

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIELA BARONE VOLCE DA SILVA

Modelo de sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG): Relação entre o glúten de trigo e o estresse oxidativo, inflamação e expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo estriado esquelético de ratos *Wistar*

Maringá  
2024

GABRIELA BARONE VOLCE DA SILVA

Modelo de sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG): Relação entre o glúten de trigo e o estresse oxidativo, inflamação e expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo estriado esquelético de ratos *Wistar*

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

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Losi Alves de Almeida

Maringá  
2024

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

S586m

Silva , Gabriela Barone Volce da

Modelo de sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG) : relação entre o glúten de trigo e o estresse oxidativo, inflamação e expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo estriado esquelético de ratos Wistar / Gabriela Barone Volce da Silva . -- Maringá, PR, 2024.

58 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Losi Alves de Almeida.

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

1. Gliadina. 2. Celula satélite de músculo esquelético. 3. Expressão gênica . 4. Estresse oxidativo . I. Almeida, Fernanda Losi Alves de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Ciências Morfológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). III. Título.

CDD 23.ed. 572.6

GABRIELA BARONE VOLCE DA SILVA

Modelo de sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG): Relação entre o glúten de trigo e o estresse oxidativo, inflamação e expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo estriado esquelético de ratos *Wistar*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Banca Examinadora composta pelos membros:

Aprovado em: 22 de agosto de 2024.

COMISSÃO JULGADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Losi Alves de Almeida  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Raquel Marçal Natali  
Universidade Estadual de Maringá

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Errero Porto Saporoli  
Universidade Estadual de Maringá

## **DEDICATÓRIA**

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Fabiana Barone Volce da Silva e Celso Aparecido Claro da Silva. Vocês são a base da minha vida, minha fonte de força e determinação. A vocês toda gratidão do mundo, por todo suporte, ensinamentos, conselhos e por me acompanharem sempre.

Por vocês eu luto para ser melhor a cada dia.

Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

### Agradeço ...

Em primeiro lugar, meus agradecimentos serão direcionados para Ele, que é minha maior fonte de força e motivação. “Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês”, diz o Senhor, planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro” Jeremias 29:11.

Em segundo lugar, agradeço aos meus pais, que são a minha base e fortaleza. Para eles eu entrego toda minha gratidão, por sempre estarem ao meu lado, acreditando em mim quando nem eu mesmo o faço. Todo o amor do mundo para vocês.

Agradeço minha orientadora, amiga, irmã e confidente, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Losi Alves de Almeida. Obrigada por sempre me estender a mão quando preciso, por nunca sair do meu lado e principalmente, por sempre me incentivar a ser melhor a cada dia. Você é minha inspiração. Amo você.

Agradeço a Dr<sup>a</sup>. Prof<sup>a</sup>. Maria Raquel Marçal Natali, por confiar em meu trabalho e me incluir em seu projeto de pesquisa. Gratidão por todo o carinho comigo até aqui.

A ciência não se faz sozinha e ninguém caminha só, por isso, meus mais sinceros agradecimentos a Karile Costa Salomão, Anne Caroline Santa Rosa, Ana Luiza Russo Duarte, Angélica Khatlab, e as técnicas Ana Paula Santi Rampazzo, Valéria Romão, Márcia Fabrício e Maria Ângela por toda a ajuda e suporte durante o desenvolvimento deste trabalho. Vocês foram essenciais.

A vida fica mais leve com a presença de amigos, portanto, sou extremamente grata por todo o apoio, ensinamentos e conselhos recebidos da minha amiga Ana Paula Santi Rampazzo. Você foi essencial para o meu crescimento, e eu sou extremamente grata pela nossa amizade. Te carregarei comigo pra sempre. Amo você.

A Camila Thom, que veio para tornar essa caminhada mais leve e tranquila. A ela sou extremamente grata por todo suporte emocional, por todas as palavras de encorajamento e por todos os momentos vividos até aqui. Como diz nossa Tay Tay “I had the time of my life fighting dragons with you”. Eu te amo, obrigada por tudo.

Agradeço as minhas amigas, Rafaela do Santos Machados, Andressa Santoro, Caroline Marinho Hernandez, Patrícia Zorzetto e Layane Colombo, por compartilharem a vida comigo e por sempre estarem presentes me apoiando em todas as minhas decisões. Amo vocês. Meu amigo e irmão, Guilherme Oliveira Santos, obrigada por estar comigo desde sempre, me acompanhando em cada passo e conquista. Amo você.

Agradeço pela oportunidade de conquistar mais um título em uma Universidade pública, gratuita e de qualidade. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PBC) da Universidade Estadual de Maringá. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil CAPES - código de financiamento 001, e com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil.

## **EPIGRAFE**

“And if you never bleed,  
you're never gonna grow  
And it's alright now”

**Taylor Swift**

## 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: “Sensibilidade Não Celíaca ao Glúten (SNCG): Relação entre o glúten de trigo e a inflamação, estresse oxidativo e expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo estriado esquelético de ratos Wistar” redigido de acordo com as normas da revista *Nutrients* (ISSN: 2072-6643 e Fator de Impacto 5.9, disponível em: <https://www.mdpi.com/journal/nutrients/instructions>).

## Resumo

As gliadinas, presentes no glúten de trigo, são as proteínas que casam a toxicidade do cereal e, portanto, podem acarretar no desenvolvimento da sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG). A SNCG está relacionada a quadros de estresse oxidativo (EO) que causam danos nas fibras musculares, podendo alterar os níveis de enzimas como creatina quinase (CK), mieloperoxidase (MPO) e N-Acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) e a expressão de genes que controlam a atividade das células satélites (CS), como os fatores de regulação miogênica (MRFs) e a miocina interleucina-6 (IL-6). Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar se a ingestão de diferentes níveis de fonte de glúten de trigo promove inflamação, estresse oxidativo e mudanças na expressão dos MRFs e IL-6 na musculatura esquelética de ratos. Foram utilizados 50 ratos *Wistar* machos, com 21 dias de idade (n=10), distribuídos nos seguintes grupos: G0: dieta isenta de fonte de glúten de trigo; GC14: dieta controle com 14% de fonte de glúten de trigo; G42: dieta com alto teor de fonte de glúten de trigo; G70: dieta com excesso de fonte de glúten de trigo. Ao final de 100 dias de experimento, os animais foram eutanasiados e amostras sanguíneas e dos músculos sóleo (SOL) e gastrocnêmio (GCN) foram coletadas. Foram realizados cortes histológicos para análise da morfologia e morfometria das fibras musculares, além de técnicas para determinação do EO e análise da expressão gênica. Os músculos SOL e GCN mostraram morfologia preservada, apresentando focos de inflamação e mionecrose que foram mais evidentes no SOL do G0. Foi observado aumento no diâmetro das fibras do músculo SOL e GCN em G0, G42 e G70 em relação ao GC14, indicando um mecanismo de defesa no G0 e contribuição do alto teor de proteínas na ração em G42 e G70. Os níveis séricos de CK foram menores no G42 e G70, em comparação ao G14, indicando que o SOL e GCN foram menos acometidos por focos de inflamação em comparação ao G14. Os maiores níveis de produtos de peroxidação lipídica, observados no SOL do G42, em comparação aos demais grupos, indica estresse oxidativo (EO). No GCN, observou-se redução na atividade dos antioxidantes catalase (CAT) em G42 e G70, e da glutatona reduzida (GSH) no grupo G70 em relação ao GC14. No SOL, a atividade de NAG apresentou-se aumentada no G70 em relação ao GC14, indicando uma relação entre a alta concentração de fonte de glúten de trigo e a inflamação mediada pela ativação de macrófagos nas fibras. No GCN, a redução na atividade de NAG em G42 e G70, em comparação ao GC14, corrobora com os achados morfológicos de um menor comprometimento desse músculo com focos de inflamação em comparação ao SOL. A atividade da MPO, em ambos os músculos, reduziu em G42 e G70 em relação ao GC14, resultado diferente do esperado, uma vez que a análise de EO mostrou um desequilíbrio em agentes antioxidantes nesses músculos. Não foram observadas diferenças entre

os grupos na expressão do gene Pax7, marcador de CS quiescentes, em ambos os músculos. No músculo SOL, a maior expressão gênica de MyoD em G42, em relação ao GC14, indica uma maior ativação de CS e proliferação de mioblastos contribuindo com o maior diâmetro das fibras musculares. A expressão gênica de MyoD e miogenina (MYOG), no músculo GCN, não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Assim, os níveis crescentes de fonte de glúten de trigo, bem como a dieta isenta de glúten, influenciaram na morfologia e morfometria das fibras, na inflamação, estresse oxidativo e expressão de genes relacionados com a atividade de CS nos músculos SOL e GCN de ratos *Wistar*.

**Palavras-chave:** sóleo; gastrocnêmio; gliadina; desequilíbrio redox; célula satélite.

## **Abstract**

Gliadins, present in wheat gluten, are the proteins responsible for cereal toxicity and, therefore, can lead to the development of non-celiac gluten sensitivity (NCGS). NCGS is related to oxidative stress (OS) that causes damage to muscle fibers, which can alter the levels of enzymes such as creatine kinase (CK), myeloperoxidase (MPO) and N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) and the expression of genes that control the activity of satellite cells (SC), such as myogenic regulatory factors (MRFs) and the myokine interleukin-6 (IL-6). Thus, the objectives of this study were to evaluate whether the ingestion of a wheat gluten source promotes inflammation, oxidative stress and changes in the expression of MRFs and IL-6 in the skeletal muscles of rats. Fifty male Wistar rats, 21 days old (n=10), were used and distributed into the following groups: G0: diet free of wheat gluten; GC14: control diet with 14% wheat gluten; G42: diet with high wheat gluten content; G70: diet with excess wheat gluten. At the end of the 100 days of experiment, the animals were euthanized and blood samples and samples from the soleus (SOL) and gastrocnemius (GCN) muscles were collected. Histological sections were performed to analyze the morphology and morphometry of the muscle fibers, in addition to techniques for determining OS and analyzing gene expression. The SOL and GCN muscles showed preserved morphology, presenting foci of inflammation and myonecrosis that were more evident in the SOL muscle of G0. An increase in the diameter of the fibers of the SOL and GCN muscles was observed in G0, G42 and G70 in relation to GC14, indicating a defense mechanism in G0 and a contribution of the high protein content in the diet in G42 and G70. Serum CK levels were lower in G42 and G70, compared to G14, indicating that the SOL and GCN were less affected by foci of inflammation compared to G14. The higher levels of lipid peroxidation products observed in the SOL of G42, compared to the other groups, indicate oxidative stress (OS). In the GCN, a reduction in the activity of the antioxidant catalase (CAT) was observed in G42 and G70, and of glutathione reductase (GSH) in the G70 group in relation to GC14. In SOL, NAG activity was increased in G70 compared to GC14, indicating a relationship between the high concentration of wheat gluten source and inflammation mediated by macrophage activation in the fibers. In GCN, the reduction in NAG activity in G42 and G70, compared to GC14, corroborates the morphological findings of a lower involvement of this muscle with foci of inflammation compared to SOL. MPO activity, in both muscles, was reduced in G42 and G70 compared to GC14, a different result than expected, since the EO analysis showed an imbalance in antioxidant agents in these muscles. No differences were observed between the groups in the expression of the Pax7 gene, a marker of quiescent SC, in either muscle. In the SOL muscle, the higher gene expression of MyoD in G42, compared to GC14, indicates a

greater activation of SC and proliferation of myoblasts contributing to the larger diameter of the muscle fibers. The gene expression of MyoD and myogenin (MYOG) in the GCN muscle did not show significant differences between the groups. Thus, the increasing levels of wheat gluten source, as well as the gluten-free diet, influenced the morphology and morphometry of the fibers, inflammation, oxidative stress and expression of genes related to the activity of SC in the SOL and GCN muscles of Wistar rats.

**Keywords:** soleus; gastrocnemius; gliadin; redox imbalance; satellite cell.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	16
2.1 Delineamento experimental.....	16
2.2 Coleta do material biológico .....	18
2.3 Processamento e análise histológica muscular.....	18
2.4 Análises Bioquímicas .....	19
2.5 Quantificação da expressão gênica .....	22
2.6 Análise estatística.....	23
3. RESULTADOS .....	23
3.1 Dados anatômicos e morfometria das fibras musculares .....	23
3.2 Análise morfológica das fibras musculares.....	25
3.3 Análises bioquímicas.....	27
3.4 Quantificação da expressão gênica .....	34
4. DISCUSSÃO .....	37
5. CONCLUSÃO .....	46
6. REFERÊNCIAS.....	47

## 1. INTRODUÇÃO

O trigo é cultivado, comercializado e consumido em todo o mundo, e consequentemente, considerado uma das principais culturas alimentares [1]. É constituído por proteínas, lipídios e carboidratos, sendo o glúten, a proteína mais abundante [2]. O glúten é formado por um conjunto de proteínas de armazenamento, sendo encontrado em sementes de cereais como, trigo, centeio, cevada e aveia [3].

O glúten, encontrado no trigo, é constituído por três tipos de prolaminas, como as prolaminas ricas em enxofre, prolaminas pobres em enxofre e prolaminas de alto peso molecular [3,4]. Além disso, a estrutura primária das prolaminas é rica em resíduos de aminoácidos prolina e glutamina [3].

No glúten de trigo, as prolaminas são divididas em duas classes, como as gliadinas, proteínas monoméricas solúveis em álcool e que conferem coesão e extensibilidade, e as gluteninas, que são proteínas poliméricas, insolúveis e que conferem força e elasticidade ao glúten [4]. A gliadina apresenta epítomos (sequências peptídicas) que são resistentes à digestão proteolítica gástrica, pancreática e intestinal, e por isso, não é degradada no intestino humano [1]. A resistência da digestão pelas proteases é consequência do alto teor de sequências peptídicas de prolina-glutamina presentes na gliadina [5]. Esses resíduos ricos em prolina constituem estruturas compactas que desencadeiam reações imunes, como, por exemplo, na doença celíaca (DC). Além disso, já foram identificadas várias sequências de gliadina ( $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\omega$ ) e de gluteninas que também são responsáveis pela ativação da DC [1].

O glúten está relacionado com o desenvolvimento de três doenças, conhecidas como doença celíaca (DC), sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG) e alergia ao trigo (AT) [6]. A SNGC ainda é um termo pouco conhecido e foi uma descoberta recente, distinta da doença celíaca (DC) da qual se tem pouca certeza sobre o quadro clínico [7]. O termo SNCG é utilizado para caracterizar os pacientes que não são afetados pela DC ou pela AT, mas, ainda assim, apresentam sintomas intestinais e extra-intestinais decorrentes da ingestão do glúten, com melhora após a sua retirada da dieta [7].

Os sinais da SNCG são diversos e podem acometer diferentes sistemas, com diferentes graus de gravidade. Os sintomas intestinais se manifestam como dores abdominais, diarreia crônica e mudança no padrão evacuatório, sintomas semelhantes à síndrome do intestino irritável [8,9]. Os sintomas extra-intestinais incluem dor de cabeça e quadros de enxaqueca, mente enevoada, fadiga crônica, dores musculares e nas articulações, dormência nas pernas ou braços, além de anemia e outras alterações comportamentais [10].

Outra complicação extra-intestinal, causada pela SNCG, são as miopatias inflamatórias idiopáticas (MII) caracterizadas como um grupo de doenças sistêmicas adquiridas e heterogêneas que causam fraqueza muscular simétrica progressiva e elevam os níveis séricos de enzimas musculares como, por exemplo, a creatina quinase (CK). Além disso, infiltrados inflamatórios em biópsias musculares também são recorrentes, assim como alterações morfológicas, como fibras musculares atroficas e a presença de núcleos internos [11]. Entre as anormalidades observadas em biópsias de pacientes com sensibilidade ao glúten, a inflamação muscular é uma característica comum [11].

A concentração de CK no soro aumenta significativamente em pacientes que apresentam lesão e inflamação muscular [12]. A CK é uma enzima com cerca de 82 kDa encontrada tanto no citosol quanto nas mitocôndrias daqueles tecidos que possuem alta demanda energética [13]. É uma enzima dimerica, constituída por duas subunidades com cerca de 42 kDa, sendo chamadas de subunidade M (isoforma muscular) e B (isoforma cerebral); essas duas subunidades formam três isoenzimas classificadas como CK-BB, CK-MM e CK-MB, sendo a última um heterodímero formado pelas duas subunidades M e B [13,14].

Na musculatura estriada esquelética, a forma predominante dessa enzima é a isoforma CK-MM, presente como um homodímero citosólico localizado na região da linha M das miofibrilas e no lado citoplasmático do retículo sarcoplasmático, áreas que precisam de muito ATP [14,15].

Outros marcadores de inflamação que podem ser alterados, diante de uma patologia, são as enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-Acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG). A MPO é uma heme peroxidase, encontrada em neutrófilos e monócitos, e age como um marcador de inflamação e estresse oxidativo. Seus níveis estão aumentados em doenças inflamatórias que estão relacionadas com a intolerância ao trigo, como por exemplo, a DC e SNCG [16,17]. A NAG é uma enzima lisossomal, sintetizada por macrófagos ativos na fase inflamatória tardia [18], e que atua principalmente na destruição de agentes lesivos na inflamação [19]. Além disso, é observada sobretudo em processos inflamatórios crônicos [20].

