



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas

Rachel Bacha Silva

**EFEITOS METABÓLICOS E INFLAMATÓRIOS DA INGESTÃO DE GLÚTEN EM
MULHERES SAUDÁVEIS COM SOBREPESO E OBESIDADE E SUA
ASSOCIAÇÃO COM GENÓTIPO DA HAPTOGLOBINA**

Belo Horizonte

2019

Rachel Bacha Silva

**EFEITOS METABÓLICOS E INFLAMATÓRIOS DA INGESTÃO DE GLÚTEN EM
MULHERES SAUDÁVEIS COM SOBREPESO E OBESIDADE E SUA
ASSOCIAÇÃO COM GENÓTIPO DA HAPTOGLOBINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Imunologia.

Orientadora: Prof.^a Jacqueline Isaura Alvarez Leite.

Co-orientadora: Dr.^a Rachel Horta Freire.

Co-orientadora: Dr.^a Érica Rodrigues Castillo.

Belo Horizonte

2019

043

Silva, Rachel Bacha.

Efeitos metabólicos e inflamatórios da ingestão de glúten em mulheres saudáveis com sobrepeso e obesidade e sua associação com genótipo da haptoglobina [manuscrito] / Rachel Bacha Silva. – 2019.

86 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Jacqueline Isaura Alvarez Leite. Co-orientadora: Dr.^a Rachel Horta Freire. Co-orientadora: Dr.^a Érica Rodrigues Castillo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Glutens. 3. Peso Corporal. 4. Dieta. I. Leite, Jacqueline Isaura Alvarez. II. Freire, Rachel Horta. III. Castillo, Érica Rodrigues. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE RACHEL BACHA SILVA. Aos cinco dias do mês de agosto de 2019 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Efeitos metabólicos e inflamatórios da ingestão de glúten em mulheres saudáveis com sobrepeso e obesidade e sua associação com genótipo da haptoglobina", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez Leite, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Ana Maria Caetano de Faria (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Marciane Milanski Ferreira (Universidade Estadual de São Paulo), aprovada; Dr. Carla Barbosa Nonino (USP - Ribeirão Preto), aprovada; Dr. Maria Isabel Toulson Davisson Correia (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Erica Castilho Rodrigues - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Rachel Horta Freire - Coorientadora (Universidade de Harvard - USA), aprovada; Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 05 de agosto de 2019.

Anamariacatania
 Dr. Ana Maria Caetano de Faria (UFMG)
Marciane Milanski Ferreira
 Dr. Marciane Milanski Ferreira (Universidade Estadual de São Paulo)
Carla Barbosa Nonino
 Dr. Carla Barbosa Nonino (USP - Ribeirão Preto)
Maria Isabel Toulson Davisson Correia
 Dr. Maria Isabel Toulson Davisson Correia (UFMG)
Erica e Rodrigues
 Dr. Erica Castilho Rodrigues - Coorientadora (UFMG)
Rachel Horta Freire
 Dr. Rachel Horta Freire - Coorientadora (Universidade de Harvard - USA)
Jacqueline Isaura Alvarez Leite
 Dr. Jacqueline Isaura Alvarez Leite - Orientadora (UFMG)

Leda Queiroz Vieira
 Prof^a Leda Queiroz Vieira
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Dedico esse trabalho ao meu pai, Valdemar Filho e Arthur, meu irmão, por serem os maiores apoiadores desta jornada, sempre com a parceria, inspirações e uma torcida de amor incondicional para que este momento se realizasse.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quem me conhece sabe da conexão e gratidão que tenho pelo Universo e Deus. Este Universo de harmonia e sincronicidade onde tudo acontece da melhor forma! Uma gratidão enorme por tudo e todos que estão ao meu redor!

Um agradecimento que merecia uma tese inteira para minha queridíssima Chefe Jacque! Todos, sem exceção, que convivem comigo nesses últimos 6 anos já ouviram falar dela. Minha mãe científica! Agradeço a sua existência e habilidade em me ensinar e orientar, de uma forma que única, sempre observando as limitações e impulsionando para as soluções e crescimento do aluno. Agradeço por ser minha inspiração permanente.

À Rachel Horta que desde mestrado sempre foi muito prestativa e doadora de suas idéias e competência grandiosa. De amiga e colaboradora de mestrado à co-orientadora! Agradeço pela disponibilidade, pelo acolhimento em Boston e tudo que estes momentos me geraram.

À Erica Castilho, que surgiu num momento oportuno. Agradeço a sua dedicação com a estatística sempre com paciência e envolvimento num trabalho como este.

Ao professor Alessio Fasano por ceder espaço em seu laboratório, técnicas e por suas grandiosas descobertas científicas que contribuíram para realização de um dos experimentos mais importantes deste estudo!

À Professora Adaliene pela parceria na colaboração, pela confiança em nosso trabalho e pela gentileza do empréstimo de seus equipamentos, essenciais para realização das coletas de dados

Às minhas voluntárias da pesquisa por toda seriedade e dedicação com o estudo. Agradeço a disponibilidade e respeito à pesquisa!

Às pessoas que fizeram parte da parte logística, da produção, da organização do espaço físico da Cozinha Dietética: Lia, Barbara Ventura. À professora Rita Ribeiro por ceder este espaço

Agradeço a paciência e disponibilidade do Orlando, por 6 anos de convivência e Alexandre, sempre atentos e abertos a ajudar e guiar os alunos.

Não vou colocar segundo terceiro lugar, mas meu Pai querido. A pessoa que mais torce incondicionalmente por mim, que me acompanha de coração e presença! Sempre me apoiando de uma forma que me impulsiona. Por ser esse cara que eu tanto me reconheço, de garra, disposição para vida, energia infinita para fazer tudo acontecer!

Um agradecimento enorme para meu irmão, uma pessoa que sempre me ensinou, me inspirou com sua firmeza e inteligência, me guia e está no meu coração de uma forma muito única! E a Nayara Torres pela sua boa e verdadeira energia em parceria com meu irmão.

À minha mãe, que mesmo não presente fisicamente, está certamente presente na torcida, incentivo e ensinamentos através de quem foi na sua existência! À sua presença que sinto verdadeiramente!

Agradeço meus amigos do Labin, os que foram e os novos. A cada momento de descobertas, compartilhamento de dificuldades bem como os de alegria, com brincadeiras, almoços com risos intermináveis! A cada pessoa que nestes 6 anos fez parte de um momento inesquecível destes. Nossa parceria não existe igual, êta turma conectada!

Um agradecimento especial a minha “fração glutenina”, Hirla, por ter iniciado este projeto comigo, de mãos dadas e ter me mostrado o quanto as coisas podem ser mais simples com sua coragem e energia!

Um agradecimento a pessoas que doaram bastante seu tempo e conhecimento para os momentos mais delicados e essenciais nessa jornada: Wesley, Elândia, Melissa, Penélope e Paola!

Um agradecimento especial a “plataforma” Paola e Penélope por tantas ajudas, pessoais, materiais, experimentais, estatísticas e posso dizer, 24h, assistência em qualquer local. Minhas maiores inspirações e doadoras de um saber com uma dedicação e amor incondicional!

Um agradecimento às minhas colaboradoras Bruna Laignier, Luana Batista, Karine Andrade que se dedicaram ativamente e de coração para que este projeto desse certo! Pessoas competentes e maravilhosas que tive a sorte de ter por perto!

Agradeço a minha comissão de tias, primos e tios, que sempre torceram e esperaram por este momento! Pela compreensão das minhas ausências e incentivo a essa realização! À torcida especial da Tania e Bá desde o mestrado!

Agradeço especialmente à Simone, minha “quase” mãe e ao Arquimedes, por todas as conversas, apoios aos domingos e à todos os momentos que me serviram de grande inspiração para exercer tudo com qualidade e sabedoria.

À alguns amigos que fazem meu coração vibrar: a Joana, Bruna Laignier, Dani Malheiros, Pedro Rolim, Tikinha, Cele, Júlia, Fê, Bela, Penélope e seus respectivos companheiros, tão especiais quanto. Sempre me acompanharam nessa jornada, ativamente, me

apoiaram nos momentos mais negros e estiveram nos mais felizes! Quando lembro da existência deles logo sei que tenho sucesso na vida!

Aos amigos de cafés, boas conversas e muitas alegrias, alguns que entraram na minha vida há poucos anos, Maria Vitória, Bárbaras (Babis), outros que distanciaram mais, mas estão sempre no meu coração Felipinho, Farinha.

À uma pessoa, ao profissional, parceiro e grande fonte de inspiração por sua voz ativa, verdadeira, conhecimento e sabedoria Dr José Resende Neto.

Um agradecimento especial e cheio de amor às pessoas que mudaram minha vida profundamente por serem quem são e, nestes últimos anos e momentos, doarem a sua sabedoria e capacidade de me guiar e me mostrar o que verdadeiramente importa: Geane Corniglion, Bernardo Coelho, Patrícia Coelho, Fernanda Kalil, Livia Farnese e Giuliano Cretoiu.

Ao Gustavo Ribeiro Boulos por fazer parte de parte desta caminhada me mostrando o poder da calma, tranquilidade com um apoio e incentivo enorme às minhas conquistas e vitórias. Também pela sua cía, descobertas da vida, momentos bons e inesquecíveis!

“Às vezes, sua alegria é a fonte do seu sorriso, mas às vezes, o seu sorriso pode ser a fonte da sua alegria”

Tich Nhat Hanh

RESUMO

Objetivos: estudos demonstraram papel imunogênico da gliadina, fração protéica do glúten presente no trigo. Efeitos da ingestão de glúten no aumento de adiposidade, redução na termogênese e alterações de microbiota e permeabilidade intestinal já foram constatados em modelo experimental. Em humanos, embora alguns estudos observem alterações de padrões alimentares, não há evidências claras sobre estes mecanismos da ingestão de glúten na obesidade. Portanto, nosso objetivo foi avaliar os efeitos do consumo controlado de glúten de trigo (24g/dia) no ganho de peso corporal e composição corporal, na ingestão alimentar, no metabolismo basal e no perfil inflamatório de citocinas em mulheres não celíacas com sobrepeso e obesidade e a associação desses fatores com o genótipo da haptoglobina (Hp). Metodologia: foi realizado um estudo cruzado simples cego com recrutamento de 42 mulheres com idade entre 18 a 50 anos (em período pre-menopausa), com faixa de índice de massa corporal (IMC) entre 24,9 a 35,4 kg/m² (sobrepeso e obesidade sem doenças crônicas ou relacionadas ao glúten). As voluntárias foram submetidas à oito semanas experimentais sem consumo de glúten na dieta com a manutenção da dieta habitual e uso dos bolos do estudo. Foram confeccionados dois tipos de bolos sendo uma unidade com glúten (12g/unidade) e outro placebo, idêntico ao primeiro, para uso diário durante 8 semanas. Foram realizadas coletas de dados idênticas nos tempos T0, T4, T8 e T13, sendo estes respectivamente os períodos: pré estudo, uso por 4 semanas de placebo ou glúten e o pós estudo referente ao período com dieta livre. Foram aferidos peso e composição corporal, metabolismo basal por calorimetria indireta, amostras de sangue para dosagem de IL6, TNF e IL-1 β por Elisa e uma única coleta de swab bucal para genotipagem da haptoglobina, gene que codifica dois alelos (Hp1 e Hp2), sendo o Hp2 a pre-haptoglobina, também chamada de zonulina. Dados dietéticos foram coletados por meio de registros alimentares semanais, tabulados para avaliação de macronutrientes e estabelecimento do índice inflamatório da dieta em cada tempo (T). Resultados: no comparativo entre a mesma pessoa submetida à ingestão de glúten ou ao placebo houve uma redução pequena no peso corporal e IMC no final de ambas as intervenções o que não aponta para uma associação com o consumo ou restrição do glúten. Quando considerados os parâmetros em dados relativos à variação de cada parâmetro (dado final menos o dado inicial) não houve mudanças relativas ao período de glúten e placebo na taxa metabólica basal e composição corporal dessas pessoas. No aspecto dietético, somente a ingestão de proteínas/kg de peso foi maior no período glúten e

o % de gorduras, embora ambos não apresentaram associação com a intervenção e os demais macronutrientes não sofreram alterações. Já o índice inflamatório da dieta foi menor no período pós-estudo quando comparado ao período de oito semanas sem glúten na dieta. De acordo com genotipagem de haptoglobina (Hp1-1, Hp2-1e Hp2-2), as voluntárias com genótipo HP2-2 apresentaram correlação negativa de TMB/kg/massa magra quando submetidas ao glúten e com relação as citocinas, tiveram correlação positiva que sugeriu, exclusivamente na fase de glúten, maiores níveis de IL6 e IL1 β . Além das correlações, o comparativo dos valores absolutos mostraram que as voluntárias com genótipo HP2-2 submetidas à ingestão de glúten tem a mesma resposta em citocinas e taxa metabólica. Conclusão: Observou-se que a retirada do glúten na dieta por oito semanas teve relação com maior índice inflamatório da dieta quando comparada ao período de dieta livre. Alterações relevantes de comportamento alimentar não foram detectadas bem como diferenças de parâmetros antropométricos, composição corporal e peso e metabolismo basal. A diferença observada em citocinas e taxa metabólica basal foi associada com a presença do alelo Hp2. As voluntárias com genótipo Hp2-1 ou Hp2-2 apresentaram redução na taxa metabólica basal, aumento de algumas citocinas pró inflamatórias, exclusivo aos períodos de ingestão de glúten, e não correspondente ao placebo nem no genótipo HP1-1. Dessa forma, observamos a presença do alelo Hp2 esteve associado a pior controle de inflamação e metabolismo quando essas pessoas são submetidas ao consumo de glúten.

Palavras-chave: glúten; peso corporal; dieta.

ABSTRACT

Aim: Several studies have shown the immunogenic role of gliadin, a wheat protein fraction. Effects of gluten intake on adiposity increase, thermogenesis reduction, changes in the gut microbiota, and intestinal permeability have already been documented in experimental models. In humans, some studies observed changes in dietary patterns; however, there is no clear evidence about the mechanisms of gluten effects in obesity. Therefore, our aim was to evaluate the effects of the controlled intake of wheat gluten (24g/day) on weight gain, body composition, dietary intake, metabolic rate and pro-inflammatory cytokines secretion in non-celiac women with overweight and obesity; and the association of these factors with the haptoglobin genotype.

Methods: We designed a blind cross-sectional study. 42 pre-menopausal women, 18 to 50 years old, body mass index (BMI) from 24.9 to 35.4 kg/m², and no gluten-related chronic diseases were included. The volunteers were submitted to eight experimental weeks on a gluten-free diet. During this period, we recommended the maintenance of the usual diet and the intake of two muffins per day (gluten or gluten-free/placebo). The gluten-containing muffin and the gluten-free were identical but added with 12g of gluten. Data were collected at baseline (T0), at week four (T4), at the end of the experimental period (T8) and after five weeks with usual non-gluten-free diet (T13). We collected body weight, body composition by bioelectrical impedance analysis, basal metabolic rate (BMR) by indirect calorimetry, blood for cytokines analysis (IL6, TNF, and IL1 β), and buccal cells (collected by swab) for haptoglobin genotyping. The haptoglobin encodes for two alleles Hp1 and Hp2. The allele Hp2 pre-haptoglobin, also known as zonulin, is a physiological regulator of tight junctions and it is released upon gluten stimulation. A 24-h dietary recall was collected weekly for evaluation of macronutrients intake and dietary inflammatory index (DII).

Results: We observed a small reduction in body weight and BMI at the end of both interventions (gluten or placebo), which did not indicate any association with gluten intake or restriction. Analysis of the variation of each parameter (final minus initial) also showed no changes in the BMR or body composition after gluten or placebo. Related to the dietary pattern, only the protein intake (g/body weight) and percentage of fat were higher during gluten-muffin period, although not associated with the intervention. No difference in carbohydrate intake was observed. DII was lower in the post-study period (T13) when compared to T0-T8. Intriguingly, the presence of the Hp2 allele (higher zonulin producers) was negatively correlated to BMR/kg/lean mass and positively correlated to higher

levels of IL6 and IL1 β only during gluten-muffin period. Conclusion: We concluded that the gluten-free diet presented a higher DII when compared to the usual non-gluten-free diet. Significant changes in eating behaviour were not detected. Body weight, body composition, and BMR were not affected by the intake of gluten-muffin or placebo. The presence of Hp2 allele was associated with lower BMR and increased secretion of pro-inflammatory cytokines only during the gluten-muffin period. Any association was observed to placebo or the Hp1-1 genotype. Altogether, the data suggest that higher zonulin producers presented a worsen control of inflammation and lower metabolism upon gluten intake.

Keywords: gluten; body weight; diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Epítomos da gliadina.....	26
Figura 2 - Mecanismos de liberação da zonulina, aumento de permeabilidade intestinal e indução de resposta autoimune por fragmentos de gliadina.....	28
Figura 3 - Desenho experimental.....	41
Figura 4 - Interpretação dos resultados da genotipagem da haptoglobina (HP1-1, HP2-1 e HP2-2).....	49
Figura 5 - Evolução de IMC.....	51
Figura 6 - Variação de dados entre placebo e glúten.....	53
Figura 7 - Gráficos em barra com evolução individual do peso corporal em cada intervenção.....	53
Figura 8 - Distribuição de macronutrientes. Distribuição de calorias, fibras e macronutrientes durante o período pré-estudo, fases placebo e glúten e período pós estudo.....	55
Figura 9 - Índice Inflamatório da Dieta (DII) no período pré estudo, nas fases placebo e glúten e no período pós-estudo de voluntárias no período pré-estudo, nas fases de intervenção (placebo ou glúten) e no período pós estudo. * $p<0.05$ e ** $p<0,01$	56
Figura 10 - Variação das concentrações sanguíneas das citocinas. IL6, IL1 β e TNF em voluntárias durante as fases de placebo e glúten.....	57
Figura 11 - Hipótese resumida do estudo.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição nutricional dos bolos experimentais	42
Tabela 2 - Dados gerais da amostra. Dados relativos ao período inicial (T0) nos grupos intervenções placebo e glúten. Teste t- student realizado entre os períodos de intervenção entre si que contemplam a intervenção	50
Tabela 3 - Dados de antropometria, composição corporal e calorimetria. Referente as voluntárias ao início e final do período ingerindo bolos placebo ou glúten por 4 semanas.	52
Tabela 4 - Média da ingestão de macronutrientes. Referente ao período pré-estudo, nas fases de intervenção (placebo ou glúten) e no período pós estudo.	54
Tabela 5 - Média do IMC, TMB e citocinas conforme genótipo. Médias ao final de cada intervenção e variação das concentrações das citocinas ao longo das intervenções considerando aquelas portadoras do genótipo HP1-1 e HP2-2.....	58
Tabela 6 - Correlação entre genótipos, taxa metabólica basal e citocinas.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
BIA	bioimpedância elétrica
µL	Microlitro
CXCR3	Receptor de quimiocina do tipo CXC
DM	diabetes mellitus
Elisa	Enzyme linked immuno sorbent assay
HSL	Lipase Hormônio Sensível
HAS	hipertensão arterial sistêmica
IL 1β	Interleucina 1-Beta
IL 6	Interleucina 6
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corpórea
IRB	<i>Institutional Review Board</i>
IRC	insuficiência renal crônica
Kg	Quilograma
Kcal	Quilocaloria
LABiN	Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional
MBIRC	<i>Mucosal Biology and Immunology Research Center</i>
mg/dL	Miligramas por decilitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
PBS	Salina tamponada com fosfato
T	Tempo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMB	Taxa metabólica basal
TNF	Fator de necrose tumoral
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Obesidade	20
2.2	Fisiopatologia da obesidade	20
2.3	Glúten: descrição e estrutura química	24
2.4	Glúten: papel imunogênico e alteração de permeabilidade intestinal	25
2.5	Glúten e obesidade	31
2.6	Consumo de glúten e desfechos clínicos associados	33
3	JUSTIFICATIVA	35
4	OBJETIVOS	36
4.1	Objetivo geral	36
4.2	Objetivos específicos	36
5	MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1	Caracterização do estudo	37
5.2	População do estudo	37
5.3	Alocação de voluntários e dietas	37
5.4	Cálculo amostral	38
5.5	Delineamento experimental	40
5.6	Produção dietética dos alimentos veículo de glúten ou placebo	41
5.7	Fases de coleta e dados em T0, T4, T8 e T13	42
5.8	Fases de intervenção dietética	43
5.9	Biompedância e Calorimetria Indireta	44
5.10	Análises sanguíneas – dosagem de citocinas no soro	45
5.11	Avaliação do consumo alimentar	46
5.12	Índice inflamatório da dieta	46
5.13	Genotipagem de haptoglobina	47
5.14	Análise estatística	49
6	RESULTADOS	50
6.1	Dados gerais das voluntárias ao iniciar o estudo	50
6.2	Análise da evolução do índice de massa corporal ao longo do experimento	50

6.3	Efeito da ingestão de glúten ou placebo nos dados antropométricos e de composição corporal	51
6.4	Análises dietéticas.....	54
6.5	Índice Inflamatório da Dieta (DII)	55
6.6	Avaliação de citocinas pró-inflamatórias	56
6.7	Avaliação da expressão de zonulina	57
7	DISCUSSÃO	60
8	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70
	APÊNDICES	77
	APÊNDICE A - Receitas	78
	APÊNDICE B - Fichas técnicas - placebo	79
	APÊNDICE C - Ficha técnica – Glúten	80
	APÊNDICE D - Modelo de caderno entregue para cada etapa de registro alimentar ..	81
	ANEXOS	82
	ANEXO A - Aprovação pelos Comitês de ética	83
	ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido para pesquisa	84

1 INTRODUÇÃO

O glúten é um complexo protéico composto por duas frações principais, a prolamina e glutenina. É a principal proteína de armazenamento dos grãos de trigo e se torna bastante útil em processos industriais e de panificação, uma vez que a interação dessas proteínas que formam o glúten, contribui para viscosidade e elasticidade de massas entre outros produtos alimentícios que precisem de emulsificantes ou de gelatinização como doces, manteigas e outros alimentos. Por essa razão, trata-se de um componente amplamente presente na alimentação em todo o mundo (Biesiekierski; Muir; Gibson, 2013).

