

Rachel Horta Freire

**EFEITOS METABÓLICOS E
INFLAMATÓRIOS DO GLÚTEN DE TRIGO:
papel da proteína na obesidade**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2015

Rachel Horta Freire

**EFEITOS METABÓLICOS E
INFLAMATÓRIOS DO GLÚTEN DE TRIGO:
papel da proteína na obesidade**

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 Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Co-orientadora: Dra. Luciana Rodrigues Fernandes Meyer

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2015

Dedico este trabalho à minha família,
almas especiais eternamente presentes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, força maior de qualquer conquista.

Agradeço também à minha família, almas especiais a quem devo simplesmente tudo. Papai, mamãe e Nina, muito obrigada pelo amor incondicional, pela paciência, pelo suporte nas horas mais difíceis. Sem vocês, nada seria possível.

Aos meus avós, tios, tias, primos, primas... Agradeço de coração o jeitinho especial de cada um ficar na torcida.

Ao Matheus pelo companheirismo, paciência e amor.

Às minhas amigas e aos meus amigos que cativei ao longo da vida. Impossível seria citar aqui todos os nomes, mas agradeço imensamente à compreensão pela ausência, ao carinho e à eterna amizade.

A todos os professores que contribuíram com a minha formação acadêmica.

Às agências financiadores CNPq, CAPES e FAPEMIG.

A todos os colegas do LABiN pela ajuda nos experimentos e valiosas discussões. Em especial agradeço a Lilian Teixeira e o Edenil Aguilar pela disponibilidade em todas as horas.

Aos colegas dos outros laboratórios pelas centrífugas, equipamentos, materiais e reagentes emprestados nos preciosos momentos. Em especial aos técnicos Eneida, Jamil e Juliano pelo suporte. À Poli pelo bom-humor contagiante.

À técnica e amiga Maria Helena Alves. Muito obrigada pelo seu cuidado com o biotério e com os nossos animais. Parabéns pela sua competência e agradeço pelo carinho.

Aos alunos de iniciação científica Laís Araújo, Victor Oliveira e Bruna Laignier pelo auxílio. Sendo este agradecimento especial à Bruna, por ter se tornado uma querida amiga.

Aos colaboradores desse projeto Raquel Araújo, João Marcus Andrade e Paulo Lima e seus professores Dr. Valbert Cardoso, Dr. Sérgio Santos e Dr. Cândido Coimbra. Obrigada pelo tempo dedicado e pela disponibilidade. Foram, certamente, resultados valiosos, enriquecedores e indispensáveis. Em especial à Raquel por quem tenho enorme carinho.

À amiga Rachel Bacha. Obrigada por ter sido colaboradora do projeto e companheira de congresso, de crossfit, de festas. Você foi grande amiga dentro do LABiN e continuará sendo muito querida fora dele.

À grande amiga Luciana Meyer. Não me esqueço do seu retorno ao LABiN com a proposta de trabalharmos no mesmo projeto. Além da grande pesquisadora que eu já conhecia, foi uma alegre surpresa descobrir em você uma grande pessoa. Obrigada pela enorme contribuição ao trabalho e pelos anos de convivência dentro e fora do laboratório.

Por último, mas um dos mais importantes agradecimentos que quero deixar aqui: à minha orientadora Jacque. Desde o início da graduação eu já havia decidido que queria seguir a minha carreira me dedicando a lecionar bioquímica. Treze anos se passaram e hoje eu realizo esse sonho que não seria possível sem o seu apoio. Obrigada por confiar em mim e me receber em seu laboratório. Obrigada pela dedicação, competência, valiosos ensinamentos e por ter sido orientadora, médica, mãe, amiga. Grandes profissionais como você, tornam-se eternos exemplos.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, meu eterno muito obrigada!

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”

Cora Coralina

E se me permitido for adicionar palavras às de Cora Coralina, eu diria que decido nunca desistir dos meus sonhos...

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Glúten: definição e estrutura.....	19
2.2 Desordens relacionadas ao glúten.....	21
<i>Doença celíaca, alergia ao trigo e sensibilidade ao glúten não-celíaca</i>	21
2.3 Evidências científicas dos possíveis benefícios da exclusão do glúten em outras doenças	23
<i>Dermatite herpetiforme</i>	23
<i>Desordens neurológicas: esclerose múltipla e autismo</i>	23
<i>Diabetes tipo 1</i>	24
<i>Artrite reumatoide</i>	25
2.4 Consequências nutricionais das dietas isentas de glúten	26
2.5 O papel imunogênico do glúten	27
<i>Glúten e aumento da permeabilidade intestinal</i>	27
2.6 O papel do glúten na obesidade	30
2.7 Os diferentes tipos de tecido adiposo	33
2.8 Adipócitos beges e o processo de <i>browning</i>	35
2.9 Os componentes do gasto energético.....	37
<i>Métodos de avaliação do gasto energético</i>	39
3. JUSTIFICATIVA.....	40
4. HIPÓTESES.....	41
5. OBJETIVOS.....	42
6. MATERIAIS E MÉTODOS	43
6.1 Animais e dietas.....	43
<i>Desenho experimental</i>	45
6.2 Absorção intestinal e cinética da biodistribuição do glúten de trigo	47

<i>Radiomarcção do glúten de trigo com tecnécio $^{99m}\text{Tc-GLU}$</i>	47
<i>Determinação do rendimento e qualidade da radiomarcção in vitro e in vivo</i>	47
<i>Estudo da absorção intestinal e cinética da biodistribuição do glúten de trigo</i>	48
6.3 Experimentos <i>in vivo</i>	50
<i>Avaliação do perfil lipídico e glicemia</i>	50
<i>Consumo de oxigênio e estimativa do gasto energético</i>	51
<i>Análise da expressão gênica</i>	52
6.4 Experimentos <i>in vitro</i>	55
<i>Desenho experimental, extração e isolamento dos adipócitos</i>	55
<i>Análise da expressão gênica dos adipócitos isolados</i>	56
6.5 Análise estatística	58
6.6 Questões éticas	58
7. RESULTADOS	59
7.1 Absorção intestinal e cinética da biodistribuição do glúten de trigo radiomarcado com tecnécio ($^{99m}\text{Tc-GLU}$).....	59
<i>Rendimento de radiomarcção e estabilidade da ligação $^{99m}\text{Tc-GLU}$</i>	59
<i>Absorção intestinal e biodistribuição do glúten de trigo</i>	60
7.2 Experimentos <i>in vivo</i>	64
<i>Ingestão alimentar e ganho de peso</i>	64
<i>Perfil lipídico e glicemia</i>	66
<i>Consumo de oxigênio e estimativa do gasto energético</i>	66
<i>Termogênese e ‘browning’</i>	69
7.3 Experimentos <i>in vitro</i>	72
7.4 Hipótese final.....	74
8. DISCUSSÃO.....	75
9. CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO A: Artigo aceito para publicação.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição energética (% do valor calórico total) e densidade calórica das dietas AIN-93M, AIN-93M+ Glúten, DIO e DIO + Glúten.....	43
Tabela 2: Composição das dietas AIN-93M e AIN-93M acrescida de 4,5% de glúten de trigo	44
Tabela 3: Composição das dietas DIO e DIO acrescida de 4,5% de glúten de trigo	44
Tabela 4: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR no tecido adiposo marrom e tecido adiposo subcutâneo	54
Tabela 5: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para a qPCR nos adipócitos isolados do TAV.....	57
Tabela 6: Biodistribuição do glúten radiomarcado com tecnécio ($^{99m}\text{Tc-GLU}$) nos tecidos corporais 30min, 1h e 2h após gavagem	62
Tabela 7: Glicemia e perfil lipídico sérico (colesterol total, HDL-colesterol e triacilglicerol)	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Motivos de gliadina com atividade citotóxica, imunomodulatória e de alterações de permeabilidade intestinal.....	20
Figura 2: Mecanismos de liberação da zonulina, aumento de permeabilidade intestinal e indução de resposta inflamatória provocados por fragmentos de gliadina	29
Figura 3: Proposta dos efeitos da dieta isenta ou não de glúten de trigo no metabolismo do tecido adiposo branco.....	32
Figura 4: Fenótipos dos três diferentes tecidos adiposos.....	34
Figura 5: Perspectiva termodinâmica do gasto energético	39
Figura 6: Desenho experimental	46
Figura 7: Desenho experimental e etapas do isolamento de adipócitos do TAV para análise da expressão gênica.....	56
Figura 8: Imagens cintilográficas <i>in vivo</i> obtidas em gama câmara	60
Figura 9: Imagens cintilográficas do trato gastrointestinal obtidas em gama câmara	61
Figura 10: Cinética de absorção do ^{99m} Tc-GLU e cálculo da área sob a curva para sangue, fígado e tecido adiposo visceral	63
Figura 11: Ingestão calórica (kcal/animal/dia)	64
Figura 12: Evolução ponderal, ganho de peso, tecido adiposo visceral (TAV) e tecido adiposo subcutâneo (TAS)	65
Figura 13: Consumo de oxigênio (VO ₂), gasto energético médio (GE) e quociente respiratório (QR) avaliados por calorimetria indireta no estado alimentado	67
Figura 14: Consumo de oxigênio (VO ₂), gasto energético médio (GE) e quociente respiratório (QR) avaliados por calorimetria indireta após jejum <i>overnight</i>	68
Figura 15: Expressão de proteínas relacionadas à termogênese no tecido adiposo marrom (interescapular).....	70
Figura 16: Expressão de proteínas relacionadas à termogênese e ao ‘browning’ no tecido adiposo subcutâneo (inguinal).....	71
Figura 17: Influência da ingestão de glúten sobre a modulação da expressão gênica de adipócitos brancos: moléculas relacionadas à inflamação	72

Figura 18: Influência da ingestão de glúten sobre a modulação da expressão gênica de adipócitos brancos: moléculas relacionadas ao metabolismo lipídico 73

Figura 19: Hipóteses sobre os mecanismos obesogênicos do glúten de trigo 74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^{99m}\text{Tc-GLU}$	Glúten radiomarcado com tecnécio
$^{99m}\text{TcO}_2$	Tecnécio hidrolisado
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	Tecnécio livre
ANOVA	Análise de variância
BMP7	Proteína morfogenética óssea 7
CEBIO	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CPT1	Carnitina-palmitoil transferase 1
DC	Doença celíaca
DMEM	<i>Meio</i> de cultura Eagle Modificado por Dulbecco
DIO	Dieta hiperlipídica indutora de obesidade
Eut	Grupo Eutrófico
EutG	Grupo Eutrófico + Glúten
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GE	Gasto energético
GLP1	Peptídeo semelhante ao glucagon
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HLA	Antígenos leucocitários humanos
IFN	Inteferon
IL	Interleucina
IMC	Índice de Massa Corporal
IPEN/CNEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Comissão Nacional de Energia Nuclear
LABiN	Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LHS	Lipase hormônio-sensível
LPL	Lipase lipoproteica
MBq	Mega becquerel
MCP1	Proteína quimiotática de monócitos 1
NK	Células Natural killer

NOD	Camundongos diabéticos não-obesos
Ob	Grupo Obeso
ObG	Grupo Obeso + Glúten
PCR	Proteína C reativa
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PGC1 α	Coativador de PPAR
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissomos
qPCR	Reação da cadeia da polimerase quantitativa
QR	Quociente respiratório
SGNC	Sensibilidade ao glúten não-celíaca
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerol
TAM	Tecido adiposo marrom
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TAV	Tecido adiposo visceral
TLR	Receptores do tipo Toll
TMB	Taxa metabólica basal
TNF	Fator de necrose tumoral
UCP	Proteína desacopladora
VCO ₂	Volume do dióxido de carbono
VO ₂	Volume de oxigênio
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
ZO1	Zona ocludente 1

RESUMO

Objetivos: A associação entre glúten e obesidade é ainda controversa e escassa na literatura. Previamente nosso grupo demonstrou que as dietas sem glúten levaram à redução do peso corporal em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. O presente trabalho objetivou investigar em modelos experimentais os mecanismos pelos quais o glúten exerce tais ações, com ênfase nos seus possíveis efeitos na termogênese, no gasto energético e no metabolismo do tecido adiposo.

Métodos: Camundongos C57BL/6 foram alimentados com dieta padrão (Eutrófico – Eut) ou dieta hiperlipídica indutora de obesidade (Obeso – Ob) sem glúten ou adicionadas com 4,5% de glúten de trigo (EutG e ObG). Após oito semanas de tratamento, os animais receberam glúten radiomarcado com Tecnécio ($^{99m}\text{Tc-GLU}$) para estudo da absorção e biodistribuição corporal e foram submetidos à calorimetria para avaliação do consumo de oxigênio (VO_2) e gasto energético. Após a eutanásia o tecido adiposo marrom (TAM) e o tecido adiposo subcutâneo (TAS) foram retirados para avaliação da expressão de proteínas relacionadas à termogênese e ‘browning’. Adipócitos do tecido adiposo visceral (TAV) foram isolados e cultivados para estudo da expressão de genes relacionados à inflamação e ao metabolismo lipídico.

Resultados: A adição de 4,5% glúten não alterou a ingestão calórica em nenhum dos dois grupos experimentais (dietas padrão ou hiperlipídica). Apesar disso, os animais que consumiram glúten apresentaram maior ganho de peso devido à expansão do TAV e TAS, tanto nos grupos eutróficos quanto nos obesos. $^{99m}\text{Tc-GLU}$ ou seus fragmentos peptídicos foram detectados no sangue, fígado e TAV, sugerindo que o glúten poderia atingir órgãos extra-intestinais e exercer ações diretas. No TAM de animais obesos, dietas com glúten estiveram associadas à menor expressão da UCP1 (proteína desacopladora da fosforilação oxidativa, responsável pela termogênese). No TAS dos grupos EutG e ObG houve também redução na expressão das proteínas UCP1 e BMP7 (relacionada à diferenciação de adipócitos marrons no tecido adiposo branco: ‘browning’). A calorimetria indireta mostrou menor VO_2 em animais EutG e ObG, comparados aos seus controles. Em obesos, o gasto energético foi reduzido com a ingestão de glúten. A ingestão de glúten também reduziu a expressão de gênica de adiponectina, $\text{PPAR}\alpha$, $\text{PPAR}\gamma$ e da enzima lipase hormônio-sensível em cultura de adipócitos de animais obesos. Nos animais eutróficos a ingestão de glúten aumentou a expressão de IL-6 e TNF ($p=0,06$).

Conclusão: Glúten ou seus fragmentos peptídicos podem atingir órgãos periféricos, sugerindo efeitos diretos nesses tecidos. A inclusão de glúten de trigo em dietas isocalóricas reduziu a termogênese, o ‘browning’ e o gasto energético levando a aumento do peso e expansão do tecido adiposo, em camundongos eutróficos e, principalmente, em obesos.

Palavras-chave: glúten de trigo; obesidade; termogênese; calorimetria; cultura de adipócitos

ABSTRACT

Objectives: Despite the popularity of gluten-free diets, an association between gluten and obesity is still controversial, and there are few controlled studies published. Previously, we showed that a gluten-free diet reduces weight gain without changing food intake in mice fed high-fat diets. In the present study, we investigated the effects of gluten intake on fat metabolism, thermogenesis and energy expenditure in mice fed a standard or a high-fat diet.

Methods: C57BL/6 mice were fed a standard (Eutrophic – Eut) or high-fat diet (Obese – Ob) to induce obesity. EutG and ObG groups had diets containing 4.5% of wheat gluten. After eight weeks, the animals received ^{99m}Tc-Technetium-radiolabeled gluten (^{99m}Tc-GLU) orally to study gluten absorption and biodistribution or they underwent indirect calorimetry to study oxygen consumption (VO₂) and energy expenditure. After euthanasia, brown (BAT) and subcutaneous adipose tissue (SAT) were collected to assess thermogenic and browning-related protein expression. Lipid metabolism and the inflammatory profile were studied in adipocyte cultures from the four groups.

Results: Despite having had the same energy intake, EutG and ObG mice exhibited increased body weight and fat deposits (SAT and VAT – visceral adipose tissue) compared with their respective controls. ^{99m}Tc-GLU or its peptides were detected in the blood, liver and VAT, suggesting that it can reach extra-intestinal organs. Uncoupling protein 1 (UCP1) expression was reduced in the BAT of Ob-G and in the SAT of EutG and ObG mice. In SAT of EutG and ObG groups there was also a reduction in BMP7 expression (related to browning which is the differentiation of brown adipocytes in white adipose tissue). Indirect calorimetry showed lower VO₂ in EutG and ObG groups compared with their controls. In obese mice, daily energy expenditure was reduced with gluten intake. Gluten also reduced adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR γ and hormone-sensitive lipase in cultures of adipocytes isolated from Ob mice, while in the EutG group, gluten intake increased Il-6 expression and tended to increase that of TNF.

Conclusion: Gluten or its peptides can reach extra-intestinal organs, such as liver and VAT, supporting a direct effect on those sites. The inclusion of wheat gluten in isocaloric diets decreases thermogenesis, browning and energy expenditure, and accelerates weight gain and adiposity in eutrophic and, mainly, in obese mice.

Keywords: wheat gluten; obesity; thermogenesis; calorimetry; adipocyte culture

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o sobrepeso e a obesidade podem ser definidos como acúmulo anormal e excessivo de gordura, acarretando em riscos à saúde do indivíduo. O excesso de adiposidade está atualmente entre os principais fatores de risco para diversas doenças crônicas não transmissíveis incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e alguns cânceres (1).

Recentes pesquisas com estimativa da prevalência do excesso de peso indicaram índices alarmantes. Nos Estados Unidos mais de um terço da população adulta é obesa (34,9%) e 62% apresenta sobrepeso (1, 2). No Brasil, o sobrepeso e a obesidade atingem 47,4% e 17,5% da população, respectivamente (3).

Assim, alternativas para a prevenção e o tratamento do sobrepeso e da obesidade vem sendo amplamente estudadas, incluindo a adição ou exclusão de diversos nutrientes e/ou alimentos. Neste contexto, muito tem sido comentado sobre o glúten de trigo e suas ações imunogênicas.

O glúten, presente em alguns cereais como trigo, centeio, cevada e aveia, é definido como complexo proteico formado por duas frações principais: a prolamina e a glutenina. As proteínas formadoras do glúten compõem cerca de 80 a 85% da fração proteica da farinha de trigo, assim, 100g de farinha de trigo possuem cerca de 8,5g de glúten (4). Suas características de viscosidade e elasticidade são importantes para o processo de panificação, por isso o trigo é amplamente utilizado na indústria alimentícia e consumido em todo o mundo (5, 6). O trigo é uma das fontes primárias de alimentos, sendo o segundo cereal mais cultivado no mundo (7). Nos países ocidentais, estima-se que a ingestão média de glúten pela população em geral esteja entre 10 a 15g por dia (8).

Devido ao alto conteúdo de prolina e glutamina, o glúten não é completamente digerido no trato gastrointestinal, aumentando a concentração de peptídeos resistentes à clivagem enzimática no lúmen intestinal (9). Assim, esses fragmentos peptídicos poderiam desencadear respostas inflamatórias (10), estando relacionados ao desenvolvimento das desordens relacionadas ao glúten como a doença celíaca, a alergia ao trigo e a recentemente descrita, sensibilidade ao glúten não-celíaca (11, 12). Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas e ressaltam o papel imunogênico do glúten e de seus fragmentos peptídicos. Já foram apresentadas evidências de alterações no perfil de microbiota intestinal (13, 14), aumento da permeabilidade intestinal (15) e exacerbação do perfil inflamatório (16, 17)

associados à ingestão da proteína. Embora essas alterações tenham sido descritas principalmente na doença celíaca, há relatos de benefícios da exclusão do glúten em outras doenças como autismo, síndrome do intestino irritável, artrite reumatoide e diabetes tipo 1 (17).

O papel do glúten na obesidade é pouco descrito na literatura científica, apesar das dietas isentas de glúten estarem ganhando popularidade e sendo utilizadas como abordagem terapêutica para o emagrecimento. Pioneiro estudo realizado por Soares et al. (18) demonstrou efeitos deletérios do glúten de trigo contribuindo para aumento do peso e da adiposidade, resistência à insulina e maior perfil pró-inflamatório em animais obesos alimentados com a proteína.

No entanto, não está claro se o glúten ou seus fragmentos peptídicos poderiam atingir a circulação sistêmica e órgãos periféricos para exercer esses efeitos metabólicos e inflamatórios. Até o momento, não há estudos que investigaram a absorção e o metabolismo da proteína em animais obesos e molecularmente não se conhecem as vias associadas ao aumento de peso e à inflamação. Desta forma, o presente trabalho investigou alguns mecanismos pelos quais o glúten leva à expansão do tecido adiposo estudando sua absorção e suas ações metabólicas e inflamatórias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Glúten: definição e estrutura

O glúten pode ser definido como complexo proteico presente em cereais como trigo, centeio, cevada e aveia. O glúten contém centenas de componentes proteicos e sua composição aminoacídica única é caracterizada por alto conteúdo de glutamina (30-40%) e prolina (20%) e baixas quantidades de triptofano e lisina. As proteínas do glúten podem ser divididas em duas frações principais, de acordo com a solubilidade: os fragmentos polipeptídicos que constituem a fração solúvel em álcool são denominados prolaminas e a fração insolúvel é denominada glutenina (5, 6, 19).

Quando em contato com a água, por homogeneização mecânica, a glutenina e prolamina se interagem por meio de pontes de hidrogênio, ligações de Van der Waals e pontes dissulfeto, dando origem à massa com características de viscosidade e elasticidade fundamentais para o processo de panificação. Entre os cereais que contém glúten, nenhum apresenta proteínas com capacidade para a formação da massa como o trigo, sendo o mais utilizado na indústria alimentícia (6).

Considerando as duas frações proteicas principais, a prolamina difere de acordo com o tipo de cereal em que está presente: gliadina no trigo, secalina no centeio, hordeína na cevada e avenina na aveia (19).

O glúten tem sido amplamente estudado pelo seu importante papel na doença celíaca, sendo que já foi demonstrada a toxicidade da gliadina, da hordeína e da secalina nesta doença (20). Entretanto, quanto ao papel tóxico da avenina ainda existem controvérsias (21).

A propriedade do glúten em promover inflamação intestinal está associada à sua habilidade em desencadear respostas imunes celulares e humorais. Epítomos imunorreativos às células T foram encontrados na gliadina e glutenina, sendo que pelo menos 50 epítomos exercendo atividade citotóxica, imunomodulatória e de alteração de permeabilidade intestinal já foram identificados nos peptídeos (15, 22). Entre os fragmentos identificados, o peptídeo 33-mer exerce maior atividade imunogênica (15) (Figura 1).

