior concentração de proteínas carboniladas, diferindo inclusive do grupo G14. A retirada de glúten na ração por 30

dias no grupo G70/0, leva a diminuição significativa desse indicador em relação aos grupos G42 e G70, sugerindo um efeito positivo.

A Figura 5b, que exibe os resultados da análise de TBARS, mostra que houve aumento significativo dos grupos G14, G42 e G70 em relação ao G0, simultaneamente ao decréscimo dos níveis do grupo G70/0 em relação ao G70.

As figuras 5c e 5d apresentam a atividade antioxidante hepática das enzimas catalase e SOD nos diferentes grupos. O ensaio da catalase mostrou que os grupos G42 e G70 obtiveram diminuição significativa em relação aos grupos G0 e G14, enquanto o grupo G70/0 obteve aumento significativo em relação aos grupos G42 e G70. Os resultados da superóxido dismutase (SOD) revelam que houve apenas a diminuição significativa dos grupos G42 e G70 em relação ao G0.

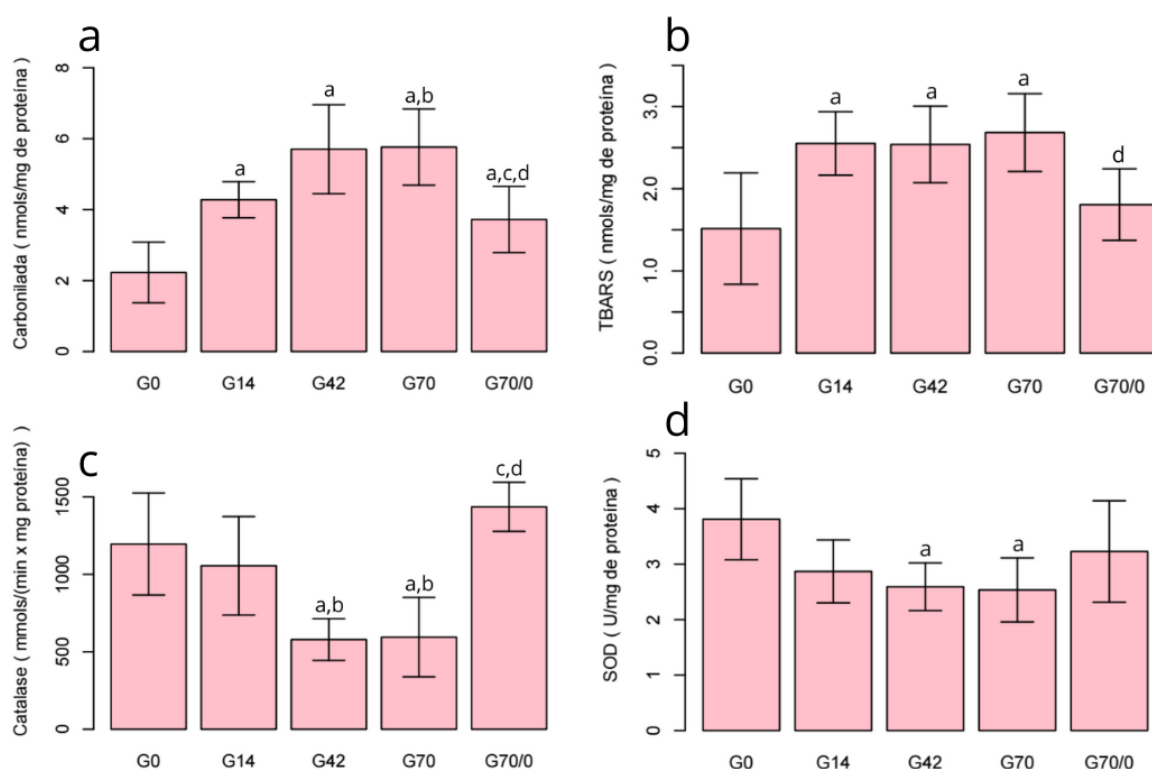


Figura 5. Estado oxidativo: (a) Proteína carbonilada expressa em nmols/mg de proteína. (b) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) expresso em nmols/mg de proteína. (c) Catalase expressa em mmols/(min x mg de proteína). (d) Superóxido dismutase (SOD) expressa em U/mg de proteína do fígado de ratos alimentados com diferentes níveis de glúten de trigo apresentados como 0% (G0), 14% (G14), 42% (G42), 70% (G70) e (G70/0) 70% por 70 dias e 0% por 30 dias. Análise de variância *one-way* ANOVA seguido de pós teste de Tukey, expressos em média $\pm$ desvio padrão. (n=5-7/grupo). ^a p<0.05 vs. G0; ^b p<0.05 vs. G14; ^c p<0.05 vs. G42; ^d p<0.05 vs. G70.

4. Discussão

A sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG) é caracterizada por sintomas intestinais e extraintestinais causados após a ingestão de glúten na dieta por indivíduos que não apresentam o diagnóstico de doença celíaca ou alergia ao trigo [25]. Dessa forma, a abrangência do conhecimento envolvendo dietas sem glúten vem crescendo rapidamente ao longo dos anos, sendo principalmente impulsionado pela grande mídia e a indústria médica, justificada pela associação direta da ingestão de glúten com quadros de diarreia, vômito, constipação intestinal e entre outros [25,26].

Em razão disso, pesquisadores alertam sobre eminentes preocupações nutricionais em relação a retirada completa de glúten da dieta, incluindo deficiência de nutrientes, como vitaminas do complexo B, minerais e fibras, e que de forma compensatória eleva o consumo de ácidos graxos saturados e hidrogenados e alto teor de carboidratos, proporcionando aumento do índice glicêmico [27,28]. Contudo, os cereais, por exemplo o trigo, ainda são muito consumidos em todo o mundo, principalmente na alimentação da região do Mediterrâneo, que é considerada a dieta mais saudável existente [29].