Outro fator observado na SNCG é o desequilíbrio no sistema de defesa antioxidante, em que a gliadina, além de desencadear quadros inflamatórios, pode estar envolvida com estresse oxidativo (EO) que é decorrente do aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e redução no sistema antioxidante [21]. Os antioxidantes são substâncias que, mesmo presentes em baixas concentrações, são capazes de atrasar ou inibir os agentes oxidantes, e

se encontram divididas em duas classes, sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos [22].

As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST), enquanto as defesas antioxidantes não enzimáticas incluem a glutathione reduzida (GSH), vitamina E, ubiquinol, carotenóides, flavonóides e bilirrubina [22,23].

A enzima SOD realiza a dismutação do radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), enquanto a CAT promove a catálise do  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) [24,25]. A GPx também promove a desintoxicação do  $H_2O_2$ , entretanto, ela utiliza a GSH como um doador de elétrons para reduzir o  $H_2O_2$  em água, e, além disso, a GST também reduz peróxidos orgânicos resultantes da lipoperoxidação lipídica [26]. A GSH desempenha um papel importante na defesa contra radicais livres, peróxidos e xenobióticos e atua em conjunto com as enzimas GPx e GST. É considerada um fator chave na viabilidade celular, visto que, quanto menor for o conteúdo de GSH em uma célula, menor será a probabilidade de sobrevivência da mesma [27,28].

O programa miogênico está altamente envolvido na resposta ao dano muscular, o que confere ao músculo adulto a capacidade de aumentar de tamanho após estímulos mecânicos (hipertrofia), assim como de se regenerar após uma lesão [29]. Além disso, essa plasticidade do músculo esquelético é decorrente da presença de células satélites (CS), conhecidas também como células-tronco musculares, que desempenham um papel importante no crescimento e regeneração desse tecido [30]. Após uma lesão muscular, para que haja a remodelação do tecido, é necessário que ocorra a ativação de CS quiescentes que expressam os fatores de transcrição *Paired-box* (Pax3/Pax7) [31].

Seguida a ativação, a progressão das CS quiescentes na linhagem miogênica é regulada por fatores de transcrição, como Pax7 e fatores de regulação miogênica (MRFs) [32]. Os MRFs são um grupo de fatores de transcrição que, em conjunto com Pax7, são capazes de regular a ação das CS e sua progênie, os mioblastos. Os MRFs MyoD, Myf5, miogenina (MYOG) e MRF4 direcionam a ativação, proliferação e diferenciação de CS [33].

O Pax7 é expresso na maioria das CS e é amplamente utilizado como marcador de sua quiescência [32]. Em contraste, as CS ativadas, chamadas de mioblastos, que expressam os MRFs, não são mais consideradas quiescentes [34]. A proteína MyoD exerce uma função de marcador da divisão celular em que sua atividade está diretamente relacionada à proliferação dos mioblastos, marcando uma fase inicial da atividade miogênica, enquanto

que a MYOG está envolvida na fase final do processo de diferenciação desse tipo celular [35].

Além dos MRFs, outro fator que influencia o comportamento das CS são os macrófagos que, quando ativados, agem secretando mediadores como a citocina interleucina-6, necessária para promover a proliferação e diferenciação dos mioblastos [36]. A IL-6 é reconhecida como uma miocina, podendo ser produzida localmente ou transitoriamente em resposta a estímulos como exercício físico, lesões musculares e, na presença de ROS, seus níveis aumentados são fisiologicamente necessários para induzir a proliferação de CS em processos de regeneração. Portanto, a IL-6 age participando ativamente na proliferação de CS e crescimento muscular [37,38].

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo investigar se a ingestão de fonte de glúten de trigo em excesso causa danos no tecido muscular esquelético que alteram a morfologia e morfometria das fibras musculares, e desencadeiam processos inflamatórios mediados pelos biomarcadores CK, MPO e NAG, promove EO e altera a expressão de genes que controlam a atividade das CS, como Pax7, MRFs e IL6.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

O protocolo experimental deste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá, sob o protocolo número 6295090221.

### **2.1 Delineamento experimental**

#### *a. Grupos experimentais*

Foram utilizados 40 *Rattus norvegicus* machos da linhagem *Wistar* (n=10 por grupo). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UEM, com 21 dias de idade. Os ratos ficaram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) da UEM sob ciclos regulares de iluminação (12h claro:12h escuro), temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e exaustão de ar. Os animais foram organizados em grupos, de acordo com o nível crescente de fonte de glúten de trigo presente na ração: G0: animais alimentados com dieta isenta de fonte de glúten de trigo; GC14: animais alimentados com dieta controle contendo 14% de fonte de glúten de trigo; G42: animais alimentados com dieta contendo alto teor de fonte de glúten de trigo; G70: animais alimentados com dieta contendo excesso de fonte de glúten de

trigo. A eutanásia desses animais foi realizada aos 121 dias de idade, equivalente a 100 dias de experimento.

#### *b. Preparação da ração*

Os animais foram alimentados com a ração produzida no Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA/UEM), fabricadas em máquina extrusora monorosca (Inbramaq RX50) com todos os ingredientes em percentuais adequados para roedores. Para definir os níveis de fonte de glúten, utilizamos como matéria-prima o trigo. Na ração padrão do grupo controle (GC14), a fonte de glúten como componente protéico foi o trigo, sendo substituído por arroz no grupo G0. Para os grupos com níveis de fonte de glúten acima de 14%, o percentual de trigo foi acrescido.

**Tabela 1.** Componentes das rações para roedores, com diferentes níveis de fonte de glúten de trigo, são apresentados como 14% (GC14), 0% (G0), 42% (G42) e 70% (G70).

<b>Ingredientes</b>	<b>GC14</b>	<b>G0</b>	<b>G42</b>	<b>G70</b>
Milho	614g	614g	334g	0g
Soja	141g	141g	141g	141g
Trigo	140g	0g	420g	700g
Arroz	0g	140g	0g	0g
Óleo de soja	40g	40g	40g	40g
Cloreto de sódio	6,8g	6,8g	6,8g	6,8g
Carbonato de cálcio	25g	25g	25g	25g
Fosfato bicálcico	11,4g	11,4g	11,4g	11,4g
Premix vitamínico	10g	10g	10g	10g
Premix mineral	11,8g	11,8g	11,8g	11,8g

Para a preparação da ração do grupo controle (GC14), foram utilizados como parâmetros os percentuais presentes na ração comercial para roedores NUVILAB CR-1 IRRADIADA (Quimtia S/A, Brasil), com 75,4% de carboidratos, 14,1% de proteínas, 4,0% de gorduras, e 25% de umidade. Na composição da ração foi acrescido o *Premix* vitamínico e mineral para roedores (PX 1577 PREMIX- Nucleopar Nutrição Animal Ltda).

**Tabela 2.** Calorias e frações químicas da ração com 14% (grupo controle) de fonte de glúten de trigo para roedores.

<b>Valores Nutricionais</b>	<b>Dieta Padrão</b>
Calorias (kcal/100g de dieta)	417
Carboidratos (%)	75,4
Proteínas (%)	14,1
Gorduras (%)	4,0
Água (%)	25

Composição bruta energética (Kcal/100g de dieta). Dados obtidos no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal – LANA – Departamento de Zootecnia (DZO) - UEM.

## **2.2 Coleta do material biológico**

Após 100 dias de experimento, os animais foram eutanasiados, após jejum noturno, por sobrecarga de anestésico (mistura 1:1 de quetamina 90 mg/kg e xilazina 9 mg/kg por via intraperitoneal). Foi realizada a coleta de sangue, por punção cardíaca, e as amostras foram centrifugadas para separação de soro e plasma e armazenadas em freezer -80°C para análises bioquímicas.

Os músculos SOL e GCN foram dissecados, retirados e pesados. Amostras desses músculos foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C até o processamento.

## **2.3 Processamento e análise histológica muscular**

Em criostato (*Leica* CM1850, *Leica Microsystems* - Alemanha), foram obtidos cortes histológicos transversais, com 10 µm de espessura, das amostras musculares congeladas, seguida de coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação da morfologia e morfometria das fibras musculares.

As análises morfológica e morfométrica foram realizadas a partir de imagens obtidas dos cortes histológicos, utilizando microscópio óptico (*Nikon Eclipse*<sup>®</sup>, Shinjuku, Japão) acoplado a uma câmera de alta resolução (*Nikon*<sup>®</sup>, Ds-Fi1c, Shinjuku, Japão), por meio do software *NIS-Elements* (versão 4.0, Praga, República Tcheca). Por meio do software *Image Pro-Plus* (versão 4.5) foi determinado o menor diâmetro de 200 fibras musculares, por animal, em cada grupo, de acordo com a metodologia descrita em Aguiar et al. (2010).

## 2.4 Análises Bioquímicas

### *a. Determinação quantitativa da atividade da creatina quinase (CK) total*

Amostras de soro, equivalentes a 500 uL, foram coletadas em eppendorfs para a análise da creatina quinase total. A análise foi realizada de acordo com as instruções do kit CK NAC Gold Analisa para determinação da creatina quinase total por metodologia cinética-IV. Foram utilizados 4 volumes de Tampão (reagente 1) para 1 volume do Substrato (reagente 2) e 20 uL de soro. Posteriormente, 1000 uL de Reagente de Trabalho e 20 uL de soro foram pipetados em um tubo de ensaio seguido da homogeneização. A leitura foi realizada de forma cinética contínua crescente em um analisador semi-automático de bioquímica BIOPLUS - BIO 2000, no comprimento de onda de 340 nm e temperatura a 37°C.

### *b. Mensuração de espécies reativas de oxigênio (ROS)*

Em um ambiente com baixa luminosidade, foram homogeneizadas 200 mg de amostras do músculo GCN em 1ml de tampão fosfato de sódio (0,08 M; pH 7,2). Posteriormente, foram acrescentados 180µL de DCFH+DMSO e o homogenato obtido foi incubado durante 40 minutos no escuro [39]. Após a incubação, a leitura do material foi realizada em espectrofluorímetro com excitação de 488nm e emissão de 520 nm. Para a expressão dos resultados foi utilizada a curva da intensidade de fluorescência [40]. No músculo SOL não foi possível realizar a técnica devido à quantidade de material.

### *c. Ensaio para determinação da concentração de proteínas*

A concentração de proteína foi determinada em placa de 96 poços, utilizando o kit BCA TM *protein assay kit*<sup>®</sup> (PIERCE, *BCA protein*), seguindo instruções do fabricante, que assume a albumina sérica bovina como padrão. As proteínas do *pellet* foram dosadas para a realização dos cálculos das atividades enzimáticas de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG), enquanto as proteínas presentes no sobrenadante foram aplicadas nos cálculos da atividade enzimática de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione s-transferase (GST).

### *d. Preparação das amostras de estresse oxidativo*

De acordo com o protocolo de [40], as amostras dos músculos SOL direito e GCN lateral esquerdo (máximo 0,300g) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 200mM (pH 6,5) na fração 3:1. Uma parte do homogenato foi utilizada para quantificar a

concentração de glutathiona reduzida (GSH) e o restante foi centrifugado durante 20 minutos a 9.000 rpm. Com o sobrenadante foram realizadas as técnicas de dosagem de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona s-transferase (GST) e a quantificação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH).

*e. Mensuração da atividade enzimática da SOD*

Na análise da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), o sobrenadante foi homogeneizado em tampão TRIS-HCl (200mM) e EDTA (2mM; pH 6,5), acrescentado pirogalol a 1mM. A solução passou por incubação durante 20 minutos em temperatura ambiente e a reação foi interrompida com HCl 1N. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 4 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante resultante foi pipetado em microplacas para leitura em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

*f. Mensuração da atividade enzimática da CAT*

Para análise da atividade enzimática da catalase (CAT), o sobrenadante foi diluído em tampão fosfato de potássio (0,2M; pH 6,5) na proporção de 1:10. A amostra foi homogeneizada em placa com 96 poços, com uma solução contendo tampão TRIS-HCl-EDTA (0,1M; pH 8,5), água destilada e peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 240 nm e os resultados foram expressos em mmol/min/mg proteína.

*g. Mensuração da atividade enzimática da GST*

Para análise da atividade enzimática da glutathiona s-transferase (GST), o sobrenadante foi diluído em tampão fosfato de potássio (0,1M; pH 6,5) e a reação iniciada a partir da adição de solução com tampão fosfato de potássio (0,1M; pH 6,5), 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e glutathiona-reduzida (GSH). A amostra foi pipetada em placa de 96 poços e a leitura realizada em espectrofotômetro a 340 nm. Os resultados foram expressos em mmol/min/mg proteína.

*h. Quantificação da GSH*

Para a quantificação de glutathiona-reduzida (GSH), foi incluído ácido tricloroacético a 12% no sobrenadante, seguido de homogeneização e centrifugação por 15 minutos a 9.700 rpm. Tampão TRIS (0,4M; pH 8,9) foi adicionado à microplaca e a reação foi iniciada com

a adição de 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (1mM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 415 nm e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de GSH/g de tecido.

*i. Mensuração dos níveis de LOOH*

A quantificação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos foi realizada a partir da homogeneização do sobrenadante em metanol (1:4) e centrifugação por 20 minutos à 4°C e 10.000 rpm. A amostra (60 $\mu\text{l}$ ) acrescida de 240 $\mu\text{l}$  do meio reativo contendo xilenol laranja, ácido sulfúrico (25mM), hidroxitoluenobutilado (BHT; 4mM) e  $\text{FeSO}_4\text{NH}_4$  (250mM) foi adicionada em placa de 96 poços e incubada no escuro durante 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 560 nm. A determinação da concentração de LOOH foi determinada pelo coeficiente de extinção de 4,3 mM  $1.\text{cm}^{-1}$  e os resultados foram expressos em mmol/mg tecido.

*j. Determinação da atividade enzimática de MPO e NAG*

Para a determinação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG), foi utilizada a metodologia disponibilizada na literatura [40]. As amostras dos músculos SOL direito e GCN lateral esquerdo (máximo 0,300g) foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 200mM (pH 6,5) e centrifugadas a 4°C durante 20 minutos a 11.000 rpm. O *pellet* formado após o processo de centrifugação foi ressuspensionado em tampão fosfato de sódio contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio.

Para a mensuração de MPO, uma solução com tampão fosfato de sódio (0,1M; pH 7,4) e peróxido de hidrogênio a 0,017% foi acrescentada ao sobrenadante. A reação foi iniciada com tetrametilbenzidina e incubada por 3 minutos a 37°C, posteriormente, a reação foi interrompida com acetato de sódio (1,46M; pH 3,0). A leitura para análise de MPO foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados foram expressos como mD.O./mg de proteína.

Para a mensuração de NAG, o sobrenadante foi incubado com tampão citrato (5mM; pH 4,5) com p-nitrofenil-N-acetil-fl-D-glucosaminidase (2,24mM). As microplacas foram incubadas por 60 minutos a 37°C e foi utilizado tampão glicina (200mM; pH 10,4) para interromper a reação. A leitura para análise de NAG foi realizada em espectrofotômetro a 405 nm. Ambos os resultados foram expressos em unidade de densidade óptica D.O./min/mg de proteína.

## 2.5 Quantificação da expressão gênica

Foi analisada a expressão dos genes Pax7, MyoD, MYOG e IL-6 nas amostras dos músculos SOL e GCN medial. O RNA total foi extraído das amostras musculares congeladas, utilizando o reagente Trizol<sup>®</sup> (*Invitrogen - Thermo Fisher Scientific*, EUA), seguindo-se as orientações do fabricante. As amostras de RNA total obtidas foram dissolvidas em água ultrapura livre de DNases e RNases (*Invitrogen - Thermo Fisher Scientific*, EUA) e armazenadas a -80°C.

Para a quantificação do RNA, foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop<sup>™</sup> 2000 (*Invitrogen - Thermo Fisher Scientific*, EUA), com as leituras realizadas nas absorvâncias de 260 e 280 nm. A pureza do RNA foi garantida pela obtenção de uma razão 260/280 nm superior a 1.8.

Uma alíquota de 1 µg do RNA total extraído foi submetida ao tratamento com o kit *DNase I Amplification Grade* (*Invitrogen - Thermo Fisher Scientific*, EUA) para eliminação de DNA genômico contaminante. Em seguida, as amostras foram submetidas à transcrição reversa (RT) com os reagentes presentes no *High Capacity cDNA archive kit* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante. As amostras de DNA complementar (cDNA) obtidas foram armazenadas a -20°C.

Os níveis de expressão gênica de Pax7, MyoD, MYOG e IL-6 foram detectados por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR), utilizando a plataforma *StepOne™ Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*, EUA). A expressão dos genes-alvo Pax7, MyoD, MYOG e IL-6 foram normalizados pela expressão do gene de referência  $\beta$ -actina.

Os primers utilizados para a amplificação dos genes Pax7, MyoD, MYOG, IL-6 e  $\beta$ -actina foram construídos a partir das respectivas sequências disponíveis para *Rattus norvegicus*, publicadas no NCBI, utilizando, como ferramenta, o software *Primer 3 Web* (versão 4.1.0) (Tabela 3). Esses primers foram sintetizados comercialmente pela Exxtend Biotecnologia LTDA (Paulínia-SP, Brasil) e diluídos em água ultrapura livre de DNases e RNases (*Invitrogen - Thermo Fisher Scientific*, EUA) para uma concentração inicial de 5 µM.