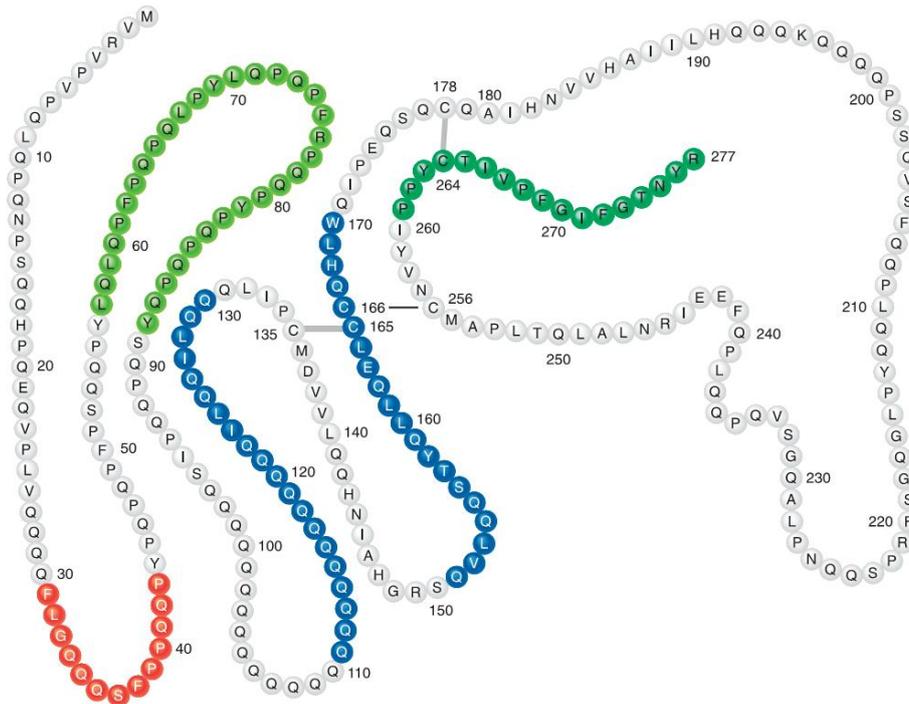


Figura 1: Motivos de gliadina com atividade citotóxica, imunomodulatória e de alterações de permeabilidade intestinal

Vermelho: atividade citotóxica; verde-claro: atividade imunomodulatória (33-mer); azul: atividade de alteração de permeabilidade intestinal e liberação de zonulina; verde-escuro: liberação de IL-8 (Interleucina 8).

Fonte: Fasano, A. *Physiol Rev*, 91:151-175 (2011).

2.2 Desordens relacionadas ao glúten

Doença celíaca, alergia ao trigo e sensibilidade ao glúten não-celíaca

A doença celíaca, a alergia ao trigo e a sensibilidade ao glúten não-celíaca representam as principais reações ao glúten mediadas pelo sistema imunológico. Atualmente, estima-se que essas desordens atinjam cerca de 10% da população (11) e são desencadeadas pela ingestão de glúten por indivíduos com alguma predisposição genética ou imunológica.

A doença celíaca (DC) apresenta características de doença autoimune e constitui enteropatia crônica desencadeada pela ingestão de glúten por indivíduos susceptíveis geneticamente, sendo essa susceptibilidade sugerida pela associação com certos antígenos leucocitários humanos (HLA). A expressão dessas moléculas de HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 é necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento da doença e o HLA-DQ2 é encontrado em até 95% dos pacientes celíacos (12). A prevalência da doença é aproximadamente 1% da população e permanece não diagnosticada em grande parte dos indivíduos afetados (20). Os sintomas clássicos da DC envolvem diarreia, dor abdominal e perda de peso. Outras manifestações incluem anemia ferropriva, osteoporose e em estágios mais avançados alterações neurológicas, hipoproteinemia e hipocalcemia. A DC pode também ser assintomática, o que a torna de difícil diagnóstico clínico. O diagnóstico da DC requer resposta positiva à dieta isenta de glúten e biópsia intestinal com achados característicos de linfocitose intraepitelia, hiperplasia de criptas e atrofia de vilosidades (10, 11).

A alergia ao trigo atinge 0,4% da população e é definida como reação imunológica imediata à ingestão de glúten, estando entre as oito alergias alimentares mediadas por IgE mais comum nos Estados Unidos. A ingestão de glúten por indivíduos alérgicos pode desencadear sintomas cutâneos, gastrointestinais e respiratórios (11, 12).

A sensibilidade ao glúten não-celíaca (SGNC) é uma nova condição clínica desencadeada pela ingestão de glúten, levando a presença de sintomas intestinais e extra-intestinais que desaparecem após a retirada da proteína. No entanto, não deve haver atrofia de vilosidades intestinais ou marcadores sorológicos compatíveis com a doença celíaca ou alergia ao trigo (23). Os sinais clínicos são diversos e envolvem dor e distensão abdominal, cefaleia, fadiga crônica, dores musculares, entre outros (23). Não há abrangentes estudos epidemiológicos publicados, mas a prevalência é estimada em 3-6% da população geral.

Embora a associação genética, fatores ambientais e anticorpos já tenham sido identificados na DC, a fisiopatologia da SGNC não é clara (11).

O tratamento clínico para as desordens relacionadas ao glúten é baseado na completa exclusão dietética dos cereais (trigo, centeio, cevada e aveia) e todos os alimentos que os contém. Em relação à aveia, ainda existem controvérsias sobre a sua tolerância pelos pacientes. Alguns estudos argumentam que a ingestão da aveia pura e livre de contaminações parece ser seguro, porém deve ser introduzido com cautela e os pacientes monitorados (20).

2.3 Evidências científicas dos possíveis benefícios da exclusão do glúten em outras doenças

Além das desordens relacionadas ao glúten, existem algumas evidências científicas mostrando benefícios da exclusão do glúten em outras doenças como dermatite herpetiforme, síndrome do intestino irritável, esclerose múltipla, autismo, enteropatia associada ao HIV e diabetes tipo 1. Porém o uso da dieta sem glúten ainda não é consenso para o tratamento desses pacientes (17).

Dermatite herpetiforme

A dermatite herpetiforme é caracterizada por condição cutânea autoimune associada com enteropatias de sensibilidade ao glúten e atualmente é reconhecida como manifestações extra-intestinais da doença celíaca (24). A sua fisiopatologia não está completamente elucidada e o tratamento envolve a retirada do glúten da dieta (25). Estudos mostraram que para a maioria dos pacientes, a isenção do glúten foi eficiente para atenuar os sinais cutâneos e reduzir ou retirar o tratamento medicamentoso (26-28). No entanto, ainda não há consenso sobre o uso dessa dieta, visto que em alguns pacientes não é observada melhora dos sintomas após a exclusão do glúten (29) e em outros a remissão é mantida após a reintrodução da proteína (30).

Desordens neurológicas: esclerose múltipla e autismo

O papel do glúten em desordens neurológicas como a esclerose múltipla e o autismo tem sido discutido e estudado. A esclerose múltipla constitui desordem inflamatória autoimune do sistema nervoso central e tem etiologia multifatorial, incluindo fatores ambientais, imunológicos e genéticos (31). Alguns autores relataram regressão dos sintomas da esclerose múltipla após a isenção do glúten da dieta, sendo esta dieta sugerida aos pacientes (32-34). Recentemente, associação entre anticorpos anti-gliadina e anti-transglutaminase tecidual foi demonstrada em pacientes com esclerose múltipla (35). Estudo publicado por Reichelt e Jensen (36) mostrou que esses anticorpos foram detectados com maior frequência no sangue de pacientes com esclerose múltipla (n=36), quando comparado a pacientes controles (n=26). No entanto, outros trabalhos mostraram que não há evidências

científicas suficientes para justificar o uso da dieta sem glúten como tratamento clínico para esses pacientes (34, 37, 38).

Os transtornos do espectro do autismo são clinicamente caracterizados por dificuldades de interação social, de comunicação verbal e não-verbal e comportamentos estereotipados (39). Em busca de alternativas terapêuticas, considerável atenção tem sido destinada às dietas isentas de glúten e de caseína (proteína presente no leite e seus derivados) como tratamento para esses transtornos (40). Um estudo baseado em relatos de pais de crianças autistas observou que a completa eliminação do glúten e da caseína levou à melhora significativa de sintomas físicos e do comportamento social (41). Outros dois relatos de casos mostraram melhora de crises convulsivas e dos sintomas do autismo com essa mesma dieta (42, 43). No entanto, estudo de meta-análise incluindo artigos de 1970 a 2013 concluiu que evidências para suportar a exclusão do glúten e de leite e derivados são ainda limitadas e insuficientes (44).

Diabetes tipo 1

O diabetes tipo 1 e a doença celíaca são, ambos, considerados doenças autoimunes e há alta prevalência de pacientes com as duas doenças que compartilham semelhantes alelos e antecedentes genético (45). Entre os pacientes diagnosticados com diabetes tipo 1 e doença celíaca, a maioria foi diagnosticada com diabetes antes da doença celíaca, provavelmente pelo fator protetor desempenhado pela dieta sem glúten sobre o diabetes (46).

Diante dessas observações, a conexão entre o glúten e a patogênese do diabetes tipo 1 tem sido discutida no meio científico (47). Já foi demonstrado o efeito protetor das dietas isentas de glúten no desenvolvimento de doenças autoimunes, incluindo o diabetes tipo 1 (46). Dall et al. (48) observaram que fragmentos da gliadina, principalmente o 33-mer, pode afetar diretamente as células β -pancreáticas contribuindo para a hiperatividade dessas células observada antes do desenvolvimento do diabetes tipo 1. Também foi relatado que o glúten aumenta a atividade de células NK (natural killer) contra as células β do pâncreas (49). Além disso, autores mostraram que as dietas isentas de glúten reduziram a incidência de diabetes tipo 1 de 64% para 15% em camundongos NOD (diabéticos não-obesos) (50). Em humanos, seis meses de isenção do glúten apresentou efeitos benéficos na preservação da função das células β em indivíduos em risco para diabetes tipo 1 (51).

No entanto, os resultados são controversos. Klemetti et al. (52) observaram que a resposta das células T ao glúten estiveram levemente aumentada em pacientes recém diagnosticados com diabetes tipo 1, porém resposta imune celular ao glúten não foi observada na maioria dos pacientes. Assim, os resultados não são suficientes para comprovar o papel do glúten na patogênese do diabetes tipo 1 em humanos. Funda et al. (53) também mostraram efeitos similares das dietas isentas ou não de glúten na prevenção do diabetes em camundongos NOD.

Em conclusão, apesar de algumas evidências científicas, a adoção da dieta isenta de glúten ainda não é consenso para pacientes com diabetes tipo 1 e a indicação deve ser realizada com cuidado.

Artrite reumatoide

O papel do glúten na artrite reumatoide também é ainda controverso. Essa doença constitui síndrome clínica definida por diversos achados e sintomas, mas a principal característica é a inflamação crônica e destrutiva primariamente localizada no revestimento sinovial das articulações diartrodiais (54). Pacientes com artrite reumatoide possuem aumento do risco cardiovascular e aterosclerose, apresentando perfil lipídico anormal. Assim, medicamentos e manipulação dietética são opções de tratamento para a dislipidemia nesses pacientes (55). Portanto, considerando essas alterações, a dieta isenta de glúten poderia exercer algum benefício. Elkan et al. (56) mostraram que dieta vegetariana isenta de glúten reduziu o IMC (Índice de Massa Corporal) e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) quando comparado à dieta controle, mudanças potencialmente ateroprotetoras e anti-inflamatórias.

Além dos benefícios considerando alterações no perfil lipídico, Hafström et al. (57) observaram que essa mesma dieta seguida por 22 pacientes por nove meses ou mais, significativamente reduziu os níveis de anticorpos anti- β -lactoglobulina e anti-gliadina e houve melhora dos sintomas. No entanto, o papel desempenhado pelo glúten nessas alterações é desconhecido.

2.4 Consequências nutricionais das dietas isentas de glúten

Com a crescente popularidade das dietas isentas de glúten, muito se questiona sobre os possíveis benefícios e malefícios da completa retirada dessa proteína da alimentação. Devido à sua composição aminoacídica, o glúten é considerado proteína de baixo valor biológico, principalmente por conter pequeno teor do aminoácido essencial lisina (58). Assim sendo, a exclusão do glúten não causaria deficiências proteicas. Com o objetivo de avaliar possíveis consequências nutricionais, detalhado estudo com 37 pacientes celíacos mostrou deficiências mínimas com a isenção do glúten (59).

No entanto, a menor ingestão de produtos derivados do trigo tem como principal consequência indesejável a redução da ingestão de fibras alimentares e polissacarídeos, nutrientes com ação probiótica que estão naturalmente presentes nesses alimentos (13, 60). Assim, a adoção da dieta isenta de glúten pode apresentar impactos negativos na saúde intestinal, tendo alguns estudos mostrado associação desta dieta com alterações no perfil da microbiota intestinal (disbiose). As mais relevantes alterações parecem estar relacionadas à redução nos grupos benéficos (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium longum*) e aumento nos grupos patogênicos (*Enterobacteriaceae* e *Escherichia coli*) (13, 14, 61). No entanto, a relação de causalidade considerando o papel do glúten e o papel das fibras como causa da disbiose ainda não é bem esclarecida.

Outra consequência adversa da dieta sem glúten pode estar associada ao aumento da ingestão calórica consequente à inadequada substituição dos alimentos e escolhas de alimentos sem glúten com menor valor nutricional (62). De acordo com Saturni et al. (63) os indivíduos tendem a compensar a restrição imposta pela dieta ingerindo alimentos com alto teor de gorduras, açúcares e calorias.

Assim, a exclusão do glúten é nutricionalmente segura e os efeitos adversos parecem estar principalmente associados à menor ingestão de fibras. A adequada prescrição alimentar por nutricionista pode auxiliar os pacientes a aderirem dieta isenta de glúten equilibrada, sendo os alimentos densos em nutrientes, naturalmente isentos de glúten e balanceados em macro e micronutrientes a opção de escolha (64).

2.5 O papel imunogênico do glúten

O surgimento das desordens relacionadas ao glúten não é surpreendente visto que o glúten foi introduzido recentemente na dieta humana. O estilo de vida do homem caçador-coletor ancestral, no período paleolítico, sustentou a humanidade por 2,4 milhões de anos. Sua dieta consistia de vegetais, frutas, sementes, raízes, carnes e insetos. Apenas recentemente na história da humanidade, há cerca de 10.000 anos, a prática da agricultura foi desenvolvida e os cereais introduzidos na alimentação (65, 66). Ademais, nos últimos 500 anos a ingestão de trigo e de alimentos processados contendo glúten aumentou drasticamente (11). Desta forma, é sugerido que os indivíduos são geneticamente melhor adaptados à dieta ancestral do que à alimentação atual baseada na agricultura e alimentos processados.

Além disso, discute-se sobre as alterações genéticas sofridas pelo trigo ao longo dos anos. Achados arqueológicos sugerem que sucessivos cruzamentos espontâneos do trigo selvagem com gramíneas levaram a alterações genômicas gerando híbridos com características de maior fertilidade. No entanto, os tipos de trigo *Triticum monococcum* e *Triticum dicoccum* cultivados por milhares de anos continham menores quantidades do fragmento da gliadina com maior característica tóxica (o 33-mer) (67, 68).

Glúten e aumento da permeabilidade intestinal

Muito é estudado e conhecido sobre o papel do glúten e seus peptídeos na doença celíaca. A gliadina, em razão do seu elevado teor de prolina e glutamina, não pode ser completamente digerida pelo trato gastrointestinal, sendo seus peptídeos resistentes à degradação pelas proteases gástricas, pancreáticas e da membrana epitelial. Assim, esses peptídeos com características imunogênicas podem interagir com células do sistema imune na lâmina própria desencadeando resposta imunológica (22, 69).

Após ingestão, fragmentos parcialmente degradados da gliadina interagem com a mucosa intestinal levando a liberação de IL-8 (Interleucina 8) pelos enterócitos. Essa citocina provoca imediato recrutamento de neutrófilos na lâmina própria (69). Neste mesmo momento, outros fragmentos peptídicos da gliadina levam a aumento da permeabilidade intestinal. Evidências do estudo realizado por Drago et al. (70) indicaram que os fragmentos de gliadina induzem a liberação de zonulina e a consequente reorganização do citoesqueleto, deslocamento da ZO-1 (proteína da zona ocludente 1) do complexo juncional e separação das

proteínas da junção firme no intestino. Em celíacos, essa via é dependente de MyD88 e do receptor CXCR3 e os efeitos mediados pelo 33-mer e outros peptídeos imunomodulatórios. O aumento da permeabilidade intestinal permite translocação paracelular dos fragmentos da gliadina que ganham acesso à submucosa. A gliadina induz a produção de citocinas e ativa o sistema de sinalização da zonulina independente da predisposição genética do indivíduo, ou seja, essas alterações podem ocorrer tanto em celíacos quanto saudáveis (15, 70, 71).

Além de aumentar a permeabilidade intestinal via liberação da zonulina, a presença de fragmentos da gliadina na submucosa intestinal permite a sua interação com macrófagos. Essa interação inicia sinalização dependente de MyD88 e independente de TLR4 e TLR2 (Receptores do Tipo Toll 2 e 4), resultando em produção de citocinas, resposta pró-inflamatória do tipo Th1 e infiltração de células mononucleares na submucosa (16). A presença de mediadores inflamatórios como TNF (fator de necrose tumoral) e IFN γ (Interferon γ) pode também alterar a permeabilidade intestinal, perpetuando a disfunção da barreira intestinal inicialmente causada pela liberação da zonulina (15).

Em indivíduos geneticamente predispostos, a translocação dos fragmentos de gliadina para o espaço submucoso permite a interação das células T com as células apresentadoras de antígenos, incluindo macrófagos, via HLA DQ2/DQ8. Além disso, células dendríticas carregadas de gliadina migram do intestino para linfonodos mesentéricos e pancreáticos onde apresentam os antígenos, levando à migração de células T e exacerbação do processo inflamatório. O resultado é o desenvolvimento de resposta imune adaptativa responsável pelos danos vistos na mucosa intestinal de pacientes celíacos (10). Ocorre também maior expressão de IL-15 por enterócitos de indivíduos celíacos, perpetuando o dano epitelial e promovendo proliferação das células T (72).

Desta forma, sugere-se que os fragmentos peptídicos da gliadina podem aumentar a permeabilidade intestinal e, por transporte paracelular, entrariam no espaço mucoso intestinal desencadeando reação imunológica inflamatória. Com isso, mesmo em indivíduos saudáveis, a gliadina tem potencial para atingir e influenciar outros tecidos do organismo. Algumas dessas alterações provocadas pelos fragmentos peptídicos de gliadina estão apresentadas na Figura 2.

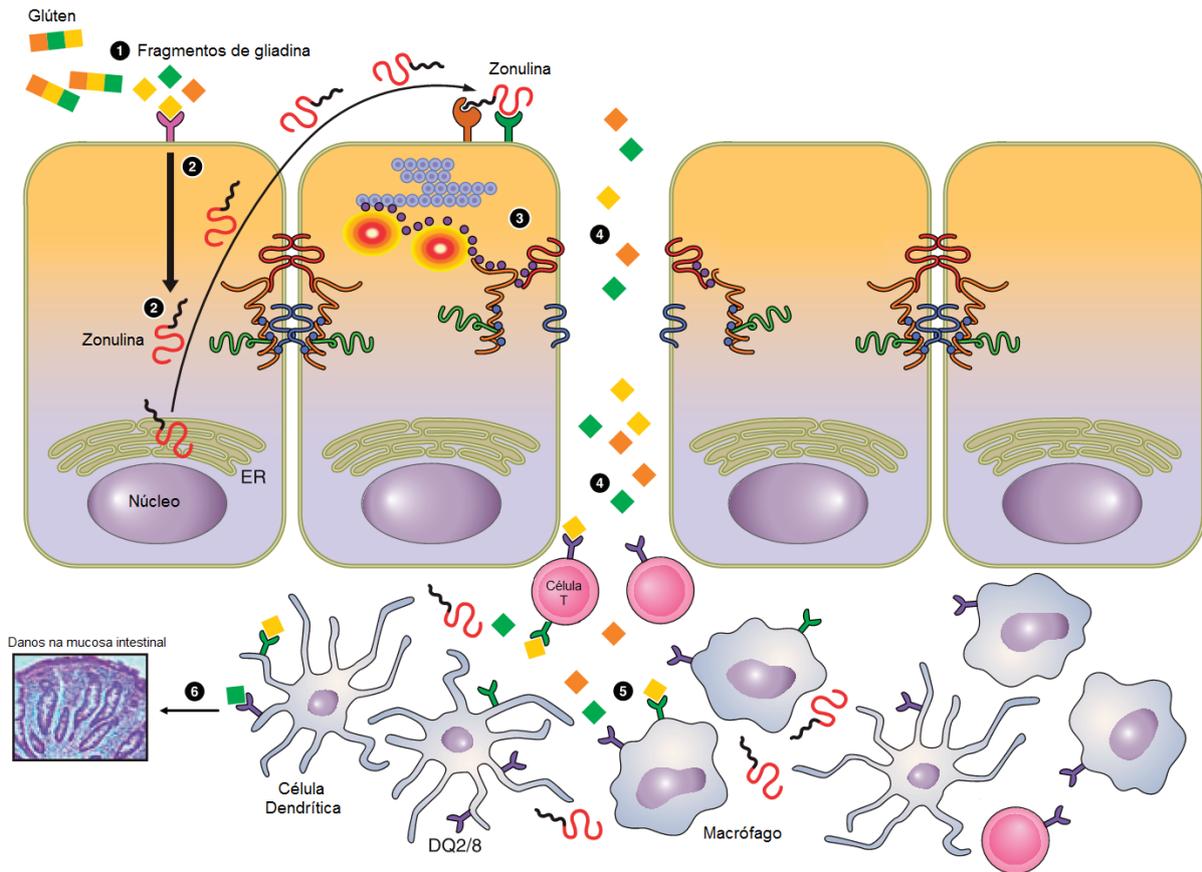


Figura 2: Mecanismos de liberação da zonulina, aumento de permeabilidade intestinal e indução de resposta inflamatória provocados por fragmentos de gliadina

1. Fragmentos peptídicos da gliadina provenientes da digestão do glúten consumido pela dieta. 2. Liberação da zonulina pelos fragmentos de gliadina mediada por CXCR3 e MyD88. 3. Deslocamento da ZO-1 do complexo juncional, separação das proteínas da junção firme no intestino e consequente aumento da permeabilidade intestinal provocados pela zonulina. 4. Transporte paracelular dos peptídeos de gliadina para o espaço submucoso. 5. Apresentação dos antígenos via HLA-DQ2/DQ8 em indivíduos geneticamente pré-dispostos e desenvolvimento da resposta imune adaptativa. 6. A resposta imune provoca danos na mucosa intestinal com atrofia das microvilosidades. ER (retículo endoplasmático).