Embora a exclusão do glúten da dieta seja necessária no tratamento condições específicas como a doença celíaca, a alergia ao trigo e a sensibilidade ao glúten não-celíaca (SAPONE *et al.*, 2012), observa-se um aumento à adesão e escolha de dietas isentas de glúten por pessoas sem diagnóstico para essas doenças. A população saudável que alega fazer a escolha desta restrição tem o intuito de melhoria da saúde uma vez que nos últimos anos a popularização equivocada deste conceito tem sido crescente em diferentes países e culturas (Gaesser; Angadi, 2015; Marcason, 2011; Newberry *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2015). A prevalência da doença relacionadas ao glúten aumenta a medida que, desde a década de 90, mais atenção tem sido dada para o diagnósticos e ao conhecimento das desordens relacionadas ao glúten (Leonard *et al.*, 2015).

A adoção dessas dietas pela população saudável e profissionais de saúde pode ter sido hipotetizada tendo como base os estudos relacionados ao papel inflamatório de gliadina em modelos experimentais. Estudos em modelos animais mostraram que peptídeos de gliadina ocasionou o aumento da liberação da proteína zonulina, aumento permeabilidade intestinal e aumento da produção de citocinas inflamatórias como IL8 e (Drago *et al.*, 2006; Lammers *et al.*, 2008). Além disso já é sabido que a ligação de gliadina ou seus peptídeos ao receptor de quimiocinas CXCR3 influencia a alteração da montagem das junções firmes no epitélio intestinal tanto em indivíduos com doença celíaca e em menor proporção em não celíacos. (Hollon *et al.*, 2015).

Embora a gliadina tenha mais de 50 epitopos imunogênicos descritos, os efeitos em alterações da barreira intestinal e aumento da permeabilidade parecem estar mais associados a indivíduos portadores do alelo Hp2. A haptoglobina codifica dois alelos (Hp1 e Hp2), sendo que o alelo HP2 apresenta uma duplicação no terceiro e quarto exons. O alelo Hp2, cofifica a

proteína pre-haptoglobina, também chamada de zonulina, que tem sido demonstrada pela sua função reguladora da permeabilidade intestinal e é ativada pela presença de fragmentos da gliadina. (Fasano, 2011). Há três possíveis genótipos para a haptoglobina: Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2.

Alterações da barreira intestinal, e composição da microbiota estão presentes na obesidade (Mörkl *et al.*, 2018; Zak-Golab *et al.*, 2013). Recentemente, poucos trabalhos que visam correlacionar dietas isentas ou de baixa ingestão de glúten no controle do peso corporal em humanos e os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente entendidos (Zhang *et al.*, 2017). Dessa forma, ainda é necessário a compreensão de vias que justifiquem os mecanismos pelos quais a dieta pobre ou isenta de glúten possam ser adjuvantes no tratamento da obesidade.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade

De acordo com último levantamento da Organização Mundial de Saúde (OMS) realizado em 2016¹, mais de 1,9 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso e 650 milhões tinham obesidade. A doença já acomete indivíduos desde a sua juventude, 39% dos indivíduos com 18 anos ou mais já se encontram com sobrepeso e 13% com obesidade. A obesidade é uma doença multifatorial e envolve várias comorbidades e seu avanço contribui para um alto índice de mortalidade. Os riscos associados à obesidade são diversos, como distúrbios músculoesqueléticos (osteoartrite), resistência a insulina e alguns tipos de câncer (como os de mama, ovário, próstata, fígado, vesícula biliar, rim e cólon) são relacionados com a progressão dessa doença. Em 2012, as doenças cardiovasculares foram a maior causa de morte no mundo, sendo a obesidade um dos fatores mais importantes para seu aparecimento.

2.2 Fisiopatologia da obesidade

De maneira simplificada e à exemplo do que ocorre em tantas outras doenças, a obesidade decorre de predisposição genética associada a fatores ambientais. Como resultado de uma ampla interação entre componentes do indivíduo e do ambiente, têm-se o desequilíbrio energético em que o aporte de energia é maior do que o gasto. O tecido adiposo responde a estímulos e age como um sensor para manejo do status energético no qual o balanço positivo, com uma disponibilidade maior de nutrientes, induz ação de insulina e outros hormônios, assim como as catecolaminas. Os adipócitos desempenham grande papel na mobilização de estoques de energia bem como para armazenamento e expandem em tamanho e número de acordo com o estímulo recebido. A resposta que ocorre a partir do aumento da disponibilidade de energia confronta, em um determinado momento, com um limiar anabólico máximo onde o adipócito sofrerá estresse metabólico e conseqüentemente ocorre uma inflamação (Reilly; Saltiel, 2017).

Nas últimas décadas, o papel do tecido adiposo como órgão endócrino ganhou grande interesse e importância. A obesidade é vista como uma doença inflamatória crônica de baixo

¹ <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

grau secundária a alterações que ocorrem com a expansão do tecido adiposo. O estado inflamatório na obesidade explica-se pela liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (chamadas de adipocinas no tecido adiposo) e pela migração de macrófagos para aquele tecido. Na homeostase do tecido adiposo, a presença fenotípica de macrófagos residentes se caracteriza pelo estado de polarização M2 que está associado um conjunto de citocinas anti-inflamatórias. Porém, o estímulo metabólico induzido pela hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo ocasiona mudanças nessas células, na qual observa-se maior taxa de macrófagos M1 em relação a M2, caracterizando um estado inflamatório (Weisberg, 2006; Lumeng *et al.*, 2012). A alteração na polarização de macrófagos no tecido adiposo de tipo M2 para M1 promove alterações como a geração de espécies reativas ao oxigênio como óxido nítrico, via ativação de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), sugerindo uma relação entre inflamação e maior estresse oxidativo no tecido adiposo. A infiltração de macrófagos e o aumento do número deles no estresse oxidativo induzem, por sua vez, secreção de adipocinas pró-inflamatórias. (Lumeng *et al.*, 2007).

Essa polarização do macrófago no tecido adiposo induz a liberação de citocinas inflamatórias como TNF e IL6 (Weisberg *et al.*, 2003).

As moléculas sintetizadas pelos adipócitos, macrófagos e células do estroma no tecido adiposo são chamadas de adipocinas e podem atuar local ou sistemicamente. O padrão de adipocinas secretadas, contudo, não é uniforme em todos os tipos de tecido adiposo. Em geral, depósitos de gordura visceral secretam mais citocinas pró-inflamatórias do que o tecido adiposo subcutâneo (Weisberg *et al.*, 2003).

A regulação metabólica do tecido adiposo está associada a secreção de adipocinas. Além disso, citocinas como IL6 e TNF são secretadas pelo tecido adiposo em resposta as respostas imunológicas e como consequência ocorrem alterações no metabolismo lipídico, resistência à insulina, no controle da pressão arterial, na coagulação sanguínea e na resposta inflamatória. A produção e a secreção de adipocinas são reguladas dinamicamente de acordo com as condições nutricionais. (Stolarczyk, 2017).

Na condição de obesidade, os receptores do tipo toll (TLR) são ativados por uma variedade de fatores dietéticos e sinais endógenos produzidos pelas alterações metabólicas. Um dos principais sinais são os ácidos graxos livres, que podem se ligar ao TLR2 e ao TLR4. A partir desse estímulo, ocorre a ativação de NF- κ B e produção de citocinas pró-inflamatórias que culmina em resistência à insulina, disfunção endotelial, e aumento do risco cardiometabólico,

fatores que contribuem para o aparecimento do Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), doença cardíaca coronariana, acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca congestiva. (Foley *et al.*, 2012)

Muitos desses fatores são relacionados à presença do inflamassoma, ativado por vários fatores, incluindo espécies reativas de oxigênio, excesso de ácidos graxos circulantes e morte celular. Com o estresse metabólico presente nos adipócitos, NOD like receptores, pertencentes a família de receptores padrão de reconhecimento (PPRs) recebem sinais dessas alterações e consequentemente ativam NALP3 inflamassoma. Inflamassomas são complexos multiproteicos, que transformam as citocinas inativas pró-IL 1 β e IL-18 nas suas formas ativas, via caspase 1, aumentando a inflamação crônica e alterando alguns processos metabólicos. Essas alterações aumentam ainda mais a resistência a insulina (Vandanmagsar *et al.*, 2011).

Macrófagos ativados e adipócitos induzem expressão do inflamassoma no tecido adiposo. A deleção experimental de NLRP3 leva à melhora da sensibilidade à insulina. Dados clínicos mostram que NLRP3 é altamente expresso em tecido adiposo visceral de indivíduos obesos. Estudos *in vivo* mostram que a ativação do inflamassoma NLRP3 na obesidade induzida por dieta é um gatilho para danos pancreáticos, um mecanismo importante para progressão do DM2 (Rheinheimer *et al.*, 2017; Vandanmagsar *et al.*, 2011).

Além de fatores genéticos e epigenéticos que influenciam a evolução da obesidade, sabe-se do importante papel da dieta no estabelecimento e manejo da doença. Portanto, são necessários estudos dos hábitos alimentares das populações com maior risco ou incidência de obesidade. Atualmente é discutido na literatura não somente os diversos aspectos da intervenção dietética para controle dessa doença e suas comorbidades, mas também quais os comportamentos e hábitos alimentares que culminam neste desequilíbrio metabólico como a esteatose hepática não alcoólica, a resistência a insulina que sinalizam o agravamento da obesidade (Musso *et al.*, 2003; Wehmeyer *et al.*, 2016).

As dietas associadas ao desenvolvimento e agravamento da obesidade e suas comorbidades apresentam, em geral, um perfil alimentar de alto consumo de frutose, carne vermelha e gordura saturada em detrimento a outras fontes de gorduras, além de uma dieta rica em ômega 6. Esses nutrientes em excesso levam à uma resposta na qual o tecido adiposo se torna incapaz de responder adequadamente à insulina e resulta em aumento de lipólise e liberação de ácidos graxos que podem ser sequestrados pelo fígado levando à esteatose (Musso *et al.*, 2003). Além disso, outros alimentos frequentemente consumidos que contribuam com o surgimento e manutenção das disfunções metabólicas são os carboidratos simples e uma maior

quantidade de glicose por 1000 kcal de dieta. O consumo excessivo de carboidratos somado ao de gorduras, comuns no padrão alimentar de pacientes com obesidade sustentam um acúmulo lipídico que ativa cascatas inflamatórias (Mccommis; Finck, 2019; Wehmeyer *et al.*, 2016).

É possível observar inúmeros estudos acerca de padrões alimentares que possam ser recomendados para o controle da obesidade e nas demais doenças associadas. Dentre as possíveis estratégias dietéticas observa-se o papel da dieta mediterrânea, DASH, low carb e low fat e uso de probióticos, embora a restrição calórica clássica é o alvo principal para controle das doenças associadas a obesidade e inflamação. A discussão acerca das possibilidades de intervenção tem como objetivo o aumento da aderência à uma dieta de alta qualidade nutricional (Eslamparast; Tandon; Raman, 2017).

Diante de diversos tipos de dietas e ensaios clínicos, associados a várias complicações advindas da obesidade, inúmeras tentativas de intervenção visam a eficácia na sua prevenção e no seu tratamento. Neste contexto, dietas isentas de glúten têm sido adotadas pela população geral sem diagnóstico de doença celíaca ou sensibilidade não celíaca, a fim de proporcionar uma nova tentativa de perda de peso. Inúmeros levantamentos de dados econômicos apontam para um grande aumento nas vendas de produtos sem glúten nos últimos anos, por conta da grande parcela de indivíduos que acreditam que a isenção dessa proteína é a estratégia adequada para o emagrecimento (Newberry *et al.*, 2017). Em grupos de indivíduos saudáveis, como praticantes de esporte de alta performance, sabe-se que a dieta isenta de glúten tem sido praticada como sinônimo de saúde (Harper; Bold, 2018; Lis *et al.*, 2013). Embora diversos trabalhos demonstrem possíveis efeitos deletérios no perfil nutricional de indivíduos que aderem às dietas isentas de glúten sem uma substituição de qualidade equivalente, como a redução no consumo de fibras e aumento do consumo de gorduras, ainda sim, muitas pessoas sustentam essa crença e gradativamente trocam produtos tradicionalmente com glúten pelos sem glúten. (Raehsler *et al.*, 2017; Vici *et al.*, 2016; Watson, 2018).

A possível hipótese para esta crescente prática pode ser justificada pelos dados já publicados em modelos experimentais (Freire *et al.*, 2016; Soares *et al.*, 2013) e descrições acerca do potencial inflamatório e imunogênico de peptídeos de glúten (Fasano, 2011). No entanto, até o presente momento, nenhum trabalho clínico randomizado que comprove a eficácia e o mecanismo pelo qual a adoção da dieta sem glúten seja adjuvante no tratamento do sobrepeso e obesidade foi publicado.

2.3 Glúten: descrição e estrutura química

O glúten é um complexo protéico composto por duas frações principais, a prolamina e glutenina. As sementes de trigo são constituídas por 8 a 15% de proteínas, sendo 10-15% albumina/globulina e 85 a 90% glúten. A glutenina e a prolamina se diferem uma vez que, esta última, trata-se de uma fração solúvel em álcool e que, se diferencia nos cereais recebendo diferentes denominações: a gliadina no trigo, avenina na aveia, secalina no centeio e hordeína na cevada (Biesiekierski, 2017).

O glúten é tradicionalmente empregado nos processos de panificação por ser resistente ao calor e ser capaz de atuar como um agente de ligação, oferecendo extensibilidade à massa. As frações gluteninas e prolaminas exercem suas ações na capacidade de absorver água e reter gás carbônico, o que modifica textura, qualidade e outros aspectos importantes para o processo de produção de produtos. A gliadina (fração prolamina do trigo) contribui mais para viscosidade e extensibilidade da massa e a glutenina hidratada é mais coesiva e contribui para força e elasticidade da massa (Shewry *et al.*, 1986, 2002). A estrutura de rede protéica do glúten é estabilizada através de ligações dissulfeto, interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, que fazem com que a interação entre glutenina e gliadinas ocorra.

Além disso, sabe-se que essas proteínas são constituídas com um alto conteúdo de resíduos de glutamina, fenilalanina e prolina, presentes na gliadina. Sua estrutura aminoacídica é de difícil proteólise pelo trato gastrointestinal humano, principalmente pelo conteúdo de prolina, formando fragmentos remanescentes que podem contribuir para respostas imunológicas (Biesiekierski, 2017; Gutiérrez *et al.*, 2017).

O glúten vital é a fração remanescente após o lavado de trigo, mecanismo pelo qual possibilita o isolamento da parte proteica, de interesse, das demais frações de amido e outros constituintes solúveis em água. O glúten também é amplamente usado em produtos diversos como um estabilizante de estrutura e aditivo para melhorar textura e sabor da preparação. Dessa forma, além dos produtos de panificação, o glúten pode também ser encontrado, em menores porções, em medicamentos, carnes processadas, balas e outros. (Wieser, 2007).

Dados que estimam precisamente o consumo de glúten ainda não foram publicados, embora alguns trabalhos de outras populações fora do Brasil já demonstrem levantamentos realizados conforme a região. Segundo um estudo feito na Dinamarca entre 2005 e 2008 com 1494 adultos entre 20 e 75 anos, constatou-se um consumo de 10,4±4,4/ dia para homens e 12,0

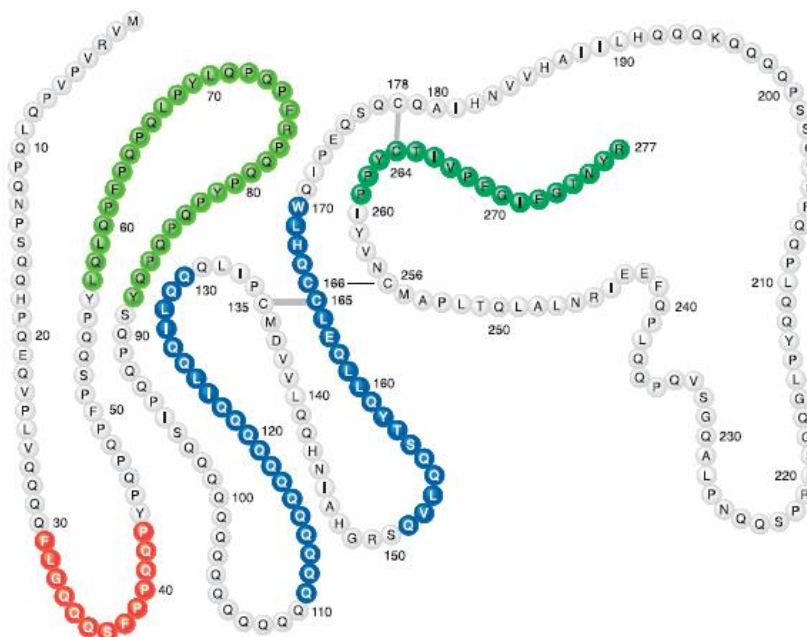
$\pm 4,6\text{g/}$ dia para mulheres. (Hoppe *et al.*, 2017) Embora outros dados da literatura mostraram que este consumo pode variar em torno de 5-20g de glúten por dia. Normalmente essa quantidade é calculada indiretamente pela análise de levantamentos sobre ingestão de cereais. Assim, os cálculos acerca do consumo de glúten foram baseados nos ingredientes dos alimentos e, a partir dele, a ingestão de glúten foi estimada. (Biesiekierski, 2017; Hoppe *et al.*, 2017)

2.4 Glúten: papel imunogênico e alteração de permeabilidade intestinal

O glúten é um complexo proteico formado por peptídeos, no qual, são descritos 50 epítopos tóxicos, relacionados a atividades imunomodulatórias, citotóxicas e ainda, ao aumento da permeabilidade intestinal (Fasano, 2011) A desregulação da barreira intestinal leva ao aumento da passagem de antígenos e outras macromoléculas do ambiente externo para o organismo e inicia inflamação local ou sistêmica com ativação de respostas imunológicas. Alterações de permeabilidade intestinal e mudanças na integridade da barreira intestinal são relevantes pois estão fortemente associadas ao aumento da inflamação de baixo grau presente na obesidade e suas comorbidades.(Cani *et al.*, 2009; Everard; Cani, 2013). As atividades destes peptídeos foram mapeadas em domínios específicos na alfa-gliadina

Os principais domínio α -gliadina associadas com atividade relevantes mapeadas na Figura 1.

Figura 1 - Epítomos da gliadina.



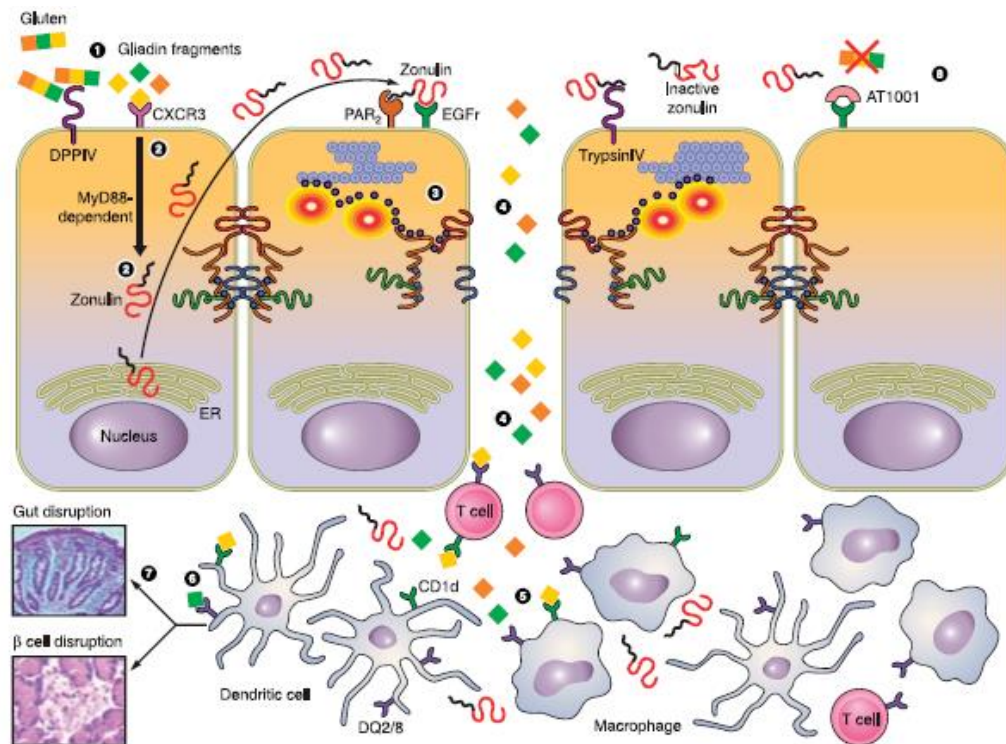
Notas: Mapeamento da α -gliadina contendo peptídeos relacionados à atividade citotóxica (vermelho), à atividade imunomodulatória (peptídeo 33-mer, em verde claro), à liberação de zonulina e alteração da permeabilidade intestinal (em azul) e à liberação de IL-8 (verde escuro). Figura adaptada de FASANO, A. **Physiol Rev**, v.91, p.151-175,2011.