Tendo em vista que a composição do glúten de trigo é estimada em cerca de 85% de carboidratos, 9-18% de proteínas e 3-4% de lipídeos [30], a padronização da ração produzida para este experimento equivale a 14% de glúten de trigo. A tabela 1, por meio de análise calorimétrica (LANA-DZO-UEM), apresenta os seguintes valores nutricionais para a dieta padrão: 75.4% de carboidratos, 14.1% de proteínas e 4% de lipídeos. Desta forma, de acordo com Christoffolette e Moriscot [31], a ração utilizada é normoproteica, pois não ultrapassou os níveis de até 80% de carboidratos e 19% de proteínas, foi eficaz em manter o ganho de peso dos animais, e hipercalórica, pois apresentou mais que 1% de lipídeos.

Em um processo de alimentação, a exigência de energia metabolizável precisa ser adequada, pois a eficiência da energia ingerida (energia bruta) é utilizada como regulador de funções vitais dos animais (energia líquida), ou seja, as necessidades energéticas interferem diretamente na quantidade de alimento ingerido [32]. Os animais que receberam alimentação com dieta padrão (14%) apresentaram, qualitativamente, o menor consumo alimentar, comprovando que a ração possui potencial de fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento e manutenção dos animais. Por outro lado, os grupos que exibiram o maior consumo alimentar foi o grupo isento de glúten (G0), seguido do grupo que recebeu alimentação com 70% de glúten de trigo por 70 dias e isenção de glúten até a eutanásia (G70/0).

De acordo com Bektaş e colaboradores [29], estudos indicam que 65% dos americanos consideravam que a dieta sem glúten era mais saudável, e 27% deles presumiam que a eliminação do glúten da dieta acarretava em perda de peso. Entretanto, na literatura não há evidências suficientes que associem a ingesta de glúten com o desenvolvimento da obesidade em camundongos [33]. Nossos resultados indicam consonância com o descrito, uma vez que não houve diferença entre a massa corporal dos animais alimentados com total isenção de glúten (G0) em relação aos que receberam glúten considerado padrão na dieta de roedores (14%) e em excesso (42%), apesar do maior consumo alimentar no grupo G0.

Entretanto, o grupo de animais que receberam 70% de glúten na ração, ou seja, uma sobrecarga de glúten, apresenta uma resposta diferenciada com relação a dieta padrão (14%), com aumento significativo da massa corporal final e comprimento nasoanal, além de maior consumo alimentar, IMC e Índice de Lee ($p>0.05$). Resultados distintos foram obtidos por Bektaş et al. [29], onde ratos Wistar que receberam ração padrão suplementada com 12% de glúten de trigo, não diferiram na massa corporal final e nem no consumo alimentar.

O grupo G70/0 avalia a resposta dos animais a uma situação de sobrecarga de glúten por 70 dias e substituição por uma dieta isenta de glúten por 30 dias. Constatou-se comportamento semelhante ao G70 nos parâmetros citados, possivelmente devido ao curto período de isenção, impedindo a reversão do quadro.

Houve manutenção da massa hepática associada ao teor de glúten na ração, 0%, 14% ou 42%. Resultados semelhantes foram obtidos por Liang et al. [34] para cobaias alimentadas com glúten (dieta padrão) e sem glúten por cinco semanas. Entretanto a sobrecarga de glúten (G70 e G70/0) promoveu redução significativa da massa do fígado quando comparado ao grupo G0.

Dos quatro depósitos de tecido adiposo avaliados (mesentérica, periepídidimal, retroperitoneal e inguinal), nenhum deles apresentou diferenças significativas entre os grupos. Consequentemente, o índice de adiposidade também foi mantido. Esta resposta pode estar associada a manutenção da massa corporal final dos grupos com isenção de glúten, controle e excesso de glúten. A sobrecarga de glúten (70%), apesar de resultar em maior massa corporal final, não interferiu na adiposidade. Não avaliamos o tecido adiposo subcutâneo. Freire et al. [33], obtiveram aumento no depósito de tecido adiposo subcutâneo em camundongos não obesos alimentados durante oito semanas com ração padrão de roedores acrescido de 4,5% de glúten, e relacionou a um possível efeito direto sobre esse tecido e também sobre fatores pró-inflamatórios.

A análise do perfil lipídico indica que o nível de glúten na ração interfere no nível de colesterol total e triglicerídeos. O colesterol total, desempenha papel importante no diagnóstico de várias doenças, inclusive hepáticas [35]. Animais alimentados com ração isenta de glúten apresentaram o maior nível de colesterol entre todos os grupos. Atribuímos esse fato devido a inclusão de farelo de arroz, componente que substituiu o glúten, pois contém um alto teor de carboidratos, chegando a 30% de amido, e cerca de 15% de fibras [36]. O farelo de arroz é gerado através da separação entre a casca e o grão, e sua formação consiste principalmente de lignina e sílica, gerando um valor nutricional muito baixo [36].

Os grupos que receberam maiores níveis de glúten, G42, G70 e G70/0 também apresentaram maiores níveis de triglicerídeos, de forma significativa entre G42 e G14. Todo o alimento ingerido, quando não consumido é convertido em triglicerídeo e armazenado em adipócitos e, através da ação hormonal, pode ser usado como fonte de energia [35]. Importante destacar que os valores para colesterol total e triglicerídeos de todos os grupos não se enquadram nos valores de referência para ratos Wistar adultos [37], indicando que a ração oferecida a todos os animais interfere negativamente no perfil lipídico. Ressaltamos que, esse fato não repercutiu sobre os depósitos de tecido adiposo avaliados e sobre o índice de adiposidade.