Fonte: adaptado de Fasano, A. *Physiol Rev*, 91:151-175 (2011).

2.6 O papel do glúten na obesidade

Obesidade é definida como acúmulo excessivo ou anormal de gordura corporal que pode ter impactos prejudiciais à saúde e resulta do desequilíbrio energético, em que a ingestão de calorias é excedente em relação ao gasto pelo organismo (1).

O sobrepeso e a obesidade são atualmente considerados um dos maiores problemas mundiais de saúde pública, sendo reconhecidos como causa de elevado risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, hipertensão arterial, dislipidemia e doenças cardiovasculares (73). Pelo menos 2,8 milhões de adultos morrem a cada ano em decorrência do sobrepeso ou da obesidade. A Organização Mundial de Saúde estimou que, em 2008, mais de 1,4 bilhões de adultos tinham sobrepeso e mais de 10% da população mundial adulta estava obesa (1).

Estudos indicam que a obesidade é acompanhada por inflamação crônica de baixo grau, principalmente devido ao acúmulo de células inflamatórias como linfócitos e macrófagos no tecido adiposo. Essas células inflamatórias juntamente com os adipócitos secretam várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-6, CCL2/MCP1 (proteína quimiotática de monócitos 1), resistina, leptina, entre outras, que contribuem para o desenvolvimento da síndrome metabólica e podem exacerbar as consequências da obesidade (74, 75).

Novos medicamentos, dietas e estratégias nutricionais vêm sendo estudadas visando a prevenção e o tratamento do sobrepeso e da obesidade. Recentemente a retirada do glúten da alimentação tem ganhado destaque neste cenário. Nos Estados Unidos, o mercado dos produtos alimentícios sem glúten cresceu 28% entre 2004 e 2011 (12), sendo que a venda movimentou seis bilhões de dólares e as expectativas são que atinjam 10,2 bilhões em 2018 (76). No entanto, o maior crescimento das vendas de alimentos sem glúten é atribuído aos indivíduos que visam o emagrecimento e alimentação saudável e não diagnosticados com alguma desordem relacionada ao glúten.

Contudo, apesar da enorme popularidade das dietas isentas de glúten e o grande número de livros publicados sobre o assunto, a associação do glúten com obesidade e emagrecimento ainda é inconsistente na literatura científica e pouco se sabe sobre o assunto (77, 78).

Estudos com pacientes celíacos que aderiram à dieta sem glúten mostraram aumento do IMC e percentual de indivíduos com sobrepeso (79, 80). Esse aumento, na verdade, pode

estar associado à melhora da atrofia das vilosidades, absorção intestinal (80) e maior valor calórico de alguns produtos isentos de glúten (81), sendo grande fator de confusão. No entanto, quando os pacientes celíacos são categorizados de acordo com o peso antes da adesão à dieta, pôde-se observar aumento do peso entre aqueles com IMC abaixo da normalidade ($IMC < 18,5$) e redução entre aqueles com sobrepeso ou obesidade ($IMC > 25$) (82).

Novas evidências vêm mostrando o papel pró-inflamatório e imunogênico do glúten e dos fragmentos de gliadina. Thomas et al. (16) mostraram que o peptídeo 33-mer pode atuar como agente pró-inflamatório, aumentando a expressão gênica e produção de citocinas inflamatórias por macrófagos, principalmente TNF. Em outro estudo com suínos, os autores mostraram que a dieta isenta de cereais reduziu níveis da proteína C reativa (PCR), importante marcador fisiológico de inflamação e melhorou o controle da pressão arterial (83). Ademais Fasano (15) relatou que o glúten e os fragmentos de gliadina podem levar à liberação de zonulina e aumento da permeabilidade intestinal, conforme discutido previamente. Embora exacerbada na doença celíaca, essas alterações não foram vistas apenas na presença da doença (15).

A capacidade do glúten em aumentar o peso corporal, bem como os mecanismos metabólicos associados a esse efeito obesogênico são ainda incertos. No entanto, o papel do glúten relacionado ao aumento da inflamação intestinal e alterações no perfil da microbiota tem sido descrito, e essas ações estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento da obesidade.

Importante trabalho realizado no nosso laboratório mostrou que a exclusão do glúten de trigo da dieta exerceu efeito protetor sobre o ganho de peso e adiposidade. Os dados mostraram que o glúten levou a redução da expressão de PPAR- γ (Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos) e PPAR- α , e conseqüentemente das enzimas lipase lipoproteica, lipase hormônio sensível e carnitina palmitoil transferase-1, levando a menor mobilização e oxidação de ácidos graxos e causando maior acúmulo de triacilgliceróis no tecido adiposo. Além disso, observou-se atenuação do perfil inflamatório (maiores níveis de adiponectina e menores níveis de leptina, IL-6, TNF e resistina) em animais obesos que receberam dieta isenta de glúten (Figura 3) (18).

O papel do glúten sobre conseqüências metabólicas da obesidade, principalmente o diabetes tipo 2, também tem sido investigado, embora poucos estudos tenham sido publicados. Em humanos com diabetes tipo 2, dois trabalhos conduzidos pelo mesmo grupo não observaram diferenças nas concentrações séricas pós-prandiais de glicose, insulina, glucagon, ácidos graxos, peptídeo semelhante ao glucagon (GLP1) e fatores que contribuem

para doenças cardiovasculares, comparando a ingestão de glúten com outras fontes proteicas (caseína, proteína isolada do soro do leite ou bacalhau). No entanto essas concentrações foram avaliadas após a ingestão de apenas uma refeição contendo as diferentes fontes proteicas (84, 85).

Contudo, em modelos animais, dois trabalhos mostram a relação da ingestão de glúten com piora da resistência à insulina. Jönsson et al. (83) mostraram que a exclusão de cereais da dieta levou a melhora da sensibilidade à insulina em suínos. Resultados semelhantes foram observados por Soares et al. (18) em camundongos obesos com dieta isenta de glúten. Os autores observaram que a melhora da sensibilidade à insulina esteve associada à redução na concentração de resistina e aumento na expressão do receptor de insulina e do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4).

Diante dessas evidências, a exclusão do glúten poderia ser utilizada como possível ferramenta na prevenção e tratamento da obesidade e suas desordens metabólicas.

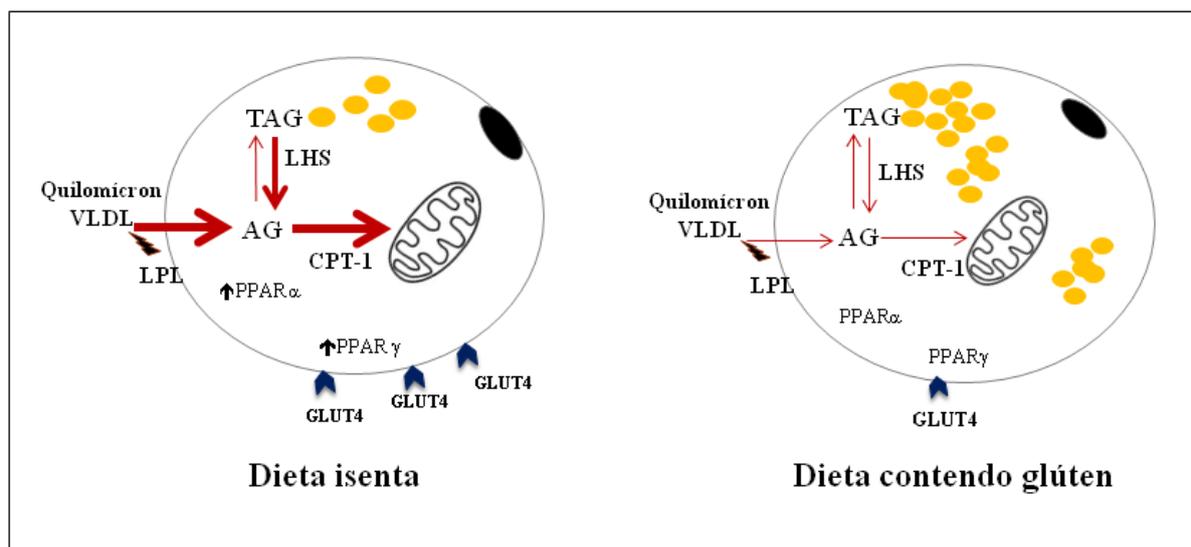


Figura 3: Proposta dos efeitos da dieta isenta ou não de glúten de trigo no metabolismo do tecido adiposo branco

Em dietas contendo glúten, ocorreu menor expressão de PPAR α e PPAR γ , levando a redução da expressão enzimática de lipase lipoproteica (LPL), lipase hormônio-sensível (LHS) e carnitina-palmitoil transferase (CPT1). Essas alterações resultaram em menor captação de ácidos graxos (AG) a partir de lipoproteínas, menor hidrólise de triacilgliceróis (TAG) intracelulares e menor oxidação de AG, levando a acúmulo lipídico e expansão do tecido adiposo. A ingestão de glúten também esteve associada à redução na expressão de GLUT4 e aumento da resistência à insulina.

Fonte: baseado em Soares et al. *J Nutr Biochem*, 24(6):1105-11 (2013).

2.7 Os diferentes tipos de tecido adiposo

As funções primárias e clássicas do tecido adiposo envolvem o isolamento e proteção do organismo e o estoque de lipídeos que serão utilizados durante o jejum para assegurar suficiente suprimento energético (86). O tecido adiposo é importante órgão que evoluiu para responder a mudanças na oferta de nutrientes e de temperatura e existem dois tipos de tecido adiposo com diferentes características: o branco (TAB) e o marrom (TAM) (87).

O tecido adiposo branco estoca grande quantidade de energia na forma de triacilgliceróis que podem ser hidrolisados a ácidos graxos livres (que serão oxidados para produção de ATP) quando há baixo estoque de energia. O tecido adiposo marrom atua na manutenção da temperatura corporal, armazenando triacilgliceróis que são quebrados para liberação da energia na forma de calor (termogênese) (87).

Morfologicamente diferentes, o TAB é constituído por adipócitos uniloculares brancos e, por ser um órgão endócrino, contribui para as alterações metabólicas observadas na obesidade. O TAM é caracterizado por adipócitos multiloculares marrons, com grande número de mitocôndrias e alta expressão de UCP1 (proteína desacopladora 1). Essa proteína está presente na membrana interna da mitocôndria e atua como canal de prótons, dissipando a energia gerada na fosforilação oxidativa na forma de calor ao invés de canalizá-la para produção de ATP (88). Quando ativado por estímulos β -adrenérgicos ou pelo frio os adipócitos marrons dissipam a energia química armazenada na forma lipídica, contribuindo para a manutenção da temperatura corporal. Em humanos, exposição repetida a baixas temperaturas aumenta a atividade do TAM e a termogênese (89). Em humanos, o TAM é conhecidamente presente em recém-nascidos e acreditava-se que este tecido desaparecia durante o período pós-natal. No entanto, estudos recentes realizados com tomografia por emissão de pósitrons (PET) demonstraram a existência de consideráveis sítios ativos desse tecido adiposo também em adultos (90, 91).

Além dos adipócitos brancos e marrons, nos últimos anos novo tipo de adipócito foi identificado e tem sido alvo de diversos estudos: o adipócito bege. Esses adipócitos desenvolvem-se no tecido adiposo branco em processo conhecido por *browning*. Em camundongos, os adipócitos beges podem ser encontrados no tecido adiposo subcutâneo da região inguinal, os adipócitos marrons são encontrados no tecido adiposo interescapular e os brancos no tecido adiposo visceral (epididimal e gonadal). Em humanos a localização dos adipócitos marrons e beges é ainda controversa (92) (Figura 4).

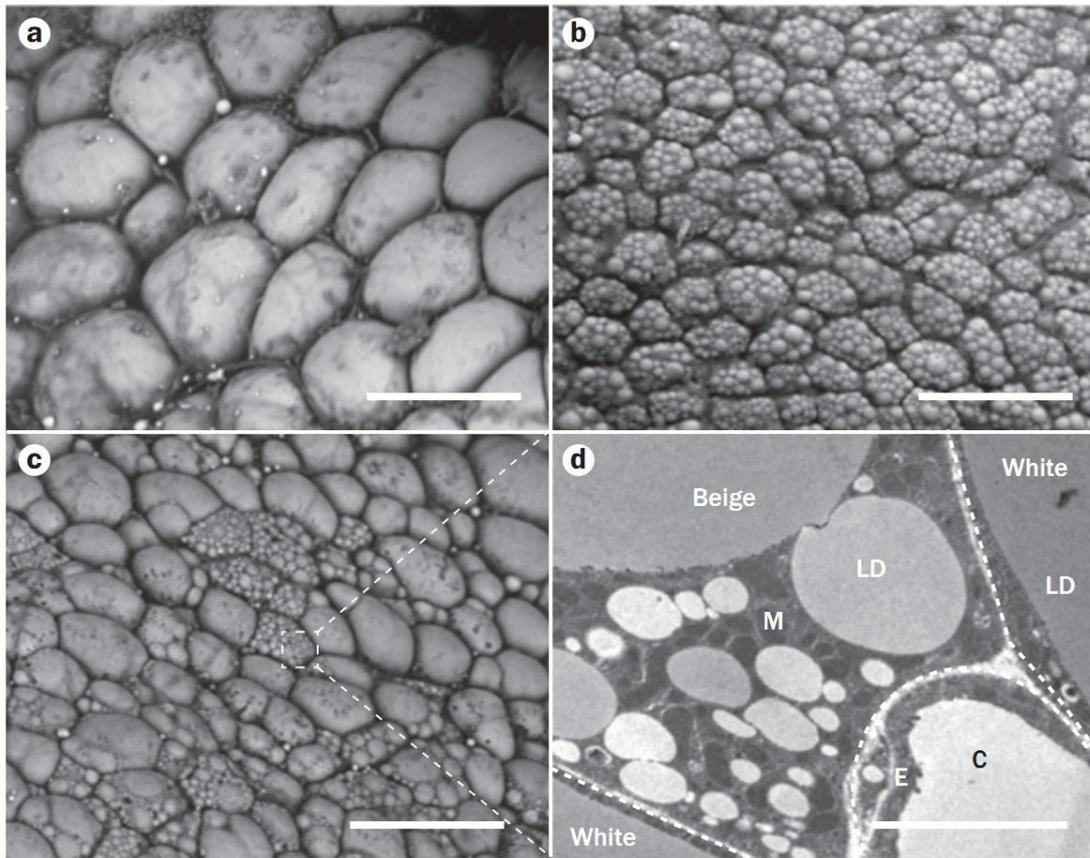


Figura 4: Fenótipos dos três diferentes tecidos adiposos

Micrografia eletrônica de varredura demonstra as características do tecido adiposo de camundongos. **a.** Adipócitos brancos na região inguinal contendo apenas uma gotícula lipídicas. **b.** Adipócitos marrons no tecido adiposo interscapular com múltiplas gotículas lipídicas. **c.** *Browning* do TAB leva a formação de ilhas de adipócitos multiloculares beges. **d.** Micrografia eletrônica de transmissão de um adipócito bege no TAB, mostrando o alto número de mitocôndrias. Barra de escala: a-c 50 μ m; d 5 μ m. LD: gotícula lipídica; C: capilar; E: célula endotelial; M: mitocôndria; TAB: tecido adiposo branco.

Fonte: Bartelt, A. Heeren, J. *Nat Rev Endocrinol.* 10, 24-36 (2014)

2.8 Adipócitos beges e o processo de *browning*

Os adipócitos beges (também chamados de marrons induzíveis ou ‘brown-in-white’ ou ‘brite’) despertaram o interesse da ciência por seu potencial terapêutico no tratamento da obesidade e desordens relacionadas (93). Os adipócitos beges apresentam morfologia multilocular, possuem grande número de mitocôndrias e expressam UCP1, ao contrário dos adipócitos brancos que não possuem essa proteína (92).

Apesar de possuírem características morfológicas semelhantes aos adipócitos marrons, os adipócitos beges surgem a partir de diferentes precursores. As células adiposas clássicas marrons derivam de linhagem miogênica Myf-5⁺ e não de linhagens adipogênicas (94). Por sua vez, os adipócitos beges originam-se no TAB por geração *de novo* a partir de pré-adipócitos, compartilhando precursores comuns aos adipócitos brancos. Outro processo alternativo de transdiferenciação também foi descrito, evidenciando que adipócitos beges formados por geração *de novo* após indução pelo frio podem se diferenciar em adipócitos brancos em períodos de termoneutralidade ou estímulo por dieta hiperlipídica. Após novo estímulo, os mesmos adipócitos podem readquirir a morfologia multilocular, por transdiferenciação. Ambos os processos podem coexistir de forma independente (95).

O processo de *browning* e a diferenciação dos adipócitos marrons no TAM são regulados por diversos fatores. Por ser crucial para a função dos adipócitos beges e marrons, a expressão da UCP1, proteína desacopladora da fosforilação oxidativa, é importante ponto regulador. Maior expressão dessa proteína no tecido adiposo está associada com aumento da termogênese (96).

O PGC1 α (coativador de PPAR) tem sido considerado o regulador mais importante da termogênese, ligando-se ao PPAR α ou PPAR γ para ativar a expressão da UCP1 e promovendo adipogênese do tecido marrom. Além disso, o PGC1 α também regula a biogênese mitocondrial, ativando a expressão de enzimas mitocondriais chaves da cadeia respiratória (97, 98).

A proteína BMP7 (proteína morfogenética óssea 7) é importante indutora da diferenciação de adipócitos marrons, levando a maior expressão de UCP1, maior consumo de oxigênio, termogênese e aumento da massa e atividade do TAM (99). De acordo com Boon et al. (100) maior expressão da BMP7 reduziu a obesidade, o acúmulo hepático de gordura e atenuou a dislipidemia e hiperglicemia em camundongos com obesidade induzida por dieta.

Além disso, essa proteína está associada à formação de adipócitos bege no TAB, independente da temperatura (100).

Outro importante fator para diferenciação dos adipócitos marrons a partir de precursores Myf5⁺ é o PRDM16. Este cofator é altamente expresso nos adipócitos marrons quando comparados aos brancos e inibe a expressão de genes clássicos dos adipócitos brancos. Quando ectopicamente expressa em pré-adipócitos no tecido adiposo branco, a PRDM16 induz a formação da morfologia multilocular e a transcrição de várias proteínas envolvidas na termogênese (incluindo a PGC1 α e UCP1) (101, 102).

2.9 Os componentes do gasto energético

Com o aumento da prevalência do excesso de peso e a necessidade de busca por tratamentos eficazes, há grande interesse no estudo das variações no gasto energético e como este pode contribuir para o balanço calórico diário (103). Variações no peso corporal ocorrem apenas quando não há homeostase energética, sendo a ingestão calórica diferente do gasto energético. Portanto, o emagrecimento é decorrente do balanço energético negativo (ingestão menor que o gasto) e o ganho de peso do balanço energético positivo (ingestão maior que o gasto) (104, 105).

Classicamente, o gasto energético total envolve três componentes principais: a taxa metabólica basal (TMB), o efeito térmico dos alimentos e a energia gasta com atividades físicas. A taxa metabólica basal corresponde à energia utilizada para manutenção das funções vitais no repouso e representa aproximadamente 60 a 70% do gasto energético total (em sedentários). O efeito térmico dos alimentos (aproximadamente 10 a 15% do gasto energético total) está relacionado à energia utilizada nos processos de digestão, absorção, metabolização e armazenamento dos alimentos. Estes valores variam de acordo com o tipo de macronutriente ingerido: 0-3% para lipídeos, 5-10% para carboidratos e 20-30% para proteínas. O gasto energético associado à atividade física é o componente mais variável e corresponde ao gasto de energia da atividade realizada multiplicado pelo tempo de realização (103, 104).

A energia que o organismo necessita para manutenção das funções orgânicas vitais é obtida a partir da oxidação dos macronutrientes presentes nos alimentos (carboidratos, proteínas e lipídeos), cuja metabolização envolve o consumo de oxigênio (O_2) e resulta na produção de dióxido de carbono (CO_2), água, moléculas de adenosina trifosfato (ATP) e calor (termogênese). O ATP produzido é utilizado para geração de trabalho nos sistemas biológicos. O calor é liberado em duas principais vias: 1. reações exotérmicas presentes no metabolismo (por exemplo na bomba de sódio/potássio) e 2. termogênese adaptativa (liberação de calor pelas proteínas desacopladoras da fosforilação oxidativa) (106). A UCP1 é a principal proteína da família das proteínas desacopladoras e é expressa unicamente nos adipócitos marrons e beges. As proteínas desacopladoras 2 e 3 (UCP2 e UCP3) apresentam grande similaridade estrutural à UCP1, porém estão também envolvidas na modulação da formação dos radicais livres e não apenas na dissipação de calor, sendo o seu papel fisiológico não completamente elucidado. Expressão de mRNA de UCP2 é encontrado em diversos tecidos, sendo níveis mais elevados no tecido adiposo branco, músculo esquelético, baço e

células β -pancreáticas. UCP3 é predominantemente expressa no músculo esquelético, coração e em menor quantidade no tecido adiposo (107, 108).

A termogênese adaptativa é definida como a produção de calor em resposta a variações na temperatura ambiente ou na dieta e objetiva proteger o organismo contra a exposição ao frio ou regular o balanço energético após mudanças na alimentação, sendo o tecido adiposo marrom (TAM) o principal local dessa termogênese em roedores (106). De acordo com Lowell e Spiegelman (106), fatores que interferem na termogênese adaptativa são importantes alvos de estudo para o desenvolvimento de terapias anti-obesidade.