Cada amostra de cDNA foi amplificada utilizando-se o Fast SYBR<sup>™</sup> Green Master Mix (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific*, EUA), conforme as instruções do fabricante. Ao término de cada reação, a amplificação específica de cada gene foi confirmada pela análise da curva de dissociação dos fragmentos amplificados. A quantificação relativa

da expressão gênica foi determinada pela fórmula  $2^{-\Delta Ct}$  (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001).

**Tabela 3.** *Primers* utilizados na RT-PCR quantitativa em tempo real para a amplificação dos genes Interleucina-6, MYOG, MyoD, Pax7 e do gene de referência Beta Actina.

Gene	Número de acesso ao GenBank		Sequência (5'-3')	TA
Pax7	NM_001191984.2	Forward	TGCCCTCAGTGAGTTCGATT	125
		Reverse	GATGCCATCGATGCTGTGTT	
MyoD	NM_176079.2	Forward	CCTGAGCAAAGTGAACGAGG	126
		Reverse	AGAGCCTGCAGACCTTCAAT	
MIOG	NM_017115.3	Forward	ACCCAGGAGATCATTGCTC	120
		Reverse	TGGTTTCATCTGGGAAGGTG	
IL-6	M26744.1	Forward	TTCCTACCCCAACTTCCAATG	85
		Reverse	ATGAGTTGGATGGTCTTGGTC	
Beta Actina	NM_031144.3	Forward	TCTTCCAGCCTTTCCTTCCTG	147
		Reverse	CAATGCCTGGGTACATGGTG	

TA: tamanho do *amplicon* em pares de bases.

## 2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software *Prisma*<sup>®</sup> versão 5.0 (*GraphPad, San Diego-CA, EUA*). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para amostras com distribuição normal, foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de *Tukey*. O teste de *Kruskal-Wallis* seguido pelo teste de *Dunn's* foi utilizado para dados não-paramétricos. As análises entre dois grupos foram realizadas por meio do Teste *T de Student*. Em todos os casos, foram considerados significativos resultados com valor de  $p < 0,05$ .

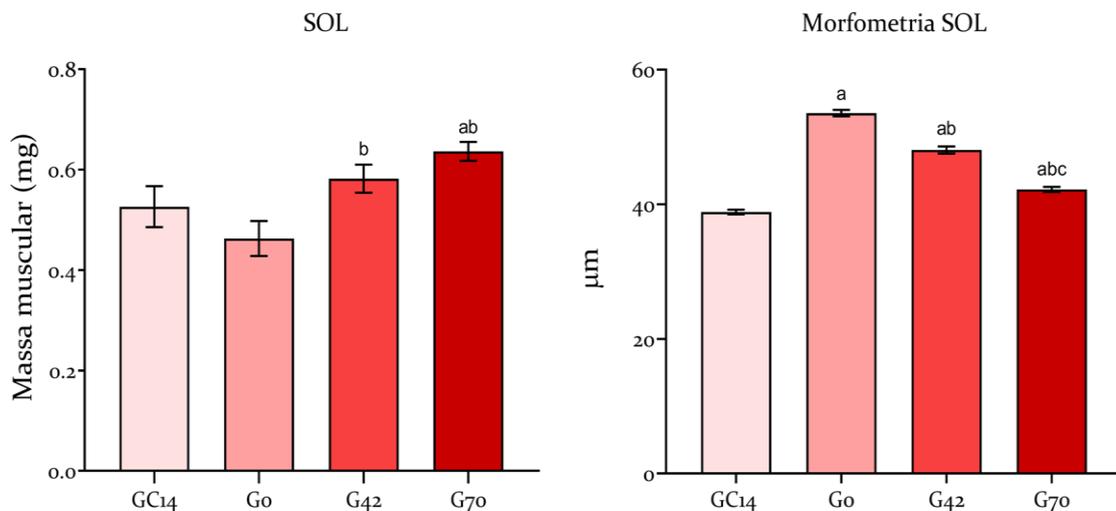
## 3. RESULTADOS

### 3.1 Dados anatômicos e morfometria das fibras musculares

A relação entre a massa do músculo SOL e a massa corporal (Figura 1) mostrou aumento no grupo G42 em relação ao grupo G0, bem como aumento do grupo G70 em referência ao grupo controle GC14 e ao grupo G0.

Os dados morfométricos das fibras desse mesmo músculo (Figura 1) mostraram maior diâmetro no grupo G0 em relação aos grupos GC14, G42 e G70. Nos grupos G42 e G70, o diâmetro das fibras musculares foi maior em relação ao controle GC14. Um aumento no diâmetro das fibras musculares foi observado no grupo G42 em relação ao grupo G70.

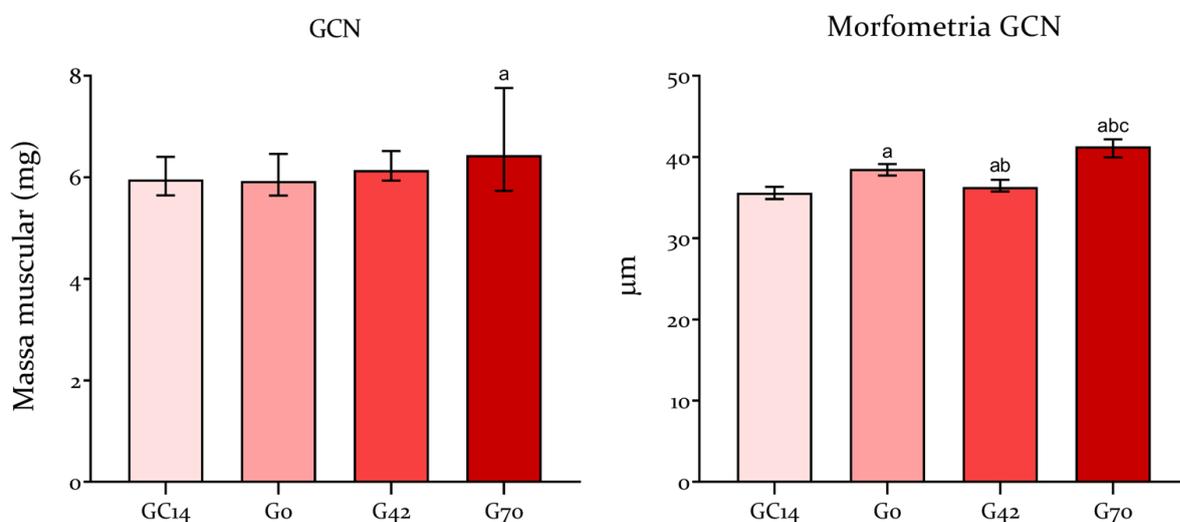
**Figura 1.** Gráficos ilustrando a massa e morfometria das fibras do músculo SOL. GC14: grupo controle com 14% de fonte de glúten; G0: ração isenta de fonte de glúten; G42: grupo com alto nível de fonte de glúten; G70: grupo com sobrecarga de fonte de glúten de trigo.



Resultados expressos como mediana e intervalo interquartil com 95% de intervalo de confiança (CI), (n = 8 para massa muscular, n = 3 para morfometria). Massa muscular (b:  $p < 0.05$  vs G0; ab:  $p < 0.05$  vs GC14 vs G0); Morfometria (a:  $p < 0.05$  vs GC14; ab  $p < 0.05$  vs GC14 vs G0; abc  $p < 0.05$  vs GC14 vs G0 vs G42).

Considerando o músculo GCN, a relação entre a massa muscular e a massa corporal (Figura 2), nos animais do grupo G70, mostrou aumento significativo em relação ao grupo G0. O diâmetro das fibras do GCN (Figura 2) no grupo G0 foi maior em relação ao controle GC14 e ao G42; entretanto, o mesmo grupo mostrou redução no diâmetro das fibras em relação ao grupo G70. O grupo G42 mostrou aumento no diâmetro das fibras musculares em relação ao grupo controle GC14. No grupo G70, o diâmetro das fibras musculares foi maior em relação ao controle GC14 e ao G42.

**Figura 2.** Massa muscular e morfometria das fibras musculares do músculo GCN. GC14: grupo controle com 14% de fonte de glúten; G0: ração isenta de fonte de glúten; G42: grupo com alto nível de fonte de glúten; G70: grupo com sobrecarga de fonte de glúten. b:  $p < 0,05$  vs. G0.



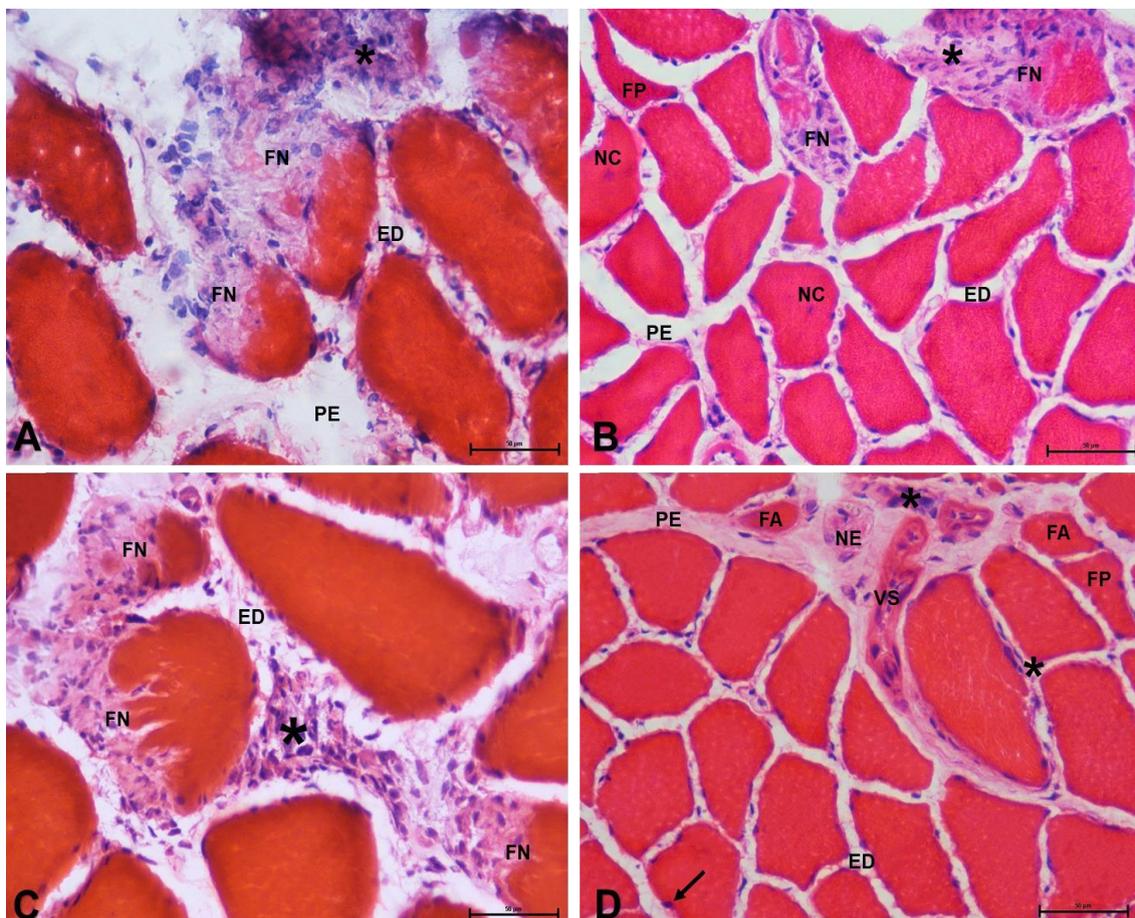
Resultados expressos como mediana e intervalo interquartil 95% de intervalo de confiança (CI), ( $n = 5$  para morfometria e  $n = 8$  para massa muscular). Massa muscular (a:  $p < 0.05$  vs GC14). Morfometria (a:  $p < 0.05$  vs GC14; ab:  $p < 0.05$  vs GC14 vs G0; abc:  $p < 0.05$  vs GC14 vs G0 vs G42).

### 3.2 Análise morfológica das fibras musculares

A análise dos cortes histológicos, corados em HE, do músculo SOL (Figura 3), em todos os grupos analisados, observou-se um espessamento do perímio e endomímio, indicando provável edema, sendo mais evidente no grupo G0. Adicionalmente, algumas regiões características de inflamação foram encontradas nesse músculo, como presença de células inflamatórias no tecido conjuntivo, além de vários focos de mionecrose em diferentes estágios.

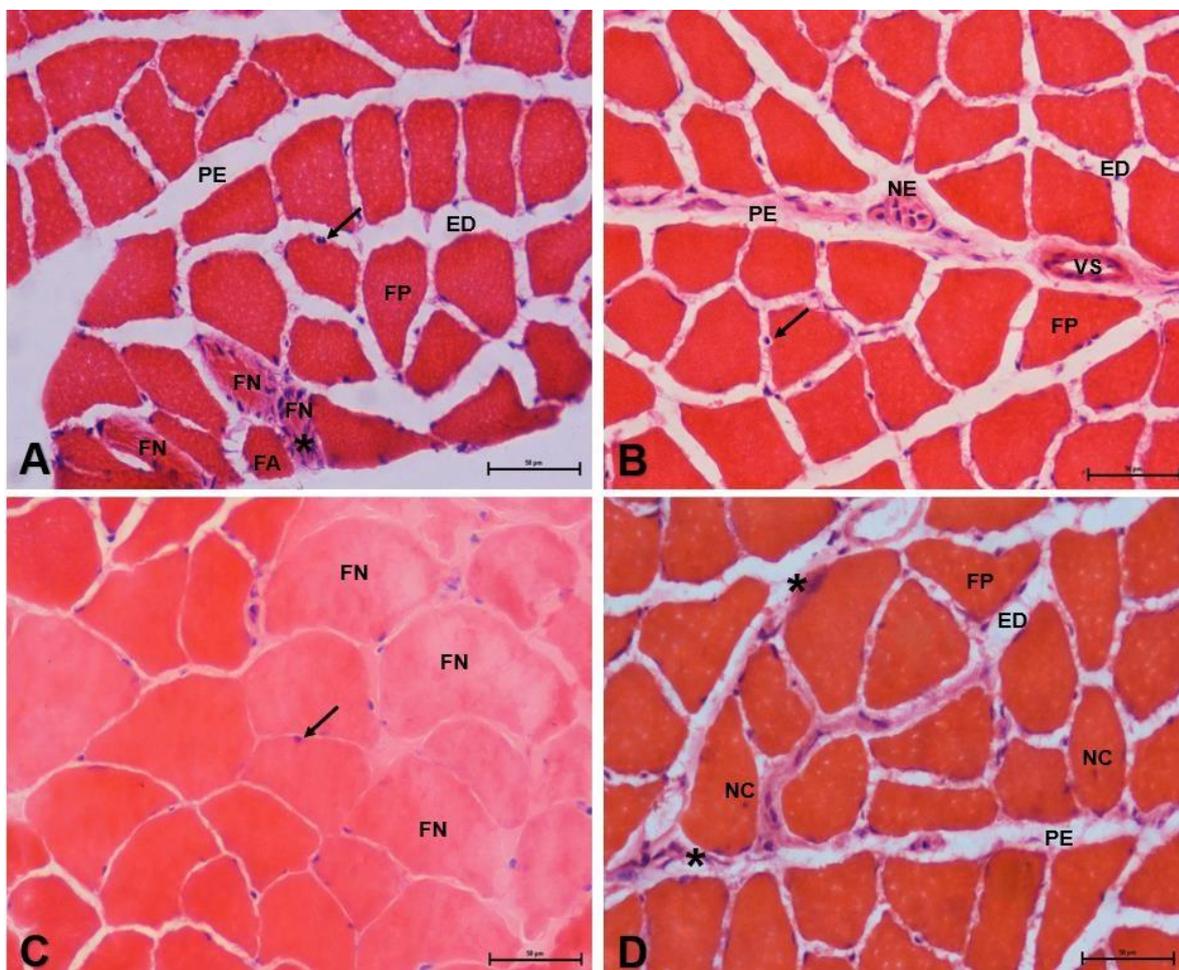
Além disso, foram observados, ocasionalmente, núcleos hipertróficos na periferia das fibras e núcleos centrais. Embora a maior parte das fibras do músculo SOL tenha apresentado morfologia normal, foram observadas algumas fibras polimórficas predominantemente angulares e fibras atroficas ocasionais. Apesar das características semelhantes entre os grupos analisados, nossos dados sugerem que os danos causados pela dieta isenta de glúten (grupo G0), no músculo SOL, foram mais acentuados em relação ao observado no grupo controle GC14 e aos grupos G42 e G70.

**Figura 3.** Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do músculo SOL dos ratos dos grupos com ração isenta de fonte de glúten G0 (A), GC14 (B), G42 (C) e G70 de fonte de glúten (D) ilustrando focos de inflamação e de mionecrose. FN: fibra muscular em mionecrose; NC: núcleo central; FA: fibra muscular atrófica; FP: fibra muscular polimórfica; NE: nervo; VS: vaso sanguíneo; ED: endomísio; PE: perimísio; Asteriscos: infiltrado inflamatório; seta: núcleo hipertrófico. Coloração: Hematoxilina-Eosina; objetiva de 40X, barra: 50 µm.