Por consequência da ingestão de glúten, torna-se necessário entender a respeito da absorção e digestão de glúten através da identificação do maquinário enzimático que participa dessa ação. Segundo um estudo desenvolvido por Gutiérrez e colaboradores (2017), foram identificadas 3 enzimas, 3B (CEL3B), elastase 2A (CEL2A), e carboxipeptidase A1 (CBPA1) capazes de hidrolisar o glúten em indivíduos saudáveis e celíacos. Após a digestão realizada, as frações de peptídeos de glúten geradas, 13-mer, 19-mer foram totalmente degradadas, embora somente a fração 33-mer não foi totalmente hidrolisada tanto nos indivíduos com a doença celíaca como nos controles. Uma dessas frações, a 33-mer, tem reconhecido papel imunogênico. Assim, o 33-mer poderia causar mudanças no padrão das bactérias comensais, causando mais toxicidade e promovendo proliferação de microorganismos que geram mais peptídeos imunogênicos nesse ambiente intestinal (Gutiérrez *et al.*, 2017). Embora os mecanismos de respostas imunológicas após a ingestão e digestão do glúten sejam em maior proporção caso isto seja analisado em indivíduos com doença celíaca, observa-se que os peptídeos de glúten podem, em quaisquer condições, estar remanescentes devido a incapacidade de hidrólise completa das frações peptídicas. Uma vez que esta evidência existe, pode-se

hipotetizar os efeitos subsequentes nessa condição. Estudos como Drago *et al* (2006) buscaram compreender o mecanismo de interação entre a gliadina e as células do epitélio intestinal e constataram que a gliadina na desestabiliza a montagem da barreira intestinal. Os autores utilizaram células intestinais humanas (Caco2 e T84) e biópsia de intestino para a avaliação da integridade da barreira na presença de gliadina. Observaram que a gliadina foi capaz de induzir a liberação de zonulina, um peptídeo intestinal. A presença de gliadina foi diretamente relacionada com aumento da permeabilidade intestinal por meio de alteração na expressão de proteínas de junção firme, onde ocorreu a perda da interação de ocludina e a ZO-1. Previamente 2000, Fasano *et al.* (2000) juntamente com grupo do Dr Alessio Fasano publicaram um estudo que descreve a identificação da toxina *Vibrio Cholerae* Zonula Ocludens Toxin- (Zot), uma enterotoxina de *Vibrio Cholerae* que afeta a montagem da barreira intestinal reversivelmente por modular as junções firmes. Estudos subsequentes sobre a zonulina levaram a investigação da complexidade da cascata de sinais que interferem na regulação da barreira e juntamente com a sua identificação (Fasano *et al.*, 2000).

Uma vez identificadas as mudanças na permeabilidade intestinal decorrentes da ingestão de glúten, foi observado a via de sinalização (Figura 2). O que foi proposto por Fasano (2011) é que após a ingestão oral da gliadina, ocorre uma interação desta com epitélio intestinal causando liberação e IL-8 pelos enterócitos. Com isso, há recrutamento de neutrófilos na lâmina própria. Concomitante a isto, peptídeos de gliadina são reconhecidos pelo receptor CXCR3 e estimulam a liberação de zonulina e via MyD88. A zonulina modula as proteínas da junção firme provocando aumento da permeabilidade intestinal e translocação dos fragmentos de gliadina. A translocação de gliadina, sendo o 33-mer e outros peptídeos imunomodulatórios, permite uma interação com macrófagos de forma subsequente, iniciando uma resposta Th1 e produção de uma resposta pró inflamatória através da liberação de TNF e IFN γ em indivíduos susceptíveis (presença de HLA-DQ2/DQ8). Estímulos persistentes com este mecanismo contribuem para estabelecimento desta permeabilidade intestinal aumentada. Mecanismos posteriores em pacientes com doença celíaca envolvem a ação de células T com células apresentadoras de antígenos incluindo os macrófagos, levando a resposta imune adaptativa. Em indivíduos saudáveis essa resposta parece ser atenuada.

Figura 2 - Mecanismos de liberação da zonulina, aumento de permeabilidade intestinal e indução de resposta autoimune por fragmentos de gliadina.



Notas: Fragmentos de gliadina se ligam ao receptor CXCR3 da célula (1) e, por um mecanismo dependente de MyD88, induzem a liberação de zonulina (2). A zonulina circulante leva a alteração da junção de oclusão no intestino (3). O aumento da permeabilidade intestinal viabiliza a entrada de antígenos (incluindo a gliadina) pela lâmina própria (4) e a ligação em receptores HLA-DQ2/DQ8 em indivíduos geneticamente pré-dispostos (5). Inicia-se a resposta imune adaptativa (6-7). A resposta imune provoca danos na mucosa intestinal com atrofia das microvilosidades. ER (retículo endoplasmático). Figura adaptada de FASANO *et al.*, A. **Physiol Rev.**, v.91, p.151-175, 2011.

De forma complementar, outro trabalho realizado por Hollon *et al.*, (2015), analisou quatro grupos: indivíduos com doença celíaca ativa, em remissão, com sensibilidade ao glúten não-celíaca e controles assintomáticos. Foram avaliados a resposta da barreira intestinal à exposição de gliadina através da análise de biópsias intestinais. Nesse estudo, verificou-se que após a incubação com gliadina, houve aumento de permeabilidade intestinal em todas as amostras. A permeabilidade aumentada no grupo de pacientes celíacos com a doença ativa foi mais relevante quando comparada aos outros, embora esse resultado também tenha sido visto no grupo controle, ainda que menor proporção e por tempo determinado. Neste estudo bem como no de Drago *et al.* (2006) não estava elucidado claramente os mecanismos pelos quais o glúten poderia promover alteração da barreira intestinal em indivíduos saudáveis. Embora as evidências de que frações como 33-mer não são totalmente hidrolisadas levam a hipótese de

que estes peptídeos remanescentes podem induzir respostas imunológicas no epitélio intestinal com possível alteração da permeabilidade da barreira pela interação direta de gliadina com receptor de quimiocinas CXCR3 e subsequente liberação da zonulina. Em 2003, em um estudo desenvolvido por Lamers *et al.* (2003), observou-se o mecanismo pelo qual a gliadina promove a liberação de zonulina, através da identificação da ligação da gliadina ao receptor de quimiocina, CXCR3, expresso no epitélio intestinal de camundongos e humanos. O receptor CXCR3, quando ligado à gliadina, é capaz de promover a liberação de zonulina e aumentar a permeabilidade barreira intestinal. Modelos de animais *knockout* para CXCR3 não apresentaram esse mecanismo, confirmando dessa forma, a via de sinalização que incorpora este receptor nas reações subsequentes (Lammers *et al.*, 2008).

A zonulina induz a Proteína Kinase C (PKC) à polimerização de filamentos de actina que fazem a conexão de estruturas proteicas e, dessa forma, desestabiliza as estruturas que mantêm a permeabilidade intestinal. Esses dados foram confirmados pelos estudos de Clemente *et al.* (2003) que realizaram um ensaio com cultura de células epiteliais IEC-6 de ratos incubadas com gliadina e observaram que a PKC induz a liberação de zonulina e, concomitantemente, a polimerização de filamentos de actina. Quando usado o inibidor de zonulina (FZI/O) a polimerização de actina induzida por gliadina não ocorreu, confirmando as associações entre gliadina, zonulina e permeabilidade intestinal.

Embora o mecanismo pelo qual gliadina ativa a liberação de zonulina fosse conhecido, observa-se que ainda não havia uma definição se todos os indivíduos poderiam secretar zonulina nessas condições. Tripathi *et al.* (2009) comprovaram pela primeira vez que a zonulina, uma proteína de ~47kDa, tinha identidade similar ao precursor de haptoglobina 2 (pré-Hp2), previamente considerada somente precursor inativo de HP2, uma das variantes genéticas de haptoglobina humanas. Os autores constataram que a proteína tinha papel na regulação da barreira intestinal secundário ao estímulo de gliadina e comprovaram através de análises proteômicas de soro humano que a cadeia simples de zonulina continha o fator semelhante ao EFG (*epidermal growth factor*) e por isso levava a transativação do receptor EGFR via ativação de PAR₂ (*proteinase activated receptor 2*). Portanto, a ligação de gliadina ao receptor de quimiocina CXCR3 é o estímulo para liberação de zonulina, que é então reconhecida por EGFR e PAR₂ regulando cooperativamente a permeabilidade intestinal. (Drago *et al.*, 2006; Tripathi *et al.*, 2009).

Uma vez que a produção de zonulina é ativada pelos fragmentos de gliadina, a proteína provoca modulação da organização das junções firmes, levando a consequente aumento da permeabilidade intestinal. Assim, observa-se o elo entre a ingestão de glúten e subsequentes efeitos da gliadina e da zonulina no aumento da permeabilidade. Portanto, neste contexto torna-se importante avaliar a presença dos diferentes alelos da haptoglobina (Hp1 e Hp2), perfazendo três diferentes genótipos: Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2. A presença do alelo Hp2, ativo como a proteína zonulina, foi associado não apenas ao aumento de permeabilidade intestinal (Fasano 2011), mas também com pior prognóstico em diversas doenças infecciosas (Delanghe *et al.* 1998; Kasvosve *et al.*, 2000), doenças auto-imunes como a doença celíaca (Tripathi *et al.*, 2009) e desordens neurológicas (Gloria-Bottini *et al.*, 2008).

A permeabilidade intestinal aumentada na obesidade se torna fator promotor do aumento da inflamação (Cani *et al.*, 2009). O glúten por sua vez pode afetar diferentemente indivíduos com doença celíaca na qual é sabido um efeito de super expressão de zonulina após a ingestão dos peptídeos de gliadina. Porém, os efeitos do consumo dessa proteína e alterações subsequentes, em humanos com obesidade, não foram ainda esclarecidos.

No estudo desenvolvido por (Zhang *et al.*, 2017) e colaboradores com experimento em animais, foram avaliados a forma que a gliadina poderia impactar no metabolismo associado à dieta obesogênica. Analisaram o papel da gliadina no aumento da permeabilidade intestinal e sua influência na resistência à insulina, em alterações dos tecidos hepático e adiposo e possíveis alterações do perfil da microbiota intestinal em camundongos com dieta obesogênica, com ou sem adição de gliadina a 4%. Os autores constataram que no grupo suplementado com gliadina, houve aumento da resistência a insulina e aumento dos níveis de hemoglobina glicada comparado ao grupo sem gliadina. Além disso, observaram que o grupo com gliadina teve maior acúmulo lipídico hepático, aumento da colonização de bactérias patogênicas e alteração na produção de ácidos graxos de cadeia curta, com uma maior a produção de ácido acético. Além disso, houve aumento da permeabilidade intestinal como sugerido pela redução na expressão dos genes de proteínas de junção firme e junção aderente na porção ileal e colônica dos animais que receberam gliadina. Os autores sugerem que, a partir desses resultados em modelo experimental, indivíduos sem intolerância ao glúten ingerindo dieta rica em glúten e gordura podem sofrer alterações negativas no controle metabólico e homeostase intestinal.

2.5 Glúten e obesidade

Trabalhos experimentais também foram realizados em nosso laboratório, onde nosso grupo investigou os possíveis efeitos do glúten no metabolismo de camundongos obesos e eutróficos. O primeiro trabalho publicado por Soares *et al.*, (2013) promoveu obesidade por meio de dieta indutora em dois grupos experimentais de camundongos C57BL/6 por 8 semanas, recebendo dieta isenta de glúten ou com acréscimo de 4,5% de glúten vital. O objetivo foi comparar os grupos, isento ou acrescido de glúten, em relação ao ganho de peso, adiposidade e inflamação do tecido adiposo. Os resultados demonstraram que no grupo que recebeu dieta isenta de glúten houve menor ganho de peso e adiposidade, mesmo sem alterações no consumo alimentar e excreção lipídica, em comparação ao grupo que recebeu glúten. Além disso, no grupo com dieta sem glúten, observou-se redução na produção de citocinas pró inflamatórias, melhora de perfil lipídico e glicemia. Outros parâmetros avaliados mostraram também que houve regulação positiva de PPAR- γ relacionada ao aumento de adiponectina e GLUT-4 no grupo isento. Por meio da microscopia intravital realizada, observou-se ainda menor adesão celular no tecido adiposo, o que representa menor ativação de macrófagos neste tecido e produção de citocinas neste grupo. Assim, esse estudo sugere que dietas isentas de glúten podem promover uma regulação positiva de PPAR γ , aumentando adiponectina e GLUT4, tais efeitos estão associados a redução de adiposidade, inflamação e resistência à insulina. Dessa forma a dieta sem glúten poderia ser testada como uma nova abordagem para prevenção de obesidade e ganho de peso.

No trabalho subsequente, realizado por Freire *et al.* (2016), tornou-se necessário investigar possíveis mecanismos pelos quais o glúten poderia interferir no metabolismo que justificasse a diferença no ganho de peso, e os efeitos pró-inflamatórios encontrados nos animais que utilizavam o glúten na dieta. Além dos dois grupos de animais obesos, foram estudados outros dois grupos com animais eutróficos, ambos subdivididos em grupos isentos ou com 4,5% de glúten na dieta e acompanhados também por 8 semanas. Desta forma verificou-se os efeitos do glúten ingerido no metabolismo lipídico, termogênese e gasto energético. Os resultados encontrados mostraram que os animais que receberam glúten na dieta, tanto no grupo eutrófico quanto obesos, tiveram maior ganho de peso e de gordura corporal quando comparados aos controles isentos. Em um dos experimentos realizados neste estudo os animais receberam glúten marcado com radionuclídeo tecnécio 99m ($^{99m}\text{TcGLU}$) por gavagem com o

objetivo de se avaliar a biodistribuição do glúten no organismo. Neste experimento foram detectados peptídeos do glúten radiomarcado em diversos órgãos como tecido adiposo visceral, sangue e fígado, o que demonstrou seu alcance em órgãos extraintestinais. Mecanismos de controle do gasto energético avaliados, demonstraram que, os animais que receberam glúten na dieta, tiveram menor expressão de UCP-1 no tecido adiposo, bem como redução no consumo do volume de oxigênio (avaliado por calorimetria indireta), o que justificaria as possíveis alterações no ganho de peso. Além disso, o grupo obeso com glúten apresentou menor expressão de adiponectina, quando comparado aos controles e, em experimento realizado com cultura de adipócitos, apresentaram menor expressão em PPAR α , PPAR γ e lipase sensível a hormônio (HSL), o que está relacionado à diminuição do gasto energético e da oxidação lipídica e, conseqüentemente, ao acúmulo de gordura. Em conclusão esses estudos suportam a hipótese que o glúten em modelo animal foi capaz de promover o ganho de peso tanto em obesos quanto nos animais eutróficos por reduzir a capacidade de termogênese no tecido adiposo.

O gasto energético se torna importante alvo de estudo para controle da obesidade. A atividade física, alimentação, composição corporal compõem o gasto energético e uma variação em um destes componentes pode modificá-lo. Uma das formas precisas de aferição da taxa metabólica basal que compõe este fator é a calorimetria indireta, que foi usada no estudo citado anteriormente bem como é uma técnica padrão para avaliação em humanos embora outras como a calorimetria direta, água duplamente marcada também possam ser aplicadas para este fim (Pinheiro Volp *et al.*, 2011). Diversos fatores podem interferir no gasto energético bem como a dieta, alimentos no que diz respeito ao fator térmico de alimentos podem interferir embora sejam responsáveis por somente 10% pois os fatores como a atividade se tornam o componente mais variável. Fatores como ingestão alimentar aumentada podem impactar este gasto enquanto que restrições calóricas severas podem reduzir (Westerterp, 2017). Embora diversos mecanismos sejam bem conhecidos, a busca pelo entendimento de compostos como capsaicina, substância pungente presente nas pimentas e outros compostos ou componentes de alimentos tem sido estudado para entendimento de sua influência nos tecidos adiposos. A alteração do tecido adiposo branco, no processo de “browning” no qual o tecido adiposo branco é dotado de uma superexpressão de UCP-1 após uma transdução de sinal após estímulos é uma das vias que tais compostos e componentes pode atuar. No estudo de Freire *et al.* (2016) esta interação entre glúten e termogênese foi explorada no qual o glúten regulou negativamente a expressão das proteínas envolvidas nestes mecanismos nos diferentes tecidos adiposos,

Trabalhos clínicos que estudam especificamente o glúten no metabolismo humano são escassos e não foram encontrados estudos clínicos controlados que observem seus possíveis mecanismos relacionados a alteração de peso corporal, seu papel imunogênico ou qualquer outro aspecto relacionado à sua ingestão ou restrição em pacientes não celíacos.

2.6 Consumo de glúten e desfechos clínicos associados

Alguns estudos buscam compreender mecanismos que esclareçam a relação entre glúten e seus possíveis efeitos no metabolismo. Fatores inflamatórios decorrentes da expansão do tecido adiposo e respostas subsequentes é sustentado por um estado de integração das diversas vias de sinalização que são entendidas a cada dia com mais detalhes. Muito já se sabe sobre o impacto que mudanças no perfil alimentar podem acarretar incluindo as mudanças na composição da microbiota intestinal que, por consequência, alteram a homeostase metabólica. (Griffin, 2017)

Uma vez que não só a restrição calórica, mas também a composição da dieta pode causar mudanças na composição da microbiota intestinal e em marcadores metabólicos e inflamatórios, torna-se necessário analisar padrões dietéticos e seus desfechos a fim de se definir bases para o tratamento da obesidade, especialmente quanto à influência do glúten neste contexto. (Kong *et al.*, 2014)

Kim *et al.*(2017) realizaram um estudo com objetivo de verificar os possíveis benefícios que indivíduos que auto relatavam seguir uma dieta sem glúten, embora metabolicamente saudáveis, poderiam obter quando comparados aqueles com risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares que não seguiam essa dieta. Analisaram os dados dentro da amostra do *National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)* 2009–2014 e observaram que somente 155 indivíduos não-celíacos seguiram a dieta sem glúten embora não apresentassem riscos para desenvolvimento das doenças cardiovasculares e compararam com aqueles indivíduos que apresentavam riscos. Não encontraram diferenças entre os resultados mensurados a partir do escore de Framingham embora observaram casualmente que este grupo tinha níveis de HDL maiores e menor circunferência de cintura. A maior parte da amostra era do sexo feminino (64,6%) e a maioria que seguia a dieta sem glúten tinha peso dentro da normalidade. Além disso esses indivíduos relataram perda média de 1,3kg de peso corporal após um ano do seguimento da dieta ($p=0,053$) a qual os autores atribuem a

um perfil de indivíduos que provavelmente obteve isto por serem perfil de pessoas com uma maior preocupação com saúde idenpendente do glúten.

Emilsson e Semrad (2017) publicaram um trabalho no qual apontam para a necessidade de estudos clínicos que demonstrem o impacto da restrição de glúten em indivíduos não-celiacos e ressaltam que a popularidade das dietas sem glúten aumentou sem que haja associações consistentes que justifiquem a adoção de tal medida. Além disso salientaram o fato de que os estudos relacionados a fatores de risco e possíveis benefícios desse tipo de intervenção não demonstraram relação com a redução de risco para doenças cardiovasculares e efeitos metabólicos.

Pouco se discute sobre a provável mudança no padrão e consciência alimentar quando a dieta possui alguma restrição específica. Villafuerte-Galvez *et al.* (2015) identificaram que um comportamento alimentar direcionado pode oferecer benefícios e mudanças no padrão alimentar. Nesse trabalho foi observado que a adoção de dieta sem glúten está diretamente relacionada ao aumento de consciência alimentar e que os seguidores dessa dieta possuíam um alto nível de informação (Villafuerte-Galvez *et al.*, 2015). Em contrapartida, outro estudo observacional usando a base de dados NHANES 2009-2014 apontou efeitos deletérios desse tipo de prática (Bulka *et al.*, 2017). Nesse estudo os autores analisaram amostras urinárias e marcadores sanguíneos de contaminação por metais tóxicos e o relacionaram com os resultados dos questionários aplicados referentes a adoção de dieta livre de glúten. O resultado mostrou que dietas sem glúten expunham os indivíduos a altos níveis de contaminação por mercúrio e arsênio. O fato foi justificado pelo aumento do consumo desses elementos tóxicos presentes no arroz (que não contém glúten) na dieta.

Uma outra visão demonstra a controversa sobre o assunto, sugerindo que não há efeitos diretos da restrição de glúten com piora do padrão alimentar. O estudo realizado por (Rocchetti *et al.*, 2017), avaliou os diversos substitutos de trigo na alimentação como extrato de grão de bico, sorgo, quinoa, arroz negro, lentilha, amaranto, arroz integral e branco quanto a o conteúdo e capacidade antioxidante de compostos fenólicos e antocianinas. Constatou-se maior conteúdo fenólico em arroz negro seguido de quinoa, bem como em produtos integrais e farinhas. A partir desses achados, inferiu-se que o risco nutricional de uma dieta sem glúten é relativo e que é possível ter uma dieta com bom valor nutricional se houver uma seleção criteriosa dos substitutos do trigo por alimentos com bom valor nutricional.

3 JUSTIFICATIVA

Estudos clínicos controlados que esclareçam o papel do glúten dietético e seus efeitos diretos sobre o metabolismo humano são escassos. Com base no seu papel imunogênico, nos efeitos sobre o metabolismo energético em modelos animais e nas vias metabólicas que são relevantes para controle de peso e inflamação, torna-se necessário um estudo clínico controlado para avaliação destes parâmetros no metabolismo humano e a análise sobre o impacto da exclusão do glúten como adjuvante no tratamento de obesidade e suas comorbidades.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do consumo controlado de glúten de trigo (24g/dia) no ganho de peso corporal, composição corporal, ingestão alimentar, metabolismo basal e perfil inflamatório em mulheres não-celíacas com sobrepeso e obesidade e a associação desses fatores com o genótipo da haptoglobina.

4.2 Objetivos específicos

Comparar os efeitos do dietas com teor controlado de glúten e dietas sem glúten nos seguintes parâmetros:

- a) Peso e composição corporais (avaliada por meio do IMC, massa gorda e massa livre de gordura);
- b) Metabolismo em repouso (avaliado por meio da calorimetria indireta medida a cada período de intervenção do estudo);
- c) Composição nutricional da dieta (macro nutrientes) e Índice inflamatório da dieta;
- d) Perfil inflamatório do sangue (avaliado pela medida das citocinas próinflamatórias IL6, IL 1 β e TNF- α);
- e) Correlacionar os dados obtidos com a presença do alelo Hp2 (pre-haptoglobina 2) também chamado de zonulina.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Caracterização do estudo

Ensaio clínico cruzado, placebo controlado, simples mascarado (apenas participantes).