Entre os fatores que contribuem para aumento da termogênese e da atividade do TAM, estão a exposição a baixas temperaturas e à dieta. Alterações nesses fatores podem levar a maior captação e oxidação de substratos energéticos para produção de calor, tanto em modelos animais quanto em humanos. Em animais, Vallerand et al. (109) observaram aumento de 110 vezes na captação de glicose em ratos, após 48 horas de exposição a 5°C. Resultados semelhantes foram relatados por Shimizu et al. (110), demonstrando aumento na expressão do GLUT4 e na captação de glicose pelo TAM. Em humanos, Yoneshiro et al. (111) observaram aumento da atividade do TAM e aumento de 28% no gasto energético após 2 horas de exposição ao frio. Ouellet et al. (112) observaram aumento de 1,8 vezes no gasto energético associado à maior captação de glicose e ácidos graxos pelo TAM, após 3 horas de exposição ao frio. Aumento da atividade do TAM também levou a maior clearance de triacilgliceróis, em camundongos mantido a 4°C por 4h e 24 horas (113). No entanto, o percentual de contribuição da termogênese para o gasto energético total não é bem esclarecido na literatura.

Diversos componentes da dieta têm sido estudados como termogênicos, ativando a termogênese e aumentando o gasto energético (114). Entre os principais nutrientes estudados pode-se citar a cafeína (115, 116); a capsaicina cuja ação está baseada na estimulação β -adrenérgica estimulando a produção de catecolaminas (117) e as catequinas presentes no chá verde que também atuam via β -adrenoreceptores aumentando o gasto energético e a oxidação lipídica (118).

Diante da contribuição da termogênese adaptativa para o gasto energético, Lowell e Spiegelman (106) incluíram esse valor como componente do gasto energético total, quando avaliado sob o ponto de vista termodinâmico (Figura 5).

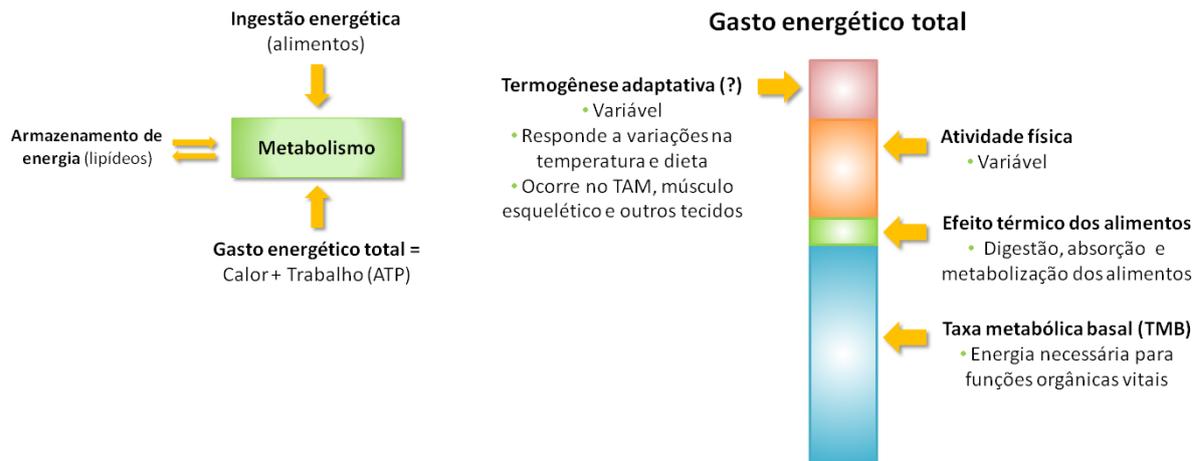


Figura 5: Perspectiva termodinâmica do gasto energético

A energia fornecida ao organismo é proveniente dos alimentos (carboidratos, proteínas e lipídios), oxidados a calor e trabalho (energia). A energia pode, também, ser mobilizada dos estoques lipídicos. Do ponto de vista termodinâmico, o gasto energético total pode ser subdividido em quatro principais componentes: a taxa metabólica basal (TMB) – energia obrigatória para as funções orgânicas vitais; o efeito térmico dos alimentos – gasto com digestão, absorção e metabolização; gasto energético da atividade física – atividades diárias e exercício físico e termogênese adaptativa – definida pela produção de calor em resposta a mudanças na temperatura ambiente ou na dieta.

Fonte: Adaptado de Lowell, BB. Spiegelman, BM. *Nature*. 404, 652-60 (2000)

Métodos de avaliação do gasto energético

Dada a importância de se investigar os componentes do gasto energético, diversos métodos foram desenvolvidos com esse objetivo, sendo os principais: a calorimetria direta, a calorimetria indireta e técnicas não-calorimétricas (por exemplo: água duplamente marcada) (119).

A calorimetria indireta constitui método não invasivo e avalia o gasto energético por meio de medida do volume de gás oxigênio consumido (VO_2) e de gás carbônico produzido (VCO_2), cujas quantidades diferem de acordo com o substrato oxidado. A relação entre a produção de CO_2 e o consumo de O_2 é referida como quociente respiratório ($QR = VCO_2/VO_2$) e pode ser empregada para conhecer o tipo de substrato que está sendo oxidado. Os carboidratos possuem valor de QR igual a 1,0, as proteínas 0,8 e os lipídeos 0,7 e é compatível com a ingestão nutricional (120).

3. JUSTIFICATIVA

Alternativas para a prevenção e tratamento da obesidade e suas desordens metabólicas vêm sendo estudadas em todo o mundo. Recentemente, observa-se o grande crescimento da aderência às dietas isentas de glúten como abordagem para o emagrecimento, embora evidências científicas que suportem sua exclusão ainda sejam escassas na literatura.

Diversos trabalhos vêm mostrando o papel imunogênico do glúten e seus fragmentos peptídicos, tanto para indivíduos celíacos quanto saudáveis. Assim, visando estudar a relação entre o glúten de trigo e obesidade, em 2013 o nosso laboratório publicou um importante trabalho mostrando efeitos protetores da exclusão dessa proteína da dieta de camundongos contra o ganho de peso e adiposidade, resistência à insulina e inflamação do tecido adiposo (18). No entanto, este trabalho contemplou apenas animais com obesidade induzida por dieta, não avaliando o papel do glúten em camundongos eutróficos.

Desta forma, estudar os efeitos da inclusão do glúten de trigo não apenas em obesos e compreender melhor os mecanismos pelos quais o glúten poderia exercer papel negativo na obesidade torna-se importante ferramenta no tratamento desta doença e suas consequências metabólicas.

4. HIPÓTESES

Diante dos resultados prévios mostrando que a ingestão de glúten levou a aumento de peso e redução da oxidação lipídica no tecido adiposo, nossa primeira hipótese é de que o glúten ou seus fragmentos peptídicos atravessem a barreira intestinal e atinjam a circulação sistêmica. Desta forma, a proteína estaria exercendo efeitos diretos sobre a modulação celular e alterando o desenvolvimento da obesidade. De outra maneira, se os fragmentos imunogênicos do glúten estivessem restritos ao trato gastrointestinal, o metabolismo celular estaria sendo modulado de forma indireta.

Ademais, os achados sobre o aumento do peso e da adiposidade dos animais mesmo em dieta isocalórica nos levaram a investigar a hipótese de que o glúten estaria modulando o gasto energético e a termogênese.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos e possíveis mecanismos pelos quais a inclusão do glúten de trigo na dieta provoca aumento de peso, expansão do tecido adiposo e exacerbação do perfil inflamatório em camundongos C57BL/6 eutróficos e obesos.

5.2 Objetivos específicos

- Estudar se ocorre absorção do glúten íntegro ou de seus peptídeos e se tais moléculas atingem órgãos e tecidos extra-intestinais envolvidos na gênese da obesidade e metabolismo lipídico, como fígado e tecido adiposo visceral.
- Avaliar os efeitos da ingestão do glúten de trigo por animais eutróficos e obesos sobre:
 - A evolução ponderal e o peso do tecido adiposo visceral (epididimal) e subcutâneo (inguinal);
 - O perfil lipídico sérico e glicemia, fatores importantes ligados à comorbidades da obesidade;
 - O consumo de oxigênio (VO₂) e o gasto energético, avaliados por calorimetria indireta;
 - A expressão de genes relacionados à termogênese e ativação do tecido adiposo marrom;
 - A expressão de genes relacionados ao *browning* e termogênese no tecido adiposo subcutâneo;
- Avaliar a secreção de citocinas e outros marcadores metabólicos e inflamatórios por adipócitos isolados do tecido adiposo visceral de animais recebendo ou não glúten na dieta.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais e dietas

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos obtidos no CEBIO (Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG) e mantidos no Biotério Experimental Ênio Cardillo Vieira, do Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional (LABiN), na mesma instituição.

Os animais tinham idade inicial de seis a oito semanas e foram mantidos em gaiolas coletivas com até cinco animais, ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ($26\pm 2^\circ\text{C}$) e livre acesso a dieta e água.

Os camundongos receberam diferentes dietas por oito semanas: AIN-93M ou dieta indutora de obesidade (DIO), adicionadas ou não de glúten de trigo a 4,5%, proporção normalmente ingerida pelos camundongos. O glúten utilizado é um extrato proteico a 75% fornecido pela Granotec®, Brasil. A DIO apresenta característica hipercalórica e hiperlipídica, contendo 61% da energia em forma de gordura saturada (121), sendo utilizada para o desenvolvimento da obesidade. As dietas AIN-93M e DIO foram ajustadas para apresentar semelhante composição nutricional (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição energética (% do valor calórico total) e densidade calórica das dietas AIN-93M, AIN-93M+ Glúten, DIO e DIO + Glúten

	AIN-93M	AIN-93M + Glúten	DIO	DIO + Glúten
Carboidrato (% kcal totais)	74,2	74,3	23,3	23,2
Proteína (% kcal totais)	15,8	15,8	14,9	15,1
Lipídeos (% kcal totais)	10,0	10,0	61,8	61,7
Calorias/g	2,76	2,76	5,21	5,21

A composição das dietas AIN-93M, acrescida ou não de glúten, está apresentada na Tabela 2, enquanto a Tabela 3 apresenta a composição das duas dietas hiperlipídicas usadas nos experimentos.

Tabela 2: Composição das dietas AIN-93M e AIN-93M acrescida de 4,5% de glúten de trigo

Ingredientes	Quantidade (g)	
	AIN-93M	AIN-93M + Glúten 4,5%
Amido de milho	465,7	465,7
Maltodextrina	155,0	155,0
Caseína	140,0	106,0
Sacarose	100,0	93,0
Celulose	50,0	50,0
Glúten de trigo Granotec®	0	45,0
Mix de minerais	35,0	35,0
Óleo de soja	40,0	40,0
Mix de vitaminas	10,0	10,0
Cistina	1,80	1,80
Bitartarato de colina	2,50	2,50
BHT	0,008	0,008

Tabela 3: Composição das dietas DIO e DIO acrescida de 4,5% de glúten de trigo

Ingredientes	Quantidade (g)	
	DIO	DIO + Glúten 4,5%
Banha de porco	355,0	355,0
Groselha	310,0	308,0
Caseína	200,0	170,0
Amido de milho	62,0	57,0
Celulose	50,0	50,0
Glúten de trigo Granotec®	0,0	45,0
Mix de minerais	35,0	35,0
Óleo de soja	20,0	20,0
Mix de vitaminas	10,0	10,0
Cistina	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,50	2,50
BHT	0,014	0,014

Desenho experimental

Os camundongos C57BL/6 machos foram divididos em quatro grupos que receberam as diferentes dietas por oito semanas, sendo: *Eutrófico (Eut)* – dieta AIN-93M; *Eutrófico + glúten (EutG)* – dieta AIN-93M acrescida de 4,5% de glúten de trigo; *Obeso (Ob)* – dieta hiperlipídica indutora de obesidade (DIO) e *Obeso + glúten (ObG)* – DIO acrescida de 4,5% de glúten de trigo.

O acompanhamento da evolução da obesidade foi feito pela monitoração semanal do ganho de peso e peso dos sítios de tecido adiposo visceral (epididimal) e subcutâneo (inguinal), retirados ao final do experimento.

A ingestão alimentar foi quantificada a cada semana, por meio do cálculo da diferença entre o peso da dieta ofertada e do resto não consumido. O valor final foi ajustado pelo número de animais por gaiola e apresentado em calorias por dia.

Ao final das oito semanas do experimento, os animais foram submetidos à análise do consumo de oxigênio por calorimetria indireta ou receberam glúten radiomarcado com tecnécio ($^{99m}\text{Tc-GLU}$) para estudo da absorção intestinal e biodistribuição. Posteriormente, uma gota de sangue da veia caudal foi coletada para análise da glicemia e procedeu-se a eutanásia para retirada de sangue, fígado, trato gastrointestinal (estômago, intestino delgado e cólon), tecido adiposo visceral (epididimal – TAV), subcutâneo (inguinal – TAS) e marrom (interescapular – TAM). As etapas do desenho experimental estão resumidas na Figura 6. Os órgãos foram armazenados a -70°C para análises posteriores. O sangue destinado a outras análises foi coletado pelo plexo inguinal. O tempo de jejum divergiu dependendo do objetivo de cada experimento. A eutanásia se deu por deslocamento cervical após anestesia intraperitoneal com solução de cetamina (70mg/kg) e xilazina (15mg/kg), conforme preconizado pelo CEUA/UFMG (Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG).

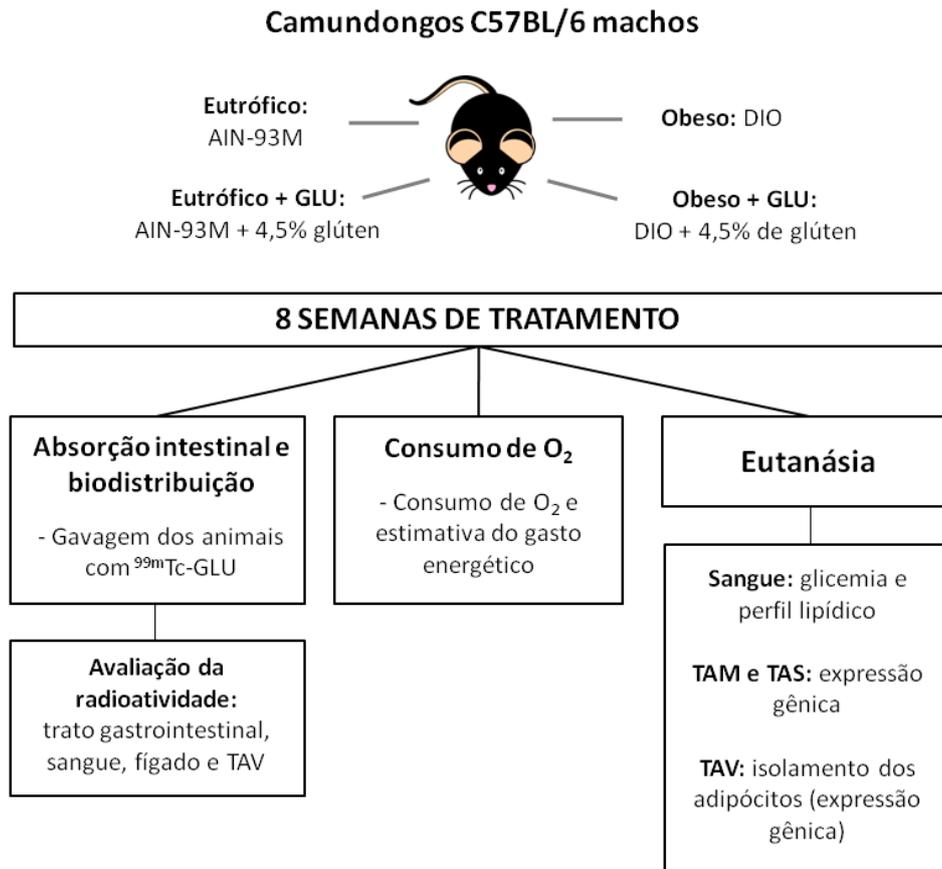


Figura 6: Desenho experimental

Etapas do desenho experimental: camundongos C57BL/6 machos foram divididos em quatro grupos: Eutrófico (Eut), Eutrófico + glúten (EutG); Obeso (Ob) e Obeso + glúten (ObG). Após as oito semanas de tratamento, os animais foram submetidos à análise do consumo de oxigênio por calorimetria indireta ou receberam glúten radiomarcado com tecnécio (^{99m}Tc-GLU) para estudo da absorção intestinal e biodistribuição. Procedeu-se a eutanásia para retirada de sangue, fígado, trato gastrointestinal (estômago, intestino delgado e cólon), tecido adiposo visceral (epididimal – TAV), subcutâneo (inguinal – TAS) e marrom (interescapular – TAM).

6.2 Absorção intestinal e cinética da biodistribuição do glúten de trigo

Radiomarcção do glúten de trigo com tecnécio ^{99m}Tc -GLU)

Previamente foi demonstrado que a ingestão do glúten de trigo aumentou o ganho de peso e a adiposidade através da redução da mobilização e oxidação de ácidos graxos e aumento dos depósitos lipídicos. No entanto, não estava claro se o glúten ou seus peptídeos poderiam atingir a circulação sistêmica e órgãos periféricos para exercer esses efeitos. Portanto, estudou-se a cinética de absorção intestinal e a biodistribuição por meio da administração da proteína marcada com o radionuclídeo tecnécio ^{99m}Tc .

Previamente foram realizados diversos testes com o objetivo de definir os melhores padrões de marcação. Ao final, utilizou-se a proteína hidrolisada do glúten de trigo (HyPep Protein Hydrolysate from wheat gluten – Sigma #H6784) e o ^{99m}Tc na forma de pertecnato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) foi obtido do gerador de ^{99}Mo molibdênio/ ^{99m}Tc tecnécio (IPEN/CNEN, São Paulo, Brasil). A radiomarcção da proteína hidrolisada de glúten de trigo (GLU) e posterior determinação do rendimento de radiomarcção foram baseadas em metodologias propostas por Faintuch et al. (122) e de Barros et al. (123).

Brevemente, em um frasco, ácido etilenodiaminodiacético (EDDA) (5mg) e tricina (20mg) foram solubilizados em 0,5 mL de salina (NaCl 0,9%). Em seguida, adicionou-se 10 μg da proteína hidrolisada de glúten de trigo e 50 μL de solução de SnCl_2 em HCl 0,25 N (1mg/mL) e o pH foi ajustado para 7, utilizando-se solução aquosa de NaOH 0,1 N. Posteriormente, o frasco foi lacrado para realização de vácuo. A seguir, adicionou-se 0,1mL de salina contendo 0,37MBq de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$. A mistura reagente foi mantida em banho-maria fervente (100°C) por 15 minutos e resfriada a temperatura ambiente. O volume final foi completado com salina em quantidade suficiente para 1mL.

*Determinação do rendimento e qualidade da radiomarcção *in vitro* e *in vivo**

O rendimento de radiomarcção *in vitro* foi determinado por cromatografia em camada delgada. Utilizou-se como fase estacionária a sílica-gel e como fases móveis a metiletilcetona e a acetonitrila:água (1:1), para a determinação do percentual de tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e de tecnécio hidrolisado ($^{99m}\text{TcO}_2$), respectivamente. O rendimento de radiomarcção foi determinado por meio da fórmula representada a seguir:

$$\%^{99m}\text{Tc-GLU} = 100 - (\%^{99m}\text{TcO}_4^- + \%^{99m}\text{TcO}_2)$$

Imagens cintilográficas foram realizadas com intuito de confirmar o resultado de pureza de radiomarcção obtido pela cromatografia em camada delgada e também para verificar a estabilidade do complexo *in vivo*.

Para isso, camundongos C57BL/6 sem nenhum tratamento prévio receberam por via oral (gavagem) 5,5 MBq de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (tecnécio livre) (n=2) ou 5,5 MBq de $^{99m}\text{Tc-GLU}$ (n=3). Nos tempos de 1h, 4h e 6h após a administração, os animais foram anestesiados com solução de cetamina e xilazina e, em seguida, colocados em decúbito dorsal sob a gama câmara (NucleineTM TH 22, Hungria). Janela de 20% de simetria foi utilizada para pico de energia de 140keV e colimador de baixa energia foi utilizado para direcionar os raios. As imagens foram obtidas durante 10 minutos e armazenadas em uma matriz 256 x 256 pixels.

Estudo da absorção intestinal e cinética da biodistribuição do glúten de trigo

A cinética de absorção intestinal foi estudada em camundongos C57BL/6, em jejum por cerca de duas horas e sem nenhum tratamento prévio. Os animais receberam por gavagem 100µL de solução de $^{99m}\text{Tc-GLU}$ (5,5MBq) e depois foram divididos em quatro grupos para serem eutanasiados em diferentes tempos: 1h (n=3), 2h (n=2), 4h (n=2) e 6h (n=3) após a administração. Retirou-se todo o trato gastrointestinal (estômago, intestino delgado, cecum e cólon) que foi colocado sob a gama câmara (NucleineTM TH 22, Hungria) para obtenção de imagens cintilográficas de dez minutos usando matriz de 256 x 256 pixels.

Para os estudos de biodistribuição, os camundongos C57BL/6 machos foram divididos em dois grupos: *Eutrófico + glúten (EutG)* que recebeu dieta AIN-93M acrescida de 4,5% de glúten de trigo e *Obeso + glúten (ObG)* que recebeu DIO acrescida de 4,5% de glúten de trigo.

Ao final das oito semanas de tratamento, os animais foram submetidos a jejum de cinco a seis horas e receberam 5,5MBq de $^{99m}\text{Tc-GLU}$ por gavagem. Em tempos pré-estabelecidos (30 minutos, 1 hora e 2 horas após a administração do glúten marcado) os animais foram anestesiados para coleta de sangue e, em seguida, eutanasiados por deslocamento cervical para coleta de fígado e tecido adiposo visceral (epididimal). Em cada tempo avaliado foram utilizados seis a sete animais por grupo.

O sangue, o tecido adiposo visceral e o fígado foram retirados, pesados e tiveram a radioatividade determinada por contador gama (Wizard, Finlândia). Padrões de dose contendo a mesma quantidade de radioatividade administrada nos animais foram utilizados para corrigir o decaimento físico e para calcular o percentual da dose administrada.

Os resultados foram expressos como percentual da dose administrada por grama de tecido (% Dose/g), calculados pela seguinte equação:

$$\% \text{ Dose/g} = \frac{\text{cpm/g de órgão}}{\text{cpm da dose padrão}} \times 100 \quad \text{cpm} = \text{contagem por minuto}$$

6.3 Experimentos *in vivo*

Avaliação do perfil lipídico e glicemia

A glicemia foi avaliada em glicosímetro portátil. Após jejum *overnight* uma gota de sangue da veia caudal do animal foi coletada e a dosagem da glicemia foi realizada no aparelho Accu-Check Performa (Roche Diagnostics, USA).