Nos grupos G0, GC14 G42 e G70, a análise morfológica do músculo GCN -revelou espessamento do perimísio e endomísio característico de edema (Figura 4). Além disso, núcleos centrais e hipertróficos foram evidenciados em algumas fibras musculares, sendo o primeiro observado principalmente no grupo G0. A maior parte das fibras apresentaram formato poligonal, com morfologia normal e preservada; entretanto, observou-se a presença de algumas fibras polimórficas com tendência à morfologia angular, além de fibras atróficas nos grupos G0, GC14 e G42. No grupo G42, foram observadas algumas fibras hipocrômicas, indicando mionecrose inicial. Foi observado aumento de células inflamatórias no tecido conjuntivo do endomísio, circundando as fibras musculares, caracterizando mionecrose em estágio inicial de todos os grupos.

**Figura 4.** Fotomicrografias representativas de cortes histológicos do músculo GCN dos ratos dos grupos com ração isenta de fonte de glúten G0 (A), GC14 (B), G42 (C) e G70 de fonte de glúten (D). FN: fibra muscular em mionecrose; NC: núcleo central; FA: fibra muscular atrófica; FP: fibra muscular polimórfica; NE: nervo; VS: vaso sanguíneo; ED: endomísio; PE: perimísio; asteriscos: infiltrado inflamatório; seta: núcleo hipertrófico. Coloração: Hematoxilina-Eosina; objetiva de 40X, barra: 50  $\mu$ m.

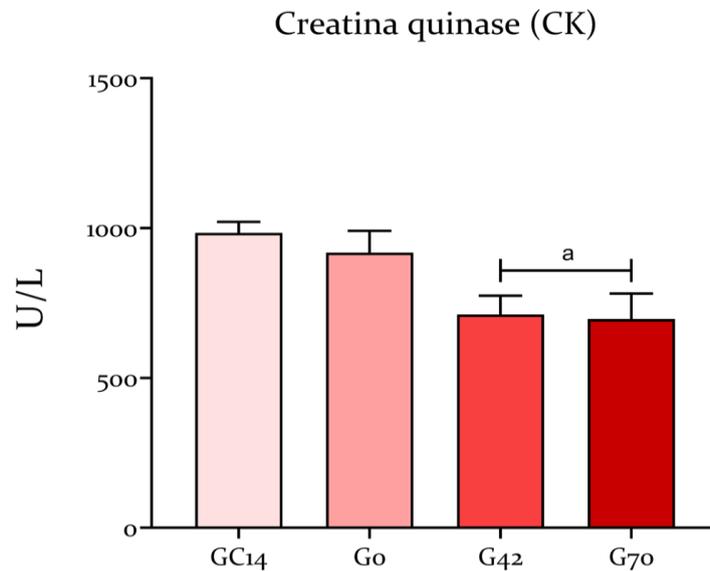


### 3.3 Análises bioquímicas

#### 3.3.1 Creatina quinase total (CK)

A concentração sérica da CK total reduziu nos grupos G42 ( $712.1 \pm 62.31$  U/L) e G70 ( $697.0 \pm 84.74$  U/L) em relação ao grupo controle GC14 ( $984.1 \pm 36.72$  U/L) (Figura 5). Não foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo controle GC14 para os demais grupos.

**Figura 5.** Gráfico ilustrando a dosagem de creatina quinase (U/L) no soro dos animais. GC14: grupo controle positivo com 14% de fonte de glúten; G0: ração isenta de fonte de glúten; G42: grupo com alto nível de fonte de glúten; G70: grupo com sobrecarga de fonte de glúten.

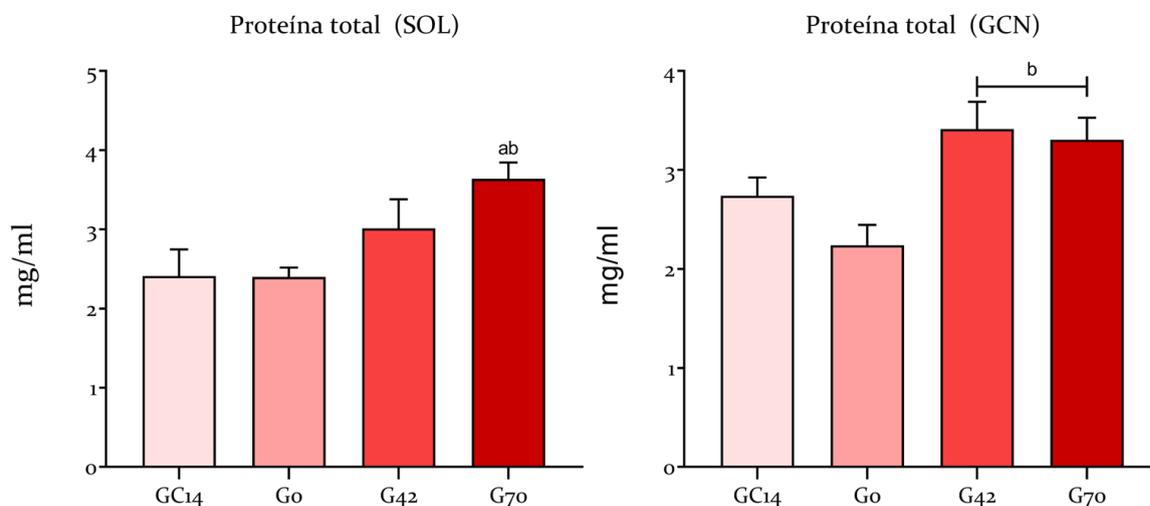


Resultados expressos com média  $\pm$  erro padrão, (n = 5) a:  $p < 0.05$  vs. G0

### 1.1.1 Proteínas totais

Quando analisados os níveis de proteínas totais no músculo SOL, o grupo G70 mostrou um aumento significativo em relação ao grupo controle GC14 e ao grupo isento de fonte glúten. No músculo GCN, os níveis de proteínas totais foram significativamente maiores nos grupos G42 e G70 em relação ao grupo isento de glúten (Figura 6).

**Figura 6.** Gráficos ilustrando os níveis de proteínas totais dos músculos SOL e GCN. GC14: grupo controle positivo com 14% de fonte de glúten; G0: ração isenta de fonte de glúten; G42: grupo com alto nível de fonte de glúten; G70: grupo com sobrecarga de fonte de glúten de trigo.



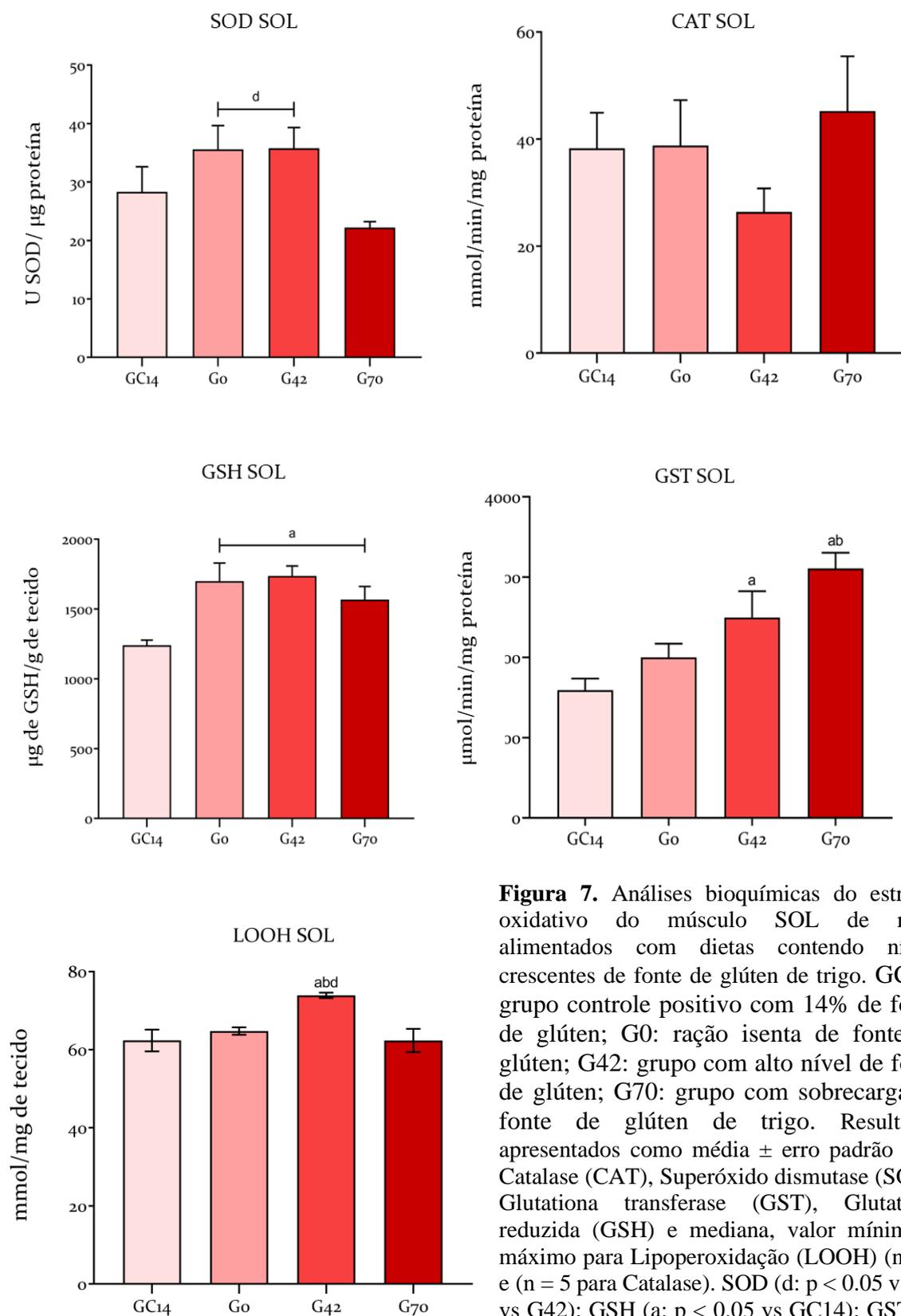
Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão (n = 7, para GCN) (n = 5, para SOL). Proteína total SOL (ab: p < 0.05 vs GC14 vs G0); Proteína total GCN (b: p < 0.05 vs G0)

### 3.3.4 Mensuração do estresse oxidativo

Os resultados referentes à mensuração do estresse oxidativo no músculo SOL estão apresentados na Figura 7. No músculo SOL, na atividade de superóxido dismutase (SOD), houve redução em 37.6% no grupo G70 em relação ao grupo G0 e em 38% em relação ao grupo G42.

Não foram observadas diferenças significativas na atividade da enzima catalase (CAT) entre os grupos avaliados. Nos grupos G42 e G70, a atividade da enzima glutiona s-transferase (GST) foi significativamente maior em relação ao grupo controle GC14, no primeiro o aumento foi de 36.2% e no segundo foi de 48.7%. Além disso, o grupo G70 aumentou em 35.6% em relação ao grupo G0.

Em relação à glutiona reduzida (GSH), os grupos G0, G42 e G70 apresentaram atividade enzimática aumentada em 27%, 28.6% e 21% em relação ao grupo controle GC14. Os resultados de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) mostraram aumento em na lipoperoxidação no grupo G42 em 12.37% em relação ao grupo G0, 15.6% em relação ao grupo controle GC14 e em 18.3% em relação ao grupo G70.



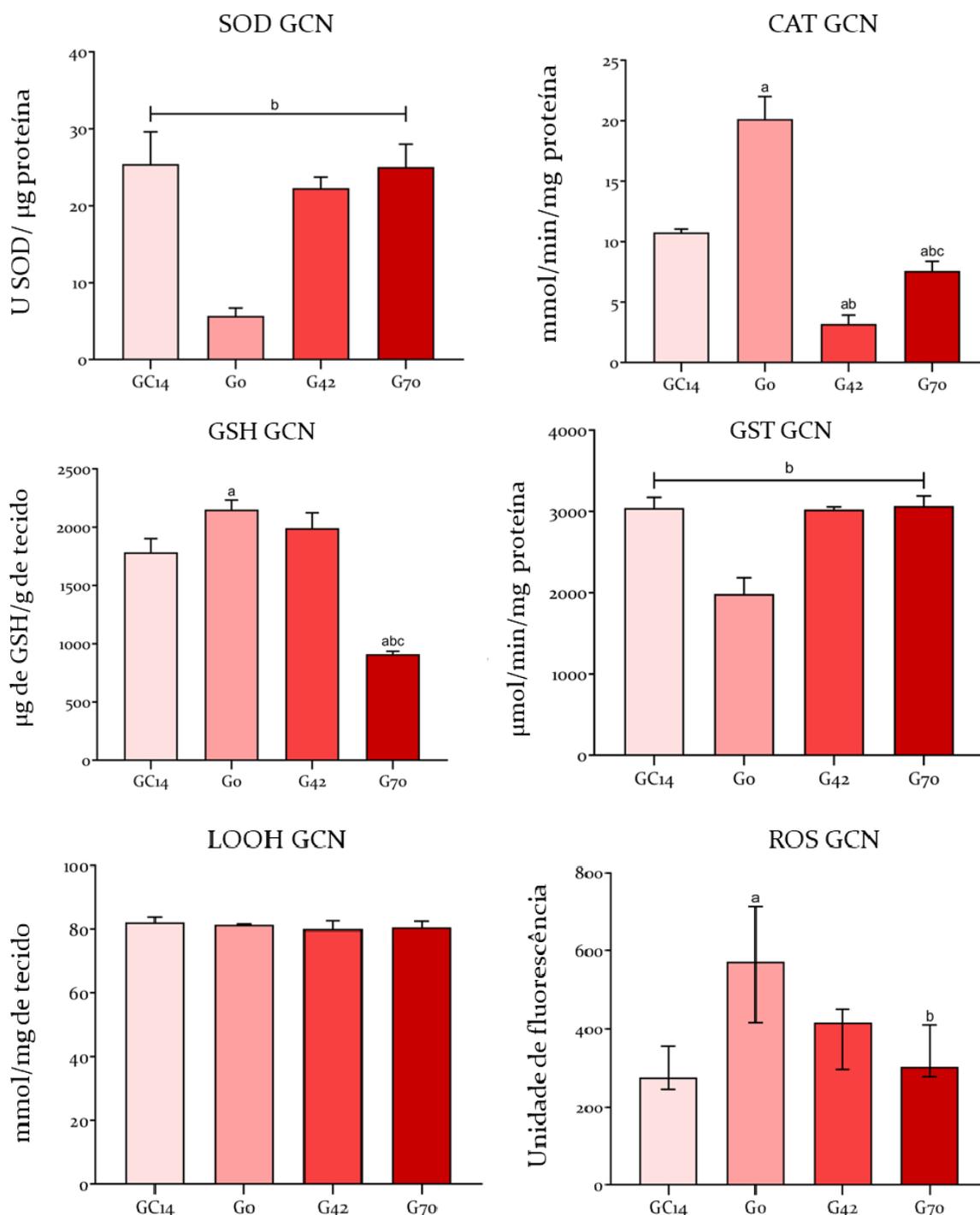
**Figura 7.** Análises bioquímicas do estresse oxidativo do músculo SOL de ratos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de fonte de glúten de trigo. GC14: grupo controle positivo com 14% de fonte de glúten; G0: ração isenta de fonte de glúten; G42: grupo com alto nível de fonte de glúten; G70: grupo com sobrecarga de fonte de glúten de trigo. Resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão para Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Glutaciona transferase (GST), Glutaciona reduzida (GSH) e mediana, valor mínimo e máximo para Lipoperoxidação (LOOH) (n= 6) e (n = 5 para Catalase). SOD (d:  $p < 0.05$  vs G0 vs G42); GSH (a:  $p < 0.05$  vs GC14); GST (a:  $p < 0.05$  vs GC14; ab:  $p < 0.05$  vs GC14 vs G0); LOOH (abd:  $p < 0.05$  vs GC14 vs G0 vs G70).

Os resultados referentes à mensuração do estresse oxidativo e de proteínas totais no músculo GCN estão apresentados na Figura 8. Na determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), foi observado um aumento no grupo G0 em 47.7% em relação ao grupo controle GC14 e em 40.70% em relação ao grupo G70. Entre os demais grupos, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de ROS.

No músculo GCN, em relação aos resultados da SOD, o grupo G0 apresentou atividade enzimática reduzida em 77.7% em relação ao grupo controle GC14, 74.5% em relação ao grupo G42 e 77.3% em relação ao grupo G70. A atividade da enzima CAT no grupo G0 aumentou em 87.2% em relação ao grupo controle GC14, 84.1% em relação ao grupo G42 e em 68.4% em relação ao grupo G70. O grupo G42 mostrou redução em 70.3% da atividade de CAT em relação ao grupo controle GC14 e em 57.8% em relação ao grupo G70. O grupo G70 também mostrou redução em 29.5% da atividade de CAT em relação ao grupo controle GC14.