5.2 População do estudo

O estudo foi composto por indivíduos do sexo feminino, com idade entre 18 e 50 anos (em período pre-menopausa), com faixa de índice de massa corpórea (IMC) entre 24,9 e 35,4 kg/m² (sobrepeso e obesidade). As secretarias da escola de Enfermagem e Nutrição e do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais fizeram a divulgação da pesquisa.

Foram adotados, além dos critérios de IMC e idade os seguintes critérios de exclusão: o diagnóstico ou suspeita de doença celíaca ou outras associadas ao consumo de glúten ou trigo, presença de doenças crônicas como diabetes mellitus (DM), hipertensão arterial sistêmica (HAS), insuficiência renal crônica (IRC) e uso de medicamentos controlados, chás, cápsulas ou quaisquer elementos que pudessem interferir no gasto energético e metabolismo de repouso.

5.3 Alocação de voluntários e dietas

A partir da divulgação feita pela UFMG como descrita acima, as candidatas à participação da pesquisa entraram em contato para obter maiores esclarecimentos e para fornecer dados de peso, altura e idade para conferência dos critérios de inclusão. Além disso, nesta oportunidade foi enviado um material explicativo sobre a logística do período experimental e a exclusão do glúten na dieta sem objetivo de emagrecimento. O esclarecimento parcial incluiu informações sobre a restrição do glúten da dieta, somente por oito semanas experimentais, as datas de coleta de dados e tipo de exames que seriam realizados, além de demais informações sobre o trabalho.

A partir da confirmação de interesse e aprovação dos critérios de inclusão, as voluntárias foram convidadas a participar de uma reunião geral presencial realizada previamente ao início da coleta de dados exclusivamente com o objetivo de apresentar detalhadamente todas as etapas

do trabalho. Também estavam presentes nesta reunião a equipe composta por biomédicos, acadêmicos de nutrição e colaboradores. Neste encontro as voluntárias que estiveram de acordo com a participação no estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B). Após essa reunião geral foram mantidos contatos com as voluntárias pré selecionadas para coleta de registros alimentares com rotinas alimentares habituais.

A partir desses registros alimentares de 24h ou 72h prévios a entrada no estudo, denominados pela equipe como “registros pré-estudo”, foram elaborados materiais com sugestões de mudanças de alimentos equivalentes aos de uso habitual nas versões sem glúten para a manutenção das oito semanas com isenção de glúten na dieta e sem alterações do padrão alimentar.

É importante salientar que durante a reunião enfatizou-se que o objetivo da retirada de glúten na dieta não tinha como intenção proporcionar nenhuma dieta de restrição calórica ou modificar quaisquer padrões na composição corporal. Caso estas alterações ocorressem, deveriam ser de forma espontânea. As voluntárias ficaram cientes destas alegações desde o momento da reunião geral e receberam materiais que foram especialmente desenvolvidos a fim de evitar grandes mudanças nas rotinas dietéticas e também de atividades físicas até o final do estudo. Esses materiais incluíam uma lista de substituições de alimentos com o objetivo de facilitar a mudança da dieta habitual para a versão sem glúten. Foi bastante recomendado e esclarecido que as participantes não deviam alterar o padrão alimentar e nem mesmo de atividade física após a reunião geral.

Ainda, as voluntárias receberam orientações detalhadas sobre o uso imprescindível de bolos de milho que seriam veículos de glúten ou placebo (APÊNDICE A) e que deveriam ocorrer desde o primeiro dia de coleta de dados até o último dia de cada etapa. As voluntárias foram informadas quanto a composição de nutrientes e ingredientes destes bolos afim de minimizar quaisquer problemas de aceitação ou incompatibilidade com os ingredientes deste alimento teste. Além disso, foi ressaltada a importância do uso de exclusivamente 2 bolos por dia.

5.4 Cálculo amostral

A amostragem foi realizada pelo cálculo amostral foi feito de acordo com Armitage (1987), considerando a variação do peso corporal do estudo piloto das voluntárias que

apresentou desvio padrão de 604g e assumindo uma diferença no peso a ser detectada entre as fases, de 500g. Assim, calculado pelo site do laboratório de Epidemiologia e Estatística². Os resultados são mostrados a seguir:

Desvio padrão	604.0000
Diferença a ser detectada	500.0000
Nível de significância %	5%
Poder do teste	80%
Teste de hipótese	bicaudal
Tamanho da amostra calculado para cada fase (placebo e glúten)	23

Para outros valores do nível de significância e poder do teste temos:

Nív. de signif.	Poder do teste	Tam. amostra p/ grupo
5%	65%	16
5%	85%	26
5%	90%	31
5%	95%	38

Referencia: ARMITAGE, P. ; BERRY, G. The planning os statistical investigations. In: _____ **Statistical methods in medical research**. 2.ed. Oxford, Blackwell, 1987. p.179-85.

Comitês de ética e registro no IBR *Institutional Review Board*

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG (CAAE:49480215.0.000.5149) (ANEXO A). As voluntárias assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, ANEXO B) e foram orientadas sobre os procedimentos éticos e legais.

Este estudo também foi devidamente aprovado pelo IRB (*Institutional Review Board*) pelo protocolo: 2016P002748 em dezembro de 2016, considerando que parte das análises de

² <http://www.lee.dante.br/index.html>.

soro e genotipagem que foram realizadas no laboratório do Prof. Alessio Fasano (MBIRC – *Mucosal Biology and Immunology Research Center*) do Massachusetts General Hospital (Boston, MA, EUA).

5.5 Delineamento experimental

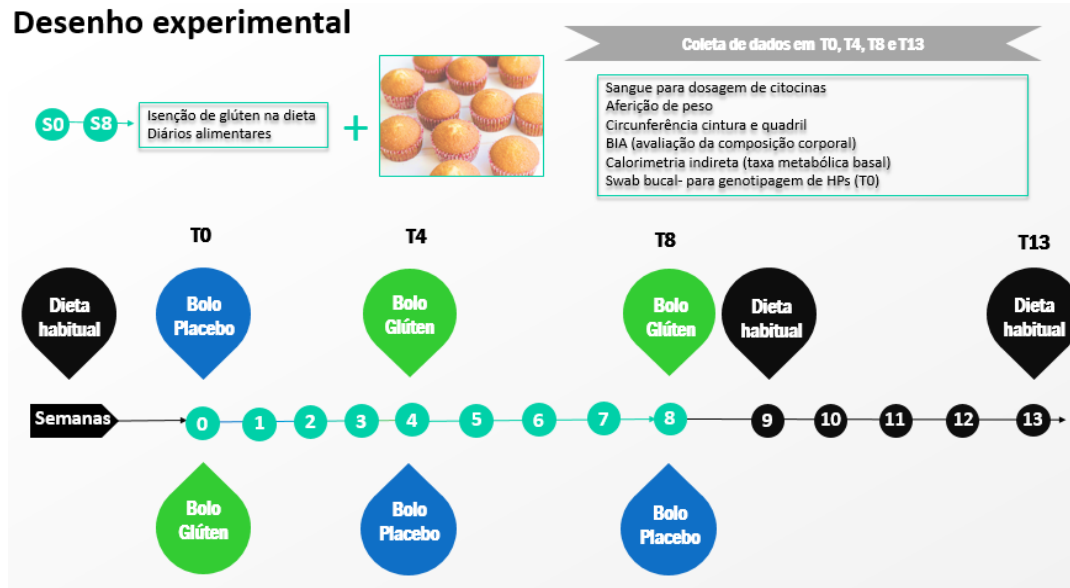
O estudo foi dividido da seguinte forma (Figura 3): as voluntárias selecionadas após a assinatura do TCLE e participação na reunião geral, permaneceram na dieta de rotina habitual com glúten, fase denominada pré estudo e aguardaram a data para a primeira realização de coleta de dados, fase denominada Tempo 0 (T0).

Todas as voluntárias iniciaram no T0 a exclusão do glúten da dieta habitual pelas próximas 8 semanas (até T8). No T0, dividiu-se a amostra geral em dois grupos, aquelas que iniciaram a intervenção dietética com o uso do “Bolo Placebo” isento de glúten e as demais iniciando com a ingestão do “Bolo Glúten”, contendo 12g/bolo de glúten vital. O estudo foi realizado de forma simples mascarado, no qual as voluntárias não sabiam qual o tipo de bolo estava recebendo.

Ao final da 4ª semana (T4), realizou-se a segunda coleta de dados, que marcou a troca das intervenções (final da fase 1 e início da fase 2): as voluntárias que utilizaram o Bolo Glúten na fase 1 passaram a utilizar o Bolo Placebo na fase 2 (4 últimas semanas) e vice-versa. No final da oitava semana (T8), foram realizados os mesmos exames feitos em T0 e T4 para a análise comparativa de cada voluntária com ela mesma nas duas intervenções.

Após as 8 semanas de intervenção, definiu-se o momento pós estudo, período correspondente ao retorno da rotina habitual sem quaisquer restrições dietéticas (semana de T8 a T13) a fim de se avaliar as possíveis alterações decorrentes do retorno às rotinas habituais de alimentação. O momento T13 foi definido para que 4 semanas completas fossem verificadas isentando a influência da semana T8 com a finalização das intervenções. Neste período, as voluntárias foram orientadas a consumirem glúten normalmente conforme a dieta que tinham anteriormente ao início do estudo. Neste período, as voluntárias foram orientadas a consumirem glúten normalmente conforme a dieta que tinham anteriormente ao início do estudo.

Figura 3 - Desenho experimental



5.6 Produção dietética dos alimentos veículo de glúten ou placebo

A produção dos bolos foi feita no laboratório de técnica dietética da Universidade Federal de Minas Gerais, departamento de Nutrição, com a autorização da professora Rita Ribeiro, responsável pela coordenação do laboratório e da disciplina. Foram realizados semanalmente, ao longo do período experimental, A produção dos bolos veículos do glúten (ou placebo) foi realizada semanalmente, ao longo do período experimental,

Foram realizados inúmeros testes para padronização e oferta final de um alimento palatável que tivesse aceitação garantida pelas participantes. Diversos membros do grupo de pesquisa e pessoas externas ao estudo foram convidados a degustar e avaliar os bolos quanto aos quesitos sensoriais e palatáveis, bem como identificar possíveis diferenças entre eles. O bolo com glúten não apresentou diferença palatável que o fizesse se distinguir do bolo placebo. Os bolos também eram indiferenciáveis quanto a aparência ou tamanho, que pudesse propiciar a identificação a identificação.

A produção dos bolos foi realizada conforme a receita e fichas técnicas (APÊNDICES A, B) sendo que, a voluntária que consumia o bolo com glúten recebia duas unidades contendo 12g de Glúten Vital (Granotec Brasil), com o percentual de pureza de 75% segundo descrição do fornecedor, totalizando a ingestão de 24g/dia.

Os bolos foram confeccionados semanalmente pela manhã e eram entregues imediatamente após a produção em embalagens plásticas contendo duas unidades por embalagem (quantidade a ser ingerida por dia) para atender o consumo para o período de uma semana. Não foi feito nenhum armazenamento e, portanto, as voluntárias compareciam à Escola de Enfermagem para buscá-los. Se houvesse dificuldades quanto aos horários agendados, as voluntárias recebiam as embalagens contendo os bolos que foram propriamente acondicionadas em geladeira por, no máximo, 24h.

Ao total, cada voluntária recebeu oito caixas por semana para consumo diário dos dois bolos e uma caixa extra por segurança. Todas foram orientadas quanto ao acondicionamento em suas residências, bem como informações a serem passadas aos seus familiares sobre o período em que estariam participando do estudo a fim de evitar o consumo dos bolos por terceiros. Após o fim de cada etapa (T4), os bolos restantes foram recolhidos para evitar a ingestão equivocada. A tabela nutricional com os principais nutrientes dos bolos experimentais está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Composição nutricional dos bolos experimentais

INGREDIENTES	Bolo Placebo	Bolo Glúten
Energia (Kcal)	155,5	162,00
Carboidratos (g)	21,34	13,45
Proteínas (g)	2,74	10,89
Lipídeos (g)	7,02	6,68
Sódio (mg)	50,95	50,95
Fibra alimentar (g)	1,09	0,53
Glúten Vital (g)	0,00	12,00

Notas: Ingredientes: Leite, milho, ovo, fubá, glúten vital (Granotec), açúcar, fermento biológico .

5.7 Fases de coleta e dados em T0, T4, T8 e T13

Nos dias T0, T4, T8 e T13 foi solicitado às voluntárias que permanecessem em jejum entre 8 e 12 horas, necessário para as análises sanguíneas e para a realização do exame de bioimpedância.

Primeiramente, o peso corporal e altura foram aferidos em balança Tanita BF-680W e estadiômetro de parede (Compacto 2,1cm Mod 210 Wiso), respectivamente. As voluntárias foram posicionadas devidamente de forma que a postura do corpo fosse feita pelos pés juntos e com a coluna ereta, sendo a medida realizada rente à parte superior da cabeça após o posicionamento da haste do aparelho.

No segundo momento, posterior a essas aferições, as voluntárias permaneceram por 20 minutos em repouso com pernas descruzadas, sem uso de aparelhos de celular ou quaisquer movimentos que pudessem interferir na sua atividade. Durante o período do repouso, a nutricionista responsável, juntamente com as acadêmicas de nutrição devidamente treinadas, orientava as voluntárias quanto as principais mudanças alimentares condizentes à exclusão de glúten da dieta habitual e consumo obrigatório de duas unidades por dia dos bolos experimentais ao longo das semanas do estudo. Foram entregues (após a realização dos exames) materiais com listas de produtos sem glúten que poderiam ser adquiridos para substituição correta dos alimentos e os alimentos que deveriam ser excluídos, além de orientações sobre a inserção dos bolos do estudo no dia a dia.

Nos dias T0, T4 e T8 foi entregue um caderno específico para o período, contemplando espaços para o diário alimentar, no formato em apêndice (APÊNDICE D). Esse caderno entregue em cada uma das coletas servia para anotações de consumo alimentar diário, sete dias por semana durante todas as semanas experimentais. Foram considerados apenas três destes registros por semana embora os sete tenham sido coletados por motivos de segurança em não haver falta de dados ou dias atípicos na alimentação. Um caderno para período T8 a T13 também foi entregue para anotações de três registros alimentares por semana. As voluntárias foram orientadas a escrever precisamente as medidas caseiras ou gramaturas, nome de alimentos, marcas de produtos que utilizaram, especialmente dos produtos isentos glúten. Os cadernos com registros das dietas foram recolhidos a cada coleta, sendo para T0 até T4 um único caderno e novamente nos tempos T4 à T8 e T8 à T13 referentes a cada fase de intervenção.

5.8 Fases de intervenção dietética

No período pré-estudo, antes do início da coleta de dados e intervenções, as mulheres selecionadas não tiveram nenhuma mudança na dieta habitual e nem restrição do consumo de

glúten, apenas anotaram seu consumo rotineiro de alimentos em um registro alimentar, que serviu como base para a análise da ingestão habitual.

No T0 – coleta inicial, o grupo foi dividido entre dois grupos pareados para idade e IMC, denominados Glúten e Placebo, onde metade das voluntárias receberam primeiramente os bolos veículos de glúten (grupo Glúten) e as demais os bolos isentos de glúten (grupo Placebo). Nesse dia de coleta, as voluntárias foram orientadas a iniciar uma dieta isenta de alimentos fontes de glúten até o final das oito semanas experimentais. Após a coleta da oitava semana (T8) elas foram orientadas a retornarem à rotina de dieta habitual.

A adoção de dieta sem glúten foi definida a fim de proporcionar a oferta controlada da quantidade de glúten (24g/dia) isolando desta forma as possíveis variações do consumo de glúten das dietas. O uso de isolado de glúten (glúten vital) e não de alimentos fontes de glúten, por sua vez, teve o objetivo de introduzir apenas o nutriente teste (o glúten) sem a associação de outras variáveis alimentares, como os oligo, mono e dissacarídeos fermentáveis e polióis (FODMAPs) que poderiam interferir nos resultados.

Obedecendo o delineamento cruzado de nosso estudo, após as quatro semanas iniciais foi feita nova coleta (T4) e houve a troca dos grupos, quando aquelas que iniciaram consumindo de bolos de glúten passaram a consumir bolo placebo e vice-versa por mais outras quatro semanas (T4 até T8).

Após a coleta dos dados em T8, as voluntárias foram orientadas a retomarem a suas rotinas dietéticas inserindo o consumo de produtos habituais com glúten por mais cinco semanas, apenas anotando a ingestão alimentar. Após as cinco semanas de pós estudo (T13), o mesmo protocolo de preparo para uma nova coleta de dados foi realizado.

5.9 Biompedância e Calorimetria Indireta

Ao final do repouso de 20 minutos mencionado acima, as voluntárias foram encaminhadas para a aferição de dados de massa magra, massa gorda, percentual de gordura e água com o auxílio de bioimpedância elétrica (BIA) utilizando-se o aparelho tetrapolar BIA 450Byodynamics. Para a realização desse exame, as voluntárias permaneceram em decúbito dorsal, posicionadas em uma maca, com os braços relaxados e paralelos ao corpo e com as pernas entreabertas. Os eletrodos de corrente foram fixados abaixo da articulação metacarpo-falangeana, no terceiro dedo da mão direita e logo abaixo do arco transversal, na porção anterior

do pé direito. Os eletrodos de detecção foram colocados na porção posterior do punho direito e na porção ventral da articulação do tornozelo direito, entre os maléolos. Os valores de resistência e reactância foram utilizados para o cálculo do percentual de gordura e a massa livre de gordura.

Em seguida, as voluntárias foram mantidas na mesma maca, posicionadas ainda em decúbito dorsal, para a realização da calorimetria indireta (aparelho MetaCheck portátil- TBW importadora) para avaliação da Taxa Metabólica Basal (TMB). Com este aparelho, a aferição foi realizada com auxílio da pesquisadora e nutricionista responsável, que posicionou a máscara no rosto da voluntária sem que a mesma auxiliasse, para evitar quaisquer esforços que pudessem interferir na mensuração da taxa. Os volumes de O₂ e CO₂ (VO₂ e o VCO₂, respectivamente) foram medidos por 10 minutos.

5.10 Análises sanguíneas – dosagem de citocinas no soro

Amostras de 8 ml de sangue foram coletadas com tubos à vácuo (BD Vacoutainer) em jejum de 12h. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos na velocidade de 3.000rpm para extração do soro. O soro foi aliqotado em microtubos de 1,5 microlitros e armazenados em freezer -80°C para análises posteriores de citocinas TNF, IL 1 β , e IL6.

A dosagem de citocinas foi realizada com kits para ELISA da R&D Systems (TNF- α , DY210; IL 1 β , DY201 e IL6, DY206). Para preparo da placa foram utilizados 100 μ l do anticorpo de captura (diluição 1:120 em PBS) e realizada a incubação *overnight* a temperatura ambiente. No dia seguinte foram efetuadas três lavagens de 400 μ l a 0,05% Tween-20 em PBS e em seguida 1h do bloqueio de placa com 300 μ l de solução diluente.

Após as lavagens, foram adicionados 100 μ l das amostras ou do padrão e incubados por 2h à temperatura ambiente. Foram efetuadas três lavagens e adicionado 100 μ l anticorpo de detecção (diluição 1:60 em PBS) para ser incubado por 2h a temperatura ambiente. Foram feitas novamente três lavagens e adicionado a 100 μ l da solução diluente com estreptavidina-HRP (diluição 1:40) e incubados a 20 minutos à temperatura ambiente protegido da luz. Após a adição de 100 μ l do substrato e incubação por 20min à temperatura ambiente, foi adicionada 50 μ l da solução de parada (ácido sulfúrico 2N). A absorbância foi medida por espectrofotometria com comprimento de onda de (450nm) e os resultados foram expressos em pg/ml depois de ajustados pela curva padrão.

5.11 Avaliação do consumo alimentar

Após a devolução dos cadernos preenchidos, os dados foram tabulados referentes a cada período de intervenção, totalizando 28 registros por etapa por cada voluntária. A partir destes registros, foram considerados três registros por semana para estabelecimento de uma média de consumo referente a cada voluntária. Os dados de alimentos e diários alimentares coletados foram traduzidos em números para a avaliação do padrão alimentar semanal nas semanas experimentais e no período pós-estudo.

Os dados dietéticos de cada registro alimentar correspondentes a macro e micro nutrientes foram calculados com auxílio do Software Avanutri 4.0, que reúne as informações nutricionais com as seguintes tabelas e fontes: IBGE, informações do fabricante para marcas e produtos cadastrados, Nestlé®, tabela Philippi S.T., TACO e espaço para cadastros de novos alimentos com as informações específicas do fabricante do produto. Os produtos consumidos que não se encontravam nesses bancos foram posteriormente cadastrados no programa de cálculos Avanutri de acordo com as informações nutricionais contidas no rótulo. Os dados analisados a partir dos registros alimentares foram: valor calórico total (VCT), carboidratos, proteína e lipídeos, e calorias em razão de gramas por quilo de peso corporal bem como seu percentual em relação ao VCT da dieta e as fibras relativas à 1000kcal por dia.

5.12 Índice inflamatório da dieta

Neste trabalho também foram contabilizados os valores de cada registro alimentar e as médias semanais da ingestão alimentar de componentes nutricionais que compoem o índice inflamatório da dieta (DII). Segundo o modelo proposto por (Shivappa; Steck; Hurley, Hussey Jr, 2014) 22 itens são incluídos no cálculo do DII, a saber: as vitaminas B12, B6, A, C, D, ácido fólico, niacina, riboflavina, tiamina, calorias (kcal) totais, carboidratos, proteína, gorduras totais e as frações de ácidos graxos saturados, monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA), fibras, ferro, selênio e zinco.