O perfil lipídico dos animais foi avaliado por dosagem dos níveis séricos de colesterol total, HDL-colesterol e triacilglicerol. O sangue foi coletado pelo plexo inguinal, após jejum *overnight* e armazenado em microtubos sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas a 6.000rpm durante 5 minutos para a separação do soro e armazenadas sob refrigeração (2 a 8°C). As análises foram realizadas utilizando kits enzimáticos comerciais (Labtest, Brasil), em até 24h após a coleta, conforme descrito a seguir.

Colesterol total

Os níveis de colesterol total foram medidos de acordo com o método da colesterol oxidase, que consiste na hidrólise de ésteres de colesterol pela enzima colesterol esterase liberando colesterol livre (124). Na presença da colesterol oxidase e oxigênio, a reação com o colesterol livre produz peróxido de hidrogênio. Este, por sua vez, reage com 4-aminoantipirina e fenol formando antipirilquinonimina. Este composto apresenta coloração vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de colesterol na amostra.

A concentração do colesterol total foi determinada por ensaio em microplaca de 96 poços. As amostras de soro (5µL) foram diluídas em água deionizada (1:50) e 100µL de reagente de colesterol total foram adicionados a 100µL do soro diluído ou padrão, em duplicata. Após incubação por 15 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 490nm em leitor de microplaca (Spectra MaxPlus, Molecular Devices). O resultado final foi obtido mediante determinação da curva dos padrões e sua equação, e a relação desta com a absorbância das amostras e as diluições utilizadas.

HDL-colesterol

O princípio do método para determinação do HDL baseia-se na precipitação das lipoproteínas LDL e VLDL por agentes precipitantes (ácido fosfotúngstico e cloreto de

magnésio). Após centrifugação a 12.000rpm por 4 minutos, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade é determinado no sobrenadante.

A microplaca de 96 poços foi montada colocando-se 10µL do sobrenadante e 10µL do reagente padrão, em duplicata. Após incubação por 15 minutos a 37°C, a absorbância foi lida a 490nm (Spectra MaxPlus, Molecular Devices). Para a determinação do padrão foram substituídos 10µL de sobrenadante de amostra por 10µL de padrão de HDL. O cálculo das concentrações de HDL (mg/dL) foi feito multiplicando-se a absorbância média da amostra pelo fator de calibração, sendo este calculado pela seguinte equação:

$$\text{Fator de Calibração} = 40/\text{média da Absorbância do Padrão}$$

Triacilglicerol

As concentrações de triacilglicéris séricos foram medidas por ensaio enzimático colorimétrico (125). O método baseia-se na hidrólise dos triglicéridos pela lipase lipoproteica, produzindo glicerol e ácidos graxos livres. O glicerol é fosforilado pela enzima glicerol quinase, cujo produto sofre ação da glicerol-3-fosfato oxidase, liberando o peróxido de hidrogênio. Sob ação da peroxidase em presença de reagente fenólico (4-clorofenol) e 4-aminoantipirina o peróxido é convertido em quinoneimina, sendo este de cor rósea avermelhado com máximo de absorção a 510nm.

As amostras de soro (5µL) foram diluídas em água deionizada (1:25), afim de que as leituras de absorbância fossem adequadas à variação linear do teste. O reagente de cor (100µL) foi adicionado a 100µL do soro diluído. Após período de incubação de 15 minutos a 37°C a absorbância foi lida a 490nm em um leitor de microplaca (Spectra MaxPlus, Molecular Devices).

O resultado final foi obtido mediante determinação da curva dos padrões e sua equação, e a relação desta com a absorbância das amostras e as diluições utilizadas.

Consumo de oxigênio e estimativa do gasto energético

O gasto energético foi estimado por monitoração do consumo de oxigênio (VO₂) e liberação de dióxido de carbono (VCO₂) mensurados por calorímetro indireto (LE405 Gas Analyzer, Panlab Harvard Apparatus, Espanha).

Após as oito semanas do tratamento dietético, os camundongos foram pesados e individualmente colocados no interior da câmara de gás, onde permaneceram durante 50 minutos, sem qualquer influência externa. O VO₂ foi avaliado a cada minuto, por meio do software Metabolism Harvard Apparatus (Espanha). Os 20 minutos finais de registro foram utilizados para a análise, enquanto os 30 minutos iniciais foram descartados para garantir a condição de repouso do animal (após o stress do manejo) e evitar a interferência de gases do ambiente externo no interior da câmara do aparelho (O₂ e CO₂). O calorímetro foi calibrado antes de cada utilização, com mistura certificada de gases.

O VO₂ foi avaliado em duas condições: em jejum *overnight* (n=9 a 15 por grupo) e no estado alimentado (n=5 a 6 por grupo). Todos os experimentos foram realizados durante o mesmo período de tempo para evitar variações circadianas (jejum: 8:00 às 12:00 e estado alimentado: 12:00 às 16:00) e a temperatura da sala foi controlada a 25 ± 1°C.

Os valores do consumo de oxigênio (VO₂) e o quociente respiratório (QR=VCO₂/VO₂) foram utilizados para estimar o gasto energético diário (GE), através da equação, GE = (3,815 + (1,232 x QR)) x VO₂ x 1,44.

Análise da expressão gênica

Para a análise da amplificação do mRNA dos genes de interesse, os tecidos foram retirados do animal, imediatamente colocados em tubo eppendorf livre de RNase e congelados em nitrogênio líquido antes de serem armazenados a -70°C. Posteriormente, os tecidos foram submetidos a três etapas: 1. Extração do RNA; 2. Síntese do cDNA e 3. Amplificação do cDNA por qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa).

Extração do RNA

Para extração do RNA, 50 a 100mg do tecido adiposo marrom ou 200 a 300mg do tecido adiposo subcutâneo foram homogeneizados com 1mL de trizol (Trizol Reagent, Invitrogen #15596). Devido ao alto conteúdo lipídico, após a homogeneização o tecido adiposo subcutâneo foi centrifugado a 13.000rpm, 4°C por 10 minutos e o sobrenadante descartado.

Foram adicionados 200µL de clorofórmio, os tubos foram agitados vigorosamente por 30 segundos, incubados a temperatura ambiente por 5 minutos e novamente centrifugados a 13.000rpm, 4°C por 15 minutos. A fase superior foi transferida para outro tubo contendo

500µL de isopropanol e misturadas por inversão durante um minuto. Em seguida, os tubos foram incubados a -70°C por 90 minutos, para precipitação do RNA.

As amostras foram, então, centrifugadas a 13.000rpm, a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet formado lavado com 1mL de etanol 75%. Após centrifugação por 10 minutos sob as mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e o procedimento de lavagem e centrifugação repetidos.

Novamente desprezou-se o sobrenadante e o pellet foi seco em temperatura ambiente por cerca de 15 minutos. Depois de seco, o pellet foi ressuspenso em água e incubado em banho-maria a 55°C por 10 minutos. Espectrofotômetro foi utilizado para determinação da concentração (ng/µL) e da pureza do RNA (por meio da razão 260/280) (Spectrophotometer ND-1000). Todos os materiais utilizados, incluindo microtubos, ponteiras e água foram livres de RNase e DNase.

Síntese do cDNA

Para a síntese do cDNA, o RNA extraído de cada amostra foi transcrito em cDNA por meio da transcriptase reversa (MMLV RT). Um micrograma do RNA foi diluído em 5µL de água livre de RNase e DNase. Adicionou-se 0,5µL de Oligo(dT)15 primer (Promega #C1101) e 1,25µL de água. Após homogeneização com a pipeta, os tubos foram colocados em termociclador a 72°C por 5 minutos (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems).

Em seguida, 3,25µL do mix contendo 0,5µL de M-MLV RT (Promega #M1705), 2µL de M-MLV 5x tampão, 0,5µL de dNTP Mix (Promega #U1515), 0,1µL de RNAsin (Ribonuclease inhibitor, Promega #N2511) e 0,25µL de água foram adicionados. Os tubos foram novamente colocados no termociclador a 42°C por três horas e, em seguida, 72°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior amplificação pela técnica de qPCR.

Amplificação do cDNA por PCR quantitativa (qPCR)

O cDNA sintetizado foi amplificado pela técnica de qPCR, utilizando primers específicos. As amostras foram diluídas em água livre de RNase (1:10) e 2,5µL foram adicionados à 7,5µL do mix em placa de 96 poços específica para qPCR. O mix foi composto de 0,75µL de primer forward, 0,75µL de primer reverse, 1µL de água e 5µL de Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems #4367659).

A análise foi feita em máquina específica (ABiPrism – 7900HT Sequence Detection System) e analisados o programa SDS 2.4. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e

a quantidade de mRNA normalizada pelo GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). Os valores foram expressos em quantidade de gene amplificado em comparação ao grupo controle ($2^{-\Delta\Delta CT}$). A curva de dissociação indicou que um único produto de amplificação foi obtido em cada reação. A Tabela 4 mostra a sequência de nucleotídeos de cada primer utilizado.

Tabela 4: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para qPCR no tecido adiposo marrom e tecido adiposo subcutâneo

Gene	Sequência forward	Sequência reverse
GAPDH	CTCAAGATTGTCAGCAATGC	CAGGATGCCCTTTAGTGGGC
BMP7	CAGCCTGCAAGATAGCCATT	AATCGGATCTCTTCCTGCTC
PRDM16	CAGCACGGTGAAGCCATTC	GCGTGCATCCGCTTGTG
PGC-1 α	GTCAACAGCAAAAAGCCACAA	TCTGGGGTCAGAGGAAGAGA
UCP1	GTGAACCCGACAACCTCCGAA	TGCCAGGCAAGCTGAAACTC

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; BMP7 – Proteína Morfogenética Óssea 7; PRDM16: PR domínio contendo 16; PGC-1 α – Coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1- alfa; UCP1 – Proteína desacopladora 1

6.4 Experimentos *in vitro*

Desenho experimental, extração e isolamento dos adipócitos

Os adipócitos do tecido adiposo visceral (TAV) foram isolados para avaliação da expressão de moléculas relacionadas ao metabolismo lipídico e à homeostase de adipocinas. Para isso, após as oito semanas de tratamento oral, os camundongos dos quatro grupos (Eut, EutG, Ob e ObG) foram eutanasiados para retirada do tecido adiposo epididimal (visceral) e isolamento dos adipócitos deste tecido. Posteriormente, os adipócitos foram incubados em meio de cultura por 2 horas e tiveram a análise da expressão gênica realizada por qPCR (Figura 7).

O isolamento dos adipócitos foi baseado nas etapas descritas por Rodbell (126). Cerca de 1g do TAV foi removido de forma estéril, em fluxo laminar e, quando necessário, foi feito pool do TAV de dois ou mais animais no mesmo grupo. O tecido foi incubado para digestão com 4mg de colagenase (Sigma #C6885) solubilizada em 3mL de tampão de digestão por 40 minutos, a 37°C, sob agitação contínua (tampão de digestão: 4% de albumina livre de ácidos graxos e 0,1% de glicose solubilizados em DMEM incompleto específico para cultura de adipócitos).

Ao término do período de incubação as células foram filtradas em tela de nylon estéril e lavadas três vezes com meio DMEM completo específico para cultura de adipócitos, para remoção da colagenase e outros debris celulares. Entre cada etapa de lavagem, centrifugou-se a 500rpm, 4°C, por 3 minutos e descartou-se o infranadante. Os adipócitos isolados foram, então, ressuspensos na proporção de 1g de tecido para cerca de 6mL de DMEM completo específico para cultura de adipócitos. Foi realizada avaliação em câmara de Neubauer para a contagem de células viáveis ($1,4 \times 10^6$ a $1,0 \times 10^7$ células/mL).

A solução contendo os adipócitos isolados (1mL) foi colocada em meio de cultura DMEM completo específico para cultura de adipócitos (1mL) em placa de 24 poços. As análises foram realizadas em duplicatas e a placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂, por 2 horas. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 500rpm, 4°C por 3 minutos, parte do infranadante (1,6mL) foi retirado e a placa armazenada a -70°C para posterior extração do RNA e análise da expressão gênica.

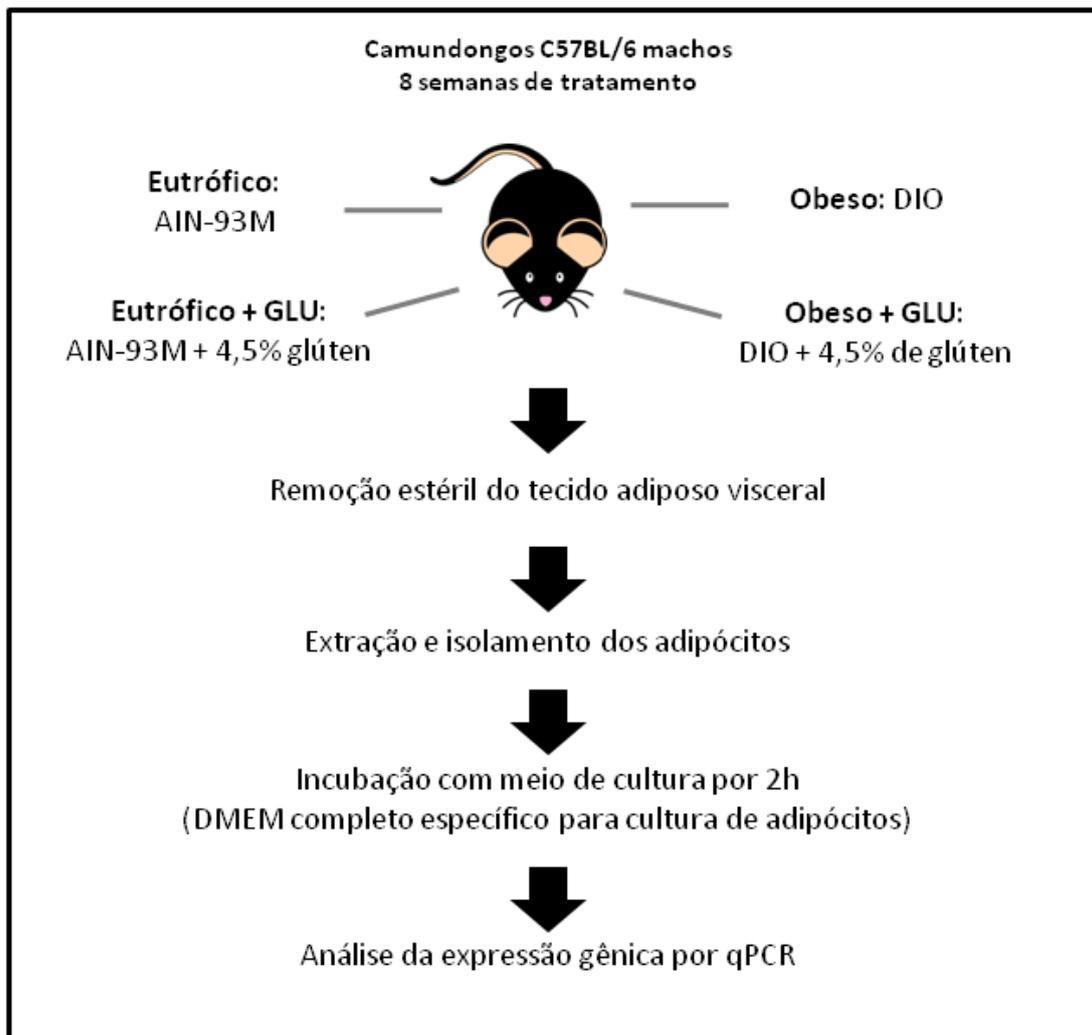


Figura 7: Desenho experimental e etapas do isolamento de adipócitos do TAV para análise da expressão gênica

TAV: tecido adiposo visceral (epididimal); DIO: dieta hiperlipídica indutora de obesidade. Eut (dieta AIN-93M). EutG (dieta AIN-93M + glúten de trigo). Ob (DIO). ObG (DIO + glúten de trigo).

Análise da expressão gênica dos adipócitos isolados

A análise da amplificação de mRNA dos adipócitos isolados conforme descrito previamente foi realizada em três etapas: 1. Extração do RNA; 2. Síntese do cDNA e 3. Amplificação do cDNA por qPCR.

Para a extração do RNA total, 1mL de Trizol (Trizol Reagent, Invitrogen #15596) foi adicionado no poço da placa de cultura, o conteúdo foi homogeneizado com pipeta e transferido para o outro poço da duplicata. Após nova homogeneização, transferiu-se o

conteúdo para microtubo onde se seguiram as mesmas etapas descritas para extração do RNA em tecidos.

A síntese do cDNA e a sua amplificação foram realizadas de acordo com o protocolo relatado para tecidos. Devido à menor concentração de RNA obtida na extração dos adipócitos isolados, a síntese do cDNA foi realizada com 1µg diluídos em 10µL de água e dobrou-se as concentrações dos reagentes. A Tabela 5 mostra a sequência de nucleotídeos de cada primer utilizado na amplificação, sendo a quantidade de mRNA normalizada pelo GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase).

Tabela 5: Sequência de nucleotídeos dos primers utilizados para a qPCR nos adipócitos isolados do TAV

Gene	Sequência foward	Sequência reverse
GAPDH	CTCAAGATTGTCAGCAATGC	CAGGATGCCCTTTAGTGGGC
IL-6	ACAACCACGGCCTTCCCTACTT	CACGATTTCCCAGAGAACATGTG
TNF	CGTCGTAGCAAACCACCAAG	GAGATAGCAAATCGGCTGACG
Leptina	CCTGTGGCTTTGGTCCTATCTG	AGGCAAGCTGGTGAGGATCTG
Adiponectina	AGTTGGATGGCAGGC	GTCTCACCCCTAGGACCAAGAA
PPAR α	TACCACTATGGAGTCCACGCATGT	TTGCAGCTTCGATCACACTTGTCG
PPAR γ	ACAGACAAGATTTGAAAGAAGCGGTGA	TCCGAAGTTGGTGGGCCAGA
LPL	AGTCTGGCCTCGAACTAACTATGTAT	TCCCAGGACACAGGAAGCTAA
LHS	ACCGAGACAGGCCTCAGTGTG	GAATCGGCCACCGGTAAAGAG
CPT1b	TCCCAGGCAAAGAGACAGACTTGC	GCAGGCGCGAGCCCTCATAG

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; IL-6 – Interleucina 6; TNF – Fator de necrose tumoral; PPAR – Receptor ativado por proliferadores de Peroxissomos); LPL – Lipase lipoproteica; LHS – Lipase hormônio-sensível; CPT1b – Carnitina palmitoil transferase 1.

6.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5.0. A normalidade foi avaliada pelo teste de D'Agostino-Pearson ou Kolmogorov-Sminorv quando o n foi menor que 8 e a presença de *outliers* foi detectada pelo teste de Grubbs.

Os dados que assumiram a distribuição normal foram submetidos ao teste t de Student ou One-way ANOVA, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls e os resultados foram apresentados pela média e erro padrão. Os dados não-paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn's e os resultados apresentados pela mediana e intervalo interquartil. O nível de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$).

6.6 Questões éticas

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) sob o protocolo de número 05/2013 e adendo 05/2015.

7. RESULTADOS

7.1 Absorção intestinal e cinética da biodistribuição do glúten de trigo radiomarcado com tecnécio ($^{99m}\text{Tc-GLU}$)

Rendimento de radiomarcção e estabilidade da ligação $^{99m}\text{Tc-GLU}$

Para controle da qualidade da marcação e estabilidade da ligação do ^{99m}Tc com a proteína hidrolisada do glúten de trigo foram realizadas análises de rendimento e obtenção de imagens cintilográficas em gama câmara.

O rendimento de radiomarcção do complexo $^{99m}\text{Tc-GLU}$, determinado por cromatografia em camada delgada, foi superior a 90% ($92,3 \pm 2,1\%$). Isto denota concentrações aceitáveis das impurezas radioquímicas $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (tecnécio livre) e $^{99m}\text{TcO}_2$ (tecnécio hidrolisado) conforme descrito pela Farmacopeia Americana (127) .

Os átomos de tecnécio livres apresentam características semelhantes ao íon iodeto e, uma vez na circulação, são captados pela tireoide aumentando substancialmente os níveis de radioatividade neste órgão (128). Portanto, as imagens cintilográficas dos animais vivos obtidas pela gama câmara representam maneira de avaliar a estabilização da ligação entre os átomos de tecnécio e o glúten de trigo hidrolisado.

Os animais gavados com $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (tecnécio livre) ou $^{99m}\text{Tc-GLU}$ foram colocados sob a gama câmara (Figura 8A) para obtenção das imagens nos tempos de 1h, 4h e 6h. Nas imagens realizadas *in vivo* com animais que receberam tecnécio livre, observa-se forte marcação da tireoide (Figura 8B-D), enquanto a ausência deste órgão nas imagens de animais que receberam o composto $^{99m}\text{Tc-GLU}$ indica que não há radioatividade livre e garante a estabilidade da marcação (Figura 8E-G). Desta forma, pôde-se certificar que a biodistribuição avaliou o glúten hidrolisado de trigo marcado e não o tecnécio livre.