Na enzima GST, o grupo G0 apresentou menor atividade da enzima em 34.7% em relação ao grupo controle GC14, em 34.3% em relação ao grupo G42 e em 35.3% em relação ao grupo G70. A mensuração da atividade enzimática de GSH do grupo G70 se mostrou reduzida em 71% em relação ao grupo controle GC14, em 74.5% em relação ao grupo G0 e em 54.2% em relação ao grupo G42. Além disso, o grupo G0 teve aumento significativo em 17% na atividade de GSH em relação ao grupo controle GC14. No que se refere à mensuração de LOOH, não foi observada diferença significativa na peroxidação lipídica em nenhum dos grupos.

**Figura 8.** Análises bioquímicas do estresse oxidativo do músculo GCN de ratos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de glúten. GC14: grupo controle positivo com 14% de fonte de glúten; G0: ração isenta de fonte de glúten; G42: grupo com alto nível de fonte de glúten; G70: grupo com sobrecarga de fonte de glúten de trigo.

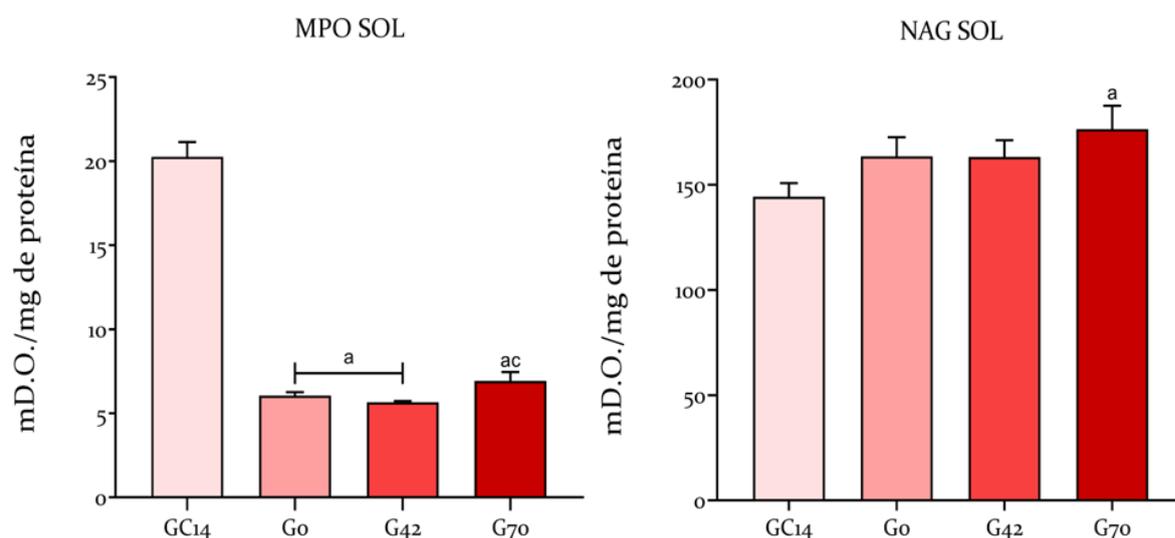


Resultados apresentados em mediana com valor mínimo e máximo para ROS e média  $\pm$  erro padrão para Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD), Glutaciona transferase (GST), Glutaciona reduzida (GSH) e Lipoperoxidação (LOOH), (n= 6) e (n = 5 para Catalase e ROS). SOD (b:  $p < 0.05$  vs G0); CAT (a:  $p < 0.05$  vs GC14; ab:  $p < 0.05$  vs GC14 vs G0; abc:  $p < 0.05$  vs GC14 vs G0 vs G42); GSH (a:  $p < 0.05$  vs GC14; abc:  $p < 0.05$  vs GC14 vs G0 vs G42); GST (b:  $p < 0.05$  vs G0); ROS (a:  $p < 0.05$  vs GC14; b:  $p < 0.05$  vs G0).

### 3.3.5 Mensuração das enzimas marcadoras de inflamação

A mensuração da atividade da MPO do músculo SOL mostrou redução significativa nos grupos G0, G42 e G70 em relação ao grupo controle GC14, em 70.1%, 72% e 65.8% (Figura 9). Também foi observada redução em 18.3% nos níveis de MPO no grupo G42 em relação ao grupo G70. A atividade enzimática de NAG (Figura 9) no músculo SOL aumentou em 18.2% no grupo G70 em relação ao grupo controle GC14.

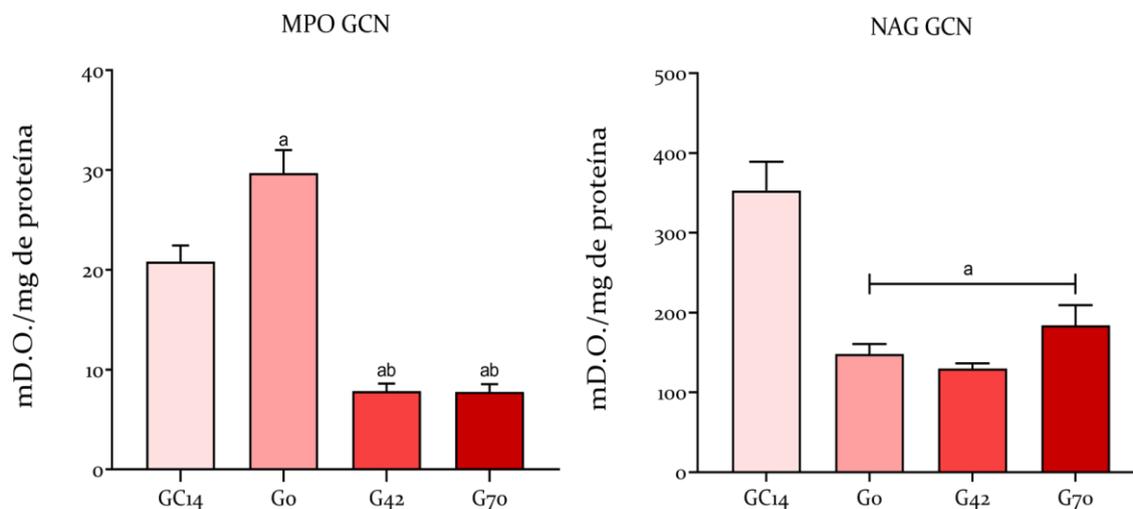
**Figura 9.** Gráficos ilustrando a atividade das enzimas marcadoras de inflamação, mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) no músculo SOL de ratos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de glúten. GC14: grupo controle positivo com 14% de fonte de glúten; G0: ração isenta de fonte de glúten; G42: grupo com alto nível de fonte de glúten; G70: grupo com sobrecarga de fonte de glúten de trigo.



Resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão (n = 5). MPO (a:  $p < 0.05$  vs GC14; ac:  $p < 0.05$  vs GC14 vs G42); NAG (a:  $p < 0.05$  vs GC14).

A atividade enzimática da MPO (Figura 10) no músculo GCN foi maior no grupo G0 em 29.9% em relação ao grupo controle GC14, 73.6% em relação ao grupo G42 e 73.9% em relação ao grupo G70. Os grupos G42 e G70 mostraram redução na atividade de MPO em relação ao grupo controle GC14, em 62.3% e 62.7%. A mensuração nos níveis da enzima NAG (Figura 9) no músculo GCN mostrou redução significativa nos grupos G0, G42 e G70 em relação ao grupo controle GC14, em 58.1%, 63.2% e 47.9%.

**Figura 10.** Gráficos ilustrando a atividade das enzimas de inflamação MPO e NAG no músculo GCN de ratos alimentados com dietas contendo níveis crescentes de glúten. GC14: grupo controle positivo com 14% de fonte de glúten; G0: ração isenta de fonte de glúten; G42: grupo com alto nível de fonte de glúten; G70: grupo com sobrecarga de fonte de glúten.

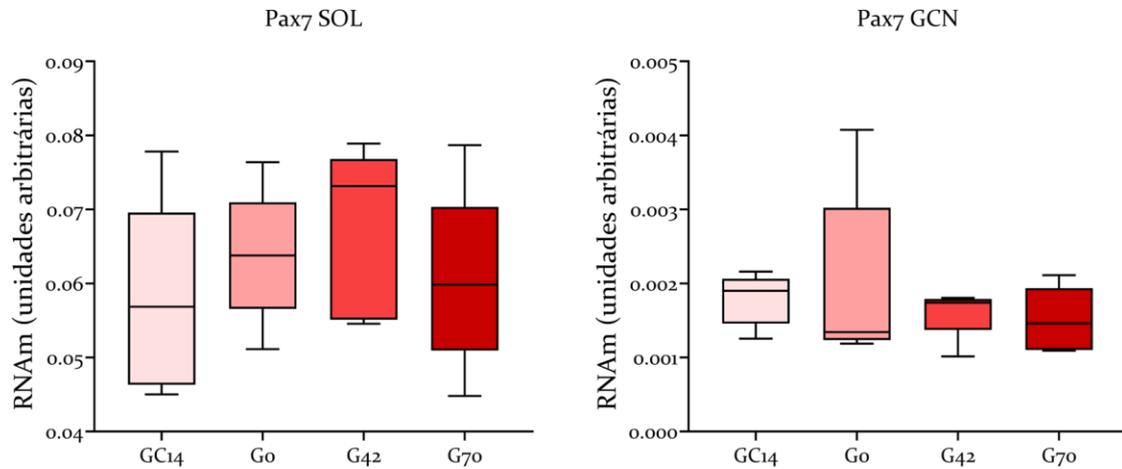


Resultados apresentados em média  $\pm$  erro padrão (n: 5). MPO (a:  $p < 0.05$  vs GC14; ab:  $p < 0.05$  vs GC14 vs G0); NAG (a:  $p < 0.05$  vs GC14).

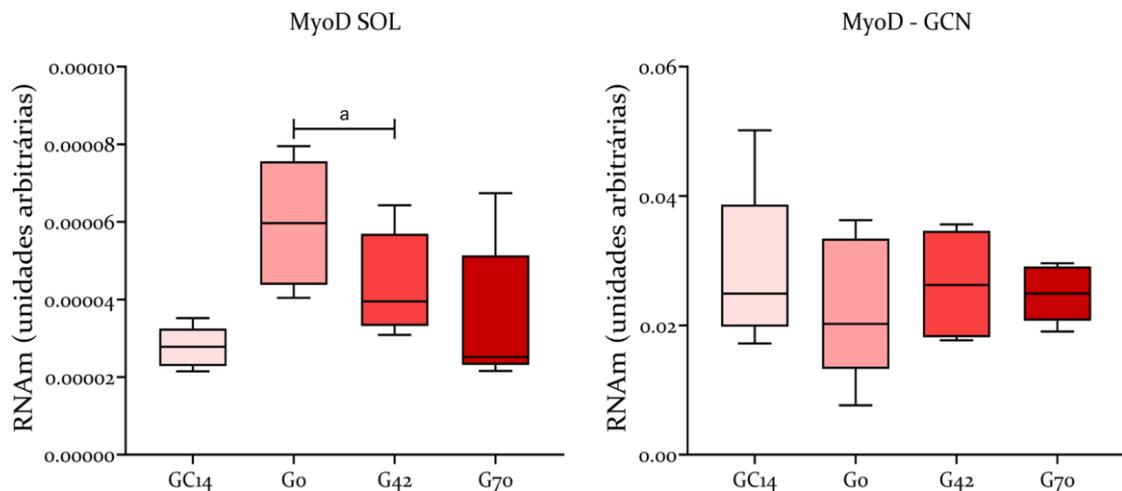
## 1.2 Quantificação da expressão gênica

Considerando a expressão do gene Pax7, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em ambos os músculos analisados (Figura 11). Em relação ao gene MyoD, foi observado aumento na expressão nos grupos G0 e G42 em relação ao grupo controle GC14 (Figura 12). A expressão do gene MYOG não apresentou diferenças significativas para nenhum dos músculos analisados (Figura 13). No músculo SOL, não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica de IL-6 entre os grupos avaliados. Entretanto, no músculo GCN dos animais alimentados com ração isenta de glúten observou-se uma redução na expressão de IL-6 em relação ao grupo controle GC14 (Figura 14).

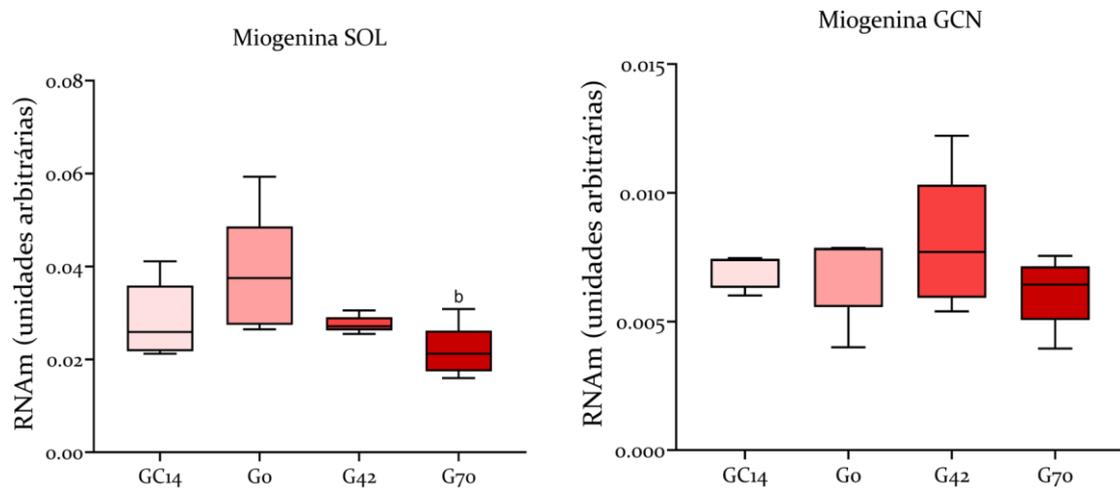
**Figura 11.** Gráficos ilustrando a expressão do mRNA de Pax7 dos músculos SOL e GCN. Dados apresentados em média  $\pm$  erro padrão para SOL e em mediana com valor mínimo e máximo para GCN, (n = 5). GC14: grupo controle positivo com 14% de fonte de glúten; G0: ração isenta de fonte de glúten; G42: grupo com alto nível de fonte de glúten; G70: grupo com sobrecarga de fonte de glúten de trigo.



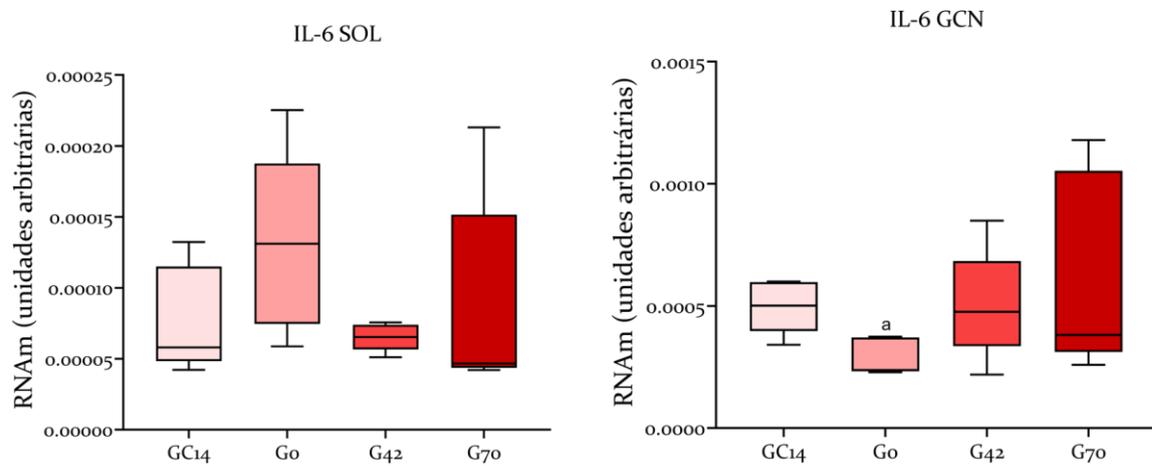
**Figura 12.** Gráfico ilustrando a expressão do mRNA de MyoD dos músculos SOL e GCN. Dados apresentados em mediana com valor mínimo e máximo para SOL e em média  $\pm$  erro padrão para GCN, (n = 5). GC14: grupo controle positivo com 14% de fonte de glúten; G0: ração isenta de fonte de glúten; G42: grupo com alto nível de fonte de glúten; G70: grupo com sobrecarga de fonte de glúten de trigo. a:  $p < 0.05$  vs GC14.



**Figura 13.** Gráficos ilustrando a expressão do mRNA de MYOG dos músculos SOL e GCN. Dados apresentados em média  $\pm$  erro padrão para SOL e em mediana com valor mínimo e máximo para GCN, (n = 5). GC14: grupo controle positivo com 14% de fonte de glúten; G0: ração isenta de fonte de glúten; G42: grupo com alto nível de fonte de glúten; G70: grupo com sobrecarga de fonte de glúten de trigo. b:  $p < 0.05$  vs G0.



**Figura 14.** Gráfico ilustrando a expressão do mRNA de IL-6 dos músculos SOL e GCN. Dados apresentados em mediana com valor mínimo e máximo, (n = 5). GC14: grupo controle positivo com 14% de fonte de glúten; G0: ração isenta de fonte de glúten; G42: grupo com alto nível de fonte de glúten; G70: grupo com sobrecarga de fonte de glúten. a:  $p < 0.05$  vs GC14.