O DII foi criado por Shivvapa e colaboradores em 2008 e atualizado em 2014 a partir da análise de 6500 artigos publicados sobre os efeitos de componentes alimentares em seis marcadores inflamatórios (IL1 β , IL-4, IL6, IL-10, TNF e proteína C reativa). Foram identificados de forma qualitativa, o efeito de cada componente, considerando +1 para aumento

de marcadores inflamatórios, -1 para redução dos marcadores e 0 para nenhum efeito. Dessa forma, pela análise da ingestão desses componentes por cada indivíduo calcula-se o DII da dieta.

Os dados coletados em nosso estudo foram enviados para o autor, Dr Nitin Shivvapa, para a análise do DII separados por períodos com os registros alimentares: pré estudo, na fase de ingestão do bolo com glúten, na fase de ingestão de bolo placebo e no período pós estudo. A planilha foi enviada de forma codificada, senso decodificada apenas após o retorno dos cálculos pela nutricionista responsável.

5.13 Genotipagem de haptoglobina

Para a genotipagem de haptoglobina (Hp) e caracterização dos genótipos Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2 foram inicialmente colhidas amostras de saliva através do esfregaço de swabs da mucosa bucal das voluntárias para posteriormente realizar a extração de DNA e genotipagem. As voluntárias foram orientadas a fazer três enxagues bucais com água, durante 30 segundos, para a higienização. A coleta, realizada por biomédica associada ao grupo, foi feita por 15 movimentos circulares com a escova do swab, em cada lado da gengiva lateral. As escovas com a salivas foram colocadas imediatamente em tubo de polipropileno, emergidas em etanol para preservação, e armazenadas a 40C até a realização dos experimentos.

As etapas de extração do DNA e genotipagem foram realizadas no laboratório do prof. Alessio Fasano (MBIRC/MGH) na Universidade de Harvard (Boston, EUA). Para o transporte, as amostras foram divididas em dois tubos, sendo um dos tubos apenas com conteúdo de etanol, e o segundo, apenas com a escova usada na coleta. Ambos os tubos foram devidamente armazenados e lacrados para evitar vazamento ou evaporação do etanol. Das amostras enviadas, 31 permaneceram intactas e viáveis para análise após o transporte aéreo.

A extração do DNA foi realizada em colunas de purificação que contém fragmentos de sílica. O procedimento foi realizado com kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, #K1820, USA). Brevemente, 400ul de PBS foram adicionados ao swab, seguido por 20ul de proteinase K e 400ul da solução de lise. As amostras foram incubadas a 55°C por 10 minutos. Foram, então, adicionados 200ul de etanol (96-100%). O lisato foi adicionado à coluna e centrifugado a 10,000rpm por 1 minuto, a temperatura ambiente. O DNA foi submetido a duas lavagens com 500ul de solução de lavagem 1 e 500ul de solução de

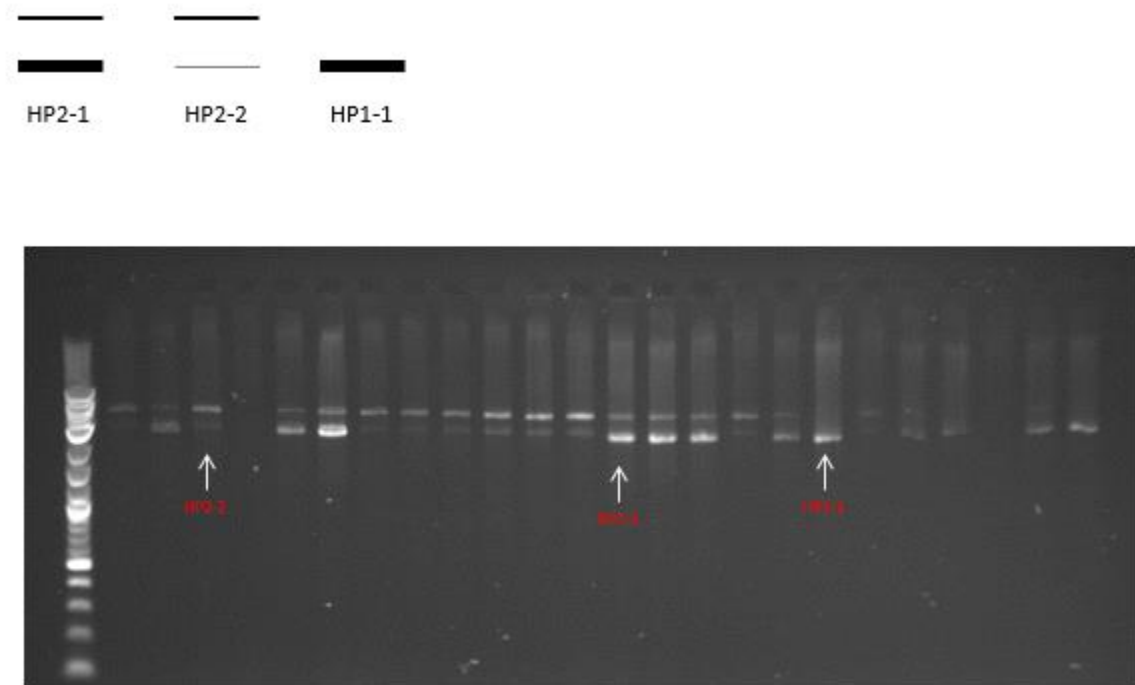
lavagem 2. Foi realizada uma centrifugação entre as lavagens e outra centrifugação final por 3 minutos. Finalmente, o DNA foi eluído em 50ul de água, incubado por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugado para coleta em novo tubo.

A genotipagem da haptoglobina foi realizada por PCR utilizando primers específicos (HPgenoF: TTT CTG GCT GCT AAG TGG e HPgenoR: AAT GTC TTT CGC TGT TGC). Os primers foram desenhados para amplificação dos exons 2 e 5 da Hp1, correspondente aos exons 2 e 7 da Hp2 (Koch *et al.*, 2002). O PCR foi realizado em termociclador de alta precisão (*Arktik Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific*).

Os produtos da amplificação foram então analisados em gel de agarose 1% preparado com solução tampão TBE (tampão tris-borato-EDTA) e bromato de etídio. A corrida do gel foi realizada a 100V por aproximadamente 45 minutos. A leitura do gel foi feita em lâmpada ultravioleta (*GeneFlash, Syngene, EUA*).

A diferença do tamanho da banda permitiu a diferenciação dos genótipos, sendo Hp1 2,5kb and Hp 5,3kb (Figura 4).

Figura 4 - Interpretação dos resultados da genotipagem da haptoglobina (HP1-1, HP2-1 e HP2-2)



5.14 Análise estatística

Primeiramente os dados foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilk. As variáveis que assumiram distribuição normal foram analisadas pelo teste *t* student e as variáveis que não assumiram tal distribuição foram analisadas por meio do teste não paramétrico de Wilcoxon. Para os casos em que o mesmo indivíduo foi comparado em diferentes momentos foram usados testes pareados e para os casos em que as amostras eram independentes foram usados testes não pareados.

O nível de significância adotado foi de 5%. No comparativo entre os quatro períodos do estudo foram realizadas comparações através da ANOVA.

Para as análises de correlação foram usadas as correlações de Pearson e Spearman. E a escolha entre esses dois tipos de correlação foi pautada na distribuição das variáveis que estavam sendo analisadas. Uma vez que se apresentavam com distribuição normal foi usada a correlação de Pearson, enquanto, se uma das duas variáveis ou ambas não apresentassem distribuição normal, a correlação utilizada foi Spearman.

6 RESULTADOS

6.1 Dados gerais das voluntárias ao iniciar o estudo

Um total de 42 voluntárias participaram do estudo. Todas relataram a ingestão dos dois bolos teste fornecidos para uso diariamente em ambas as fases do estudo. Nenhuma mudança de hábito de vida ou efeitos adversos relevantes foram relatados pelas voluntárias. Na Tabela 2 estão representadas as características principais das participantes ao iniciar o estudo (Tempo 0). Metade delas iniciaram no grupo placebo e as demais iniciaram no grupo Glúten. Todos os parâmetros avaliados neste estudo foram similares entre os grupos de intervenção inicial.

Tabela 2 - Dados gerais da amostra. Dados relativos ao período inicial (T0) nos grupos intervenções placebo e glúten. Teste t- student realizado entre os períodos de intervenção entre si que contemplam a intervenção

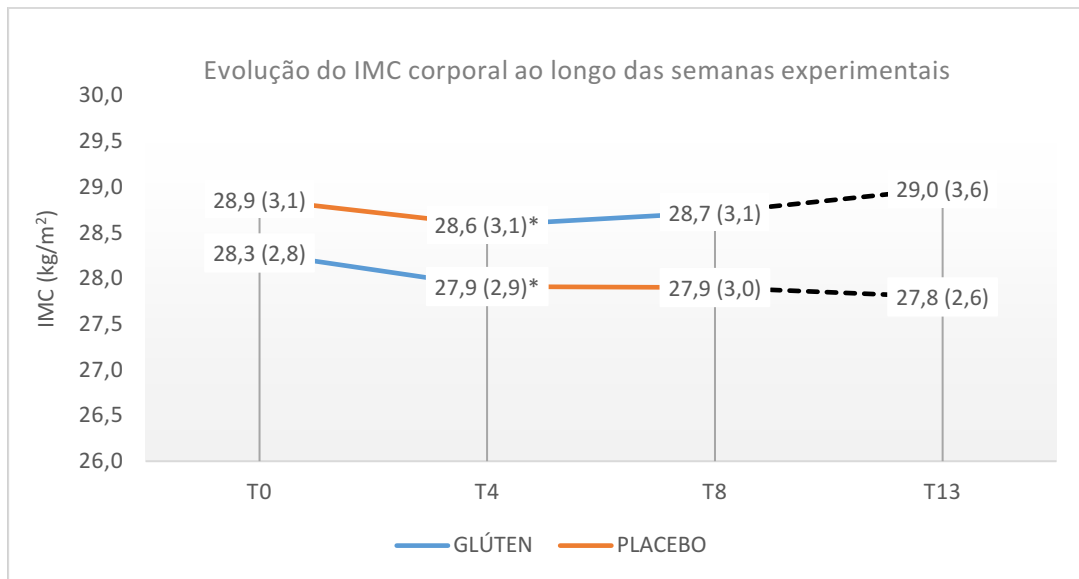
	<i>Grupo Total</i>		<i>Início Placebo</i>		<i>Início Glúten</i>		<i>Teste t</i>
	<i>(N=42)</i>		<i>(N=21)</i>		<i>(N=21)</i>		
	MÉDIA	SD	MÉDIA	SD	MÉDIA	SD	p=
<i>Idade (anos)</i>	31,6	7,7	31,7	8,76	31,6	6,73	0,953
<i>peso (kg)</i>	77,1	10,8	75,3	9,79	79	11,6	0,270
<i>altura (m)</i>	1,64	0,06	1,63	0,07	1,65	0,06	0,303
<i>IMC (kg/m²)</i>	28,6	3,0	28,3	2,91	28,9	3,2	0,539
<i>IL6 (pg/mL)</i>	9,0	6,4	8,17	6,21	9,79	6,59	0,448
<i>TNF (pg/mL)</i>	22,1	20,0	21,4	20,8	22,9	19,6	0,819
<i>IL1β (pg/mL)</i>	30,9	34,7	27,5	28,5	34,1	40,2	0,564
<i>Massa Gorda (%)</i>	35,6	4,0	35,3	3,98	35,9	4,06	0,634
<i>TMB (kcal/kg peso)</i>	14,7	3,7	14,4	3,73	15,1	3,63	0,508
<i>TMB (kcal/kg massa magra)</i>	22,8	5,4	22,1	5,55	23,4	5,35	0,453
<i>C. Cintura (cm)</i>	82,3	7,5	81,4	6,83	83,1	8,14	0,460
<i>C. Abdominal (cm)</i>	91,5	7,9	89,7	6,69	93,3	8,69	0,146
<i>C. Quadril (cm)</i>	110,0	6,8	109,0	5,5	111,6	7,7	0,298

6.2 Análise da evolução do índice de massa corporal ao longo do experimento

Inicialmente avaliamos a evolução das voluntárias, durante as 8 semanas experimentais, independentemente do tipo de intervenção à que estavam submetidas. Na Figura 5 é possível

observar uma redução pequena, mas significativa no IMC inicial (T0) em relação à quarta semana experimental (T4). Porém, essa diferença não foi mantida nas próximas 4 semanas, nem mesmo no período pós-estudo, sugerindo então, ser essa pequena redução, um efeito dependente do tempo experimental e não do tipo de intervenção dietética (placebo ou glúten).

Figura 5 - Evolução de IMC



Notas: Voluntárias submetidas a dieta sem glúten e recebendo bolos placebo ou contendo de glúten ao longo das 8 semanas do experimento. Valores correspondem a média e (desvio padrão) de cada coleta. T0= Início do estudo; T4= 4a semana experimental, T8= 8a semana experimental e T13= 5 semanas após o término do estudo.

Assim, nosso próximo passo foi analisar o efeito da intervenção sobre os parâmetros antropométricos.

6.3 Efeito da ingestão de glúten ou placebo nos dados antropométricos e de composição corporal

A investigação principal foi a avaliação das possíveis mudanças no peso e composição corporal que poderiam ocorrer com a ingestão de glúten vital. Para obter essas respostas, os dados entre início e fim de cada intervenção nutricional foram comparados, considerando o mesmo indivíduo em ambas as intervenções. Na Tabela 3 pode ser observada a média e desvio padrão dos dados das voluntárias em cada intervenção e no período pós estudo.

Tabela 3 - Dados de antropometria, composição corporal e calorimetria. Referente as voluntárias ao início e final do período ingerindo bolos placebo ou glúten por 4 semanas.

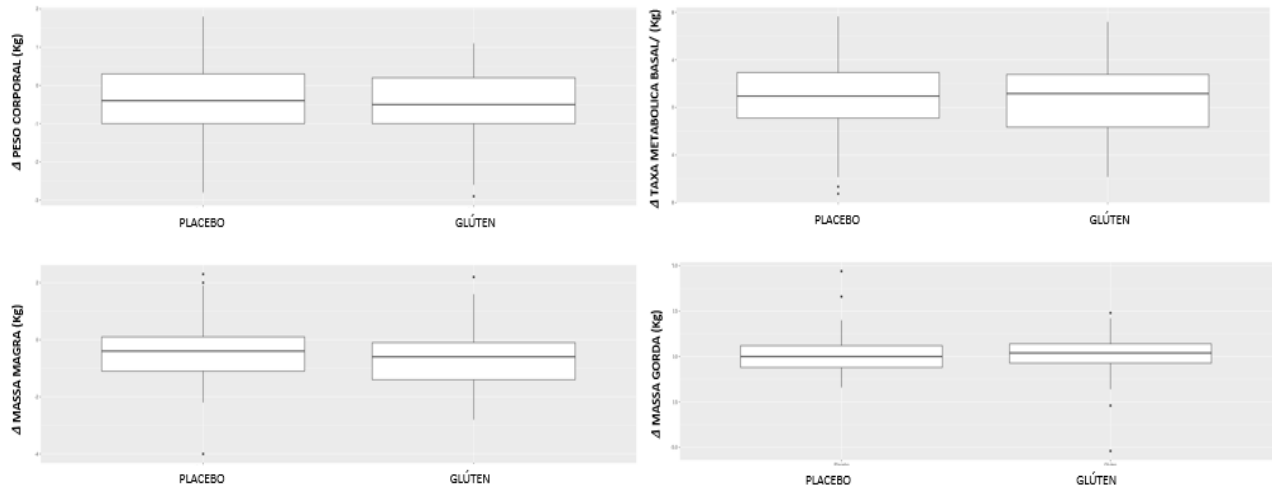
	<i>Placebo inicial</i>		<i>Placebo final</i>		<i>Glúten Inicial</i>		<i>Glúten final</i>		<i>Pos-estudo</i>	
	média	SD	média	SD	média	SD	média	SD	média	SD
<i>Peso (kg)</i>	76,90	10,89	76,53*	11,03	77,00	10,94	76,49***	11,04	76,99	11,99
<i>IMC (kg/m²)</i>	28,46	3,10	28,31*	3,20	28,51	3,08	28,31***	3,14	28,36	3,30
<i>Massa Gorda %</i>	35,91	3,74	36,22	3,95	36,03	3,87	36,38	3,81	35,92	3,93
<i>Massa Gorda (kg)</i>	27,78	6,03	27,99	6,19	27,98	6,15	28,04	6,07	27,93	6,62
<i>Massa Magra (kg)</i>	49,08	6,07	48,67*	6,20	49,15	6,05	48,42***	6,06	49,06	6,36
<i>C. Cintura (cm)</i>	81,61	7,37	81,55	8,14	82,12	7,85	81,29**	7,47	81,11	8,06
<i>C. Abdominal (cm)</i>	90,68	8,22	89,80**	8,04	90,60	7,86	89,91	8,14	90,14	8,38
<i>C. Quadril (cm)</i>	110,20	6,99	110,00	7,12	110,30	7,22	109,80	7,17	109,70	7,20
<i>TMB (kcal/kg)</i>	15,33	3,17	16,11	3,02	15,14	3,60	15,95	2,50	15,79	2,84
<i>TMB (kcal/kg MM)</i>	23,85	4,53	25,27	4,53	23,60	5,27	25,07	3,57	24,78	3,79

Notas: Significativamente diferente dos valores no tempo inicial - * p<0,05; ** p<0,01; ***p<0,001. Graph Pad Prism (teste t pareado – medidas paramétricas exceto C. quadril). TMB (kcal/kg) (taxa metabólica basal em kcal por kg de peso corporal); TMB (kcal/kg MM) (taxa metabólica basal em kcal por kg de massa magra).

Os resultados indicam redução no peso corporal e IMC no final de ambas as intervenções. Como houve uma pequena redução na circunferência da cintura na fase de ingestão de glúten e redução da circunferência abdominal na fase de placebo, esses dados sugerem uma pequena redução da deposição visceral de gordura em ambas as intervenções. Foram também aferidos e analisados os dados de circunferências da cintura, abdominal e do quadril. A circunferência da cintura e abdominal foram também reduzidas no final das intervenções glúten e placebo respectivamente (Tabela 3). Ambas representam a deposição visceral, com pequenas diferenças apenas nos pontos de referência de medida. Em relação aos dados da taxa metabólica basal não foram detectadas diferenças comparando o início e o final de cada intervenção.

Como foram vistas reduções no peso final em cada intervenção, nosso próximo passo foi analisar se essas reduções foram similares em ambos os grupos. Assim, analisamos os dados considerando as taxas de variação (Δ = valor final – inicial) de cada parâmetro em ambas as intervenções (glúten ou placebo). Observou-se que não houve mudança de padrão de variação do peso, composição corporal ou taxa metabólica basal quando a voluntária foi submetida ao consumo de bolo de glúten ou placebo. Esses dados sugeriram que as mudanças vistas no IMC e peso corporal (Figura 6) não estiveram relacionadas à ingestão de glúten, uma vez que as variações são semelhantes às vistas no período de ingestão de bolo placebo.

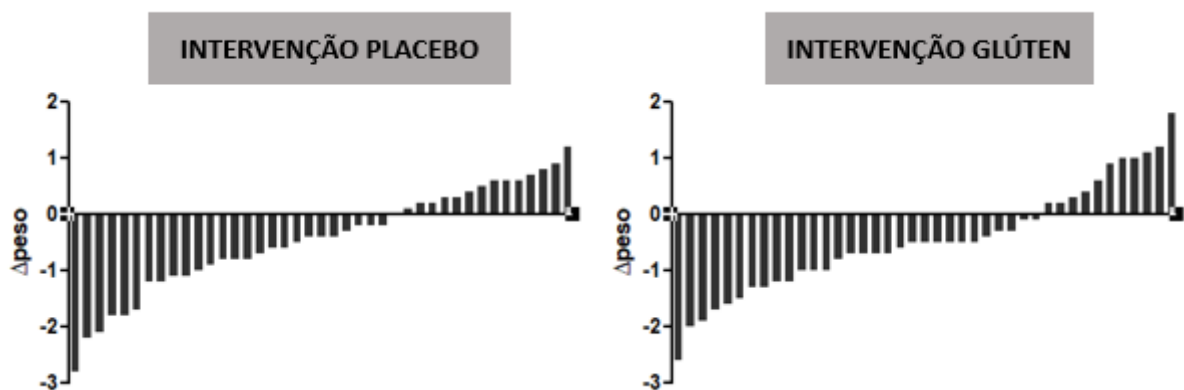
Figura 6 - Variação de dados entre placebo e glúten



Notas: Os boxplots são representativos de dados de variação Δ = dado final- inicial de cada parâmetro avaliado. Dados de antropometria, composição corporal e calorimetria. Variações médias de peso corporal, massa magra, massa gorda e taxa metabólica basal nos períodos de intervenção glúten ou placebo.

Considerando não apenas a variação do peso corporal, mas também o número de voluntárias que perderam peso em cada intervenção, é possível observar que na fase Glúten, 15 voluntárias (36,5%) perderam peso, enquanto na fase Placebo, 11 voluntárias (26,8%) perderam peso (Figura 7). Esses valores não são significativamente diferentes ($p=0,47$ – teste exato de Fisher), corroborando com os dados de variação de peso corporal.

Figura 7 - Gráficos em barra com evolução individual do peso corporal em cada intervenção



Notas: Representação das variações de peso corporal nos períodos de intervenção com glúten ou placebo. Cada barra a variação de peso corporal de uma voluntária.