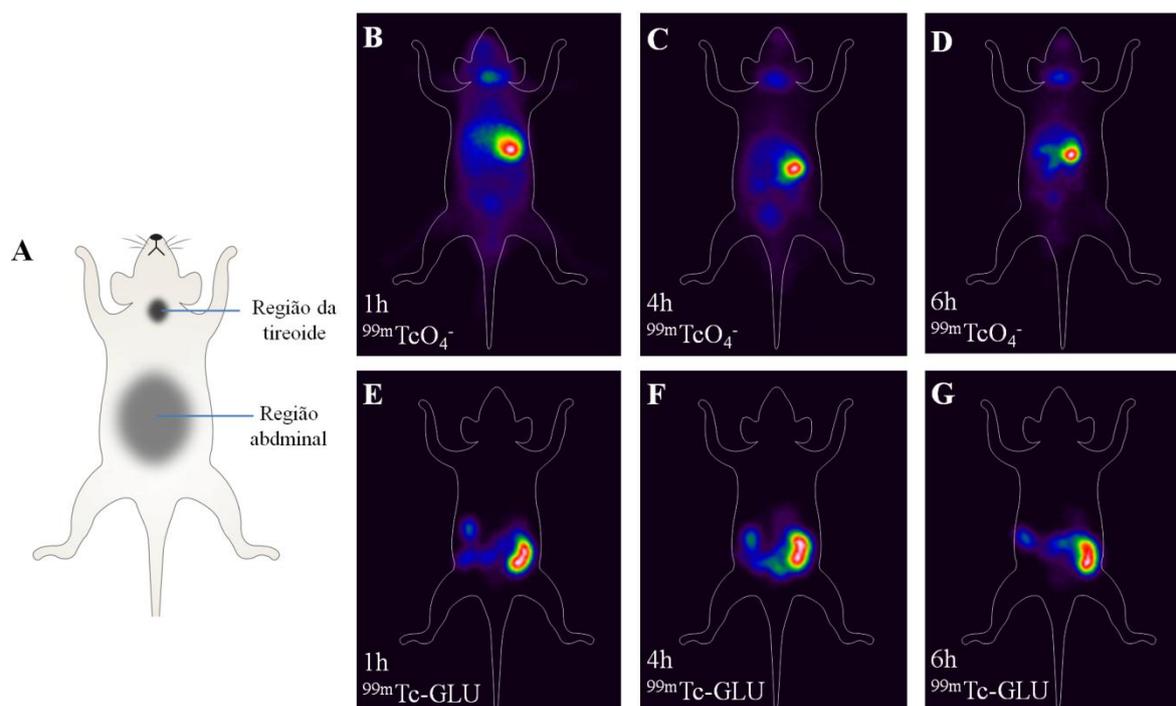


Figura 8: Imagens cintilográficas *in vivo* obtidas em gama câmara

A – Figura esquemática representando a disposição do animal vivo usado para realização das imagens. B – D: Imagens cintilográficas obtidas em gama câmara (Nucleine™ TH 22, Hungria) realizadas 1h (B), 4h (C) e 6h (D) após gavagem de 5,5 MBq de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (tecnécio livre) (n=2). E – G: Imagens cintilográficas obtidas em gama câmara realizadas 1h (E), 4h (F) e 6h (G) após gavagem de 5,5MBq de $^{99m}\text{Tc-GLU}$ (n=3).

Absorção intestinal e biodistribuição do glúten de trigo

A absorção intestinal do composto $^{99m}\text{Tc-GLU}$ foi observada em diferentes tempos. O trato gastrointestinal, incluindo estômago, intestino delgado e cólon, foi disposto conforme esquematizado na Figura 9A e as imagens foram obtidas em gama câmara.

Observou-se que 1h após a administração do $^{99m}\text{Tc-GLU}$ parte do conteúdo administrado ainda se encontrava no estômago e o restante estava na porção distal do intestino delgado. Com o passar do tempo, o glúten marcado foi gradativamente absorvido: após 2h a fração não absorvida alcançou o íleo e cecum e 4h e 6h após a gavagem, o glúten foi detectado exclusivamente no cólon, representando a fração não digerida ou não absorvida (Figura 9B–E).

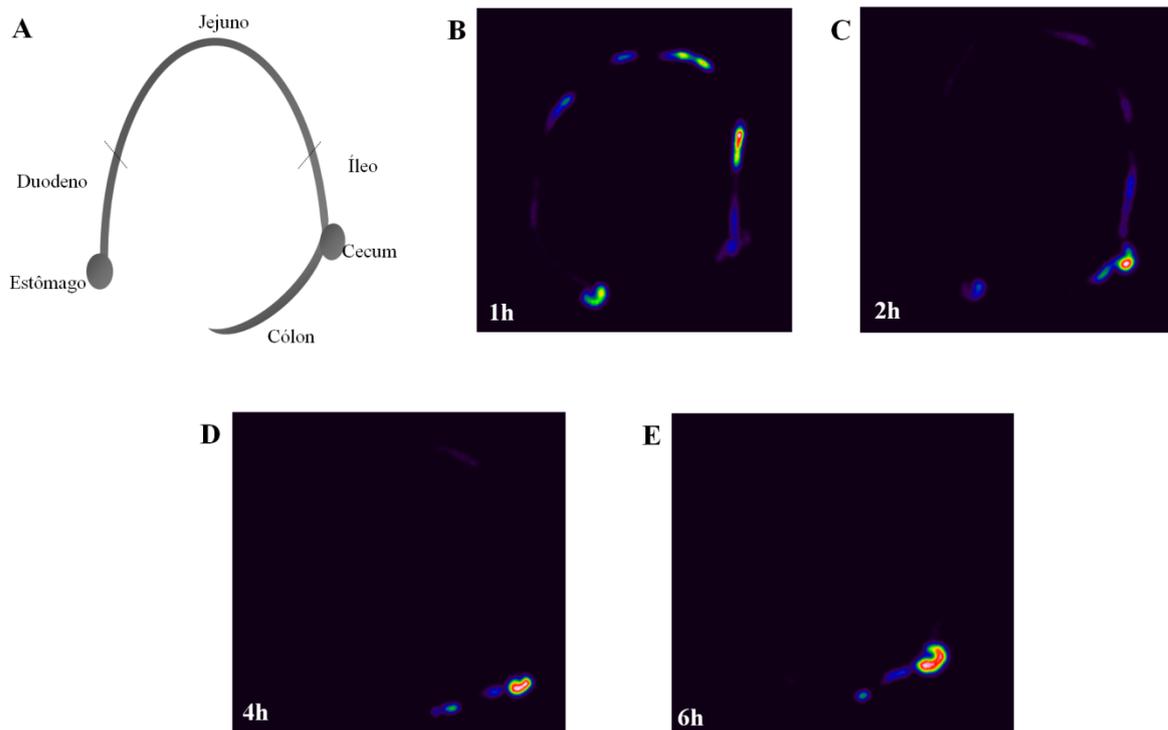


Figura 9: Imagens cintilográficas do trato gastrointestinal obtidas em gama câmara

A – Figura esquemática representando a disposição do trato gastrointestinal usado para realização das imagens. B – E: Imagens cintilográficas obtidas em gama câmara (Nucleine™ TH 22, Hungria) realizadas 1h (B), 2h (C), 4h (D) e 6h (E) após gavagem de 5,5MBq ^{99m}Tc -GLU (n=2-3).

A análise da biodistribuição do glúten de trigo teve como objetivo principal verificar se o glúten ou seus peptídeos poderiam atingir a circulação sistêmica e órgãos envolvidos na gênese da obesidade e no metabolismo lipídico. Ao final das oito semanas de tratamento, os animais eutróficos (EutG) e obesos (ObG) receberam por gavagem glúten de trigo radiomarcado com tecnécio (^{99m}Tc -GLU).

Os resultados da biodistribuição mostraram que 30 minutos após administração o glúten foi detectado no sangue e fígado dos animais, o que indica metabolização hepática da proteína. Embora presente em menor quantidade, pôde-se observar que o glúten também atingiu o tecido adiposo visceral, sugerindo uma possível ação direta da proteína sobre os componentes celulares deste tecido (Tabela 6). Perfil semelhante foi visto tanto em animais eutróficos quanto obesos.

Tabela 6: Biodistribuição do glúten radiomarcado com tecnécio (^{99m}Tc -GLU) nos tecidos corporais 30min, 1h e 2h após gavagem

	EutG (%dose/g)			ObG (%dose/g)		
	30 min	1h	2h	30 min	1h	2h
Sangue	2,36±0,16 ^a	2,09±0,19 ^a	1,57±0,14 ^b	1,59±0,17	2,53±0,23	1,74±0,07
Fígado	2,23±0,12	2,69±0,43	2,31±0,49	1,25±0,14 ^a	2,07±0,28 ^b	2,04±0,23 ^b
TAV	0,21±0,03	0,20±0,02	0,14±0,02	0,12±0,02	0,17±0,03	0,10±0,02

TAV (Tecido adiposo visceral). n=6/6/7. Resultados expressos como média ± erro padrão. Teste One-way ANOVA e post-test Newman-Keuls entre os tempos ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística (no mesmo grupo entre os tempos). EutG (dieta AIN-93M + glúten de trigo); n= 7/6/7. ObG (DIO + glúten de trigo).

Ao se avaliar a cinética de absorção e biodistribuição do glúten, observou-se que apesar de inicialmente a absorção ter sido mais lenta nos animais obesos (30min), tornou-se estatisticamente semelhante após 1h e 2h da administração. Como resultado, o total do ^{99m}Tc -GLU detectado no sangue, fígado e TAV foi similar entre os grupos EutG e ObG, conforme demonstrado pela cálculo da área sob a curva (Figura 10).

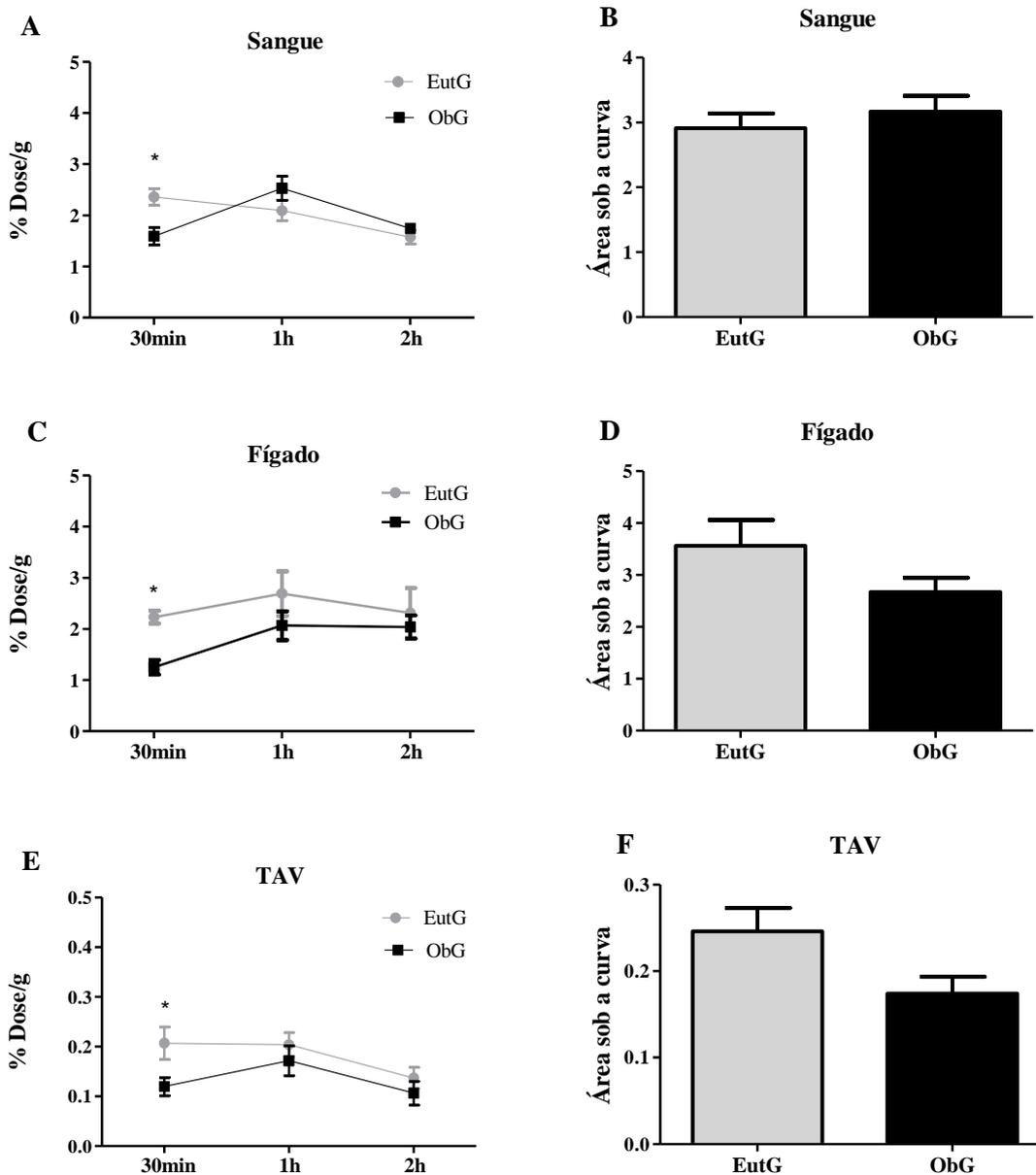


Figura 10: Cinética de absorção do $^{99m}\text{Tc-GLU}$ e cálculo da área sob a curva para sangue, fígado e tecido adiposo visceral

A, C e E – Cinética de absorção do $^{99m}\text{Tc-GLU}$ 30min, 1h e 2h após gavagem no sangue, fígado e TAV, respectivamente. B, D e F – Cálculo da área sob a curva para sangue, fígado e TAV, respectivamente. TAV: Tecido adiposo visceral (epididimal). n=6/6/7. Resultados expressos como média \pm erro padrão. Teste t de Student, *p<0,05. EutG (dieta AIN-93M + glúten de trigo); n= 7/6/7. ObG (DIO + glúten de trigo).

7.2 Experimentos *in vivo*

Ingestão alimentar e ganho de peso

Primeiramente objetivou-se investigar os efeitos da inclusão do glúten de trigo na dieta sobre a ingestão alimentar e ganho de peso de animais eutróficos e obesos. A ingestão alimentar foi estatisticamente menor nos grupos eutróficos (Eut e EutG) quando comparado aos grupos obesos (Ob e ObG) que receberam dieta hiperlipídica com maior densidade energética. A adição de glúten a 4,5% não alterou a ingestão calórica em nenhuma das duas dietas (AIN-93M ou DIO) (Figura 11).

Como esperado, os animais que receberam dieta hiperlipídica apresentaram maior ganho de peso, confirmando o desenvolvimento da obesidade. Ao se avaliarem os efeitos da inclusão do glúten, constatou-se que apesar da ingestão calórica semelhante, os animais que consumiram glúten de trigo apresentaram maior ganho de peso, tanto nos grupos eutróficos quanto nos obesos. Também foi observado aumento do tecido adiposo visceral (TAV) e do tecido adiposo subcutâneo (TAS), considerando o peso absoluto ou o peso relativo, em percentual do tecido em relação ao peso corporal final (Figura 12).

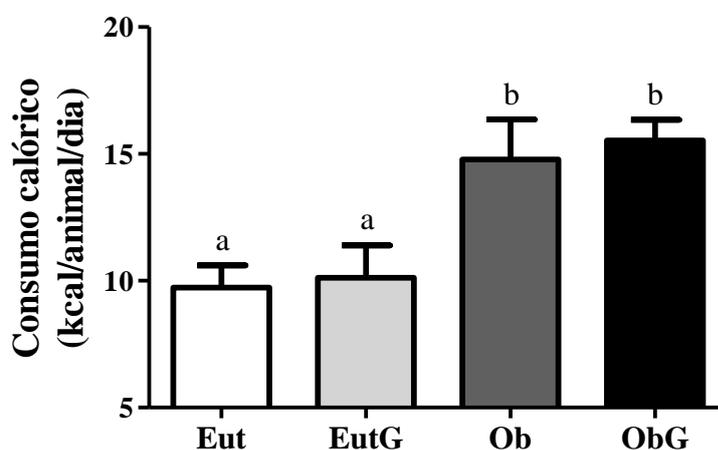


Figura 11: Ingestão calórica (kcal/animal/dia)

Ingestão calórica estimada por gaiolas, em calorias por animal por dia. n=12/12/20/18 gaiolas. Resultados expressos como mediana \pm intervalo interquartil. Teste Kruskal-Wallis e post-test Dunn's ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferença estatística. Eut (dieta AIN-93M). EutG (dieta AIN-93M + glúten de trigo). Ob (DIO). ObG (DIO + glúten de trigo).

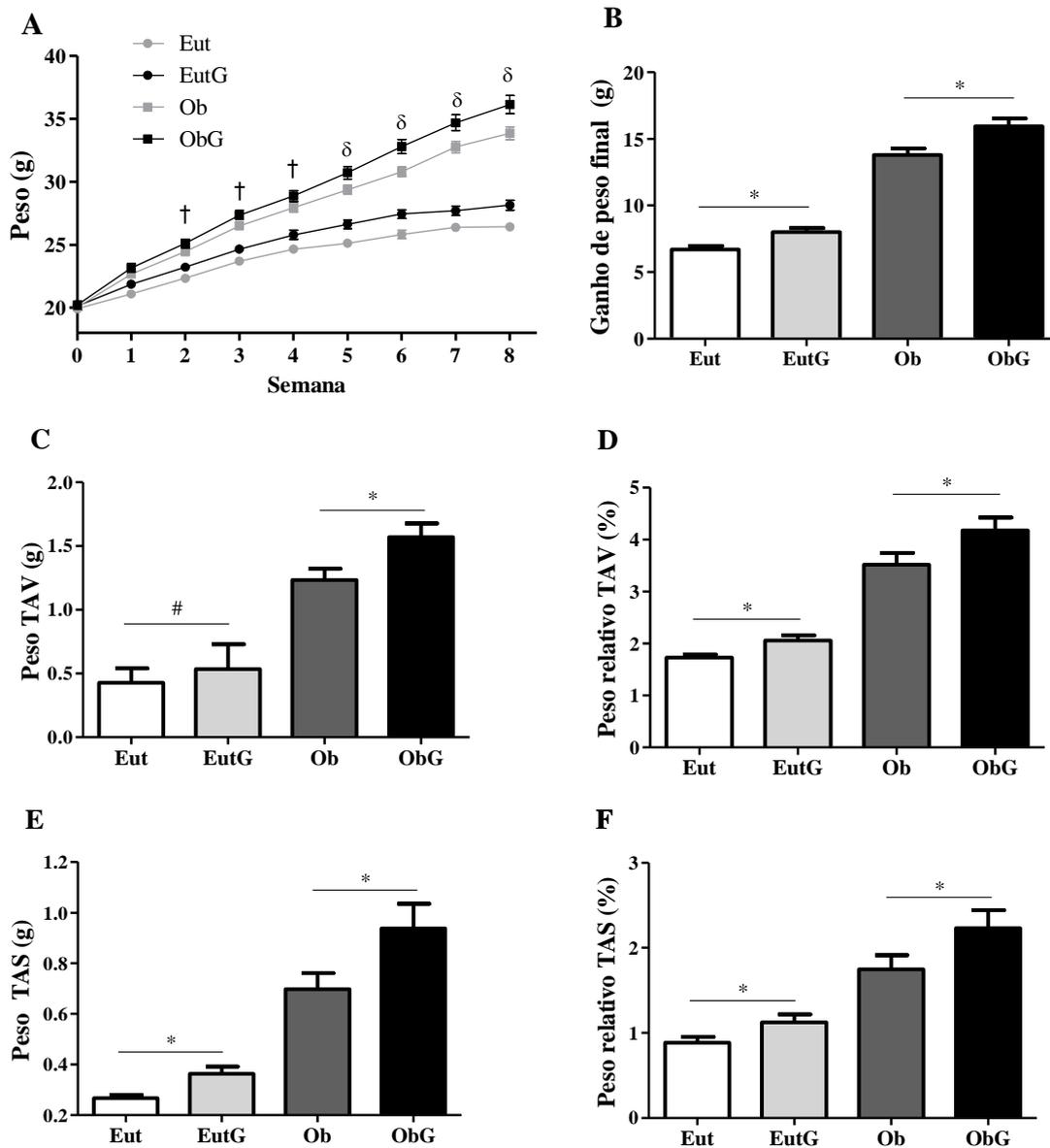


Figura 12: Evolução ponderal, ganho de peso, tecido adiposo visceral (TAV) e tecido adiposo subcutâneo (TAS)

A – Peso corporal (g) em cada semana do período experimental. n= 44/46/43/42. Resultados expressos como média \pm erro padrão. Teste one-way ANOVA e post-test Newman-Keuls ($p < 0,05$). \dagger Diferença significativa entre os grupos eutróficos e obesos; δ diferença significativa entre os quatro grupos. padrão. B – Peso ao final do experimento menos o peso inicial (g). n= 44/46/43/42. C e D – TAV: peso (g) e peso relativo em percentual do TAV em relação ao peso corporal final (%), respectivamente. n= 44/46/43/42. E e F– TAS: peso (g) e peso relativo em percentual do TAS em relação ao peso corporal final (%), respectivamente. n=26/25/25/24. * $p < 0,05$ (Teste t de Student), resultados expressos como média \pm erro padrão. # $p < 0,05$ (Teste Mann-Whitney), resultados expressos como mediana \pm intervalo interquartil. Eut (dieta AIN-93M). EutG (dieta AIN-93M + glúten de trigo). Ob (DIO). ObG (DIO + glúten de trigo).

Perfil lipídico e glicemia

Visando avaliar alterações séricas provocadas pela adição do glúten na dieta, observou-se que a ingestão da proteína não exerceu efeito sobre o perfil lipídico ou a glicemia de jejum. Não foram observadas alterações nas concentrações séricas de glicose, colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 7: Glicemia e perfil lipídico sérico (colesterol total, HDL-colesterol e triacilglicerol)

Parâmetro bioquímico	Grupo experimental			
	Eut	EutG	Ob	ObG
Glicemia (mg/dL)	75,8 ± 2,8	83,4 ± 9,4	121,6 ± 13,1	136,9 ± 16,7
Colesterol total (mg/dL)	124,3 ± 2,1	133,6 ± 3,9	144,2 ± 8,0	151,8 ± 14,2
HDL-colesterol (mg/dL)	101,0 ± 3,5	101,8 ± 2,7	92,2 ± 4,7	106,0 ± 8,4
Triacilglicerol (mg/dL)	37,3 ± 3,1	46,0 ± 4,0	32,8 ± 3,2	37,9 ± 3,7

Glicemia: n= 10/10/9/9. Perfil lipídico: n=12/9/9/9. Resultados expressos como média ± erro padrão. Teste t de Student entre Eut vs. EutG e Ob vs. ObG. Não houve diferença estatística entre os grupos avaliados ($p>0,05$). Eut (dieta AIN-93M). EutG (dieta AIN-93M + glúten de trigo a). Ob (DIO). ObG (DIO + glúten de trigo).

Consumo de oxigênio e estimativa do gasto energético

Como o aumento de peso e adiposidade observado pelos animais que ingeriram glúten não esteve associado a maior ingestão calórica, investigaram-se alterações no gasto energético no jejum e no estado alimentado.

Os resultados da calorimetria indireta mostraram que no estado alimentado não foram detectadas diferenças no consumo de O₂ ou no quociente respiratório tanto nos grupos eutróficos como nos obesos. Da mesma maneira, também não houve diferença na estimativa do gasto energético (Figura 13).