## 2. DISCUSSÃO

### 2.1 Massa muscular, análise histológica e proteínas totais musculares

O tecido muscular estriado esquelético é o mais abundante do corpo, sendo também o maior reservatório de proteínas nos vertebrados. A sua sucessiva remodelação ou renovação proteica, ou seja, a substituição de proteínas danificadas por novas, mostra a alta plasticidade do proteoma muscular para resistir a estímulos externos, os quais podem ser expressos a partir de mudanças na massa e função muscular [41,42]. Essas taxas de renovação protéica apresentam diferenças entre as espécies, sendo consideradas maiores em roedores quando comparadas com humanos [43].

Os maiores níveis de fonte de glúten de trigo influenciaram na massa e diâmetro das fibras dos músculos SOL e GCN. As rações com sobrecarga (grupo G42) e excesso (grupo G70) de fonte de glúten apresentaram maior teor proteico, de acordo com a análise bromatológica (dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa). A maior concentração de proteínas totais nos músculos SOL e GCN corroboram com a alta concentração proteica na ração fornecida aos grupos G42 e G70. O aumento na massa muscular e diâmetro das fibras musculares de animais alimentados com alto teor de proteínas nesses grupos mostram que a composição da dieta é crucial para a síntese proteica, principalmente porque a ingestão e a disponibilidade de aminoácidos essenciais vão contribuir para o balanceamento positivo de proteínas musculares, permitindo que haja a preservação da massa muscular [44–46].

Os animais dos grupos G42 e G70 receberam ração com maior teor de fonte de glúten, a farinha de trigo, que contém L-leucina, um aminoácido essencial de cadeia ramificada (BCAAs) [47]. Este aminoácido estimula a proteína mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*) na via que regula e promove o *turnover* de proteínas e reduz a proteólise, proporcionando o aumento no diâmetro das fibras musculares [47–50].

Desse modo, a L-leucina, é fundamental para a síntese de proteínas musculares, promovendo aumento da massa muscular. Esses efeitos benéficos da L-leucina vêm sendo comprovados no tratamento contra a sarcopenia [50,51]. Assim, o aumento do diâmetro das fibras musculares dos animais alimentados com ração contendo G42 e G70 de fonte de glúten está relacionado à maior disponibilidade de BCAAs que supriram a alta demanda do *turnover* protéico do tecido muscular, processo necessário para o remodelamento e a reconstrução de novas proteínas do tecido [45].

Embora os alimentos vegetais apresentem menor teor de BCAAs em relação às

proteínas de origem animal e a digestibilidade proteica nesses alimentos varie de acordo com a fonte, dietas à base de proteínas vegetais, quando bem implementadas, apresentam potencial positivo sobre o aumento da massa muscular [50,52], conforme evidenciado pelo nosso estudo.

As proteínas são importantes reguladoras do metabolismo e o principal macronutriente para a construção e manutenção do tecido muscular [53,54]. A menor concentração de proteínas totais, observada nos músculos SOL e GCN nos animais alimentados com dieta isenta de glúten e com GC14 de fonte de glúten, pode estar relacionada com as alterações morfológicas nas fibras musculares que foram mais evidentes nesses grupos.

No grupo G0, os músculos SOL e GCN apresentaram maior diâmetro das fibras em relação ao controle GC14. O aumento no diâmetro das fibras é um processo relevante para quadros patológicos, ou seja, é um mecanismo de defesa para a musculatura que contém alguma disfunção [55]. Corroborando com esses resultados, a análise morfológica dos músculos SOL e GCN dos animais do grupo G0 mostrou focos de inflamação de baixo grau e fibras em mionecrose inicial e tardia, além de fibras completamente fagocitadas, sendo mais evidentes no SOL.

Conforme o tipo de lesão, a mionecrose pode ser total ou estar presente de forma segmentada, em que apenas algumas regiões da fibra muscular são afetadas [56]. Após a mionecrose da fibra muscular, é possível observar infiltrado inflamatório de macrófagos que agem no tecido morto, iniciando a fagocitose da fibra [56], processo observado no SOL e GCN dos animais do grupo G0. A ativação primária dos macrófagos induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio após lesão tecidual [53]. O músculo que sofreu lesão, recruta monócitos sanguíneos que são diferenciados em macrófagos anti-inflamatórios e essa mudança ocorre logo após a fagocitose de miofibras necrosadas [53].

Focos de inflamação de baixo grau também foram observados nos músculos SOL e GCN dos animais em todos os grupos avaliados. O processo inflamatório é resultado de uma resposta celular específica do organismo, que pode ser desencadeada por diversos fatores de estresse que acometem os tecidos [57]. Além disso, é um processo fundamental para a restauração da homeostase funcional e fenotípica tanto da célula quanto do órgão ou tecido lesado [58].

Embora, no nosso estudo, ambos os músculos tenham apresentado focos de

inflamação de baixo grau, independentemente do nível de glúten na dieta, o modelo de SNCG em humanos está relacionado com o desenvolvimento de miopatias inflamatórias, algumas inespecíficas, em que são observadas alterações nas fibras musculares, como a presença de núcleos internos, fibras atroficas arredondadas e perda da coloração normal [11]. Todas essas características corroboram com os resultados observados na análise histológica dos músculos SOL e GCN dos animais tratados com dietas contendo GC14, G42 e G70 de glúten.

## *2.2 Análises bioquímicas*

### *2.2.1 Creatina quinase (CK)*

A CK é um biomarcador de danos no sarcolema, podendo ser utilizada como um indicador de lesão e inflamação muscular [12]. Os níveis séricos de CK foram menores nos grupos G42 e G70, em comparação ao controle GC14, o que pode estar relacionado com o fato dos músculos SOL e GCN terem sido menos acometidos por focos de inflamação em comparação ao controle GC14, conforme demonstrado na análise histológica. Além disso, o maior teor de fonte de glúten e L-leucina nessas rações, sugere que, nos grupos G42 e G70, o turnover de proteínas promoveu menor proteólise nos músculos SOL e GCN [47–50].

### *2.2.2 Estresse Oxidativo*

O desbalanceamento entre espécies reativas de oxigênio (ROS) e os sistemas antioxidantes, em que ROS se mostram elevadas, enquanto os antioxidantes apresentam-se reduzidos, leva as células ao estresse oxidativo (EO), bem como à ocorrência de danos teciduais [59]. No nosso organismo, a partir de processos metabólicos oxidativos, ocorre a produção natural de ROS que, na maioria das vezes, desempenham papéis fundamentais na ativação do sistema imunológico, como no caso de macrófagos que utilizam peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para destruir elementos estranhos ao corpo [24].

No músculo GCN, observamos aumento de ROS no grupo alimentado com dieta isenta de glúten em relação aos grupos controle GC14 e G70. Esse aumento pode ser justificado pela presença dos focos de inflamação observados nesse músculo, uma vez que células inflamatórias estão envolvidas na produção de radicais superóxido (O<sub>2</sub>•) [60].

Além disso, danos no tecido muscular e processos inflamatórios por eles induzidos podem também acarretar na produção de ROS [61]. Devido à formação contínua de ROS em pequenas quantidades em condições normais ou em altas quantidades em quadros patológicos, é necessário que haja um sistema antioxidante que regule e defenda as células e tecidos dessas substâncias agressoras [24,61].

No músculo GCN dos animais que receberam ração isenta de glúten, houve redução na concentração de SOD e aumento nos níveis de CAT em relação ao grupo controle GC14. A redução na atividade dessas enzimas antioxidantes se dá em decorrência de insultos oxidativos, ou seja, a presença demasiada de ROS reduz a ação antioxidante do organismo [61], o que corrobora com os resultados observados no músculo GCN dos animais alimentados com ração isenta de glúten, conforme mencionado anteriormente.

Além disso, a enzima SOD age regulando a quantidade do radical  $O^{2\cdot}$  presente nas células, mas, em consequência, provoca o aumento na concentração de peróxido de hidrogênio no meio intracelular [62]. Dessa forma, é normal que ocorra aumento nos níveis de CAT para que as concentrações de peróxido de hidrogênio sejam controladas [63,64]. Esse padrão, no qual as concentrações de SOD são reduzidas e de CAT elevadas, foi observado no músculo GCN dos animais que receberam ração isenta de glúten. Além disso, a atividade da SOD depende não somente da quantidade da enzima CAT no meio, mas também da concentração de seu substrato [61].

No músculo GCN dos animais alimentados com ração contendo alto teor (grupo G42) e excesso de fonte de glúten (grupo G70), foi observada redução da atividade enzimática de CAT em relação ao grupo controle GC14. No músculo SOL, não foram observadas diferenças na concentração de CAT entre os grupos avaliados. Entretanto, houve redução na concentração de SOD no grupo G70 em relação aos grupos alimentados com ração isenta de glúten e com G42 de fonte de glúten. Em trabalhos que utilizam como modelo a doença celíaca, tem sido descrito que os peptídeos P31-43 da  $\alpha$ -gliadina apresentam a capacidade de penetrar nas células por absorção endocítica [65,66].

Por consequência, esses peptídeos são acumulados nos lisossomos e resultam na ativação de algumas vias de transdução de sinal que culminam no aumento dos níveis de radicais livres [67]. Assim, nossos resultados sugerem que os fatores que potencializam a toxicidade da gliadina são a redução na capacidade antioxidante e um estado pró-inflamatório [21], características observadas na atividade de SOD e CAT dos animais alimentados com ração contendo G42 e G70 de fonte de glúten. Pacientes celíacos apresentam redução e desbalanceamento das defesas antioxidantes, como, por exemplo,

redução de SOD e CAT, quando comparados com pacientes saudáveis. Além disso, outra característica observada nos pacientes celíacos é o aumento nos níveis de produtos de peroxidação lipídica (LOOH) [59,68,69].

Neste trabalho, os maiores níveis de produtos de peroxidação lipídica foram observados no músculo SOL do grupo G42 em comparação aos demais grupos. Entretanto, no GCN não foram observadas diferenças neste parâmetro entre os grupos avaliados. Esse aumento na concentração de produtos de peroxidação lipídica no músculo SOL do grupo G42 é um indicativo de EO, o qual faz parte de um dos mecanismos que contribuem para a toxicidade da gliadina [69], uma vez que a exposição a essa proteína antecede o desequilíbrio dos antioxidantes intracelulares [70].

Além das defesas antioxidantes já citadas, outro grupo importante de antioxidantes são as glutatonas como, a GSH e a enzima GST, que atuam na defesa contra xenobióticos, radicais livres e na eliminação de produtos da lipoperoxidação [28,71], sendo considerado, provavelmente, o sistema de defesa antioxidante mais importante nas fibras musculares [61].

Neste trabalho, o excesso de fonte de glúten de trigo (grupo G70) promoveu redução na atividade de GSH no músculo GCN em comparação aos grupos controle GC14, G0 e G42. Assim, uma possível toxicidade, relacionada com o excesso de fonte de glúten e, portanto, gliadina, resultou na redução da atividade antioxidante de GSH no músculo GCN. Corroborando com nosso resultado, foi relatado, em um outro estudo, a redução da atividade de GSH na mucosa intestinal de pacientes celíacos com a forma ativa da doença [72].

Na literatura, são escassos os estudos envolvendo o glúten e os antioxidantes não enzimáticos (GSH) e enzimáticos (GST) no músculo esquelético. A maioria dos trabalhos aborda essa análise no músculo esquelético de humanos em condições patológicas. Por exemplo, em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) ou sarcoglicanopatias, foi observada a redução de GSH nos músculos bíceps e vasto lateral, o que contribuiu para a diminuição da função antioxidante [73].

Contrariamente ao observado no GCN, no músculo SOL, o alto teor (grupo G42) e excesso de fonte de glúten (grupo G70) resultaram nos maiores níveis de GSH em relação ao grupo controle GC14. Apesar do GSH ser o antioxidante mais importante e abundante no tecido muscular, em trabalhos que utilizam como modelo experimental a DMD, ainda são escassas as informações sobre os componentes principais do sistema GSH e sua resposta ao estresse oxidativo [74].

Nos músculos SOL e GCN, o grupo G0 apresentou aumento nos níveis de GSH em relação ao controle GC14. Corroborando com esse resultado, pacientes celíacos que

adotaram uma dieta isenta de glúten (grupo GFD, do inglês *gluten free diet*) apresentaram maior atividade de GSH na mucosa intestinal em relação a pacientes celíacos que mantiveram uma dieta com glúten [75]. Dessa forma, na literatura, a maioria dos estudos avalia os efeitos do glúten sobre a atividade de GSH no intestino delgado de pacientes celíacos em comparação aos não-celíacos [68,72,75,76].

Além da GSH, outra glutathiona que pode ser alterada devido à exposição à gliadina é a GST, que mostra níveis reduzidos em cultura de células [77]. No músculo SOL, o excesso de fonte de glúten de trigo (grupo G70) promoveu aumento da concentração de GST em relação ao controle GC14 e ao grupo isento de glúten. Esse resultado diverge daqueles encontrados na literatura, uma vez que há redução na atividade de GST em cultura de células Caco-2 (células tumorais de cólon humano), quando há exposição aos peptídeos P31-43 da gliadina [76].

Diferentemente dos achados observados no SOL, no músculo GCN dos grupos G42 e G70, a atividade de GST não apresentou diferenças em relação ao controle GC14, mas houve redução nos níveis dessa enzima no grupo G0 em comparação aos demais grupos. Na morfologia muscular do GCN, no grupo G0, foi possível observar a presença de alguns focos isolados de inflamação que podem ter contribuído para a redução de GST.

Já foi bem relatado em camundongos *mdx*, modelo para estudo da DMD, o comprometimento da atividade das enzimas antioxidantes, acompanhado de danos oxidativos [78]. Além disso, a inflamação crônica é uma das características que acomete a fisiopatologia e a progressão da DMD, causando as lesões musculares características dessa doença [79]. No modelo de DMD, bem como em outras distrofias musculares, como sarcoglicanopatias e disferlinopatia, é possível visualizar a redução da atividade de GST na musculatura esquelética [73].

### 2.2.3 Enzimas de inflamação: MPO e NAG

A MPO é uma enzima de inflamação e de estresse oxidativo presente nos neutrófilos e está associada com várias doenças inflamatórias relacionadas à intolerância ao glúten de trigo [80,81]. Nesse trabalho, a atividade da MPO, nos músculos SOL e GCN, mostrou-se reduzida nos animais alimentados com alto teor e excesso de fonte de glúten de trigo (grupos G42 e G70, respectivamente) em relação ao controle GC14. Esse resultado foi diferente do esperado, uma vez que a análise de estresse oxidativo mostrou um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes nesses músculos.

No nosso trabalho, foi avaliada a dosagem tecidual da MPO, enquanto, na literatura, a

maioria dos estudos realiza a dosagem sérica dessa enzima em pacientes celíacos ou em cultura de células estimuladas com gliadina. Contudo, os resultados são conflitantes, uma vez que a atividade de MPO sérica mostra-se reduzida em pacientes celíacos [82] e aumentada em células cultivadas *in vitro* que foram tratadas com a gliadina isolada [80,83]. Considerando os animais alimentados com ração isenta de glúten, o músculo SOL mostrou menor atividade de MPO em relação ao grupo controle GC14.

Estudos envolvendo a quantificação de MPO, em animais alimentados com dieta isenta de glúten e em pacientes celíacos, são limitados na literatura e os resultados já descritos são divergentes. Por exemplo, foram encontrados níveis séricos aumentados de MPO em pacientes com DC em comparação com pacientes saudáveis [17]. Entretanto, similarmente aos nossos resultados, já foram relatados níveis séricos menores de MPO em pacientes celíacos em relação aos pacientes saudáveis [82].

No grupo isento de fonte de glúten de trigo, o músculo GCN mostrou aumento da atividade de MPO em relação ao controle GC14 e aos grupos G42 e G70. Conforme discutido anteriormente, no nosso estudo, o grupo isento de glúten mostrou atividade da SOD reduzida e de CAT aumentada no GCN, já que o antioxidante tende a diminuir (SOD) na presença do agente oxidante, e a CAT tende a aumentar quando ocorre o aumento de peróxido de hidrogênio no meio. Sendo assim, uma vez que MPO catalisa a reação entre peróxido de hidrogênio e o íon cloreto (Cl<sup>-</sup>) [84], pode ser que sua atividade aumentada, no grupo isento de glúten, esteja relacionada com o aumento na concentração de peróxido de hidrogênio no meio.

A atividade elevada de NAG já foi caracterizada em algumas doenças inflamatórias [85], uma vez que essa enzima está presente em macrófagos ativados, relacionando-se com a fase inflamatória tardia [86,87]. No músculo SOL, a atividade de NAG apresentou-se aumentada no grupo G70 em relação ao controle GC14. Esse resultado sugere que os danos nas fibras musculares do SOL possam estar relacionados com uma inflamação promovida pela ativação de macrófagos [88] devido à exposição ao excesso de fonte de glúten de trigo, cujos efeitos inflamatórios já foram discutidos anteriormente.