6.4 Análises dietéticas

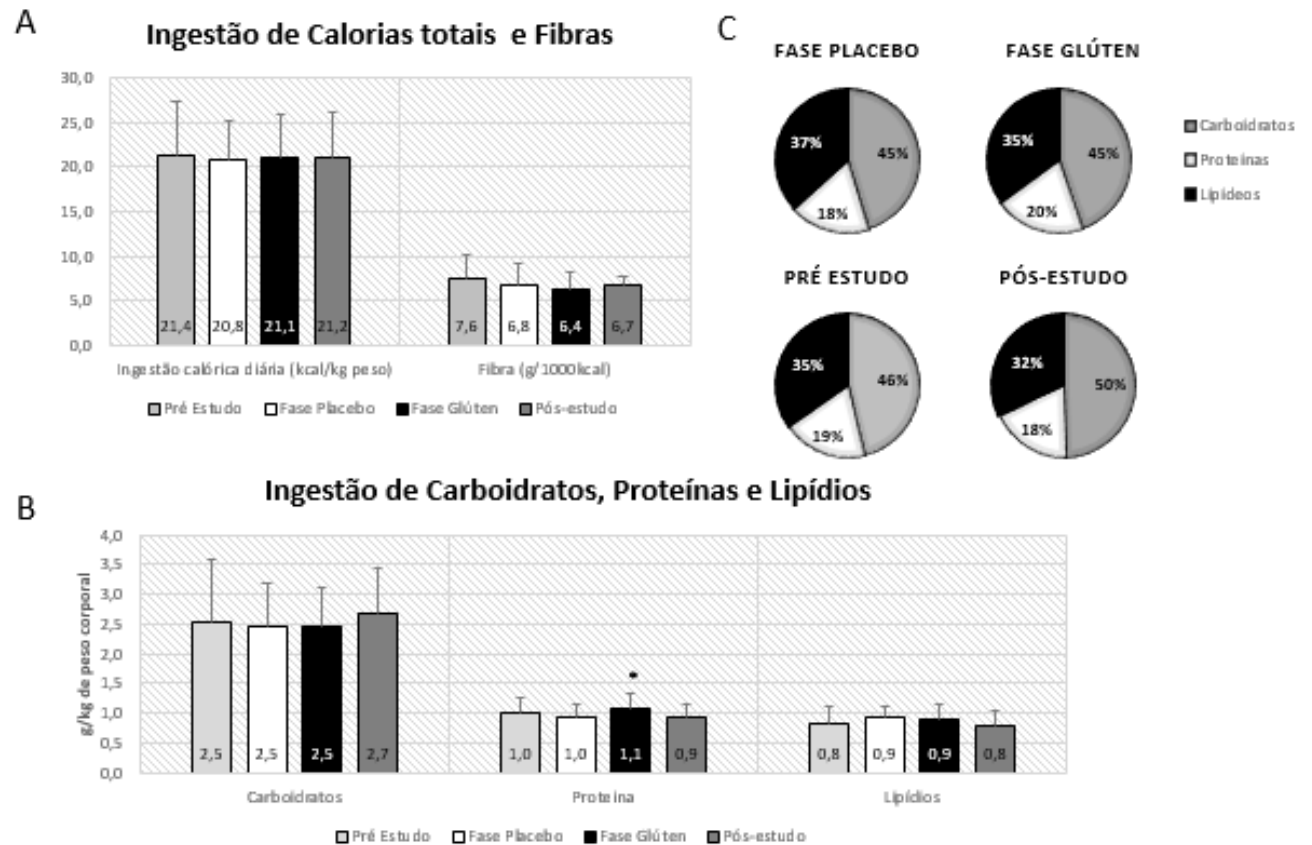
A partir dos registros alimentares coletados semanalmente, foram obtidas as médias de consumo de macronutrientes durante a fase pré-estudo, durante a intervenção glúten ou placebo e na fase pós estudo. As ingestões médias de calorias totais, carboidratos e lipídeos foram semelhantes entre os grupos, tanto considerando a ingestão por kg de peso corporal quanto como percentual da ingestão calórica diária (Tabela 4 e Figura 8). Em relação à ingestão proteica, foi verificado um aumento em termos de g/kg de peso e percentual das calorias ingeridas durante o período de ingestão de glúten, comparado ao período placebo. Cabe lembrar que nos cálculos dos registros alimentares foram incluídos os valores nutricionais referentes aos bolos experimentais. Assim, é possível que a ingestão do bolo de glúten tenha sido a causa da maior ingestão proteica no período glúten. Outra diferença que pode ser observada é o maior percentual de gordura ingerido na fase placebo, somente visto quando os períodos pré e pós estudo foram comparados juntamente com os períodos experimentais. Tal diferença pode ter ocorrido por coincidência de mudanças e adaptações alimentares decorrentes da fase pós estudo na qual a dieta livre foi orientada.

Tabela 4 - Média da ingestão de macronutrientes. Referente ao período pré-estudo, nas fases de intervenção (placebo ou glúten) e no período pós estudo.

	<i>Pré Estudo</i>		<i>Fase Placebo</i>		<i>Fase Glúten</i>		<i>Pós-estudo</i>	
	média	SD	média	SD	média	SD	média	SD
<i>Ingestão calórica diária (kcal/kg)</i>	21,41	5,92	20,75	4,34	21,05	4,98	21,15	5,08
<i>Carboidratos (g/kg)</i>	2,52	1,06	2,47	0,73	2,46	0,64	2,68	0,76
<i>Proteína (g/kg peso)</i>	1,00	0,27	0,95	0,20	1,08	0,25*	0,94	0,21
						*		
<i>Lipídeos (g/kg peso)</i>	0,82	0,30	0,92	0,21	0,91	0,25	0,79	0,24
<i>Fibra (g/1000kcal)</i>	7,6	2,67	6,79	2,40	6,38	1,83	6,67	1,07
<i>Distribuição de Nutrientes</i>								
<i>Carboidratos (% kcal totais)</i>	46,32	10,05	44,61	6,82	44,07	6,43	47,89	7,07
<i>Proteínas (% kcal totais)</i>	19,13	3,84	17,72	3,26	19,92	3,47*	17,78	6,9
						*		
<i>Lipídeos (% kcal totais)</i>	34,86	8,24	36,28	6,12	34,68	6,39	31,04*	7,69

Notas: Graph Pad Prism (teste Anova one way para comparativos de dados. Teste -t student pareado para análise de períodos de de glúten e placebo, considerando dados não paramétricos com pós teste de Wilcoxon). Significativamente diferente em % e g/kg de peso os valores de proteína - * p<0,05; ** p<0,01; Pré estudo n=40 Placebo n=39 Glúten n=38 pós estudo=29.

Figura 8 - Distribuição de macronutrientes. Distribuição de calorias, fibras e macronutrientes durante o período pré-estudo, fases placebo e glúten e período pós estudo.



Notas: #Significativamente diferente do percentual pós-estudo * $p < 0.05$ em comparação a fase placebo. Pré-estudo $n=40$; Placebo $n=39$; Glúten $n=38$ e pós estudo= 29 .

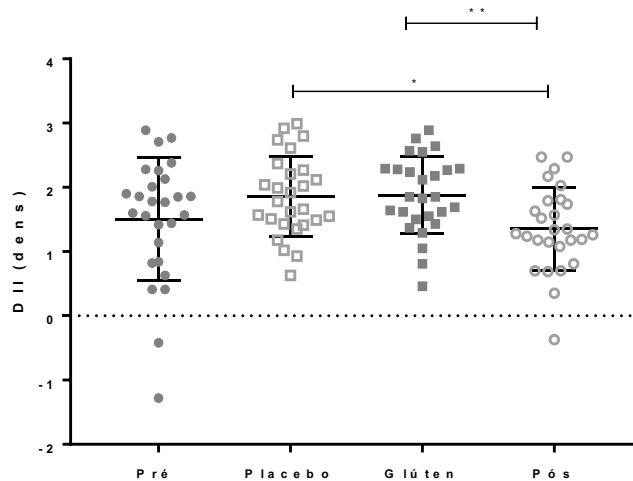
6.5 Índice Inflamatório da Dieta (DII)

Nosso próximo passo foi analisar índice inflamatório das dietas nos diferentes períodos experimentais. Foram analisados um registro alimentar do período anterior ao estudo, as médias de três registros das quatro semanas em cada fase e da mesma forma no período pós-estudo. Embora o glúten não seja um dos itens categorizados no algoritmo do DII, os demais componentes dos bolos foram contabilizados na alimentação enviada para o cálculo.

Os resultados mostram que o DII médio nas fases glúten e placebo não foram diferentes entre si, o que seria esperado, uma vez que os hábitos alimentares foram mantidos inalterados entre as fases (Figura 9). Porém, embora não tenha havido diferenças entre as fases, o DII em ambas as fases foi significativamente maior que no período pós-estudo. Em relação ao período

pré-estudo houve uma tendência a ser menor, mas essa diferença não foi significativa ($p=0,056$ comparado a fase placebo e $p=0,072$ comparado à fase glúten).

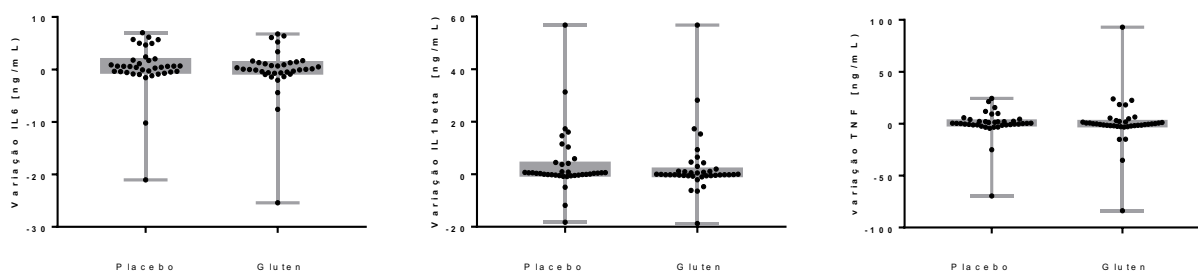
Figura 9 - Índice Inflamatório da Dieta (DII) no período pré estudo, nas fases placebo e glúten e no período pós-estudo de voluntárias no período pré-estudo, nas fases de intervenção (placebo ou glúten) e no período pós estudo. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$.



6.6 Avaliação de citocinas pró-inflamatórias

Uma vez que a ingestão do glúten tem sido associada ao aumento da inflamação, nosso próximo passo foi analisar a variação dos níveis sanguíneos das citocinas inflamatórias IL6, TNF e IL1 β considerando o início e final de cada intervenção (Figura 10). Os resultados não mostraram diferenças em nenhuma dessas citocinas quando as fases placebo e glúten foram comparados.

Figura 10 - Variação das concentrações sanguíneas das citocinas. IL6, IL1 β e TNF em voluntárias durante as fases de placebo e glúten.



Notas: Os dados são mostrados como mediana mínimo e máximo (linhas verticais).

6.7 Avaliação da expressão de zonulina

A zonulina é uma proteína que tem sua secreção induzida por fragmentos peptídeos do glúten, capaz de aumentar a permeabilidade intestinal e o perfil inflamatório do indivíduo. A presença do alelo hp2 sugere maior presença da zonulina, também identificada como pré haptoglobina 2 (Hp-2). Assim, aquelas carreadoras dos genótipos Hp2-1 ou Hp2-2 secretam zonulina em maior quantidade quando comparadas aos indivíduos com genótipo Hp1-1. Neste estudo, 34 voluntárias foram genotipadas, sendo que sete (20,6%) apresentaram o genótipo Hp1-1; outras sete voluntárias (20,6%) apresentaram o genótipo Hp2-2 e as 20 demais (58,8%) o genótipo Hp2-1.

Inicialmente comparamos as diversas variáveis medidas no final de cada intervenção entre aquelas com genótipo Hp1-1 e Hp2-2 (Tabela 5). Nossos resultados mostram que não houve mudanças nos parâmetros antropométricos. Porém, a taxa metabólica basal (por kg de massa magra) foi menor nas voluntárias Hp2-2 (grandes produtoras de zonulina) apenas no período de ingestão de glúten. O mesmo ocorreu com os níveis de IL1 β que foram estatisticamente mais altos naquelas Hp2-2, apenas no período de ingestão de glúten.

Devido a grande variação interindividual das citocinas, comparamos também a variação desses marcadores inflamatórios ao longo de cada fase (valores finais menos valores iniciais). As variações de IL1 β e também de IL6 foram maiores nas voluntárias grandes produtoras de zonulina, apenas no período de ingestão de glúten.

Tabela 5 - Média do IMC, TMB e citocinas conforme genótipo. Médias ao final de cada intervenção e variação das concentrações das citocinas ao longo das intervenções considerando aquelas portadoras do genótipo HP1-1 e HP2-2

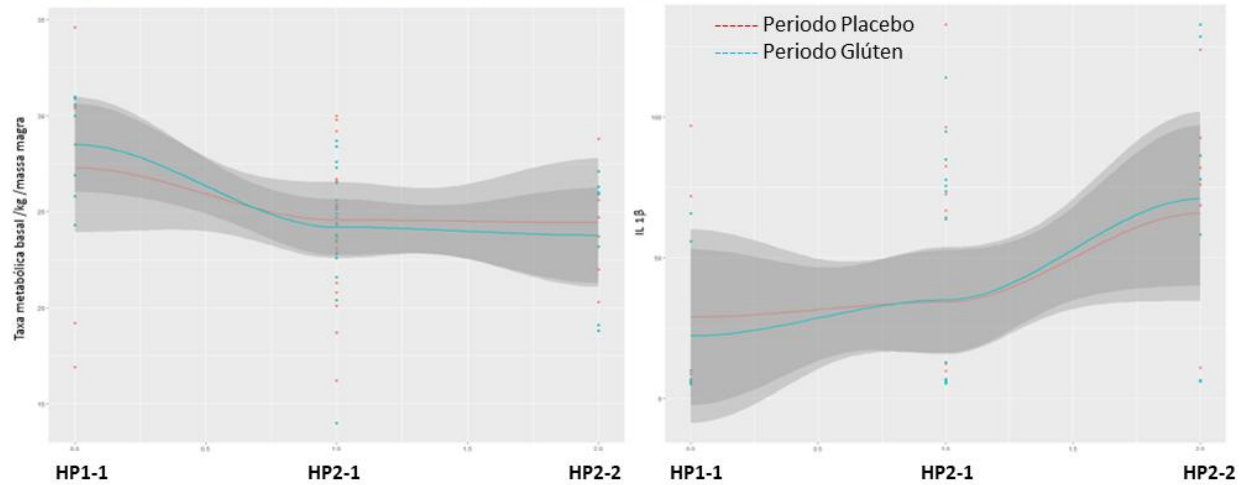
	<i>FINAL FASE PLACEBO</i>				<i>FINAL FASE GLÚTEN</i>			
	HP1-1		HP2-2		HP1-1		HP2-2	
<i>IMC (kg/m²)</i>	27,58	± 3,14	27,54	±2,11	27,41	±3,18	27,81	±2,21
<i>TMB (kg/MM)</i>	27,27	±6,58	24,42	±2,79	28,48	±2,78	23,75*	±3,50
<i>IL6 (pg/mL)</i>	10,44	±6,13	7,72	±3,03	7,99	±5,49	8,61	±2,90
<i>TNF (pg/mL)</i>	14,93	±4,10	21,81	±7,66	18,30	±7,16	18,49	±5,39
<i>IL1B (pg/mL)</i>	28,86	±38,67	65,80	±42,90	22,17	±26,57	70,93**	±51,61
<i>Variação IL6 (pg/mL) #</i>	1,12	0,59 / 5,68	0,27	-0,9 / 4,68	-0,41	-2,03 / 0,13	1,47*	0,825 / 6,48
<i>Variação TNF (pg/mL)</i>	-1,18	-3,19 / 1,35	0,57	-0,28 / 4,06	-1,14	-1,9 / 26,48	-1,86	-5,96 / 0,273
<i>Variação IL1β (pg/mL)</i>	0,17	-0,325 / 4,28	4,46	0,30 / 14,7	-0,73	-2,11 / 0,76	4,32**	0,78 / 10,9

Notas: Dados expressos em média e desvio padrão exceto para # dados de variação de citocinas (valor final – valor inicial) representam a mediana e percentis 25 / 75. Estatisticamente diferente das voluntárias com genótipo HP1-1. Estatisticamente diferente do grupo HP1.1 * p<0,05 e ** p<0,01

Em seguida, foram feitas análise de correlações, considerando a presença de nenhum, um ou dois alelos da haptoglobina 2 (Hp2) em ambos os períodos de intervenção (placebo e glúten) e no período pós estudo (dieta livre). Os resultados mostraram uma correlação negativa moderada entre a taxa metabólica basal (kg/massa magra) e o número de alelos Hp2 na fase de glúten e no período pós estudo (ambos com consumo de glúten), fato que não ocorreu no período placebo, onde não houve consumo de glúten (Tabela 6). Esses resultados sugerem que, na presença de glúten, quanto maior a produção de zonulina, menor a taxa metabólica basal do indivíduo. Os dados de correlação entre o número de alelos Hp2 e a concentração de citocinas plasmáticas confirmaram também os dados previamente analisados, mostrando que houve uma correlação positiva moderada entre o número de alelos Hp2 e as concentrações plasmáticas de IL1β. A variação dos parâmetros antropométricos como peso, IMC e composição corporal não apontaram associações significativas com o número de alelos Hp2.

Tabela 6 - Correlação entre genótipos, taxa metabólica basal e citocinas.

Número de alelo hp2 vs	Período Placebo			Período Glúten			Período Pós-estudo		
	r	CI	p	r	CI	p	r	CI	p
IMC	-0,004	-0,341 a 0,334	0,982	0,040	-0,301 a 0,373	0,820	0,118	-0,252 a 0,459	0,534
TMB	-0,303	-0,581 a 0,0391	0,082	-0,494	-0,713 a -0,188	0,003	-0,404	-0,664 a -0,051	0,027
IL6	-0,251	-0,551 a 0,106	0,165	0,067	-0,294 a 0,411	0,721	-0,027	-0,389 a 0,343	0,891
TNF	0,304	-0,037 a 0,582	0,080	0,004	-0,345 a 0,346	0,983	-0,270	-0,569 a 0,093	0,143
IL1B	0,289	-0,054 a 0,571	0,097	0,381	0,042 a 0,640	0,029	0,408	0,055 a 0,669	0,025



7 DISCUSSÃO

A adoção de restrição de glúten é alvo de discussões e levantamentos econômicos crescentes, uma vez que é comprovado desde o ano de 2014, 65% dos americanos consumiam produtos sem glúten e 27% deles alegavam ser uma estratégia para o emagrecimento (Gaesser; Angadi, 2015). Embora haja inúmeros indivíduos interessados na dieta sem glúten em diversas culturas, os trabalhos controlados que investigam esse padrão de comportamento e seu impacto no peso e composição corporal são escassos. Na luz do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo clínico investigando os efeitos da ingestão do glúten isoladamente no peso, composição corporal, ingestão alimentar e gasto energético e sua correlação com a inflamação e a presença de subtipos de genótipos para a haptoglobina.

Há algumas revisões na literatura que discorrem sobre a popularidade da exclusão do glúten nas dietas nos últimos anos. Embora haja estudos sobre possíveis benefícios da exclusão de glúten no tratamento de algumas doenças intestinais, a grande busca pela população que adota a dieta sem glúten se relaciona especificamente à perda de peso ou tentativa de se manter mais saudável (Harper; Bold, 2018; Norwood *et al.*, 2019; Pearlman; Casey, 2019). Um exemplo é o estudo em indivíduos não celíacos de Kim *et al.*, (2017). Os autores verificaram em uma amostra do estudo transversal *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) 2009–2014, que 13523 indivíduos sem doença celíaca se indentificaram como seguidores de uma dieta sem glúten. Foi observado que a maioria dos adeptos da dieta sem glúten eram mulheres com IMC menor do que população geral do estudo. Ainda foi detectado que essa população teve redução de peso autorrelatada após um ano de avaliação (1,33kg versus 0,01kg comparado a população geral). Os autores não apresentaram justificativas para esse possível efeito da mudança no peso corporal, mas hipotetizaram que a adoção de uma dieta de “tendência” induz maior cuidado com escolhas alimentares e pode ter influenciado nesse fator. Embora os resultados de Kim *et al.* (2017) pareçam apontar para um efeito da retirada de glúten no peso corporal, nossos resultados suportam a hipótese dos autores de um efeito de "dieta de tendência". No presente estudo não observamos mudanças individuais no peso e composição corporal quando comparamos a fase de consumo de bolos com ou sem glúten. Porém, pequenas diferenças antropométricas e de variação de IMC foram detectadas em nossas análises nas primeiras semanas experimentais e, possivelmente, foram ocasionadas pela adoção de uma "nova dieta" e não pela isenção de glúten propriamente dita. Essa hipótese é suportada pelo fato

de que as reduções no IMC foram similares com ambas as intervenções, independentemente do tipo de bolo utilizado. Desta forma, esses achados sem uma justificativa direta de causa e efeito, nos sugere um impacto psicológico de iniciar uma nova rotina de restrição alimentar. De acordo com esta temática de comportamento e influência de uma adoção de nova dieta, o estudo desenvolvido por Norwood *et al.* (2019) avaliou como o fator de “aderir à uma dieta” pode impactar em diversos fatores psicológicos. Nesse trabalho foi detectado que a população que adotou a dieta sem glúten o fez com intenção de se sentir mais saudável, o que poderia impactar na perda de peso pelo fato de se seguir um padrão alimentar. Embora de grande interesse, os aspectos psicológicos que regem a perda de peso com a adoção de novas dietas fogem ao escopo do presente estudo e assim não serão discutidos em detalhes.