Após jejum *overnight*, menor consumo de oxigênio foi detectado nos grupos alimentados com glúten de trigo, considerando os valores ao longo do tempo. Embora modesta diferença estatística tenha sido observada no grupo EutG, o gasto energético estimado não foi diferente comparando os grupos Eut e EutG. Nos animais ObG, o gasto energético foi reduzido em mais de 10% em comparação aos obesos (Ob). Não foram observadas diferenças no quociente respiratório em nenhum dos grupos (Figura 14).

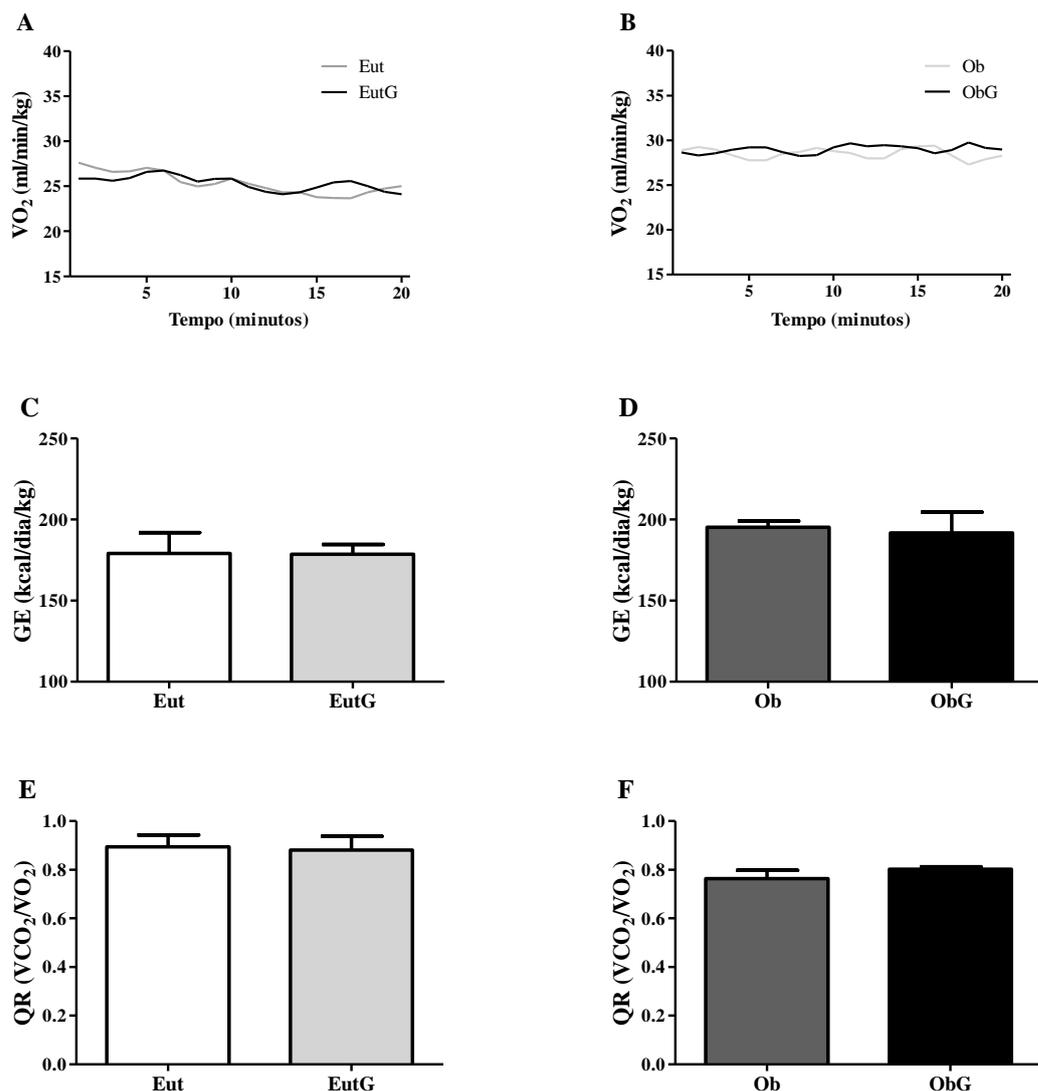


Figura 13: Consumo de oxigênio (VO₂), gasto energético médio (GE) e quociente respiratório (QR) avaliados por calorimetria indireta no estado alimentado

A, B – Consumo de oxigênio (VO₂ – mL/min/kg) dos grupos eutróficos e obesos, respectivamente. Linhas horizontais representam média em cada minuto. Teste t de Student pareado. C, D – Gasto energético médio (kcal/dia/kg) dos grupos eutróficos e obesos, respectivamente. E, F - Quociente respiratório dos grupos eutróficos e obesos, respectivamente. Resultados expressos como média ± erro padrão. Teste t de Student. n=6/5/6/6. Eut (dieta AIN-93M). EutG (dieta AIN-93M + glúten de trigo). Ob (DIO). ObG (DIO + glúten de trigo).

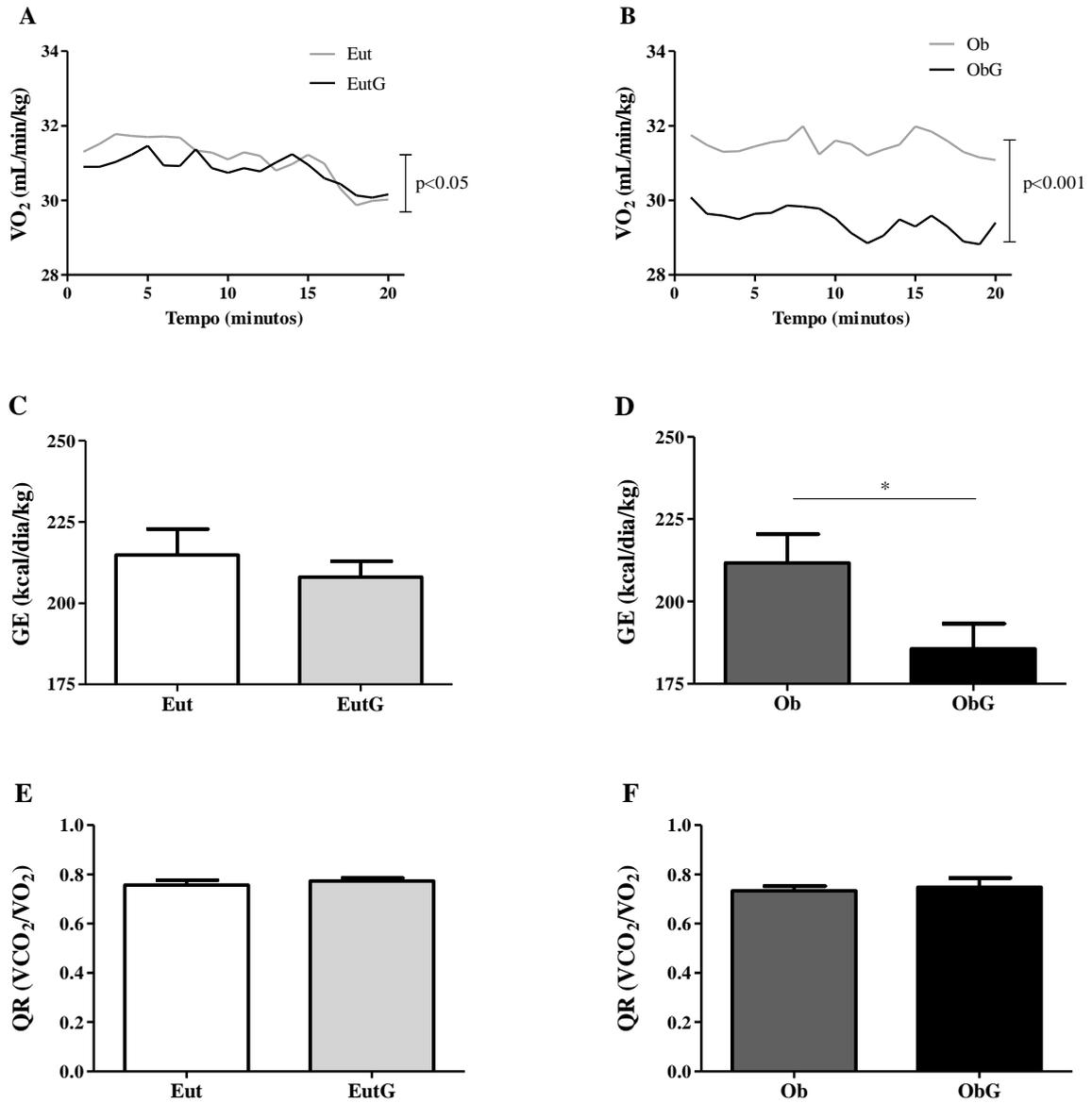


Figura 14: Consumo de oxigênio (VO₂), gasto energético médio (GE) e quociente respiratório (QR) avaliados por calorimetria indireta após jejum *overnight*

A, B – Consumo de oxigênio (VO₂ – mL/min/kg) dos grupos eutróficos e obesos, respectivamente. Linhas horizontais representam média em cada minuto. Teste t de Student pareado. C, D – Gasto energético médio (kcal/dia/kg) dos grupos eutróficos e obesos, respectivamente. E, F - Quociente respiratório dos grupos eutróficos e obesos, respectivamente. Resultados expressos como média ± erro padrão. Teste t de Student. n=9/10/15/15. *p<0,05. Eut (dieta AIN-93M). EutG (dieta AIN-93M + glúten de trigo). Ob (DIO). ObG (DIO + glúten de trigo).

Termogênese e 'browning'

Buscando compreender os mecanismos moleculares que justificariam o aumento do peso e redução do dispêndio calórico associados à ingestão de glúten, avaliou-se a expressão de proteínas relacionadas à termogênese nos tecidos adiposos marrom e branco (subcutâneo).

Análise do tecido adiposo marrom mostrou que a adição do glúten na dieta de animais obesos reduziu a expressão da UCP1, proteína desacopladora da fosforilação oxidativa responsável pela termogênese. Como consequência, houve aumento na expressão de PGC1- α , importante estimulador da expressão da UCP1 e outras proteínas mitocondriais. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de BMP7 ou PRDM16 no tecido adiposo marrom. Essas proteínas são altamente expressas neste tecido e estão relacionadas ao desenvolvimento dos adipócitos marrons e da morfologia multilocular (Figura 15).

Recentemente, muito se tem estudado sobre o *browning* do tecido adiposo subcutâneo. Este processo corresponde ao surgimento de adipócitos com fenótipo semelhante aos adipócitos marrons no tecido adiposo branco, chamados de adipócitos beges, caracterizados pelo maior número de mitocôndrias e expressão de UCP1.

Ao se avaliar o tecido adiposo subcutâneo, observou-se que a adição de glúten na dieta levou à redução na expressão de UCP1 e de BMP7, tanto em animais eutróficos quanto obesos. Esses resultados sugerem menor termogênese e menor formação de adipócitos beges no tecido adiposo subcutâneo (*browning*). Em relação à expressão das proteínas PGC1- α e PRDM16 não foram observadas alterações significativas (Figura 16).

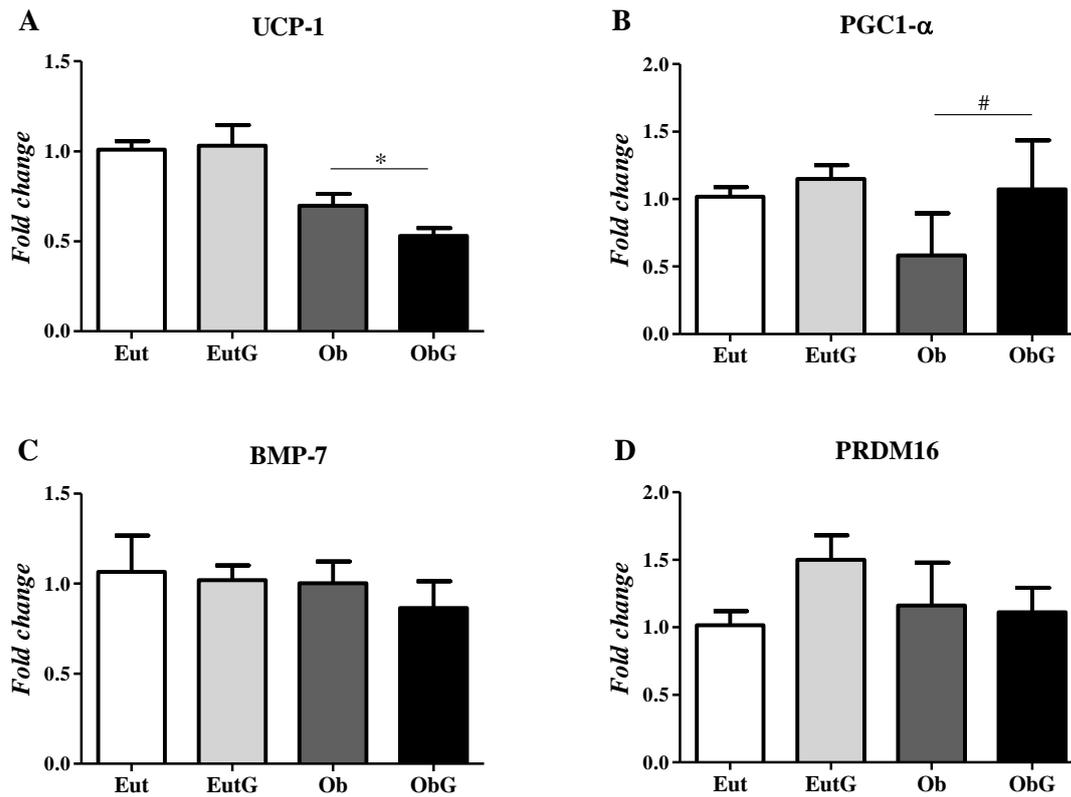


Figura 15: Expressão de proteínas relacionadas à termogênese no tecido adiposo marrom (interescapular)

UCP1: proteína desacopladora 1; PGC1- α : Coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1-alfa. BMP7 – Proteína Morfogenética Óssea 7; Eut (dieta AIN-93M). EutG (dieta AIN-93M + glúten de trigo). Ob (DIO). ObG (DIO + glúten de trigo). A: n= 9/9/10/9. B: n=8/10/10/11. C, D: n= 5/5/5/5. *p<0,05 (Teste t de Student), resultados expressos como média \pm erro padrão.. #p<0,05 (Teste Mann-Whitney), resultados expressos como mediana \pm intervalo interquartil.

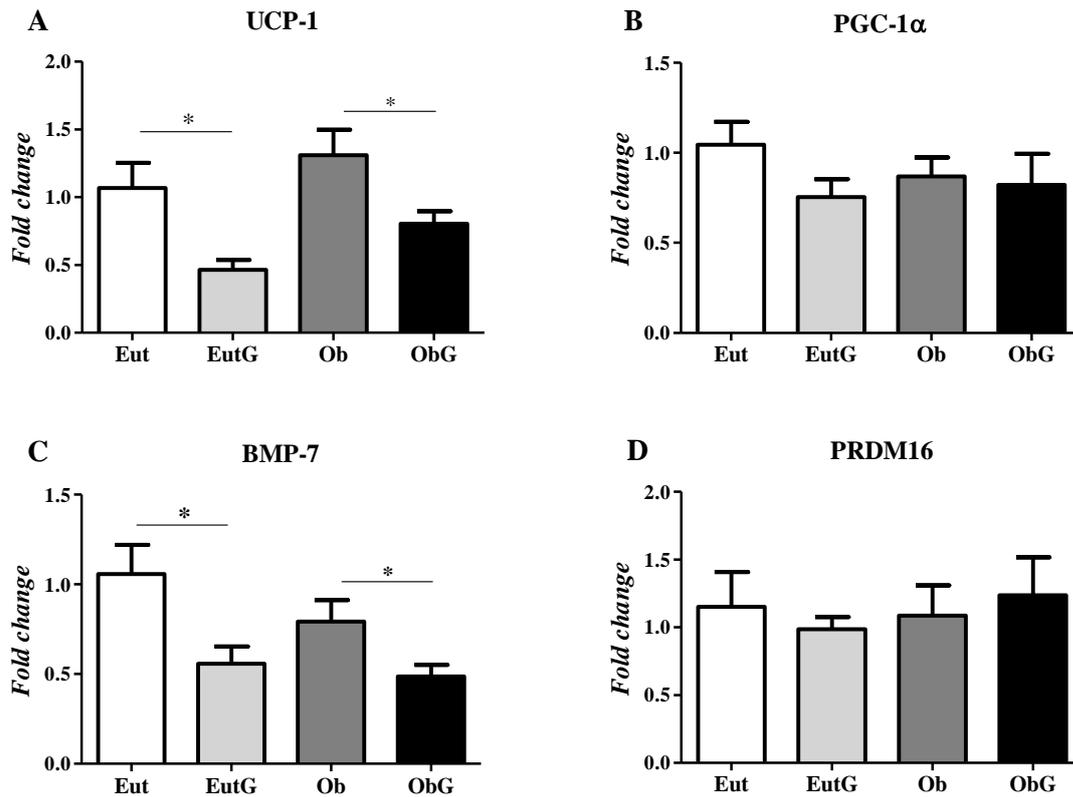


Figura 16: Expressão de proteínas relacionadas à termogênese e ao ‘browning’ no tecido adiposo subcutâneo (inguinal)

UCP1: proteína desacopladora 1; PGC1- α : Coativador do receptor ativado por proliferador de peroxissoma 1-alfa; BMP7 – Proteína Morfogenética Óssea 7. Eut (dieta AIN-93M). EutG (dieta AIN-93M + glúten de trigo). Ob (DIO). ObG (DIO + glúten de trigo). A: n= 6/7/7/7. B: n=7/7/7/7. C, D: n=6/7/7/7. *Barras representam a média e linhas verticais o erro padrão; Teste t de Student, $p < 0,05$.

7.3 Experimentos *in vitro*

Os experimentos com o glúten marcado radioativamente com tecnécio (^{99m}Tc -GLU), mostraram que fragmentos da proteína estavam presentes no tecido adiposo epididimal, sugerindo a possibilidade de ação direta. Ademais, os estudos prévios publicados por Soares et al. (18) mostraram ações do glúten sobre a modulação da expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo lipídico e genes inflamatórios no tecido adiposo. Sendo assim, os estudos *in vitro* contemplaram análise da expressão dessas moléculas em cultura de adipócitos isolados do tecido adiposo visceral.

Em eutróficos, a ingestão de glúten aumentou a expressão da citocina pró-inflamatória IL-6 e mostrou tendência a aumentar a expressão de TNF ($p=0,06$). Não foram observadas diferenças na expressão e leptina ou adiponectina. Em camundongos obesos, a ingestão de glúten reduziu a expressão de adiponectina, citocina anti-inflamatória produzida pelas células adiposas (Figura 17).

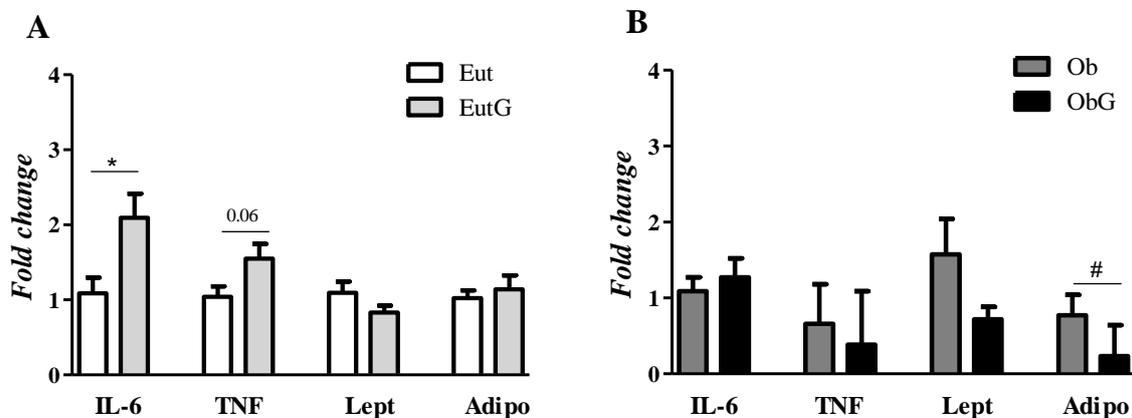


Figura 17: Influência da ingestão de glúten sobre a modulação da expressão gênica de adipócitos brancos: moléculas relacionadas à inflamação

IL-6: Interleucina 6; TNF: Fator de Necrose Tumoral; Lept: Leptina; Adipo: Adiponectina. A: Camundongos Eut (dieta AIN-93M) e EutG (dieta AIN-93M acrescida de glúten de trigo). $n=5/6$. B: Camundongos Ob (DIO). ObG (DIO acrescida de glúten de trigo). $n=8/7$. * $p<0,05$ (Teste t de Student); # $p<0,05$ (Teste Mann-Whitney). Resultados expressos como média \pm erro padrão., exceto para Figura A (Leptina) e Figura B (TNF e Adiponectina) onde os resultados foram expressos como mediana \pm intervalo interquartil.

Considerando as proteínas relacionadas ao metabolismo lipídico, nenhuma alteração foi observada em camundongos eutróficos. Em obesos, a ingestão de glúten levou a redução na expressão de PPAR α e PPAR γ e da lipase hormônio-sensível (LHS), indicando menor oxidação de ácidos graxos por essas células (Figura 18).

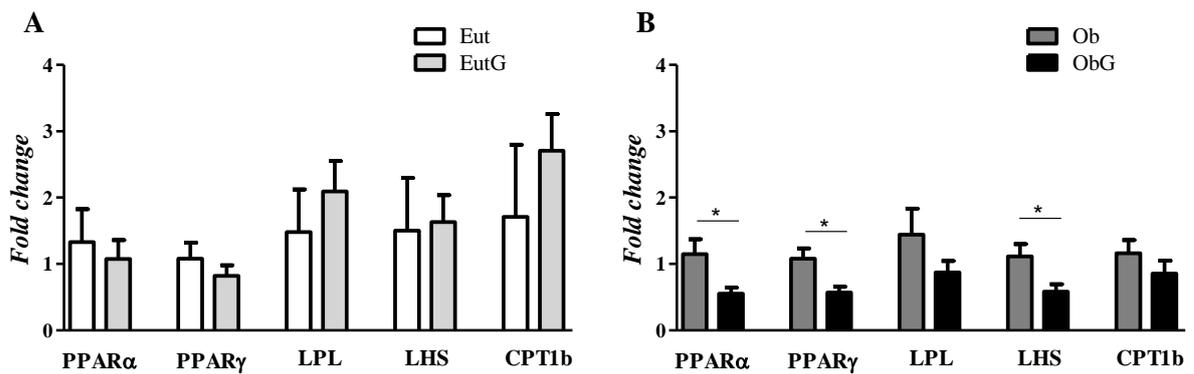


Figura 18: Influência da ingestão de glúten sobre a modulação da expressão gênica de adipócitos brancos: moléculas relacionadas ao metabolismo lipídico

PPAR (Receptores ativados por proliferadores de Peroxissomos); LPL: Lipase lipoproteica; LHS: Lipase hormônio-sensível. CPT1b: Carnitina palmitoil-transferase 1b. A: Camundongos Eut (dieta AIN-93M) e EutG (dieta AIN-93M acrescida de glúten de trigo). n=5/6. B: Camundongos Ob (DIO). ObG (DIO acrescida de glúten de trigo). n=8/8. *p<0,05 (Teste t de Student). Resultados expressos como média \pm erro padrão..