No músculo GCN, a atividade de NAG encontra-se reduzida nos grupos G0, G42 e G70 em relação ao controle GC14. A atividade de NAG está relacionada com o recrutamento de macrófagos durante a inflamação [87]. A análise morfológica mostrou que o músculo GCN foi menos afetado pelos focos de inflamação que o SOL e a redução nos níveis de NAG no GCN pode estar envolvida com uma menor atividade de células

inflamatórias, como os macrófagos, ou com a redução da migração leucocitária [88].

Trabalhos que analisaram a atividade das enzimas MPO e NAG nos músculos SOL e GCN nos modelos de SNCG ou DC são pouco frequentes na literatura; portanto, mais estudos precisam ser realizados para caracterizar a contribuição dessas enzimas em processos inflamatórios na musculatura esquelética.

### 2.3 Quantificação da expressão gênica

#### 2.3.1 Pax7, Fatores de regulação miogênica (MRFs) e IL-6

Nos músculos SOL e GCN, os diferentes níveis de fonte de glúten não influenciaram na expressão do gene Pax7, expresso especificamente pelas células satélites (CS) e amplamente utilizado como marcador de sua quiescência [32]. Em condições homeostáticas, as células satélites estão em um estado de quiescência que é iniciado e mantido pela atividade transcricional contínua da Pax7 [33]. Uma vez ativadas por estresse ou lesão, as CS proliferam, se tornam mioblastos e entram na fase inicial de diferenciação, tornando-se mioblastos que iniciam a expressão dos MRFs, ou retornam à quiescência para restabelecer a população de CS nas fibras musculares [33,89].

Os mioblastos em proliferação expressam os MRFs MyoD e Myf-5, enquanto a sua diferenciação é controlada pela expressão dos MRFs MYOG e MRF4 [32,33]. No músculo SOL, a maior expressão gênica de MyoD, observada nos grupos G0 e G42, em relação ao controle GC14, pode indicar uma maior ativação de CS e proliferação de mioblastos que contribuiu com o maior diâmetro das fibras musculares, conforme observado na análise morfométrica. A maior expressão gênica de MYOG no grupo G0, em comparação ao G70, sugere que a maior diferenciação de mioblastos, no músculo dos animais alimentados com dieta isenta de glúten, contribuiu com o maior diâmetro das fibras, em resposta aos estímulos inflamatórios, mesmo que de baixo grau, conforme observado nas análises morfológica e morfométrica.

Na literatura são escassos trabalhos que relacionem dietas com diferentes níveis de fonte de glúten e a expressão de MRFs na musculatura esquelética de humanos e roedores. Em estudos realizados com modelos de roedores *mdx* para DMD, foi observado aumento na expressão do mRNA de MyoD e MYOG no músculo diafragma, resultado que pode estar relacionado com o processo inflamatório e que corrobora com os dados encontrados no modelo estudado neste trabalho [90].

Além dos estudos com DMD, outros autores também encontraram aumento na

expressão do mRNA de MyoD e MYOG no músculo GCN de animais artríticos [91]. Em outros casos que envolveram quadros de inflamação no músculo tibial anterior (TA) de ratos, também foi notado o aumento da expressão de mRNA de MyoD [92]. A expressão gênica de Pax7, MyoD e MYOG, no músculo GCN, não apresentou diferenças significativas entre os grupos. Dessa forma, diferentes níveis de fontes de glúten não influenciaram na expressão dos genes músculo-específicos avaliados, o que pode estar relacionado com o fato do músculo GCN ter sido menos acometido por focos de inflamação que o músculo SOL, conforme observado na análise morfológica.

Nesse estudo, foi quantificada a expressão gênica da miocina IL-6 que desempenha um papel fundamental em condições fisiológicas e patológicas, sendo produzida principalmente após estímulos inflamatórios [93]. A expressão do mRNA de IL-6 no músculo SOL não apresentou diferença significativa entre os grupos, resultado que difere do músculo GCN que mostrou menor expressão IL-6 no grupo isento de fonte de glúten em relação ao grupo controle GC14. Embora ambos os músculos tenham apresentado focos de inflamação, no grupo G0 a menor expressão de IL-6 no GCN corrobora com o achado de que ele seja menos acometido pela inflamação em comparação com o músculo SOL, conforme observado na análise morfológica.

Estudos envolvendo o modelo de SNCG com o tecido muscular estriado esquelético são escassos na literatura. A maioria dos trabalhos abrange pacientes ou camundongos distróficos *mdx*. Já foram relatados resultados de biópsias musculares envolvendo o aumento na expressão do mRNA de IL-6 em pacientes que apresentam dermatomiosite juvenil [94]. Além disso, também foi encontrado aumento da expressão de IL-6 no músculo tibial anterior (TA) de ratos machos *mdx* portadores de DMD [95]. Além das distrofias musculares, a expressão do mRNA de IL-6 pode ser aumentada a partir do estímulo do exercício resistido intenso que induz danos às fibras musculares, promovendo a inflamação [96,97]. Além disso, exercícios concêntricos e excêntricos, realizados em uma única sessão, também podem aumentar a expressão de IL-6 [98].

Desse modo, de acordo com o protocolo experimental utilizado nesse estudo, os níveis crescentes de fonte de glúten de trigo, bem como a dieta isenta de glúten, influenciaram na morfologia e morfometria das fibras, na inflamação, estresse oxidativo e expressão de genes relacionados com a atividade de CS nos músculos SOL e GCN de ratos *Wistar*.

### 3. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos ao fim dessa pesquisa mostram que níveis crescentes de fonte de glúten de trigo e a dieta isenta de glúten promoveram alterações morfológicas e morfométricas nos músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos *Wistar*, como presença de focos de inflamação de baixo grau e aumento no diâmetro das fibras. Além disso, foram observadas alterações nos biomarcadores de inflamação, como a CK, MPO e NAG, um quadro de estresse oxidativo no músculo sóleo de todos os grupos analisados, e mudanças na expressão de genes músculo-específicos e de IL-6 que controlam a atividade de células satélites.

#### 4. REFERÊNCIAS

1. Biesiekierski, J.R. What Is Gluten? *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2017, 32, 78–81, doi:10.1111/jgh.13703.
2. Wieser, H. Chemistry of Gluten Proteins. *Food Microbiol.* 2007, 24, 115–119, doi:10.1016/j.fm.2006.07.004.
3. Balakireva, A. V.; Zamyatnin, A.A. Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities. *Nutrients* 2016, 8, doi:10.3390/nu8100644.
4. Farmacêuticas, F.D.E.C.; Gabriel, R.E. Caracterização Da Percepção e Da Influência Do Consumo de Produtos Gluten Free Em Comparação a Produtos Que Contenham Glúten.
5. Hausch, F.; Shan, L.; Santiago, N.A.; Gray, G.M.; Khosla, C. Intestinal Digestive Resistance of Immunodominant Gliadin Peptides. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 2002, 283, doi:10.1152/ajpgi.00136.2002.
6. Valladares, P.; Resende, G.; Luzias, N.; Matos, D.; Cristina, G.; Schettino, M. Doenças Relacionadas Ao Glúten Gluten Related Disorders. 2017, 27, 51–58, doi:10.5935/2238-3182.20170030.
7. Catassi, C.; Elli, L.; Bonaz, B.; Bouma, G.; Carroccio, A.; Castillejo, G.; Cellier, C.; Cristofori, F.; de Magistris, L.; Dolinsek, J.; et al. Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): The Salerno Experts' Criteria. *Nutrients* 2015, 7, 4966–4977, doi:10.3390/nu7064966.
8. Elli, L.; Branchi, F.; Tomba, C.; Villalta, D.; Norsa, L.; Ferretti, F.; Roncoroni, L.; Bardella, M.T. Diagnosis of Gluten Related Disorders: Celiac Disease, Wheat Allergy and Non-Celiac Gluten Sensitivity. *World J. Gastroenterol.* 2015, 21, 7110–7119, doi:10.3748/wjg.v21.i23.7110.

9. Meijer, C.R.; Shamir, R.; Mearin, M.L. Coeliac Disease and Noncoeliac Gluten Sensitivity. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2015, 60, 429–432, doi:10.1097/MPG.0000000000000708.
10. Catassi, C.; Bai, J.C.; Bonaz, B.; Bouma, G.; Calabrò, A.; Carroccio, A.; Castillejo, G.; Ciacci, C.; Cristofori, F.; Dolinsek, J.; et al. Non-Celiac Gluten Sensitivity: The New Frontier of Gluten Related Disorders. *Nutrients* 2013, 5, 3839–3853, doi:10.3390/nu5103839.
11. Hadjivassiliou, M.; Chattopadhyay, A.K.; Grünewald, R.A.; Jarratt, J.A.; Kandler, R.H.; Rao, D.G.; Sanders, D.S.; Wharton, S.B.; Davies-Jones, G.A.B. Myopathy Associated with Gluten Sensitivity. *Muscle and Nerve* 2007, 35, 443–450, doi:10.1002/mus.20709.
12. Fortunato, F.; Ferlini, A. Biomarkers in Duchenne Muscular Dystrophy: Current Status and Future Directions. *J. Neuromuscul. Dis.* 2023, 10, 987–1002, doi:10.3233/JND-221666.
13. Baird, M.F.; Graham, S.M.; Baker, J.S.; Bickerstaff, G.F. Creatine-Kinase- and Exercise-Related Muscle Damage Implications for Muscle Performance and Recovery. *J. Nutr. Metab.* 2012, 2012, doi:10.1155/2012/960363.
14. Roman, B.B.; Foley, J.M.; Meyer, R.A.; Koretsky, A.P. Contractile and Metabolic Effects of Increased Creatine Kinase Activity in Mouse Skeletal Muscle. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 1996, 270, 236–245, doi:10.1152/ajpcell.1996.270.4.c1236.
15. Koch, A.J.; Pereira, R.; Machado, M. The Creatine Kinase Response to Resistance Exercise. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 2014, 14, 68–77.
16. Koch, M.S.; Drewnowski, B.; Bueno, B.F.; Rickli, C.; Balzer, E.R.; Novak, R.S.; Velloso, J.C.R. Aspectos Gerais Da Mieloperoxidase E Seu Envolvimento Em Doenças: Uma Breve Revisão / General Aspects of Myeloperoxidase and Its Involvement in Diseases: A Brief Review. *Brazilian J. Dev.* 2021, 7, 28677–28691, doi:10.34117/bjdv7n3-536.

17. Maluf, S.W.; Filho, D.W.; Parisotto, E.B.; de Medeiros, G. da S.; Pereira, C.H.J.; Maraslis, F.T.; Schoeller, C.C.D.; da Rosa, J.S.; Fröde, T.S. DNA Damage, Oxidative Stress, and Inflammation in Children with Celiac Disease. *Genet. Mol. Biol.* 2020, 43, 1–8, doi:10.1590/1678-4685-GMB-2018-0390.
18. Castro, P.R. Cinética da Angiogênese Inflamatória Induzida por Implante de Esponja na Musculatura Abdominal em Camundongos. 2012, 0–69.
19. Peres, L.A.B.; Cunha Júnior, A.D. da; Schäfer, A.J.; Silva, A.L. da; Gaspar, A.D.; Scarpari, D.F.; Alves, J.B.F.; Girelli Neto, R.; Oliveira, T.F.T. de Biomarkers of Acute Kidney Injury. *J. Bras. Nefrol.* 2013, 35, 229–236, doi:10.5935/0101-2800.20130036.
20. Santos, B.C.S. Síntese e Modelagem Molecular de Análogos Do Metil Chavicol e Seus Potenciais Farmacológicos. *J. Sains dan Seni ITS* 2017, 6, 51–66.
21. Diaz-Castro, J.; Muriel-Neyra, C.; Martin-Masot, R.; Moreno-Fernandez, J.; Maldonado, J.; Nestares, T. Oxidative Stress, DNA Stability and Evoked Inflammatory Signaling in Young Celiac Patients Consuming a Gluten-Free Diet. *Eur. J. Nutr.* 2020, 59, 1577–1584, doi:10.1007/s00394-019-02013-5.
22. Arnr, C.; Rhm, M.; VPD Thiago Brasileiro de Vasconcelos, B.; Richelly Nunes Rocha Cardoso, A.; Batista Josino, J.; Hermelinda Maia Macena, R.; Pinheiro Diógenes Bastos Resumo, V. Radicais Livres e Estresse Oxidativo. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde* 2014, 16, 213–219.
23. GASPARRI, S. Estudo das Atividades das Antioxidante e Mutagênica/Antimutagênica Induzidas Pelo Extrato Vegetal da *Costus Spicatus*. Canoas, 2005.
24. Schneider, C.D.; Oliveira, A.R. de Radicais Livres de Oxigênio e Exercício: Mecanismos de Formação e Adaptação Ao Treinamento Físico. *Rev. Bras. Med. do Esporte* 2004, 10, 308–313, doi:10.1590/s1517-86922004000400008.
25. Mendes, A.P.A.; Pereira, R.C.; de Angelis-Pereira, M.C. Estresse Oxidativo E Sistemas

Antioxidantes: Conceitos Fundamentais Sob Os Aspectos Da Nutrição E Da Ciência Dos Alimentos. *Tecnol. Aliment. Tópicos Físicos, Químicos e Biológicos - Vol. 2* 2020, 296–312, doi:10.37885/200800988.

26. Naso, F.C. Di Efeitos Da Administração Da Orgoteína (Superóxido Dismutase Exógena) Sobre o Estresse Oxidativo Hepático Em Ratos Diabéticos. *Mestr. em Ciências Biológicas* 2010, 83.

27. Forman, H.J.; Zhang, H.; Rinna, A. Glutathione: Overview of Its Protective Roles, Measurement, and Biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 2009, 30, 1–12, doi:10.1016/j.mam.2008.08.006.

28. Neto, A.S.D.S.R. Glutathione - Envolvimento Em Defesa Antioxidante, Regulação de Morte Celular Programada e Destoxificação de Drogas. 2010, 66.

29. Forcina, L.; Miano, C.; Scicchitano, B.M.; Musarò, A. Signals from the Niche: Insights into the Role of IGF-1 and IL-6 in Modulating Skeletal Muscle Fibrosis. *Cells* 2019, 8, 1–18, doi:10.3390/cells8030232.

30. Feige, P.; Brun, C.E.; Ritso, M.; Rudnicki, M.A. Orienting Muscle Stem Cells for Regeneration in Homeostasis, Aging, and Disease. *Cell Stem Cell* 2018, 23, 653–664, doi:10.1016/j.stem.2018.10.006.

31. Fernanda, J.; Gama, G. Universidade Federal Fluminense Instituto De Biologia Programa De Pós-Graduação Em Ciências E Biotecnologia Jaciara Fernanda Gomes Gama. 2020.

32. Seale, P.; Sabourin, L.A.; Girgis-Gabardo, A.; Mansouri, A.; Gruss, P.; Rudnicki, M.A. Pax7 Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Cell* 2000, 102, 777–786, doi:10.1016/S0092-8674(00)00066-0.

33. Johnson, A.L.; Kamal, M.; Parise, G. The Role of Supporting Cell Populations in Satellite Cell Mediated Muscle Repair. *Cells* 2023, 12, doi:10.3390/cells12151968.

34. Bentzinger, C.F.; Wang, Y.X.; Dumont, N.A.; Rudnicki, M.A. Cellular Dynamics in the Muscle Satellite Cell Niche. *EMBO Rep.* 2013, 14, 1062–1072, doi:10.1038/embor.2013.182.
35. Zanou, N.; Gailly, P. Skeletal Muscle Hypertrophy and Regeneration: Interplay between the Myogenic Regulatory Factors (MRFs) and Insulin-like Growth Factors (IGFs) Pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013, 70, 4117–4130, doi:10.1007/s00018-013-1330-4.
36. Muñoz-Cánoves, P.; Scheele, C.; Pedersen, B.K.; Serrano, A.L. Interleukin-6 Myokine Signaling in Skeletal Muscle: A Double-Edged Sword? *FEBS J.* 2013, 280, 4131–4148, doi:10.1111/febs.12338.
37. Pedersen, B.K. Muscular Interleukin-6 and Its Role as an Energy Sensor. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2012, 44, 392–396, doi:10.1249/MSS.0b013e31822f94ac.
38. Serrano, A.L.; Baeza-Raja, B.; Perdiguero, E.; Jardí, M.; Muñoz-Cánoves, P. Interleukin-6 Is an Essential Regulator of Satellite Cell-Mediated Skeletal Muscle Hypertrophy. *Cell Metab.* 2008, 7, 33–44, doi:10.1016/j.cmet.2007.11.011.
39. Brandt, R.; Keston, A.S. Synthesis of Diacetyldichlorofluorescein: A Stable Reagent for Fluorometric Analysis. *Anal. Biochem.* 1965, 11, 6–9, doi:10.1016/0003-2697(65)90035-7.
40. da Silva, M.C.; Fabiano, L.C.; da Costa Salomão, K.C.; de Freitas, P.L.Z.; Neves, C.Q.; Borges, S.C.; de Souza Carvalho, M. das G.; Breithaupt-Faloppa, A.C.; de Thomaz, A.A.; dos Santos, A.M.; et al. A Rodent Model of Human-Dose-Equivalent 5-Fluorouracil: Toxicity in the Liver, Kidneys, and Lungs. *Antioxidants* 2023, 12, doi:10.3390/antiox12051005.
41. Burd, N.A.; De Lisio, M. Skeletal Muscle Remodeling: Interconnections Between Stem Cells and Protein Turnover. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2017, 45, 187–191, doi:10.1249/JES.0000000000000117.