Não houve influência dos níveis de glúten sobre os parâmetros sanguíneos, proteína total (PT), albumina, transaminases hepáticas (glutâmico-oxalacética – TGO e glutâmico-pirúvica – TGP) e gama glutamil transferase (GGT). Com relação a PT e albumina, os resultados são condizentes com os componentes presentes nas rações normoproteicas produzidas (Tabela 1).

As transaminases TGO e TGP são enzimas encontradas principalmente no fígado sendo de valiosa ajuda no diagnóstico de distúrbios hepáticos [38]. Existe forte relação dos níveis aumentados de TGO e a presença de fibrose hepática [39]. Os resultados obtidos para TGO não foram significativos ($p > 0.05$), contudo, houve uma forte tendência para níveis mais elevados nos grupos alimentados com glúten em relação ao grupo isento de glúten. O nível de TGP também não mostrou diferença significativa entre os grupos, entretanto, o grupo controle apresentou valores maiores em relação aos grupos G0, G42 e G70. Ressalte-se que, apesar de variações quantitativas, tanto TGO quanto TGP encontram-se dentro dos valores de referência para ratos Wistar [37].

Assim como as transaminases, GGT também é uma enzima hepática presente nos túbulos renais, pâncreas e intestino. Todos os indícios da presença de doenças hepáticas,

independente da causa, pode ser responsável pela alteração dos níveis séricos da GGT, sendo principalmente associado a níveis de fibrose [40].

Os níveis séricos de GGT não diferiram entre os grupos experimentais, indicando que não houve lesão tecidual hepática. Resultados similares foram observados por Ozuna e Barro [28], que compararam níveis crescentes de gliadina (componente proteico do glúten) na ração de ratos, sem obter diferenças significativas nas transaminases TGO, TGP e na GGT.

O fígado é o órgão central envolvido no metabolismo, armazenamento de nutrientes e desintoxicação, exercendo um papel importante como regulador da imunidade inata e adaptativa. Componentes presentes no sangue portal, como elementos vindos do intestino (incluindo peptídeos derivados do glúten) e produtos bacterianos, podem, sob condições específicas, desencadear respostas imunológicas associadas à inflamação e fibrose hepática [13].

A alimentação com níveis elevados de glúten de trigo interfere na organização histológica padrão hepática. O fígado de animais alimentados com sobrecarga de glúten apresentou pontos e estriações esbranquiçadas. Microscopicamente, os cordões de hepatócitos com núcleos centrais intercalados por sinusoides que convergiam em direção à veia central (Figura 3b), foram mantidos. Não foram observados infiltrados de células inflamatórias, porém visível deposição de lipídios intracelular nos grupos G42, G70, G70/0.

Constatamos relação da ingesta de ração com glúten sobre a morfometria do tecido hepático. A análise do lobo médio do fígado de animais que receberam glúten, independentemente do nível, revelou aumento significativo do número de hepatócitos e redução no perfil celular em relação ao grupo isento de glúten. Esse efeito encontra consonância na massa hepática, ou seja, a presença de glúten na ração, resulta em fígados menores, com maior número e menor área de hepatócitos. Essa resposta pode ser caracterizada como um mecanismo de compensação, onde a taxa de proliferação está aumentada devido a um desequilíbrio no processo de metabolização dos peptídeos vindos da alimentação, atuando como um agente estressor. Respostas semelhantes de adaptação morfométrica (número e perfil) de hepatócitos de ratos que receberam suplementação alimentar, com o peso do órgão, também foram descritas por Azevedo e colaboradores [41].

As inclusões hepáticas de glicogênio e lipídios foram determinadas por meio das reações histoquímicas PAS e Sudan III, respectivamente. Houve semelhança com os resultados obtidos para a área celular, onde menor percentual de glicogênio tecidual foi encontrado nos fígados de animais que receberam glúten na dieta. Os níveis de glicogênio são influenciados pelo estado

nutricional do animal, determinando a via metabólica em que ele será utilizado [42]. Portanto, níveis menores dessa reserva energética poderiam estar relacionados a um aumento da via glicogenolítica, onde os estoques de glicogênio são transformados em glicose e usados como energia.

Houve aumento significativo das inclusões lipídicas nos hepatócitos de animais que receberam glúten em relação ao grupo isento, sendo possível inferir que há relação direta entre a alimentação com essa proteína e o estoque de lipídeos que são armazenados nos hepatócitos. Essa associação é sustentada pela resposta com relação ao nível de glúten, uma vez que houve aumento significativo dos grupos que receberam excesso (42%) e sobrecarga (70%) de glúten de trigo em relação ao grupo controle (14%). Resultados semelhantes foram obtidos no fígado de camundongos que receberam glúten, onde os hepatócitos continham grandes gotículas de lipídeos, típico de esteatose hepática [43].

A fibrose hepática leve é uma das alterações mais comuns encontradas em pacientes com doença celíaca [44]. Entretanto, em nosso modelo experimental de Sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG) e corroborando com os resultados obtidos através das análises bioquímicas (TGO, TGP e GGT), não há sinais de fibrose no fígado de animais isentos ou alimentados com diferentes níveis de glúten de trigo. Apesar do baixo percentual (<0.50%) de fibras colágenas dos tipos I e III no estroma hepático, em todos os grupos, foi observada redução significativa no grupo controle (G14) em relação aos demais grupos. O grupo G70 e G70/0 se mantiveram semelhantes.