Um estudo em indivíduos não celíacos, com enfoque na avaliação dos efeitos da dieta pobre (2g/dia) ou rica (18g/dia) em glúten na microbiota intestinal sem quaisquer mudanças no padrão alimentar (a não ser a limitação do glúten) observou uma perda de peso com a dieta pobre em glúten ($0,800 \pm 0,3\text{kg}$) nas oito semanas experimentais quando comparada a nenhuma perda no outro período (Hansen *et al.*, 2018). Diferentemente do nosso estudo, neste trabalho a dieta pobre em glúten foi mantida pela substituição de alimentos nativos pelas versões sem glúten. Embora a redução de peso vista por estes pesquisadores pode não ser clinicamente relevante, a justificativa em torno dos possíveis mecanismos envolvidos para a obtenção da perda de peso foi a redução da termogênese induzida pelo consumo de glúten. Mas, ao contrário do nosso estudo, a termogênese não foi medida diretamente pelos autores. Essa hipótese foi suportada pelo nosso estudo prévio, com camundongos isogênicos C57BL/6 alimentados com dietas sem ou com glúten, que mostrou a redução da termogênese após oito semanas no grupo que ingeriu glúten (Freire *et al.*, 2016). Assim, no presente estudo, também esperávamos encontrar redução da taxa metabólica basal no período de ingestão de glúten. Porém, nossos resultados não confirmaram aqueles obtidos nos modelos animais ou a hipótese de Hansen e colegas. Acreditamos que, apesar de animais isogênicos serem uma boa ferramenta para estudos nutricionais, não é possível transpor de forma simplista os resultados obtidos experimentalmente, devido a fatores como a falta de variabilidade genética em animais isogênicos (versus a variabilidade genética no homem) e falta de correspondência cronológica entre camundongos e humanos, já que em camundongos, o consumo de glúten por oito semanas corresponderia a um consumo por 6,2 anos em humanos (Dutta; Sengupta, 2016). Além disso estudos sobre efeitos de dietas ou a própria exclusão do glúten em humanos se tornam

desafiadores uma vez que não se garante, como no nosso modelo, uma equipação exata do hábito alimentar antes e durante o estudo. A proposta de substituição da dieta por uma versão habitual sem o glúten, não exclui a diversidade de alimentos que possam ser integrados a nova dieta. Ainda que os alimentos similares a ingestão habitual das voluntárias fosse fornecidos para a substituição exata, já se sabe por diversos estudos publicados o quanto os alimentos sem glúten se diferem em gorduras, proteínas quando comparados as mesmas versões com glúten. (Simon, 2014; Vici *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2015).

Nossos resultados não mostraram alterações significativas na ingestão de calorias ou de macronutrientes entre os períodos de ingestão de bolos glúten ou placebo, ou entre o período experimental e o período pós estudo (dieta habitual) exceto pela maior ingestão proteínas, atribuída ao consumo do bolo com glúten, no respectivo período experimental. Esse fato foi em parte devido à estrutura do estudo, onde as voluntárias foram alertadas a não alterar a rotina alimentar, exceto pela exclusão de alimentos fontes de glúten. Além disso, a diferença pontual com maior consumo de gorduras em relação a fase pós estudo também pode ser justificada pela ausência de uma dieta exata a ser seguida e o fato de restrições como esta promoverem adaptações alimentares adjacentes. Estudos anteriores relativos à avaliação da qualidade de dietas sem glúten sugerem que a adoção de tais dietas causaria impactos desfavoráveis na ingestão de nutrientes (Gaesser; Angadi, 2015; Subhan; Chan, 2016; Vici *et al.*, 2016). As causas de tais mudanças seriam que os produtos comerciais "glúten-free" são mais pobres em fibras e ricos em gordura em comparação aos seus equivalentes com glúten. Em um trabalho desenvolvido por Miranda *et al.* (2014), 58 indivíduos foram submetidos a uma dieta nas versões com glúten e sem glúten, apenas com substituições de produtos equivalentes "gluten-free". Os registros alimentares revelaram um menor consumo de proteínas, fibras e aumento de gorduras totais, principalmente saturada nas dietas com produtos sem glúten. Os autores concluíram que a mudança no padrão alimentar apenas isolando a variável "presença de glúten" não melhora da qualidade da dieta, uma vez que os produtos analisados, continham valor nutricional inferior aos produtos nas versões tradicionais.

Embora a escolha alimentar seja algo cultural e particular, sabe-se que as dietas sem glúten independem do consumo de produtos nas versões sem glúten e esta preferência ocorre muitas vezes pela popularização deste tipo de produto (Gaesser; Angadi, 2012; Rostami *et al.*, 2017). De forma semelhante, ainda que o grupo estudado fosse de pacientes com doença celíaca, (Shepherd; Gibson, 2013) observaram que o maior consumo de produtos

industrializados nas versões sem glúten ou escolhas alimentares equivocadas são as maiores causas das inadequações alimentares de micro e macronutrientes nessas dietas.

Nossos resultados, ao contrário do observado pelos demais autores não mostraram diferenças quantitativas na composição nutricional da dieta. Isso se deve ao fato que nossas voluntárias utilizaram poucos produtos industrializados em versões livre de glúten, sendo as substituições realizadas mais baseadas em produtos naturais como polvilho, mandioca, arroz e batata no lugar dos produtos a base de trigo.

Outro parâmetro que se utiliza para classificar a qualidade nutricional é o índice inflamatório da dieta. Elaborado por Shivappa *et al* (2014) este algoritmo avalia de 20 a 45 parâmetros que podem influenciar nos marcadores inflamatórios considerados para esta ferramenta, capaz de identificar através dos dados de um padrão alimentar relacionado com aumento de citocinas inflamatórias. A relação entre DII e obesidade já foi estudada anteriormente, como nos estudos desenvolvidos por Ramalal *et al.*, (2017) e Cantero *et al* (2017) (Cantero *et al.*, 2018; Ramallal *et al.*, 2017). Esses autores estabeleceram associações de padrões alimentares com o DII e mostraram que a adoção da dieta mediterrânea com menor índice inflamatório, foi associada a melhores desfechos clínicos tanto para o controle da obesidade e comorbidades quanto para menores índices de IMC. Em ambos os trabalhos, a adesão à dieta mediterrânea foi associada com menor DII, já que essa dieta tem como base o consumo de vegetais, frutas, castanhas, legumes, peixes, cereais e gorduras saturadas em maior proporção que as demais dietas.

Na análise das dietas no presente estudo, não observamos diferenças do DII entre os períodos experimentais (glúten e placebo). Os motivos podem ser relacionados ao fato que as dietas foram similares em ambos os períodos, apenas diferindo na ingestão do isolado de glúten. Como essa proteína não faz parte dos 45 itens que compoem o DII, o resultado já poderia ser esperado. Porém, foi possível observar a piora do DII (perfil mais inflamatório) comparando as fases experimentais com o período de dieta habitual (pré e pós estudo). Esses resultados sugeriram que, embora as dietas livres de glúten sejam quantitativamente semelhantes às dietas habituais em termos de macronutrientes, houve uma piora qualitativa advinda da retirada do glúten.

Corroborando nossos dados, diversos trabalhos apontaram para deficiências nutricionais ou piora da qualidade de nutrientes quando se adota a dieta sem glúten sem as devidas substituições por alimentos de bom valor nutricional (Bulka *et al.*, 2017; Saturni; Ferretti;

Bacchetti, 2010). Provavelmente em nossa amostra, a retirada de vários alimentos contendo glúten, sem uma orientação nutricional, ocasionou a piora DII, provavelmente por mudanças na ingestão de micronutrientes, uma vez que não houve diferenças em relação aos macronutrientes durante o período experimental. De forma pioneira, nosso estudo foi o único que promoveu a associação da dieta sem glúten com o índice inflamatório da dieta. Ainda que o glúten não seja parte dos nutrientes considerados no algoritmo, nosso resultado aponta que as dietas isentas de glúten não asseguraram perfil menos inflamatório. Dessa forma, apesar dos possíveis efeitos deletérios do glúten na permeabilidade intestinal, o conjunto de modificações alimentares decorrentes da dieta sem glúten aumentou o potencial inflamatório da alimentação.

Em nosso trabalho, verificamos três citocinas pro-inflamatórias: IL6, TNF e IL1 β a fim de avaliar as possíveis alterações que poderiam ocorrer pela ingestão das 24g diárias de glúten vital. A hipótese de que poderia haver diferenças entre os períodos do uso de glúten ou placebo nessas citocinas teve como base os estudos em modelos animais, nos quais o glúten exacerbou a inflamação presente na obesidade (Soares *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017). Além disso, o papel de controle negativo do glúten no metabolismo poderia estar relacionado à identificação dos seus mais de 50 epítomos com atividades imunomodulatórias, citotóxicas, de alteração da permeabilidade intestinal, entre outras (Fasano, 2011). Porém, a concentração dessas citocinas no final de cada período de intervenção assim como sua variação, comparando o final e início dos períodos de ingestão de glúten ou placebo foram similares. Trabalhos analisando o efeito do glúten nas citocinas inflamatórias em indivíduos saudáveis não celíacos são escassos. Os estudos de Lis *et al* (2013, 2015) avaliaram os possíveis efeitos da restrição de glúten no desempenho de atletas e no o perfil de citocinas. Nos dois estudos os atletas alegaram que a retirada do glúten promoveu melhora do desempenho e redução de sintomas gastrointestinais, comuns em exercícios de alto impacto. Os resultados não mostraram relação entre a exclusão do glúten e alterações no perfil de citocinas pró-inflamatórias. No primeiro estudo houve somente a análise da amostra com questionários para verificação da aderência e possíveis fatores que levaram os atletas a aderirem a dieta sem glúten e os sinais de bem-estar foram autorelatados. Após a comprovação de que não houve diferenças em nenhum parâmetro no estudo posterior, os autores sugeriram que os efeitos benéficos sentidos pelos atletas podem ser justificados por uma provável atenção maior que os mesmos deram a alimentação quando realizaram a restrição de glúten.

No trabalho publicado por Fasano em 2011, a zonulina foi descrita e correlacionada com aumento de permeabilidade intestinal, com base nos diversos experimentos após a identificação dessa proteína (Fasano *et al.*, 2000). Sabe-se que as subunidades não clivadas do glúten, principalmente da gliadina, afetam diretamente a barreira intestinal ao induzir a liberação de zonulina. A ligação de gliadina ao receptor de quimiocinas CXCR3 é capaz de mediar essa ação (Drago *et al.*, 2006; Lammers *et al.*, 2008). Ainda é sabido que o epítipo mais imunodominante da gliadina é o 33-mer, que além de uma conformação estrutural complexa, não sofre hidrólise completa no lúmen intestinal (Gutiérrez *et al.*, 2017). Fragmentos como este poderiam ocasionar em aumento da inflamação, uma vez que estimulam a produção de zonulina e ativam a produção de citocinas pró-inflamatórias. Por sua vez, a zonulina ativa cascata de reações que terminam na desestabilização da montagem natural da barreira intestinal e aumento da permeabilidade intestinal. Dessa forma, acreditamos que, embora possa haver maior inflamação intestinal relacionada a peptídeos do glúten, em nosso estudo as concentrações sanguíneas das citocinas IL6, TNF e IL1 β não se mostraram marcadores eficientes dessa inflamação.

A condição de desestabilização da barreira intestinal decorrente da presença de peptídeos de glúten descrita acima é vista não apenas em pacientes com doença celíaca, mas também foi documentado e relacionado com a obesidade por alguns estudos em humanos onde o aumento de zonulina foi detectado e associado com o agravamento do excesso de peso (Moreno-Navarrete *et al.*, 2012; Zak-Golab *et al.*, 2013). Diversos autores já encontraram alterações relacionadas ao consumo de glúten e a alteração da permeabilidade de barreira intestinal devido aos efeitos diretos da ligação de gliadina (ou seus produtos de degradação) com receptor CXCR3, com indução de liberação de zonulina e piora do perfil inflamatório (Clemente *et al.*, 2003; Drago *et al.*, 2006; Lammers *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2017).

A partir dos achados já documentados na literatura, acredita-se que o principal mediador dos efeitos do glúten tanto na permeabilidade intestinal quanto na inflamação seja a zonulina. Essa proteína, também chamada de pré-haptoglobina 2 (HP2) é codificada pelo gene da haptoglobina (Hp) que possui dois diferentes alelos: hp1 e hp2. Desta forma, a população apresenta três possíveis diferentes genótipos (Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2). Com o objetivo de entender a relação entre a presença do alelo Hp2, caracterizado como alto produtor de zonulina, genotipamos as voluntárias do nosso estudo. Assim, para nosso próximo passo, avaliamos a presença do alelo Hp2, uma vez que este perfil genético poderia acarretar efeitos diferentes relacionados a ingestão dos bolos com glúten. Era nosso propósito medir também a zonulina

no soro por meio de os kits comerciais para a confirmação e possível associação. No entanto, de acordo com a literatura (Ajamian *et al.*, 2019; Scheffler *et al.*, 2018), os kits para dosagem de zonulina não são capazes de detectar a proteína. Assim, até o momento, a genotipagem é a forma mais confiável de detectar a presença de zonulina nos indivíduos (Scheffler *et al.*, 2018).

Por isso, de acordo com a caracterização de nossa amostra, podemos observar que voluntárias homocigotas para o alelo Hp2, relacionado com a maior secreção de zonulina, apresentaram comportamento diferente quando ingerindo bolos com glúten ou sem glúten. Interessantemente, foi possível observar que, na fase de ingestão dos bolos de glúten, apenas aquelas com alelo hp2 reduziram seu metabolismo basal e aumentaram a produção das citocinas inflamatória IL1- β . Esse fato que só ocorreu na presença de glúten, uma vez que no período de ingestão de bolos placebo essas alterações não foram vistas nas voluntárias HP2-2. As voluntárias caracterizadas como Hp1-1, ou seja, sem o alelo Hp2, a presença ou não do glúten não afetou significativamente o metabolismo basal ou variação de citocinas. Foi possível observar, por meio dos dados de associação, que quanto maior a produção de zonulina (sugerida pela presença de um ou dois alelos Hp2) maior o efeito da ingestão do glúten no aumento das concentrações de IL1- β e na redução do metabolismo basal. Essa associação é inédita e acreditamos esclarecer as controvérsias vistas na literatura e em nossos próprios estudos anteriores em modelo experimental quanto aos efeitos do glúten na obesidade e inflamação. Em outros trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório, Soares *et al.*, (2013) mostrou o efeito do uso de glúten em animais com modelo de obesidade e piores desfechos na homeostase glicêmica, resistência a insulina e adipogênese ao submeter animais com obesidade induzida ao uso de glúten ou à isenção do mesmos. Posteriormente, Freire *et al.*, (2016) mostrou o aumento da citocina IL6 e redução da termogênese nos camundongos submetidos à dieta com glúten quando comparados aos que receberam dieta isenta de glúten. Ambos os trabalhos apontaram para regulação distinta de glúten no metabolismo e o mais recente, com acréscimo de vias de regulação envolvidas na termogênese.

Os mecanismos para a redução da termogênese foram foco do estudo de Freire *et al* (2016) que mostraram que camundongos submetidos a dieta com suplementação de glúten apresentaram menor VO₂ e gasto energético em jejum dos que os animais com dieta sem glúten. Esse fato foi associado a menor expressão das proteínas UCP1 e BMP7 envolvidas na regulação da termogênese. Os resultados apontam a favor de uma menor produção de "*browning*" nesses animais. O estudo de Freire *et al.* (2016), sugere os possíveis mecanismos que estariam

associados a menor termogênese vista também em nossas voluntárias com o alelo hp2 nos períodos de ingestão de glúten (período com bolo glúten e pós-estudo).

Um estudo em humanos de Hansen *et al.* (2018) comparando dieta pobre (2g/dia) ou rica (18g/dia) em glúten, detectou perda de peso exclusiva no período de dieta pobre em glúten. Embora os voluntários não tenham sido genotipados para haptoglobina, os autores sugerem que possa ter havido uma regulação negativa na termogênese associada a alterações na microbiota intestinal. Com isso sugerem uma possível relação entre esses achados e papel de microbiota colônica na indução de browning. Embora por vias diferentes, vale a pena ressaltar este estudo em humanos devido a escassez destes trabalhos para que se observe que a microbiota e outras vertentes de raciocínio podem ser usadas para comparar os indivíduos e os supostos efeitos de glúten ou sua restrição no metabolismo humano. Nosso trabalho teve um foco o estudo do papel da zonulina e a categorização de indivíduos com cada genótipo, embora efeitos como mudanças na microbiota não podem ser excluídos como um mecanismo associado aos efeitos do glúten (ou de sua isenção) na dieta em humanos.

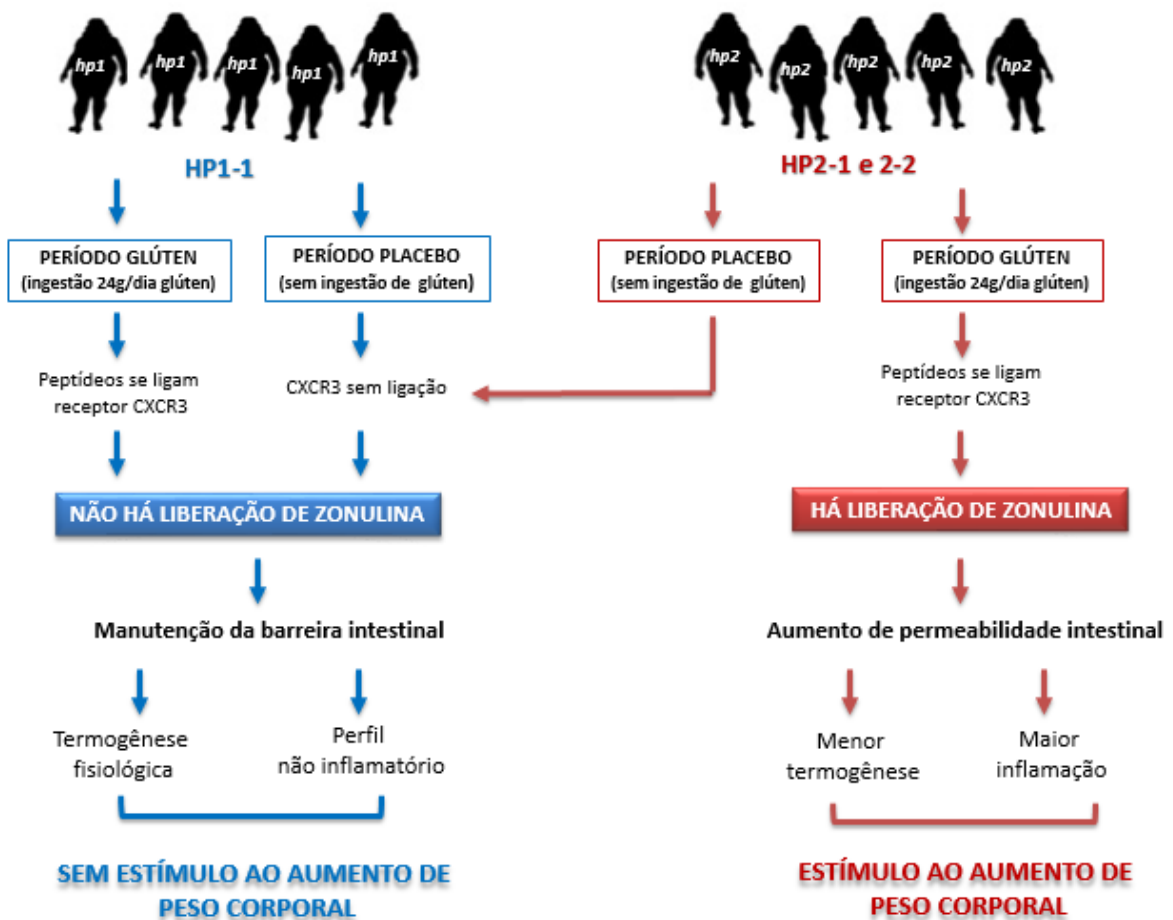
Estudos apontam para um mecanismo mais complexo com animais secretores de zonulina geneticamente modificados onde se observa-se um amplo espectro de atuação de zonulina na alteração da montagem da barreira intestinal, sua influência na microbiota intestinal e mecanismos imunológicos envolvidos nas doenças crônicas inflamatórias. Estes achados servem para nortear que embora as respostas de camundongos selvagens quando comparadas aos transgênicos para zonulina possuem menor impacto, o papel de zonulina na alteração da barreira e inflamação tem grande importância (Sturgeon; Lan; Fasano, 2017).

A identificação de pré-haptoglobina 2 como zonulina nos experimentos que combinaram técnicas de mensuração da permeabilidade intestinal com os anticorpos anti-Zot deram origem a descoberta desta proteína e possibilitaram uma compreensão mais específica para a associação em humanos, embora a detecção no soro ainda não seja precisa. Assim, a semelhança entre os resultados de nossos estudos animais com os vistos apenas em voluntárias Hp2 se deve ao fato de que o impacto maior é visto do indivíduo que apresenta o alelo Hp2. Porém, os estudos de Freire *et al.* (2016) e Soares *et al.* (2013) mostraram aumento de peso nos animais que se alimentavam com glúten. O mecanismo básico seria que, com a diminuição da termogênese e aumento da permeabilidade intestinal induzidos pela zonulina, criaria-se um ambiente favorável ao balanço energético positivo e à inflamação de baixo grau, característicos da obesidade. Porém, nas voluntárias do nosso estudo, portadoras do alelo Hp2 (que

apresentaram menor TMB), não observamos ganho de peso maior no período de ingestão de glúten comparado ao período placebo. Isto se deve ao fato de que os estudos recentes ligados ao papel de maior liberação de zonulina, propõem mecanismos inflamatórios vistos em outras condições de doenças, translocação bacteriana secundário ao aumento de permeabilidade em doença arterial coronariana (Li *et al.*, 2016) embora não tenham associação direta com a obesidade nem mesmo um mecanismo que justifique o aumento do peso em humanos (Sturgeon; Fasano, 2016). Além disso, o tempo experimental no presente estudo (4 semanas) comparado às 8 semanas nos estudos animais, não foi suficiente para causar modificações significativas no peso. Apenas um acompanhamento à longo prazo seria capaz de promover a possibilidade de se observar se uma menor TMB levaria a um ganho de peso.

Nossa hipótese está resumida na figura 11.

Figura 11 - Hipótese resumida do estudo



8 CONCLUSÃO

Observamos que a retirada do glúten na dieta por oito semanas não foi capaz de promover grandes alterações no peso e composição corporal, termogênese ou consumo de nutrientes. Embora algumas alterações de macronutrientes possam ser detectadas, as mesmas não apresentaram relações diretas com consumo de glúten. Entretanto, considerando o potencial inflamatório da dieta, as modificações alimentares advindas da retirada de glúten causaram o aumento do índice inflamatório da dieta em comparação aos períodos de dieta livre (pós-estudo).