42. Ferreira, R.P.; Duarte, J.A. Protein Turnover in Skeletal Muscle: Looking at Molecular Regulation towards Active Lifestyle. *Int. J. Sports Med.* 2022, doi:10.1055/a-2044-8277.
43. Phillips, S.M.; Glover, E.I.; Rennie, M.J. Alterations of Protein Turnover Underlying Disuse Atrophy in Human Skeletal Muscle. *J. Appl. Physiol.* 2009, 107, 645–654, doi:10.1152/jappphysiol.00452.2009.
44. Borges, J.O. Efeitos da Dieta Hiperproteica Restrita em Carboidratos e/ou Treinamento Físico sobre Concentração de Irisina e Parâmetros Morfofuncionais do Tecido Adiposo de Ratos Wistar Obesos. Vitória da Conquista, BA, 2024.
45. Carbone, J.W.; Pasiakos, S.M. Dietary Protein and Muscle Mass: Translating Science to Application and Health Benefit. *Nutrients* 2019, 11, 1–13, doi:10.3390/nu11051136.
46. Tipton, K.D. Efficacy and Consequences of Very-High-Protein Diets for Athletes and Exercisers. *Proc. Nutr. Soc.* 2011, 70, 205–214, doi:10.1017/S0029665111000024.
47. Graciano, G.; Coelho, C.; Alves, V.; Santos, A. Elaboração de Uma Tabela Unificada de L-Leucina Em Alimentos. *BRASPEN J.* 2022, 37, 165–170, doi:10.37111/braspenj.2022.37.2.06.
48. Dickinson, J.M.; Reidy, P.T.; Gundermann, D.M.; Borack, M.S.; Walker, D.K.; D’Lugos, A.C.; Volpi, E.; Rasmussen, B.B. The Impact of Postexercise Essential Amino Acid Ingestion on the Ubiquitin Proteasome and Autophagosomal-Lysosomal Systems in Skeletal Muscle of Older Men. *J. Appl. Physiol.* 2017, 122, 620–630, doi:10.1152/jappphysiol.00632.2016.
49. Timmerman, K.L.; Volpi, E. Amino Acid Metabolism and Regulatory Effects in Aging. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2008, 11, 45–49, doi:10.1097/MCO.0b013e3282f2a592.
50. Dias, M.; Correia, M. A Dieta Vegetariana e o Aumento Da Força Muscular e Da Massa Muscular. *Acta Port. Nutr.* 2022, 31, 90–94, doi:10.21011/apn.2022.3115.

51. da Rosa Lima, T.; Ávila, E.T.P.; Fraga, G.A.; de Souza Sena, M.; de Souza Dias, A.B.; de Almeida, P.C.; dos Santos Trombeta, J.C.; Junior, R.C.V.; Damazo, A.S.; Navalta, J.W.; et al. Effect of Administration of High-Protein Diet in Rats Submitted to Resistance Training. *Eur. J. Nutr.* 2018, 57, 1083–1096, doi:10.1007/s00394-017-1391-5.
52. Lee, K.S.; Lee, J.K.; Yeun, Y.R. Effects of a 10-Day Intensive Health Promotion Program Combining Diet and Physical Activity on Body Composition, Physical Fitness, and Blood Factors of Young Adults: A Randomized Pilot Study. *Med. Sci. Monit.* 2017, 23, 1759–1767, doi:10.12659/MSM.900515.
53. Manda, R.M.; Maestá, N.; Sc, D.; Burini, R.C. Revisão Bases Metabólicas Do Crescimento Muscular Metabolic Basis of Muscle Growth. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2010, 9, 52–58.
54. Cabrita André; Barata José Dietas Hiperproteicas Metabolismo, Efeitos, Segurança e Suplementação. 2017.
55. Schiaffino, S.; Reggiani, C.; Akimoto, T.; Blaauw, B. Molecular Mechanisms of Skeletal Muscle Hypertrophy. *J. Neuromuscul. Dis.* 2021, 8, 169–183, doi:10.3233/JND-200568.
56. Mackey, A.L.; Kjaer, M. The Breaking and Making of Healthy Adult Human Skeletal Muscle in Vivo. *Skelet. Muscle* 2017, 7, 1–18, doi:10.1186/s13395-017-0142-x.
57. Dimitrov, I.V.; Stankova, T.R.; Angelova, P.A.; Boyadjiev, N.P.; Georgieva, K.N.; Popov, D.I.; Dimov, I.; Bivolarska, A. V.; Gerginska, F.D.; Daskalova, E.P.; et al. Inflammatory Response of Skeletal Muscles to a High-Fat Diet. *Muscles. Ligaments Tendons J.* 2022, 12, 490–496, doi:10.32098/mltj.04.2022.04.
58. Sethi, G.; Shanmugam, M.K.; Ramachandran, L.; Kumar, A.P.; Tergaonkar, V. Multifaceted Link between Cancer and Inflammation. *Biosci. Rep.* 2012, 32, 1–15, doi:10.1042/BSR20100136.

59. Moretti, S.; Mrakic-Sposta, S.; Roncoroni, L.; Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Monguzzi, E.; Branchi, F.; Ferretti, F.; Lombardo, V.; Doneda, L.; et al. Oxidative Stress as a Biomarker for Monitoring Treated Celiac Disease Article. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 2018, 9, doi:10.1038/s41424-018-0031-6.
60. Meng, S.J.; Yu, L.J. Oxidative Stress, Molecular Inflammation and Sarcopenia. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, 11, 1509–1526, doi:10.3390/ijms11041509.
61. Powers, S.K.; Jackson, M.J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol. Rev.* 2008, 88, 1243–1276, doi:10.1152/physrev.00031.2007.
62. Frigero, M.; Efeitos da Laserterapia de Baixa Intensidade sobre Marcadores de Estresse Oxidativo do Músculo Gastrocnêmio em Ratos Diabéticos Sumentidos a Exercícios de Alta Intensidade. São Paulo, 2015, 1–130.
63. Ji, L.L. Antioxidant Signaling in Skeletal Muscle: A Brief Review. *Exp. Gerontol.* 2007, 42, 582–593, doi:10.1016/j.exger.2007.03.002.
64. Barbosa, K.B.F.; Costa, N.M.B.; De Cássia Gonçalves Alfenas, R.; De Paula, S.O.; Minim, V.P.R.; Bressan, J. Estresse Oxidativo: Conceito, Implicações e Fatores Modulatórios. *Rev. Nutr.* 2010, 23, 629–643, doi:10.1590/S1415-52732010000400013.
65. Heyman, M.; Menard, S. Pathways of Gliadin Transport in Celiac Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009, 1165, 274–278, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04032.x.
66. Ferretti, G.; Bacchetti, T.; Masciangelo, S.; Saturni, L. Celiac Disease, Inflammation and Oxidative Damage: A Nutrigenetic Approach. *Nutrients* 2012, 4, 243–257, doi:10.3390/nu4040243.
67. Zimmer, K.P.; Fischer, I.; Mothes, T.; Weissen-Plenz, G.; Schmitz, M.; Wieser, H.; Büning, J.; Lerch, M.M.; Ciclitira, P.C.; Weber, P.; et al. Endocytotic Segregation of Gliadin Peptide 31-49 in Enterocytes. *Gut* 2010, 59, 300–310, doi:10.1136/gut.2008.169656.

68. Rovaris, E.M.; Faraco, A.; Simões, P.W.; Michels, M.; Prá, S.D. De; Vieira, A.; Burger, H.; Sonai, B.; Streck, E.; Dal-pizzol, F. Oxidative Stress and Inflammatory Parameters in Adult Patients with CD. *Estresse Oxidativo e Parâmetros Inflamatórios Em Pacientes Adultos Com Doença Celíaca*. 2017, 7894, 64–69.
69. Ferretti, G.; Bacchetti, T.; Saturni, L.; Manzella, N.; Candelaresi, C.; Benedetti, A.; Di Sario, A. Lipid Peroxidation and Paraoxonase-1 Activity in Celiac Disease. *J. Lipids* 2012, 2012, 1–7, doi:10.1155/2012/587479.
70. Maiuri, L.; Luciani, A.; Vilella, V.R.; Vasaturo, A.; Giardino, I.; Pettoello-Mantovani, M.; Guido, S.; Cexus, O.N.; Peake, N.; Londei, M.; et al. Lysosomal Accumulation of Gliadin P31-43 Peptide Induces Oxidative Stress and Tissue Transglutaminase-Mediated PPAR $\gamma$  Downregulation in Intestinal Epithelial Cells and Coeliac Mucosa. *Gut* 2010, 59, 311–319, doi:10.1136/gut.2009.183608.
71. Huber, P.C. Glutathione e Enzimas Relacionadas: Papel Biológico e Importância em Processos Patológicos. São Paulo, Revisão. 2008, 31, 1170–1179.
72. Stojiljković, V.; Pejić, S.; Kasapović, J.; Gavrilović, L.; Stojiljković, S.; Nikolić, D.; Pajović, S.B. Glutathione Redox Cycle in Small Intestinal Mucosa and Peripheral Blood of Pediatric Celiac Disease Patients. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2012, 84, 175–184, doi:10.1590/S0001-37652012000100018.
73. Renjini, R.; Gayathri, N.; Nalini, A.; Bharath, M.M.S. Oxidative Damage in Muscular Dystrophy Correlates with the Severity of the Pathology: Role of Glutathione Metabolism. *Neurochem. Res.* 2012, 37, 885–898, doi:10.1007/s11064-011-0683-z.
74. Chahbouni, M.; Escames, G.; López, L.C.; Sevilla, B.; Doerrier, C.; Muñoz-Hoyos, A.; Molina-Carballo, A.; Acuña-Castroviejo, D. Melatonin Treatment Counteracts the Hyperoxidative Status in Erythrocytes of Patients Suffering from Duchenne Muscular Dystrophy. *Clin. Biochem.* 2011, 44, 853–858, doi:10.1016/j.clinbiochem.2011.04.001.

75. Stojiljković, V.; Todorović, A.; Pejić, S.; Kasapović, J.; Saičić, Z.S.; Radlović, N.; Pajović, S.B. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Small Intestinal Mucosa of Children with Celiac Disease. *Clin. Biochem.* 2009, 42, 1431–1437, doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.06.009.
76. Wang, C.; Cui, C.; Li, N.; Sun, X.; Wen, L.; Gao, E.; Wang, F. Antioxidant Activity and Protective Effect of Wheat Germ Peptides in an in Vitro Celiac Disease Model via Keap1/Nrf2 Signaling Pathway. *Food Res. Int.* 2022, 161, 111864, doi:10.1016/j.foodres.2022.111864.
77. Elli, L.; Dolfini, E.; Bardella, M.T. Gliadin Cytotoxicity and in Vitro Cell Cultures. *Toxicol. Lett.* 2003, 146, 1–8, doi:10.1016/j.toxlet.2003.09.004.
78. Ragusa, R.J.; Chow, C.K.; Porter, J.D. Oxidative Stress as a Potential Pathogenic Mechanism in an Animal Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 1997, 7, 379–386, doi:10.1016/S0960-8966(97)00096-5.
79. Costa, Á.D.D.S. Perfil Inflamatório de Indivíduos com Distrofia Muscular de Duchenne: Relações Entre Parâmetros Bioquímicos e Nutricionais. 2016, 1–23.
80. Kristjánsson, G.; Venge, P.; Wanders, A.; Löf, L.; Hällgren, R. Clinical and Subclinical Intestinal Inflammation Assessed by the Mucosal Patch Technique: Studies of Mucosal Neutrophil and Eosinophil Activation in Inflammatory Bowel Diseases and Irritable Bowel Syndrome. *Gut* 2004, 53, 1806–1812, doi:10.1136/gut.2003.036418.
81. Peterson, C.G.B.; Eklund, E.; Taha, Y.; Raab, Y.; Carlson, M. A New Method for the Quantification of Neutrophil and Eosinophil Cationic Proteins in Feces: Establishment of Normal Levels and Clinical Application in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2002, 97, 1755–1762, doi:10.1016/S0002-9270(02)04193-X.
82. Gul, M.A.; Ozgeris, F.B.; Kurt, N.; Volkan, B.; Islek, A.; Cayir, A. Effect of Gluten-Free Diet on Serum Antioxidant Levels in Children with Celiac. *Eur. J. Biol.* 2023, 82, 263–269, doi:10.26650/EurJBiol.2023.1307239.

83. Gupta, K.B.; Upadhyay, S.; Saini, R.G.; Mantha, A.K.; Dhiman, M. Inflammatory Response of Gliadin Protein Isolated from Various Wheat Varieties on Human Intestinal Cell Line. *J. Cereal Sci.* 2018, 81, 91–98, doi:10.1016/j.jcs.2018.03.012.
84. Coculescu, B.I.; Dincă, G.V.; Bălăeț, C.; Manole, G.; Bălăeț, M.; Stocheci, C.M. Myeloperoxidase, a Possible Biomarker for the Early Diagnosis of Cardiac Diastolic Dysfunction with Preserved Ejection Fraction. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2018, 33, 1292–1298, doi:10.1080/14756366.2018.1499626.
85. Perwaiz, M.; Iqbal N -Acetyl-  $\beta$  - D -Glucosam Inidase in Acute m Yocardial Infarction. 2003, 35, 275–278.
86. Barcelos, L.S.; Talvani, A.; Teixeira, A.S.; Cassali, G.D.; Andrade, S.P.; Teixeira, M.M. Production and in Vivo Effects of Chemokines CXCL1-3/KC and CCL2/JE in a Model of Inflammatory Angiogenesis in Mice. *Inflamm. Res.* 2004, 53, 576–584, doi:10.1007/s00011-004-1299-4.
87. Costa, S.M.M. Influência Do Background Genético Na Angiogênese Inflamatória Em Camundongos Hétero- e Isogênicos. 2012.
88. Brito, P.S. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória Tópica do Composto Pellec1 Isolado da Combretum Leprosum. 2016, 1–23.
89. Forcina, L.; Miano, C.; Pelosi, L.; Musarò, A. An Overview About the Biology of Skeletal Muscle Satellite Cells. *Curr. Genomics* 2019, 20, 24–37, doi:10.2174/1389202920666190116094736.
90. Burns, D.P.; Drummond, S.E.; Bolger, D.; Coiscaud, A.; Murphy, K.H.; Edge, D.; O'halloran, K.D. N-Acetylcysteine Decreases Fibrosis and Increases Force-Generating Capacity of Mdx Diaphragm. *Antioxidants* 2019, 8, 1–26, doi:10.3390/antiox8120581.
91. Oliveira, A.A. Adaptações Morfológicas e Respostas Moleculares do Dúsculo

Esquelético em Modelo Experimental de Artrite Reumatóide Submetido ao Exercício de Força. *J. Sains dan Seni ITS* 2017, 6, 51–66.

92. Ramírez, C.; Russo, T.L.; Sandoval, M.C.; Dentillo, A.A.; Couto, M.A.S.; Durigan, J.L.Q.; Salvini, T.F. Joint Inflammation Alters Gene and Protein Expression and Leads to Atrophy in the Tibialis Anterior Muscle in Rats. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 2011, 90, 930–939, doi:10.1097/phm.0b013e31822dea3c.

93. Forcina, L.; Miano, C.; Musarò, A. The Physiopathologic Interplay between Stem Cells and Tissue Niche in Muscle Regeneration and the Role of IL-6 on Muscle Homeostasis and Diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018, 41, 1–9, doi:10.1016/j.cytogfr.2018.05.001.

94. De Pasquale, L.; D'Amico, A.; Verardo, M.; Petrini, S.; Bertini, E.; De Benedetti, F. Increased Muscle Expression of Interleukin-17 in Duchenne Muscular Dystrophy. *Neurology* 2012, 78, 1309–1314, doi:10.1212/WNL.0b013e3182518302.

95. Zhou, S.; Qian, B.; Wang, L.; Zhang, C.; Hogan, M. V.; Li, H. Altered Bone-Regulating Myokine Expression in Skeletal Muscle Of Duchenne Muscular Dystrophy Mouse Models. *Muscle and Nerve* 2018, 58, 573–582, doi:10.1002/mus.26195.

96. Raastad, T.; Risøy, B.A.; Benestad, H.B.; Fjeld, J.G.; Hallén, J. Temporal Relation between Leukocyte Accumulation in Muscles and Halted Recovery 10-20 h after Strength Exercise. *J. Appl. Physiol.* 2003, 95, 2503–2509, doi:10.1152/jappphysiol.01064.2002.

97. Louis, E.; Raue, U.; Yang, Y.; Jemiolo, B.; Trappe, S. Time Course of Proteolytic, Cytokine, and Myostatin Gene Expression after Acute Exercise in Human Skeletal Muscle. *J. Appl. Physiol.* 2007, 103, 1744–1751, doi:10.1152/jappphysiol.00679.2007.

98. Mathers, J.L.; Farnfield, M.M.; Garnham, A.P.; Caldow, M.K.; Cameron-Smith, D.; Peake, J.M. Early Inflammatory and Myogenic Responses to Resistance Exercise in the Elderly. *Muscle and Nerve* 2012, 46, 407–412, doi:10.1002/mus.23317.