A adição de glúten crescente na alimentação provoca aumento do estresse oxidativo no fígado de ratos. Houve aumento significativo dos níveis da proteína carbonilada (pró-oxidante) nos grupos que receberam glúten em relação ao grupo G0. Em relação ao grupo controle (14%), o grupo que recebeu sobrecarga de glúten (70%), apresentou aumento significativo. O grupo G70/0 foi significativamente menor em relação aos grupos que receberam excesso e sobrecarga de glúten, tendendo a se equivaler com os níveis do G0.

Em relação ao TBARS (pró-oxidante), também se constatou aumento nos níveis para os grupos que receberam glúten em relação ao grupo isento. O grupo controle não diferiu dos demais e manteve níveis semelhantes ao grupo que recebeu 42% de glúten de trigo. O grupo G70/0 apresentou redução significativa em relação ao grupo que recebeu apenas 70% de glúten na alimentação, corroborando com os resultados das proteínas carboniladas e tendendo a igualar-se com os níveis de G0. O TBARS elevado e a mudança do equilíbrio celular pró-oxidante/antioxidante podem afetar a proliferação celular, diferenciação ou respostas

apoptóticas e perturbar a homeostase do tecido [14]. Portanto, consideramos possível efeito do TBARS em estimular a proliferação celular ter atuado sobre o aumento do número de hepatócitos nos grupos que receberam glúten.

Como previsto, houve menor atividade das enzimas antioxidantes (catalase e SOD) nos animais que receberam glúten na ração. A catalase apresentou redução significativa dos grupos G42 e G70 em relação aos grupos G0 e G14, indicando uma relação direta entre aumento de glúten na ração e a redução da atividade antioxidante. O grupo G70/0 foi o grupo que obteve maior atividade da catalase, sendo significativamente maior em relação aos grupos que receberam excesso (42%) e sobrecarga (70%) de glúten.

O grupo G0 apresentou maior atividade da SOD em relação aos demais grupos, entretanto foi significativo apenas em relação aos grupos G42 e G70. O grupo controle não diferiu dos demais grupos. O grupo que recebeu sobrecarga de glúten de trigo durante 70 dias e isenção de glúten até a eutanásia não diferiu do grupo que recebeu apenas 70% de glúten, contudo, apresentou níveis maiores e propensão a se adequar aos níveis de G0.

Há clara interferência nos níveis de glúten de trigo na ração com relação ao estado oxidativo tecidual. Segundo Aguilar et al. [45], o consumo de glúten de trigo provoca a esteatose hepática em camundongos obesos, exacerbando a inflamação, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a peroxidação lipídica, além de reduzir a atividade das enzimas SOD e catalase. Consideramos que quando o glúten foi removido da ração (G70/0), o estresse oxidativo no fígado também diminuiu, uma vez que houve redução dos níveis de TBARS e das proteínas carboniladas, e aumento da atividade da enzima antioxidante catalase. Neste contexto, a retirada do glúten da dieta poderia levar à redução do estresse oxidativo do órgão por nós verificado.

Com base no delineamento experimental realizado, a utilização de rações com isenção e níveis crescentes de glúten não elevou o índice de adiposidade, porém apresentou influência sobre a massa corporal e hepática, na morfofisiologia e estado oxidativo hepático. Não foram detectados indícios de injúria hepática através das análises das transaminases e gama-glutamina-transferase ou indícios de fibrose tecidual.

5. Conclusão

O modelo de Sensibilidade não Celíaca ao Glúten (SNCG) tem efeito negativo sobre a morfofisiologia hepática gerando aumento do estresse oxidativo. Maior nível de glúten na ração

(70%) resulta em fígados menores, com redução na área de hepatócitos, aumento no número de células e percentual de lipídeos intracelulares.

Apoio Financeiro

O desenvolvimento deste projeto só foi possível devido ao suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - brasil (capes) - código de financiamento 001. À Cocamar Cooperativa Agroindustrial das cidades de Maringá – PR e Marialva – Pr (COCAMAR) e Nutrimilho Indústria e Comércio de Alimentos Ltda pela disponibilização de insumos para o preparo da ração. Ao apoio técnico dos laboratórios de Engenharia de Alimentos, Fisiologia, Histotécnica Animal e Análises de Alimentos e Nutrição Animal (LANA) da Universidade Estadual de Maringá.

Referências

1. Cenni, S.; Sesenna, V.; Boiardi, G.; Casertano M.; Russo, G.; Reginelli, A.; Esposito, S.; Strisciuglio, C. The role of gluten gastrointestinal disorders: a review. *Nutrients* **2023**, *15*, 1-15. DOI: 10.3390/nu15071615
2. Balakireva, A.V.; Zamyatnin Junior, A.A. Properties of gluten intolerance: gluten structure, evolution, pathogenicity and detoxification capabilities. *Nutrients* **2016**, *8*, 1-27. DOI: 10.3390/nu8100644
3. Garcez, D.R.; Ana, D.; Cerveira, C.; Almeida, C. (2014). O Papel da Nutrição nas Doenças Autoimunes. Artigo de revisão bibliográfica. *ICBSA* **2014**, Universidade do Porto. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/76597/2/32706.pdf>
4. Araújo, H.M.C.; Araújo, W.M.C.; Botelho, R.B.A.; Zandonadi, R.P. Doença celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. *Rev. Nutr.* **2010**, *23*, 467- 474.
5. Lebwohl, B.; Ludvigsson, J.F.; Green, P.H.R. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ* **2015**, *351*, 1-13. DOI: 10.1136/bmj.h4347
6. Kowalski, K.; Mulak, A.; Jasińska, M.; Paradowski, L. Diagnostic challenges in celiac disease. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2017**, *26*, 729-737. DOI: 10.17219/acem/62452