Entretanto, o genótipo em relação à haptoglobina 2 (zonulina) foi determinante em relação aos efeitos do glúten, uma vez que apenas aquelas portadoras do alelo hp2 a ingestão de glúten foi associada ao aumento de citocinas inflamatórias (principalmente IL6) e redução da termogênese, fatores importantes na patogênese da obesidade.

Assim, nosso estudo é o primeiro a mostrar em ensaio clínico controlado que a isenção de glúten na população geral não melhora a qualidade da dieta nem leva a perda de peso a curto prazo (8 semanas). Também somos os primeiros a identificar grupos de risco (portadores do alelo hp2) aos efeitos metabólicos do glúten em indivíduos não celíacos, nos quais a presença de glúten na dieta poderia aumentar a susceptibilidade ao ganho de peso e inflamação.

REFERÊNCIAS

AJAMIAN, M. *et al.* Serum zonulin as a marker of intestinal mucosal barrier function: May not be what it seems. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2019.

BIESIEKIERSKI, J. R. What is gluten? **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 32, p. 78–81, 2017.

BIESIEKIERSKI, J. R.; MUIR, J. G.; GIBSON, P. R. Is Gluten a Cause of Gastrointestinal Symptoms in People Without Celiac Disease ? **Current allergy and asthma reports**. p. 631–638, 2013.

BULKA, C. M. *et al.* The Unintended Consequences of a Gluten-Free Diet. **Epidemiology**, p. 1, 2017.

CANI, P. D. *et al.* Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. **Gut**, v. 58, n. 8, p. 1091–1103, 2009.

CANTERO, I. *et al.* Dietary Inflammatory Index and liver status in subjects with different adiposity levels within the PREDIMED trial. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 5, p. 1736–1743, 2018.

CLEMENTE, M. G. *et al.* Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. **Gut**, v. 52, n. 2, p. 218–23, 2003.

DRAGO, S. *et al.* Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 41, n. 4, p. 408–419, 2006.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life Sciences**, v. 152, p. 244–248, 2016.

EMILSSON, L.; SEMRAD, C. E. Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiac Risk Factors: Going Gluten-Free, for Better or Worse? **Digestive Diseases and Sciences**, p. 1–2, 2017.

ESLAMPARAST, T.; TANDON, P.; RAMAN, M. Dietary composition independent of weight loss in the management of non-alcoholic fatty liver disease. **Nutrients**, v. 9, n. 8,

2017.

EVERARD, A.; CANI, P. D. Diabetes, obesity and gut microbiota. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, n. 1, p. 73–83, 2013.

FASANO, A. *et al.* Zonulin , a newly discovered modulator of intestinal permeability , and its expression in coeliac disease Detection of human herpes virus 6 DNA in fetal hydrops. **Lancet**. v. 355, p. 1518–1519, 2000.

FASANO, A. Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 1, p. 151–175, 2011.

FREIRE, R. H. *et al.* Wheat gluten intake increases weight gain and adiposity associated with reduced thermogenesis and energy expenditure in an animal model of obesity. **International Journal of Obesity**, v. 40, n. 3, p. 479–486, 2016.

GAESSER, G. A.; ANGADI, S. S. Gluten-free diet: Imprudent dietary advice for the general population? **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 9, p. 1330–1333, 2012.

GAESSER, G. A.; ANGADI, S. S. Navigating the gluten-free boom. **Journal of the American Academy of Physician Assistants**, v. 28, n. 8, p. 1–7, 2015.

GLORIA-BOTTINI, F. *et al.* Genetic polymorphism and idiopathic generalized epilepsy. Evidence of interaction between haptoglobin and ACP1 systems. **Neuropediatrics**, v. 39, n. 6, p. 357–358, 2008.

GUTIÉRREZ, S. *et al.* The human digestive tract has proteases capable of gluten hydrolysis. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 7, p. 693–702, 2017.

HANSEN, L. B. S. *et al.* A low-gluten diet induces changes in the intestinal microbiome of healthy Danish adults. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

HARPER, L.; BOLD, J. An exploration into the motivation for gluten avoidance in the absence of coeliac disease. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 11, n. 3, p. 259–268, 2018.

HOLLON, J. *et al.* Effect of gliadin on permeability of intestinal biopsy explants from celiac disease patients and patients with Non-Celiac gluten sensitivity. **Nutrients**, v. 7, n. 3, p. 1565–1576, 2015.

HOPPE, C. *et al.* Intake and sources of gluten in 20- to 75-year-old Danish adults: a national dietary survey. **European Journal of Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 107–117, 2017.

KIM, H. *et al.* Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Risk in Gluten-Free Followers Without Celiac Disease in the United States: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2009–2014. **Digestive Diseases and Sciences**, v.62, n.9, p. 2440–2448, 2017.

KONG, L. C. *et al.* Dietary patterns differently associate with inflammation and gut microbiota in overweight and obese subjects. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

LAMMERS, K. M. *et al.* Gliadin Induces an Increase in Intestinal Permeability and Zonulin Release by Binding to the Chemokine Receptor CXCR3. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, p. 194–204, 2008.

LEONARD, M. M. *et al.* Celiac disease genomic, environmental, microbiome, and metabolomic (CDGEMM) study design: Approach to the future of personalized prevention of celiac disease. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9325–9336, 2015.

LI, C. *et al.* Zonulin Regulates Intestinal Permeability and Facilitates Enteric Bacteria Permeation in Coronary Artery Disease. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–10, 2016.

LIS, D. *et al.* Athletes and gluten-free diets: Exploring the popularity, experiences and beliefs of this diet in non-coeliac athletes. **Journal of Science and Medicine in Sport**, v. 16, p. e66--e67, 2013.

LIS, D. *et al.* No Effects of a Short-Term Gluten-free Diet on Performance in Nonceliac Athletes. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 47, n. 12, p. 2563–2570, 2015.

LUMENG, C. N. *et al.* Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization Find the latest version : Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175–184, 2007.

MARCASON, W. Is there evidence to support the claim that a gluten-free diet should be used for weight loss? **Journal of the American Dietetic Association**, v. 111, n. 11, p. 1786, 2011.

MCCOMMIS, K. S.; FINCK, B. N. Treating Hepatic Steatosis and Fibrosis by Modulating Mitochondrial Pyruvate Metabolism. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, v. 7, n. 2, p. 275–284, 2019.

MORENO-NAVARRETE, J. M. *et al.* Circulating zonulin, a marker of intestinal permeability, is increased in association with obesity-associated insulin resistance. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

MÖRKEL, S. *et al.* Gut microbiota, dietary intakes and intestinal permeability reflected by serum zonulin in women. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 8, p. 2985–2997, 2018.

MUSSO, G. *et al.* Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology**, v. 37, n. 4, p. 909–916, 2003.

NEWBERRY, C. *et al.* Going Gluten Free : the History and Nutritional Implications of Today' s Most Popular Diet. **Current gastroenterology reports**, v.19, n.11, p.54. 2017.

NORWOOD, R. *et al.* The psychological characteristics of people consuming vegetarian, vegan, paleo, gluten free and weight loss dietary patterns. **Obesity Science & Practice**, v. 5, n. 2, p. 148–158, 2019.

PEARLMAN, M.; CASEY, L. Who Should Be Gluten-Free? A Review for the General Practitioner. **Medical Clinics of North America**, v. 103, n. 1, p. 89–99, 2019.

PINHEIRO VOLP, A C. *et al.* Energy expenditure: components and evaluation methods. **Nutricion hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral**, v. 26, n. 3, p. 430–440, 2011.

RAEHSLER, S. L. *et al.* Accumulation of Heavy Metals in People on a Gluten-Free Diet. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, n. July, p. 1–8, 2017.

RAMALLAL, R. *et al.* Inflammatory potential of diet, weight gain, and incidence of overweight/obesity: The SUN cohort. **Obesity**, v. 25, n. 6, p. 997–1005, 2017.

REILLY, S. M.; SALTIEL, A. R. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation.

Nature Reviews Endocrinology, v. 13, n. 11, p. 633–643, 2017.

RHEINHEIMER, J. *et al.* Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 74, p. 1–9, 2017.

ROCCHETTI, G. *et al.* Evaluation of phenolic profile and antioxidant capacity in gluten-free flours. **Food Chemistry**, v. 228, p. 367–373, 2017.

ROSTAMI, K. *et al.* Gluten-free diet indications, safety, quality, labels, and challenges. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 10–14, 2017.

SAPONE, A. *et al.* Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. **BMC Medicine**, v. 10, n. 1, p. 13, 2012.

SATURNI, L.; FERRETTI, G.; BACCHETTI, T. The Gluten-Free Diet: Safety and Nutritional Quality. **Nutrients**, v.2, n.1, p. 16–34, 2010.

SCHEFFLER, L. *et al.* Widely used commercial ELISA does not detect precursor of haptoglobin2, but recognizes properdin as a potential second member of the zonulin family. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. FEB, p. 1–11, 2018.

SHEPHERD, S. J.; GIBSON, P. R. Nutritional inadequacies of the gluten-free diet in both recently-diagnosed and long-term patients with coeliac disease. **Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association**, v.26, n.4, p.349–358, 2013.

SHEWRY, P. R. *et al.* The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. **Journal of Cereal Science**, v. 4, n. 2, p. 97–106, 1986.

SHEWRY, P. R. *et al.* The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 357, n. 1418, p. 133–142, 2002.

SHIVAPPA N, STECK SE, HURLEY TG, HUSSEY JR, H. J. Dietary Inflammatory Index. **Public Health Nutrition**, v. 17, n. 8, p. 1689–1696, 2014.

SIMON, E. Nutritional Differences Between a Gluten-free Diet and a Diet Containing Equivalent Products with Gluten. **Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v.69, n.2, p. 182–187, 2014.

SOARES, F. L. P. *et al.* Gluten-free diet reduces adiposity, inflammation and insulin resistance associated with the induction of PPAR-alpha and PPAR-gamma expression. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1105–1111, 2013.

STOLARCZYK, E. Adipose tissue inflammation in obesity: a metabolic or immune response? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 37, p. 35–40, 2017.

STURGEON, C.; FASANO, A. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. **Tissue Barriers**, v. 4, n. 4, p. 1–19, 2016.

STURGEON, C.; LAN, J.; FASANO, A. Zonulin transgenic mice show altered gut permeability and increased morbidity/mortality in the DSS colitis model. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1397, n. 1, p. 130–142, 2017.

SUBHAN, F. B.; CHAN, C. B. Review of Dietary Practices of the 21st Century: Facts and Fallacies. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 348–354, 2016.

TRIPATHI, A. *et al.* Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as preheptoglobin-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 39, p. 16799–16804, 2009.

VANDANMAGSAR, B. *et al.* Obesity induced autoinflammation. **Insulin**, v. 17, n. 2, p. 179–188, 2011.

VICI, G. *et al.* Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. **Clinical Nutrition**, v. 35, n. 6, p. 1236–1241, 2016.

VILLAFUERTE-GALVEZ, J. *et al.* Factors governing long-term adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 42, n. 6, p. 753–760, 2015.

WATSON, J. Five Reasons to Avoid Going Gluten-Free (If You Don' t Have Celiac Disease). **Medscape**, 2018, 2018. Disponível em :
<https://www.medscape.com/viewarticle/892520?form=fpf>

- WEHMEYER, M. H. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease is associated with excessive calorie intake rather than a distinctive dietary pattern. **Medicine (United States)**, v. 95, n. 23, 2016.
- WEISBERG, S. P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue Find the latest version : Obesity is associated with. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.
- WESTERTERP, K. R. Control of energy expenditure in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 340–344, 2017.
- WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 115–119, 2007.
- WU, J. H. Y. *et al.* Are gluten-free foods healthier than non-gluten-free foods? An evaluation of supermarket products in Australia. **British Journal of Nutrition**, v. 114, n. 03, p. 448–454, 2015.
- ZAK-GOLAB, A. *et al.* Zonulin Concentration in Obese and Normal Weight Subjects. **International Journal of Endocrinology**, v. 2013, p. 1–9, 2013.
- ZHANG, L. *et al.* Effects of Gliadin consumption on the Intestinal Microbiota and Metabolic Homeostasis in Mice Fed a High-fat Diet. **Scientific Reports**, v. 7, n. November 2016, p. 44613, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Receitas

BOLO DE MILHO PLACEBO	BOLO DE MILHO GLÚTEN
<p>(Rendimento 19 unidades)</p> <p>3 ovos</p> <p>100 ml de óleo</p> <p>250g de fubá</p> <p>300 ml de leite</p> <p>160 g de açúcar</p> <p>1 lata de milho verde (200g)</p> <p>Pitada de sal</p> <p>1 colher de sopa rasa de fermento</p> <p>Modo de preparo</p> <p>No liquidificador, acrescente os ovos, milho, óleo, leite, açúcar e bata tudo. Depois em outra vasilha acrescente o fubá, bata na batedeira ou com fuê</p> <p>Acrescentar por último uma colher rasa de fermento.</p> <p>Levar ao forno 40 min.</p>	<p>(Rendimento 19 unidades)</p> <p>3 ovos</p> <p>100 ml de óleo</p> <p>25g de fubá</p> <p>300 ml de leite</p> <p>160 g de açúcar</p> <p>1 lata de milho verde (200g)</p> <p>228g de glúten</p> <p>Pitada de sal</p> <p>½ colher de sopa rasa de fermento</p> <p>Modo de preparo</p> <p>No liquidificador, acrescente os ovos, milho, óleo, açúcar e metade do leite e bater. Depois acrescente metade do glúten e bata. Passe essa mistura para a batedeira e acrescente o restante do leite, com a batedeira ligada vá acrescentando o restante do glúten.</p> <p>Acrescentar por último ½ colher de sopa de fermento.</p>

APÊNDICE B - Fichas técnicas - placebo

Ingredientes	Peso Bruto (g)	Peso Líquido (g)	IPC = FC	Per capita bruto (g)	Per capita líquido (g)	Medida Caseira
Ovos	193,72	144	1,16	10,19	7,57	3 Unidades
Óleo	100	100	1	5,26	5,26	2/3 xícara de chá
Fubá	250	60	1	13,15	13,15	½ xícara de chá
Milho	200	200	1	10,52	10,52	1 lata
Açúcar	160	160	1	8,42	8,42	1 xícara de chá rasa
Leite	300	300	1	15,78	15,78	1 ½ xícara de chá cheia
Sal	qsp	-	-	-	-	-
Total	1241,72	1192		63,32	60,7	-

APÊNDICE C - Ficha técnica – Glúten

Ingredientes	Peso Bruto (g)	Peso Líquido (g)	IPC = FC	Per capita bruto (g)	Per capita líquido (g)	Medida Caseira
Ovos	193,72	144	1,16	10,19	7,57	4 Unidades
Óleo	100	100	1	5,26	5,26	2/3 xícara de chá
Fubá	25	25	1,31	1,31	1,31	½ xícara de chá
Milho	200	200	1	10,52	10,52	1 lata
Açúcar	160	160	1	8,42	8,42	1 xícara de chá rasa
Leite	300	300	1	15,78	15,78	1 ½ xícara de chá cheia
Sal	qsp	-	-	-	12	-
Gluten vital Granotec	228	228	1	12	-	-
Total	1241,72	1192		63,32	60,86	-

APÊNDICE D - Modelo de caderno entregue para cada etapa de registro alimentar

<h1 style="margin: 0;">DIÁRIO ALIMENTAR</h1> <h2 style="margin: 0;">__ ETAPA</h2> <p style="margin: 0;">Grupo de Estudos do Metabolismo do Glúten</p> <hr style="width: 20%; margin: 0 auto;"/>

	DATA: _____ NOME: _____	
DESJEJUM	ALIMENTO	QUANTIDADE[gr/ml/medida caseira].
Horário: Típico [] Atípico []		
COLAÇÃO		
Horário: Típico [] Atípico []		
ALMOÇO		
Horário: Típico [] Atípico []		
LANCHE DA TARDE		
(Horário: Típico [] Atípico []		
JANTAR		
Horário: Típico [] Atípico []		
CEIA		
Horário: Típico [] Atípico []		

	DATA: _____ NOME: _____	
DESJEJUM	ALIMENTO	QUANTIDADE[gr/ml/medida caseira].
Horário: Típico [] Atípico []		
COLAÇÃO		
Horário: Típico [] Atípico []		
ALMOÇO		
Horário: Típico [] Atípico []		
LANCHE DA TARDE		
(Horário: Típico [] Atípico []		
JANTAR		
Horário: Típico [] Atípico []		
CEIA		
Horário: Típico [] Atípico []		

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação pelos Comitês de ética



Title: Effect of gluten free diet on inflammation and intestinal permeability

Sponsor Name: SUNDRY

PI Name: Fasano, Alessio

Protocol #: 2016P002748

Type: New Protocol

Date Received:

Study Staff

Name	Role	Degree	Organization	Citi Certified
Camhi, Stephanie	Regulatory Coordinator/Manager	BS	MGH > Pediatric Service > Mucosal Immunology	9/24/2014
Fasano, Alessio	Principal Investigator	MD	MGH > Pediatric Service > Pediatric GI/Nutrition	9/8/2015
Freire, Rachel	Research Assistant	Ph.D	MGH > Pediatric Service > Mucosal Immunology	12/6/2016
Sturgeon, Craig	Research Assistant		MGH > Pediatric Service > Mucosal Immunology	2/5/2016

Signatures

PI Name: Fasano, Alessio, MD

Authenticated: December 08, 2016

Sponsor Funding: SUNDRY

Select the source of funding that will be used to support the proposed research:

- Government / Foundation / Other Non-Profit
- Corporate
- Institutional Award
- Department Funds
- None

Enter department name:

Pediatric GI/Nutrition 14NA-MGH

Enter Peoplesoft fund # (if known):

222045

Is there a research fund, gift or sundry account supporting this study?

- Yes
- No

InfoEd proposal number (read-only field):

Electronic IRB Submission Generated On December 09, 2016

Page 1 of 7

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido para pesquisa**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA**

Prezado(a) Senhor(a):

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo título é: EFEITO DE UMA DIETA ISENTA DE GLÚTEN NOS DADOS ANTROPOMÉTRICOS E NO ESTADO NUTRICIONAL DE INDIVÍDUOS NÃO CELÍACOS. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pelo estudo para esclarecê-los. O objetivo do estudo é de observar os efeitos da exclusão do glúten de trigo em dietas balanceadas em indivíduos não celíacos.

Procedimento: Após entender e concordar em participar, você será submetido a uma entrevista para avaliar se você encaixa nos critérios de inclusão do estudo. No primeiro momento será aplicado um questionário de frequência alimentar bem pedido um registro de sua alimentação durante 72 horas, com o objetivo de avaliar o consumo médio de alimentos e a média de ingestão diária de glúten. Caso você seja incluída no estudo, você será chamada para a nova fase, sendo convidada a comparecer ao local da pesquisa em jejum de 12h para coleta de sangue e realização dos exames de calorimetria indireta (que irá medir o seu gasto calórico) e bioimpedância (irá medir o percentual de gordura corporal e massa magra). A partir daí você será orientada a fazer uma dieta sem glúten e ingerir bolinhos de milho confeccionados na cozinha dietética da Escola de Nutrição da UFMG e que poderão conter glúten (GLU) ou não por 8 semanas. Após as 4 semanas iniciais, os exames feitos no início do estudo serão repetidos e prosequiremos então para uma nova etapa de outras 4 semanas no mesmo perfil. Depois disso, você finalizará as 8 semanas e fará os últimos exames semelhantes ao início do experimento imediatamente após o último dia.

Riscos ou desconfortos: A retirada de sangue será realizada por um profissional capacitado, no entanto, como todo procedimento de coleta sanguínea, poderá ocorrer um pequeno desconforto passageiro e dor na hora em que a agulha perfura a pele. Raramente ocorrem manchas roxas no local da picada da agulha causada por uma pequena quantidade de sangue que extravasa da veia.

Não há riscos de deficiência relacionadas à falta de glúten na dieta. Não há relatos de efeitos colaterais que conhecidos até o momento.

Benefícios esperados: Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício. Porém, os resultados obtidos com este estudo poderão ajudar com a busca de tratamentos dietéticos que auxiliem no tratamento da obesidade ou redução da velocidade de ganho de peso.

Confidencialidade: Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, garantido assim o sigilo, porém os resultados da pesquisa serão utilizados em

trabalhos científicos publicados ou apresentados oralmente em congressos e palestras sem revelar sua identidade.

Participação Voluntária/Compensação: Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser. Por isso, você não receberá remuneração por sua participação.

Desligamento: Você deve ter ciência de que a qualquer momento pode retirar o seu consentimento de participação, sem que isso implique em perda de direitos pré-existentes ou prejuízo no relacionamento profissional, pessoal e no tratamento de sua doença.

Contato em Caso de Dúvida: Os pesquisadores responderão a quaisquer perguntas ou esclarecimentos que você tenha ou possa ter quanto aos objetivos, procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com pesquisa. Para mais esclarecimentos, por favor, entre em contato com a Nutricionista Rachel Bacha pelo telefone (031) 3409-2629 ou com Dra. Jacqueline Alvarez Leite pelo telefone (031) 3409-2652. Email para contato: gemeq.ufmg@gmail.com e rachelbacha.s@gmail.com . Caso tenha dúvidas sobre o aspecto ético ou o andamento da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em pesquisa da UFMG que a aprovou no endereço: Avenida Antônio Carlos, nº6627, Unidade administrativa II, 2º andar, sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte/MG, telefone (31) 34094592, email: coep@prpq.ufmg.br.

Consentimento: Confirmando que li e que fui devidamente esclarecido sobre os propósitos e os procedimentos desse estudo e voluntariamente aceito participar, até que eu decida o contrário.

Eu, _____, concordo em participar do estudo.

Data ____/____/____

Assinatura do voluntário

Nut. Rachel Bacha Silva

Dra Jacqueline I. Alvarez Leite