7. Ludvigsson, J.F.; Murray, J.A. Epidemiology of celiac disease. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **2019**, *48*, 1-18. DOI: 10.1016/j.gtc.2018.09.004
8. Medza, A.; Szlagatys-Sidorkiewicz, A. Nutritional status and metabolism in celiac disease: narrative review. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 1-12. DOI: 10.3390/jcm12155107
9. Liu, W.; Wu, Y.; Wang, J.; Wang, Z.; Gao, J.; Yuan, J.; Chen, H. A meta-analysis of the prevalence of wheat gluten allergy worldwide. *Nutrients* **2023**, *15*, 1-22. DOI: 10.3390/nu15071564
10. Siddiqui, U.N.; Pervaiz, A.; Khan, Z.B.; Sultana, T. Diagnostic dilemma, possible non-celiac gluten sensitivity: consideration in approach and management. *Cureus* **2022**, *14*, 1-6. DOI: 10.7759/cureus.25302
11. Mansueto, P.; Seidita, A.; D'Alcamo, A.; Carroccio A. Non-celiac gluten sensitivity: literature review. *JACN* **2014**, *33*, 39-54. DOI: 10.1080/07315724.2014.869996
12. Di Sabatino, A., Lenti, M.V., Giuffrida, P., Vanoli, A., Corazza, G. R. New insights into immune mechanisms underlying autoimmune diseases of the gastrointestinal tract. *Autoimmun. Rev.* **2015**, *14*, 1161-1169. DOI: 10.1016/j.autrev.2015.08.004
13. Hoffmanová, I.; Sánchez, D.; Tucková, L.; Tlaskalová-Hogenová, H. Celiac disease and liver disorders: from putative pathogenesis to clinical implications. *Nutrients* **2018**, *10*, 1-17. DOI: 10.3390/nu10070892
14. Moretti, S.; Mrakic-Sposta, S.; Roncoroni, L.; Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Monguzzi, E.; Branchi, F.; Ferretti, F.; Lombardo, V.; Doneda, L.; Scricciolo, A.; Elli, L. Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2018**, *9*, 1-9. DOI: 10.1038/s41424-018-0031-6
15. Remes-Troche, J.M.; Cobos-Quevedo, O.J.; Rivera-Gutiérrez, X.; Hernández, G.; Cruz-Patino, E.; Uscanga-Domínguez, L.F. Metabolic effects in patients with celiac disease, patients with nonceliac gluten sensitivity, and asymptomatic controls, after six months of a gluten-free diet. *Mex. J. Gastroenterol.* **2020**, *85*, 109-117. DOI: 10.1016/j.rgmxe.2019.02.011
16. Junqueira, L.C.; Carneiro J. *Histologia Básica*, 14 ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, Brasil, 2023.
17. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutrition* **1993**, *123*, 1939–1951. DOI: 10.1093/jn/123.11.1939
18. Nistiar, F.; Racz, O.; Lukacinova, A.; Hubkova, B.; Novakova, J.; Lovasova, E.; Sedlakova, E. Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male

- Wistar rats in controlled environment. *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard*. **2012**, 47, 1224-1233. DOI: 10.1080/10934529.2012.672071
19. Peng, M.; Tian, S.; Song, Y.; Li, C.; Miao, M.; Ren, Z. Effects of total flavonoids from *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves on polycystic ovary syndrome with insulin resistance model rats induced by letrozole combined with a high-fat diet. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, 273, 1-12. DOI: 10.1016/j.jep.2021.113947
 20. Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method. Enzymol.* **1990**, 186, 464-478.
 21. Buege, J.A.; Aust, S.D., Microsomal lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.* **1978**, 52, 302-310. DOI: 10.1016/S0076-6879(78)52032-6
 22. Bergmeyer, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd ed.; Verlag Chemie-Academic Press: Weinheim, London, England, 1974.
 23. Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **1974**, 47, 469-474. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x
 24. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265-275. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6
 25. Scarpato, E.; Auricchio, R.; Penagini, F.; Campanozzi, A.; Zuccotti, G.V.; Troncone, R. Efficacy of the gluten free diet the management of functional gastrointestinal disorders: a systematic review on behalf of the Italian Society of Pediatrics. *Ital. J. Pediatr.* **2019**, 45, 1-11. DOI: 10.1186/s13052-019-0606-1
 26. Niland, B.; Cash, B.D. Health benefits and adverse effects of a gluten-free diet in non-celiac disease patients. *Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, 14, 82-91.
 27. Dennis, M.; Lee, A.R.; McCarthy, T. Nutritional considerations of the gluten-free diet. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* **2019**, 48, 53-72. DOI: 10.1016/j.gtc.2018.09.002
 28. Ozuna, C.V.; Barro, F. Safety evaluation of transgenic low-gliadin wheat in Sprague Dawley rats: an alternative to the gluten free diet with no subchronic adverse effects. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, 107, 176-185. DOI: 10.1016/j.fct.2017.06.037
 29. Bektaş, A.; Ulusoy, M.; Özsari, L.; Özel, A.M. The effects of gluten on weight gain, hematological, biochemical and various endocrinological parameters. *Turk. J. Gastroenterol* **2024**, [epub ahead of print]. DOI: 10.5152/tjg.2024.23210

30. Sabença, C.; Ribeiro, M.; Souza, T.; Poeta, P.; Bagulho, A.S.; Igrejas, G. Wheat/gluten-related disorders and gluten-free diet misconceptions: a review. *Foods* **2021**, *10*, 1-24. DOI: 10.3390/foods10081765
31. Christoffolete, M.A.; Moriscot, A.S. Hypercaloric cafeteria-like diet induced UCP3 gene expression in skeletal muscle is impaired by hypothyroidism. *In Braz J Med Biol Res* **2004**, *37*, 923-927.
32. Moura, A.M.A. Nutrição de roedores de laboratório: paradigmas e desafios. *RESBCAL* **2014**, *2*, 288-296.
33. Freire, R.H.; Fernandes, L.R.; Silva, R.B.; Coelho, B.S.L.; Araújo, L.P.T.; Ribeiro, L.S.; Andrade, J.M.O.; Lima, P.M.A.; Araújo, R.S.; Santos, S.H.S.; Coimbra, C.C.; Cardoso, V.N.; Alvarez-Leite, J.I. Wheat gluten intake increases weight gain and adiposity associated with reduced thermogenesis and energy expenditure in an animal model of obesity. *Internat. J. Obes.* **2016**, *40*, 479-486. DOI: 10.1038/ijo.2015.204
34. Liang, T.; Tong, L.; Geng, D.; Wang, L.; Zhou, X.; Pu, H.; Jia, W.; Wu, Q.; Huang, J. Wheat gluten regulates cholesterol metabolism by modulating gut microbiota in hamsters with hyperlipidemia. *J. Oleo Sci.* **2019**, *68*, 909-922. DOI: 10.5650/jos.ess18257
35. Narwal, V.; Deswal, R.; Batra, B.; Kalra, V.; Hooda, R.; Sharma, M.; Rana, J.S. Cholesterol biosensors: a review. *Steroids* **2019**, *143*, 6-17. DOI: 10.1016/j.steroids.2018.12.003
36. Stein, H.H.; Casas, G.A.; Abelilla, J.J.; Liu, Y.; Sulabo, R.C. Nutritional value of high fiber co-products from the copra, palm kernel, and rice industries in diets fed to pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2015**, *6*, 1-9. DOI: 10.1186/s40104-015-0056-6
37. Dantas, J.A.; Ambiel, C.R.; Cuman, R.K.N.; Baroni, S.; Bersani-Amado, C.A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do biotério central da Universidade Estadual de Maringá, estado do Paraná. *Acta Sci. Health Sci.* **2006**, *28*, 165-170. DOI: 10.4025/actascihealthsci.v28i2.1099
38. Huang, X.J.; Choi, Y.K.; Im, H.S.; Yarimaga, O.; Yoon, E.; Kim, H.S. Aspartate aminotransferase (AST/GOT) and alanine aminotransferase (ALT/GPT) detection techniques. *Sensors* **2006**, 756-782.
39. Grigorescu, M. Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. *JGLD* **2006**, *15*, 149-159.
40. Giannini, E.G.; Testa, R.; Savarino, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* **2005**, *172*, 367-379. DOI: 10.1503/cmaj.1040752

41. Azevedo, S.C.S.F.; Rosa, C.V.D.; Wunderlich, A.L.M.; Wunderlich, L.A.; Mariano, I.R.; Bataglini, C.; Branquinho, N.T. D.; Raposo, S.R.; Bazotte, R.B.; Baroni, E.A.; Natali, M.R.M.; Pedrosa, M.M.D.; Godoi, V.A.F. Glutamine or glutamine dipeptide supplementation improves gluconeogenesis and liver glycogenesis in type 1 diabetic rats. *JPP* **2019**, *7*, 398-407. DOI: 10.17265/2328-2150/2019.07.005
42. Branquinho, N.T.D.; Loiola, M.S.M.; Crepaldi, L.D.; Yamada, L.A.; Azevedo, S.C.S.F.; Bataglini, C.; Brito, M.N.; Godoi, V.A.F.; Pedrosa, M.M.D.; Natali, M.R.M. Responses of the adult rat glucose metabolism to early life feeding, caloric restriction and refeeding. *J Pharm Pharmacol.* **2018**, *6*, 370-379. DOI: 10.17265/2328-2150/2018.04.008
43. Aguilar, E.C.; Fernandes-Braga, W.; Santos, E.A.; Leocádio, P.C.L.; Capettini, L.S.A.; Orellano, L.A.A.; Campos, P.P.; Lemos, V.S.; Soares, F.L.P.; Navia-Pelaez, J.M.; Alvarez-Leite, J.I. Gluten worsens non-alcoholic fatty liver disease by affecting lipogenesis and fatty acid oxidation in diet-induced obese apolipoprotein E-deficient mice. *Mol. Cell. Biochem.* **2023**, 1-13. DOI: 10.1007/s11010-023-04802-3
44. Rubio-Tapia, A.; Murray, J.A. The liver in celiac disease. *Hepatol.* **2007**, *46*, 1650-1658. DOI: 10.1002/hep.21949
45. Aguilar, E.C.; Fernandes-Braga, W.; Leocádio, P.C.L.; Campos, G.P.; Lemos, V.S.; Oliveira, R.P.; Faria, A.M.C.; Santos, A.C.L.; Alvarez-Leite, J.I. Dietary gluten worsens hepatic steatosis by increasing inflammation and oxidative stress in ApoE^{-/-} mice fed a high-fat diet. *Food Funct.* **2023**, *14*, 3332-3347. DOI: 10.1039/d3fo00149k

Anexo A



Universidade Estadual de Maringá

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "MODELO DE SENSIBILIDADE NÃO CELÍACA AO GLÚTEN: EFEITOS SOBRE A MORFOFISIOLOGIA INTESTINAL, HEPÁTICA E MUSCULAR DE RATOS WISTAR", protocolada sob o CEUA nº 4375010922 (ID 003513), sob a responsabilidade de **Maria Raquel Marçal Natali e equipe; Anne Caroline Santa Rosa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 31/10/2022.

We certify that the proposal "NON-CELIAC GLUTEN SENSITIVITY MODEL: EFFECTS ON INTESTINAL, HEPATIC AND MUSCLE MORPHOPHYSIOLOGY OF WISTAR RATS", utilizing 50 Heterogenics rats (50 males), protocol number CEUA 4375010922 (ID 003513), under the responsibility of **Maria Raquel Marçal Natali and team; Anne Caroline Santa Rosa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 10/31/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2022** a **10/2024**

Área: **Dcm-Ciências Morfológicas**

Origem: **Biotério Central da UEM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

Linhagem: **Norvegicus/linhagem**

sexo: **Machos**

idade: **21 a 121 dias**

N: **50**

Peso: **60 a 250 g**

Local do experimento: Departamento de Ciências Morfológicas: Biotério Setorial do DCM e Bloco H79 (salas 101 e 103)

Maringá, 07 de novembro de 2022

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Antonio Campanha Martinez
Coordenador Adjunto da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá



Anexo B

Type of the Paper (Article, Review, Communication, etc.)

Title

Firstname Lastname ¹, Firstname Lastname ² and Firstname Lastname ^{2,*}

¹ Affiliation 1; e-mail@e-mail.com

² Affiliation 2; e-mail@e-mail.com

* Correspondence: e-mail@e-mail.com; Tel.: (optional; include country code; if there are multiple corresponding authors, add author initials)

Abstract: A single paragraph of about 200 words maximum. For research articles, abstracts should give a pertinent overview of the work. We strongly encourage authors to use the following style of structured abstracts, but without headings: (1) Background: Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; (2) Methods: briefly describe the main methods or treatments applied; (3) Results: summarize the article's main findings; (4) Conclusions: indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article and it must not contain results that are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusions.

Keywords: keyword 1; keyword 2; keyword 3 (List three to ten pertinent keywords specific to the article yet reasonably common within the subject discipline.)

0. How to Use This Template

The template details the sections that can be used in a manuscript. Note that each section has a corresponding style, which can be found in the "Styles" menu of Word. Sections that are not mandatory are listed as such. The section titles given are for articles. Review papers and other article types have a more flexible structure.

Remove this paragraph and start section numbering with 1. For any questions, please contact the editorial office of the journal or support@mdpi.com.

1. Introduction

The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight why it is important. It should define the purpose of the work and its significance. The current state of the research field should be carefully reviewed and key publications cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally, briefly mention the main aim of the work and highlight the principal conclusions. As far as possible, please keep the introduction comprehensible to scientists outside your particular field of research. References should be numbered in order of appearance and indicated by a numeral or numerals in square brackets—e.g., [1] or [2,3], or [4–6]. See the end of the document for further details on references.

2. Materials and Methods

The Materials and Methods should be described with sufficient details to allow others to replicate and build on the published results. Please note that the publication of your manuscript implicates that you must make all materials, data, computer code, and protocols associated with the publication available to readers. Please disclose at the submission stage any restrictions on the availability of materials or information. New methods and protocols should be described in detail while well-established methods can be briefly described and appropriately cited.

Research manuscripts reporting large datasets that are deposited in a publicly available database should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers. If the accession

numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication. Interventionary studies involving animals or humans, and other studies that require ethical approval, must list the authority that provided approval and the corresponding ethical approval code.

3. Results

This section may be divided by subheadings. It should provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation, as well as the experimental conclusions that can be drawn.

3.1. Subsection

3.1.1. Subsubsection

Bulleted lists look like this:

- First bullet;
- Second bullet;
- Third bullet.

Numbered lists can be added as follows:

1. First item;
2. Second item;
3. Third item.

The text continues here.

3.2. Figures, Tables and Schemes

All figures and tables should be cited in the main text as Figure 1, Table 1, etc.



Figure 1. This is a figure. Schemes follow the same formatting.

Title 1	Title 2	Title 3
entry 1	data	data
entry 2	data	data ¹

Table 1. This is a table. Tables should be placed in the main text near to the first time they are cited.

¹ Tables may have a footer.

The text continues here (Figure 2 and Table 2).

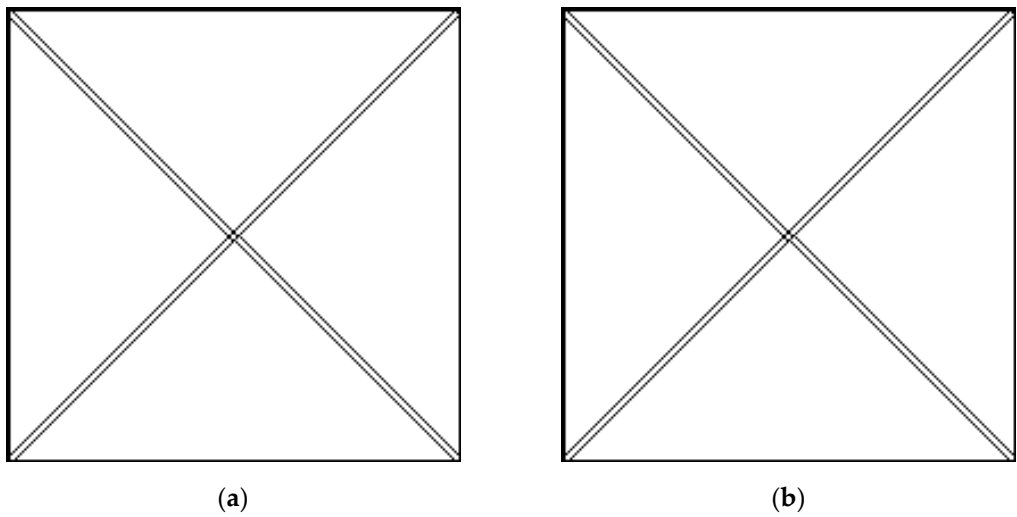


Figure 2. This is a figure. Schemes follow another format. If there are multiple panels, they should be listed as: (a) Description of what is contained in the first panel; (b) Description of what is contained in the second panel. Figures should be placed in the main text near to the first time they are cited.

Table 2. This is a table. Tables should be placed in the main text near to the first time they are cited.

Title 1	Title 2	Title 3	Title 4
entry 1 *	data	data	data
	data	data	data
	data	data	data
entry 2	data	data	data
	data	data	data
entry 3	data	data	data
	data	data	data
	data	data	data
	data	data	data
entry 4	data	data	data
	data	data	data

* Tables may have a footer.

3.3. Formatting of Mathematical Components

This is example 1 of an equation:

$$a = 1,$$

the text following an equation need not be a new paragraph. Please punctuate equations as regular text. This is example 2 of an equation:

$$a = b + c + d + e + f + g + h + i + j + k + l + m + n + o + p + q + r + s + t + u + v + w + x + y + z \tag{2}$$

the text following an equation need not be a new paragraph. Please punctuate equations as regular text. Theorem-type environments (including propositions, lemmas, corollaries etc.) can be formatted as follows:

Theorem 1. *Example text of a theorem. Theorems, propositions, lemmas, etc. should be numbered sequentially (i.e., Proposition 2 follows Theorem 1). Examples or Remarks use the same formatting, but should be numbered separately, so a document may contain Theorem 1, Remark 1 and Example 1.*

The text continues here. Proofs must be formatted as follows:

Proof of Theorem 1. Text of the proof. Note that the phrase “of Theorem 1” is optional if it is clear which theorem is being referred to. Always finish a proof with the following symbol. □

The text continues here.

4. Discussion

Authors should discuss the results and how they can be interpreted from the perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible. Future research directions may also be highlighted.

5. Conclusions

This section is not mandatory but can be added to the manuscript if the discussion is unusually long or complex.

6. Patents

This section is not mandatory but may be added if there are patents resulting from the work reported in this manuscript.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title; Table S1: title; Video S1: title.

Author Contributions: For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used “Conceptualization, X.X. and Y.Y.; methodology, X.X.; software, X.X.; validation, X.X., Y.Y. and Z.Z.; formal analysis, X.X.; investigation, X.X.; resources, X.X.; data curation, X.X.; writing—original draft preparation, X.X.; writing—review and editing, X.X.; visualization, X.X.; supervision, X.X.; project administration, X.X.; funding acquisition, Y.Y. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.” Please turn to the [CRediT taxonomy](#) for the term explanation. Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported.

Funding: Please add: “This research received no external funding” or “This research was funded by NAME OF FUNDER, grant number XXX” and “The APC was funded by XXX”. Check carefully that the details given are accurate and use the standard spelling of funding agency names at <https://search.crossref.org/funding>. Any errors may affect your future funding.

Institutional Review Board Statement: In this section, you should add the Institutional Review Board Statement and approval number, if relevant to your study. You might choose to exclude this statement if the study did not require ethical approval. Please note that the Editorial Office might ask you for further information. Please add “The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of NAME OF INSTITUTE (protocol code XXX and date of approval).” for studies involving humans. OR “The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of NAME OF INSTITUTE (protocol code XXX and date of approval).” for studies involving animals. OR “Ethical review and approval were waived for this study due to REASON (please provide a detailed justification).” OR “Not applicable” for studies not involving humans or animals.

Informed Consent Statement: Any research article describing a study involving humans should contain this statement. Please add “Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.” OR “Patient consent was waived due to REASON (please provide a detailed justification).” OR “Not applicable.” for studies not involving humans. You might also choose to exclude this statement if the study did not involve humans. Written informed consent for publication must be obtained from participating patients who can be identified (including by the patients themselves). Please state “Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper” if applicable.

Data Availability Statement: We encourage all authors of articles published in MDPI journals to share their research data. In this section, please provide details regarding where data supporting reported results can be found, including links to publicly archived datasets analyzed or generated during the study. Where no new data were created, or where data is unavailable due to privacy or ethical restrictions, a statement is still required. Suggested Data Availability Statements are available in section “MDPI Research Data Policies” at <https://www.mdpi.com/ethics>.

Acknowledgments: In this section, you can acknowledge any support given which is not covered by the author contribution or funding sections. This may include administrative and technical support, or donations in kind (e.g., materials used for experiments).

Conflicts of Interest: Declare conflicts of interest or state “The authors declare no conflicts of interest.” Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of reported research results. Any role of the funders in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results must be declared in this section. If there is no role, please state “The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results”.

Appendix A

The appendix is an optional section that can contain details and data supplemental to the main text—for example, explanations of experimental details that would disrupt the flow of the main text but nonetheless remain crucial to understanding and reproducing the research shown; figures of replicates for experiments of which representative data is shown in the main text can be added here if brief, or as Supplementary data. Mathematical proofs of results not central to the paper can be added as an appendix.

Appendix B

All appendix sections must be cited in the main text. In the appendices, Figures, Tables, etc. should be labeled starting with “A”—e.g., Figure A1, Figure A2, etc.

References

References must be numbered in order of appearance in the text (including citations in tables and legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as EndNote, ReferenceManager or Zotero to avoid typing mistakes and duplicated references. Include the digital object identifier (DOI) for all references where available.

Citations and references in the Supplementary Materials are permitted provided that they also appear in the reference list here.

In the text, reference numbers should be placed in square brackets [] and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10), or [6] (pp. 101–105).

1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated Journal Name* **Year**, *Volume*, page range.
2. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, 2007; Volume 3, pp. 154–196.
3. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, 2008; pp. 154–196.
4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Abbreviated Journal Name* year, *phrase indicating stage of publication (submitted; accepted; in press)*.
5. Author 1, A.B. (University, City, State, Country); Author 2, C. (Institute, City, State, Country). Personal communication, 2012.
6. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference (Day Month Year).
7. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.
8. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.