7.4 Hipótese final

Diante dos resultados encontrados em cada etapa do presente trabalho, hipóteses sobre os possíveis mecanismos obesogênicos do glúten de trigo foram levantadas e estão sumarizadas na Figura 19.

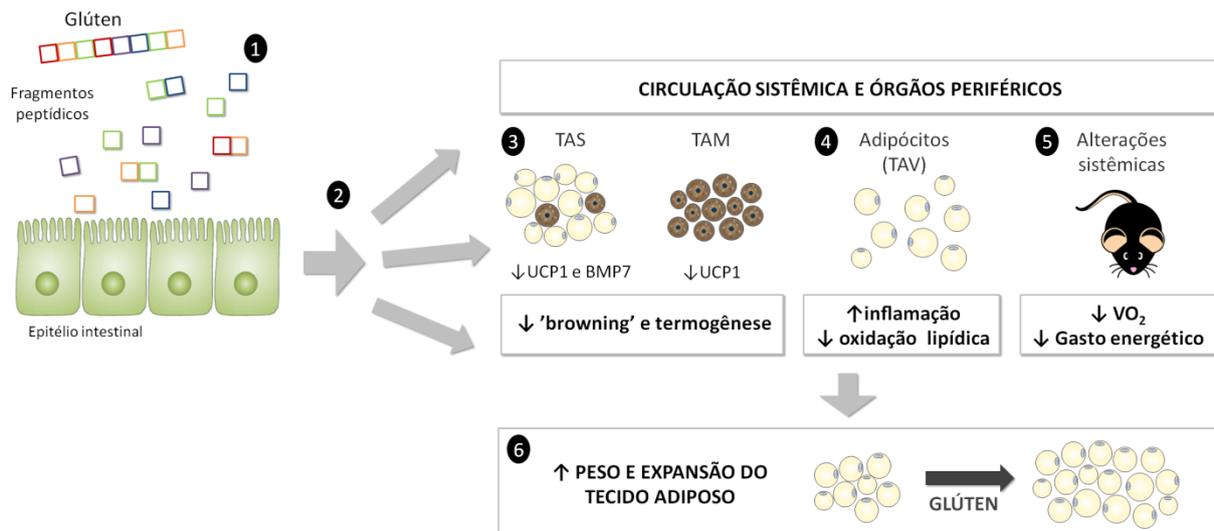


Figura 19: Hipóteses sobre os mecanismos obesogênicos do glúten de trigo

1. Após ingestão, o glúten é parcialmente digerido pelas enzimas no trato gastrointestinal. 2. Os fragmentos peptídicos são absorvidos e atingem a circulação sistêmica e importantes órgãos do metabolismo, podendo exercer ação direta sobre esses tecidos. 3. No TAS e no TAM, o glúten reduziu a termogênese e o *browning* (surgimento de adipócitos beges). 4. Em adipócitos isolados do TAV, a proteína aumentou a expressão de citocinas pró-inflamatórias e reduziu a expressão de genes relacionados à oxidação lipídica. 5. Sistemicamente, houve redução do consumo de oxigênio (VO_2) e do gasto energético total. 6. Esses mecanismos justificam os efeitos obesogênicos do glúten, levando a aumento do peso e expansão do tecido adiposo em animais eutróficos e obesos com dietas isocalóricas.

TAS: tecido adiposo subcutâneo; TAM: tecido adiposo marrom; TAV: tecido adiposo visceral

8. DISCUSSÃO

O nosso estudo é pioneiro no esclarecimento de possíveis mecanismos obesogênicos do glúten de trigo. Estudos anteriores mostraram que a ingestão de glúten de trigo ocasionou aumento do ganho de peso e adiposidade por redução na mobilização de ácidos graxos e aumento do acúmulo lipídico no tecido adiposo visceral, além de promover exacerbação do perfil pró-inflamatório (18).

No presente trabalho, os efeitos obesogênicos do glúten previamente descritos por Soares et al. (18) nos animais obesos foram confirmados e essas ações também puderam ser observadas em animais eutróficos, embora possivelmente com mecanismos que englobam diferentes vias. Apesar de apresentarem ingestão calórica similar, o ganho de peso foi cerca de 20% maior em camundongos alimentados com glúten quando comparados aos seus respectivos controles. Da mesma maneira, houve cerca de 30% de aumento nos depósitos de tecido adiposo visceral e subcutâneo em animais dos grupos EutG e ObG.

Outros estudos controlados considerando modelos animais ou ensaios clínicos que tenham avaliado o ganho de peso associado à ingestão de glúten são raros. Um trabalho realizado com suínos mostrou que os animais alimentados com dieta à base de cereais apresentaram maior ganho de peso e redução da sensibilidade à insulina. No entanto, esse trabalho não foi controlado e os efeitos do glúten não puderam ser avaliados de forma independente (83). Outros pesquisadores também observaram maior ganho de peso após administração intravenosa de gliadina pré-digerida, entretanto foram utilizados camundongos NOD (diabéticos não-obesos) (48). Considerando indivíduos celíacos que aderiram a dieta isenta de glúten, os efeitos em relação ao emagrecimento são controversos. Alguns autores observaram aumento do IMC e da ocorrência de excesso de peso após exclusão do glúten da dieta (79, 80). No entanto, este aumento pode ser relacionado à melhoria da atrofia das vilosidades dos enterócitos e da absorção intestinal (80) e maior valor calórico de alguns produtos sem glúten (81). Ademais, quando os pacientes celíacos são categorizados de acordo com peso antes da exclusão do glúten, pode ser observado ganho de peso entre aqueles com IMC inicial abaixo do normal (IMC <18,5) e perda de peso em pacientes com sobrepeso ou obesidade inicial (IMC >25) (82).

Porém o estudo de Soares et al. (18) não esclareceu se os efeitos obesogênicos do glúten seriam devido a uma ação direta no tecido adiposo ou se uma consequência do perfil inflamatório sistêmico causado por sua presença no trato gastrointestinal. Assim, a presença

dos fragmentos na circulação sanguínea e nos tecidos seria condição essencial para que a proteína exercesse efeitos diretos sobre os componentes celulares. Se o glúten (ou a gliadina) não fosse absorvido, os seus efeitos inflamatórios deveriam ser modestos em termos de ações sistêmicas e limitados às células intestinais. Portanto, no presente estudo, procurou-se detectar frações do glúten em tecidos periféricos e os resultados mostraram que fragmentos radiomarcados foram encontrados no sangue e em importantes órgãos do metabolismo, como fígado e tecido adiposo visceral. A pequena presença dos peptídeos de glúten na circulação está de acordo com a baixa digestibilidade desta proteína, associada ao seu conteúdo de glutamina e prolina (129, 130). Mais de 50 epitópos tóxicos já foram descritos na molécula do glúten e estes estão sendo relacionados a atividades citotóxicas, imunomodulatória e de alteração de permeabilidade intestinal (15). Portanto, pôde-se sugerir que após ingestão essas frações peptídicas do glúten atingem a circulação sanguínea e induzem importantes alterações no metabolismo celular endógeno.

As cinéticas de absorção e biodistribuição dos fragmentos peptídicos do glúten apresentaram semelhante perfil em animais eutróficos e obesos. Portanto, pôde-se inferir que a obesidade ou a dieta hiperlipídica não interferiram sobre a quantidade total da proteína absorvida, embora inicialmente a taxa de absorção tenha sido mais lenta nos obesos. Essa diferença inicial pode ser atribuída à diferente composição nutricional das dietas ofertadas, principalmente considerando o teor lipídico, que leva a alterações no tempo de trânsito e absorção intestinal (131).

Buscando compreender os mecanismos de ação do glúten associados ao ganho de peso investigaram-se alterações do dispêndio energético. No jejum, a ingestão de glúten por animais obesos reduziu o VO_2 e o gasto energético nas mesmas condições, sugerindo redução do dispêndio calórico diário e termogênese. Este fenômeno também foi observado nos animais eutróficos, embora em menor grau. No estado alimentado, nenhum efeito da ingestão de glúten foi observado sobre o consumo de oxigênio ou o gasto energético. Acredita-se que o aumento do gasto energético induzido pela dieta (efeito térmico dos alimentos), possa ter mascarado os efeitos do glúten sobre o metabolismo basal, uma vez que este fator pode contribuir com cerca de 10% do gasto energético total (103).

Com o objetivo de compreender os mecanismos moleculares associados à redução do dispêndio calórico, a expressão gênica das proteínas associadas à termogênese e ao 'browning' foi analisada no tecido adiposo marrom e subcutâneo. O processo do 'browning' é caracterizado pelo acúmulo dos adipócitos beiges no tecido adiposo branco (132). Esses

adipócitos apresentam elevado número de mitocôndrias e expressam UCP1, diferentemente dos adipócitos brancos (88, 133).

A atividade do tecido adiposo marrom e a expressão de UCP1 têm sido relacionadas com o desenvolvimento da obesidade, porém a relação de causalidade não é clara. Lowell et al. (134) mostrou que a ablação genética do TAM leva à obesidade em camundongos transgênicos. Corroborando esses resultados, a expressão transgênica da UCP no tecido adiposo é capaz de prevenir a obesidade e reduzir as reservas de gordura em animais (135).

Compreender o desenvolvimento e ativação dos clássicos adipócitos marrons, bem como dos adipócitos bege torna-se importante aliado no tratamento da obesidade e suas desordens metabólicas (92). Por isso, o ‘browning’ e ativação do TAM terapeuticamente ganharam muita atenção. Muitos fatores são responsáveis pela regulação da atividade e desenvolvimento dos adipócitos marrons e beges, e a expressão da UCP1 é importante ponto regulatório. Maior expressão dessa proteína no tecido adiposo está associada a aumento da termogênese (96).

Alguns componentes alimentares têm sido descritos como moduladores da termogênese no tecido adiposo evitando balanço energético positivo e a obesidade. Por exemplo, Andrade et al. (136) demonstraram que a administração oral de resveratrol aumentou a expressão de UCP1 e sirtuina 1 (SIRT1), seguida por aumento da termogênese e do consumo de oxigênio, embora não tenham observado alteração no peso corporal. Semelhantes efeitos foram relatados por Wang et al. (137) mostrando que o resveratrol aumentou o ‘browning’ no tecido adiposo inguinal, a expressão de UCP1 e PRDM16. Também têm sido relatados na literatura efeitos termogênicos da ingestão crônica de compostos como a capsaicina e capsinoides que atuam ativando o TAM, aumentando o gasto energético e reduzindo a gordura corporal (138). O chá verde também apresenta potencial termogênico, sendo que o seu uso combinado com exercício físico induziu a lipólise e o ‘browning’ do tecido adiposo branco (aumentando a expressão da LHS, PGC1 α e BMP4) (139).

O presente trabalho observou que a ingestão de glúten reduziu a expressão da UCP1 tanto no tecido adiposo marrom quanto no tecido adiposo subcutâneo, com exceção do TAM de animais do grupo EutG. No tecido adiposo subcutâneo, a ingestão de glúten também reduziu a expressão da BMP7 em eutróficos e obesos. Essa proteína está relacionada ao ‘browning’ do tecido adiposo branco, independentemente da temperatura ambiente (100). De acordo com Tseng et al. (99), a BMP7 é importante para diferenciação dos adipócitos marrons, expressão da UCP1 e aumento do gasto energético. Assim, a diminuição na

expressão da UCP1 e BMP7 está de acordo com a redução no dispêndio calórico observado pela avaliação VO_2 em animais alimentados com glúten (EutG e ObG).

Observou-se também aumento na expressão de PGC1 α no TAM de animais obesos alimentados com glúten. Esta proteína tem sido descrita como o principal ponto regulatório da termogênese no TAM, ativando enzimas chaves da cadeia respiratória, aumentando a expressão de UCP1 e induzindo biogênese mitocondrial. No entanto, foi demonstrado que a redução na expressão de UCP1 poderia aumentar a expressão de moléculas envolvidas na termogênese (incluindo a PGC1 α), como um mecanismo de indução adaptativa para compensar a menor depleção de UCP1 (140).

Alterações na expressão de proteínas relacionadas à inflamação e ao metabolismo lipídico foram observados previamente por Soares et al. (18) e confirmados no presente trabalho. Mostrou-se que o ganho de peso em decorrência da ingestão de glúten esteve associado à redução na expressão de PPAR α e γ e da enzima lipase hormônio-sensível. No entanto, neste atual estudo, mostramos que essas alterações foram detectadas não apenas no tecido adiposo, mas especificamente em adipócitos isolados.

Os PPARs possuem importante papel no metabolismo lipídico e na homeostase energética. A redução do PPAR α e γ leva a redução na expressão de genes relacionados à oxidação de ácidos graxos (141) e da enzima lipase hormônio-sensível (142), respectivamente. Portanto, a menor expressão de PPAR α por adipócitos isolados de animais ObG pode induzir a redução da lipólise de triglicerídeos intracelulares e conseqüentemente levar a acúmulo de ácidos graxos. A redução do PPAR γ observada em animais obesos alimentados com glúten pode estar relacionada à menor expressão de adiponectina pelos adipócitos (143, 144). A adiponectina é uma adipocina anti-inflamatória e seus níveis estão negativamente correlacionados com o acúmulo de gordura visceral e evidências indicam que a adiponectina protege contra as disfunções metabólicas ligadas à obesidade (74).

Em camundongos EutG o ganho de peso e o aumento da adiposidade estiveram associados com a redução do VO_2 , menor expressão de UCP1 e BMP7 no tecido adiposo subcutâneo e maior expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF ($p=0,06$) por adipócitos isolados. A IL-6 e o TNF são citocinas pró-inflamatórias com papel central na inflamação e o aumento da sua secreção contribui para disfunções metabólicas na obesidade (74).

Em camundongos obesos, os efeitos obesogênicos do glúten foram mais proeminentes quando comparados aos eutróficos. A adipocina pró-inflamatória leptina regula o

comportamento alimentar por meio do sistema nervoso central e seus níveis séricos estão positivamente correlacionados com a massa adiposa, indicando a ocorrência de resistência à leptina em indivíduos obesos (145). Poderia ser esperado que a expressão desta adipocina estivesse aumentada em EutG e ObG, quando comparados aos seus respectivos controles, considerando o maior peso corporal desses animais. Entretanto, a leptina é secretada principalmente pelo tecido adiposo subcutâneo e não pelo tecido adiposo visceral usado na cultura dos adipócitos (146).

As mudanças na expressão gênica observadas em adipócitos isolados reforçam a hipótese de que a ingestão de glúten interfere no metabolismo dos adipócitos, reduzindo a expressão de PPAR α e γ , levando a menor oxidação de ácidos graxos e acúmulo de gordura.

A obesidade é bem caracterizada por estado inflamatório sistêmico de baixo grau e o tecido adiposo atua como órgão endócrino, sendo infiltrado por macrófagos e outras células imunes que secretam diversas citocinas e adipocinas (74, 75). Descreve-se aumento da expressão de IL-6, TNF (147, 148), leptina (145), MCP1/CCL2, entre outros, e menor expressão de adiponectina (149). Conforme mencionado, no presente estudo, o perfil da expressão de genes relacionados à inflamação e ao metabolismo lipídico pelos adipócitos foi diferente em animais eutróficos e obesos alimentados com glúten. Em eutróficos, apenas as citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 estiveram aumentadas no grupo EutG, enquanto no grupo obeso a expressão de enzimas relacionadas ao metabolismo sofreram maior influência do glúten. Esses resultados sugerem que a ação do glúten pode ocorrer por várias vias e é mais intensa na presença da dieta hiperlipídica e das alterações metabólicas ligadas à obesidade. Esses diferentes mecanismos também podem estar associados às diferenças na composição nutricional das dietas ofertadas, AIN-93M e DIO, sendo que as causas desses diferentes efeitos não foram exploradas no presente trabalho e merecem futuras investigações.

Os dados do atual trabalho suportam a ideia de que a ingestão de glúten (4,5% da dieta) pode contribuir para aumento do ganho de peso e redução do dispêndio energético, sendo os efeitos sinérgicos à dieta hiperlipídica e alterações metabólicas ligadas à obesidade. No entanto, não foram avaliadas diferentes concentrações da ingestão de glúten, porém é possível que a ingestão excessiva esteja associada a tais efeitos. De acordo com Day et al. (150) a ingestão de glúten aumentou dramaticamente ao longo dos anos. Devido às suas propriedades estruturais e funcionais únicas, o glúten de trigo é atualmente importante ingrediente da indústria alimentícia, tendo sido utilizado em grande diversidade de produtos como pães, cereais, massas e até mesmo em molhos e carnes processadas, acarretando em excessiva ingestão da proteína.

Tomados em conjunto, os resultados abrem campos de estudo para compreensão da associação do glúten e seus peptídeos com o metabolismo energético e lipídico. As alterações metabólicas provocadas pelo glúten contribuem para justificar o efeito obesogênico em camundongos eutróficos e obesos. Faz-se importante salientar que os dados se resumem a modelo animal, portanto mais pesquisas são necessárias para avaliar os efeitos da proteína em humanos, visto que não há ensaios clínicos publicados. As dietas isentas de glúten devem ser indicadas para pacientes celíacos e alérgicos e ainda não há evidências sobre os benefícios do seu uso pela população geral.

9. CONCLUSÃO

O glúten de trigo ou seus fragmentos peptídicos podem atingir órgãos periféricos, como fígado e tecido adiposo visceral, sugerindo ações diretas nesses tecidos. Em adipócitos, o glúten exerceu atividade pró-inflamatória e reduziu a oxidação de ácido graxos. A ingestão da proteína também reduziu a termogênese, o ‘browning’ e o gasto energético. Portanto, a inclusão de 4,5% de glúten de trigo em dietas isocalóricas levou a aumento do peso e expansão do tecido adiposo, em camundongos eutróficos e, principalmente, em obesos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO - World Health Organization. Obesity and overweight. Fact sheet 311. Updated March 2013. WHO web site. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
2. Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM. Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA*. 2014;311(8):806-14.
3. VIGITEL Brasil 2013: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2013. Brasília: Ministério da Saúde, Brasil; 2014.
4. Goesaert H, Brijs K, Veraverbeke W, Courtin C, Gebruers K, Delcour J. Wheat flour constituents: how they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*; 2005. p. 12-30.
5. Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2002;357(1418):133-42.
6. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol*. 2007;24(2):115-9.
7. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIO E ABASTECIMENTO. Trigo. <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo>.
8. van Overbeek FM, Uil-Dieterman IG, Mol IW, Köhler-Brands L, Heymans HS, Mulder CJ. The daily gluten intake in relatives of patients with coeliac disease compared with that of the general Dutch population. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1997;9(11):1097-9.
9. Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 2002;297(5590):2275-9.
10. Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med*. 2007;357(17):1731-43.
11. Leonard MM, Vasagar B. US perspective on gluten-related diseases. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014;7:25-37.
12. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med*. 2012;10:13.
13. De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br J Nutr*. 2009;102(8):1154-60.
14. Golfetto L, de Senna FD, Hermes J, Beserra BT, França FaS, Martinello F. Lower bifidobacteria counts in adult patients with celiac disease on a gluten-free diet. *Arq Gastroenterol*. 2014;51(2):139-43.
15. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev*. 2011;91(1):151-75.
16. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol*. 2006;176(4):2512-21.
17. El-Chammas K, Danner E. Gluten-free diet in nonceliac disease. *Nutr Clin Pract*. 2011;26(3):294-9.

18. Soares FL, de Oliveira Matoso R, Teixeira LG, Menezes Z, Pereira SS, Alves AC, et al. Gluten-free diet reduces adiposity, inflammation and insulin resistance associated with the induction of PPAR-alpha and PPAR-gamma expression. *J Nutr Biochem*. 2013;24(6):1105-11.
19. Sdepanian VL, de Moraes MB, Fagundes Neto U. [Celiac disease: evolution in knowledge since its original centennial description up to the present day]. *Arq Gastroenterol*. 1999;36(4):244-57.
20. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA, Gastroenterology ACo. ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(5):656-76; quiz 77.
21. Richman E. The safety of oats in the dietary treatment of coeliac disease. *Proc Nutr Soc*. 2012;71(4):534-7.
22. Nikulina M, Habich C, Flohé SB, Scott FW, Kolb H. Wheat gluten causes dendritic cell maturation and chemokine secretion. *J Immunol*. 2004;173(3):1925-33.
23. Fasano A, Sapone A, Zevallos V, Schuppan D. Nonceliac gluten sensitivity. *Gastroenterology*. 2015;148(6):1195-204.
24. Jakes AD, Bradley S, Donlevy L. Dermatitis herpetiformis. *BMJ*. 2014;348:g2557.
25. Cardones AR, Hall RP. Management of dermatitis herpetiformis. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2012;32(2):275-81, vi-vii.
26. Fry L, Seah PP, Riches DJ, Hoffbrand AV. Clearance of skin lesions in dermatitis herpetiformis after gluten withdrawal. *Lancet*. 1973;1(7798):288-91.
27. Garioch JJ, Lewis HM, Sargent SA, Leonard JN, Fry L. 25 years' experience of a gluten-free diet in the treatment of dermatitis herpetiformis. *Br J Dermatol*. 1994;131(4):541-5.
28. Leonard J, Haffenden G, Tucker W, Unsworth J, Swain F, McMinn R, et al. Gluten challenge in dermatitis herpetiformis. *N Engl J Med*. 1983;308(14):816-9.
29. Paek SY, Steinberg SM, Katz SI. Remission in dermatitis herpetiformis: a cohort study. *Arch Dermatol*. 2011;147(3):301-5.
30. Bardella MT, Fredella C, Trovato C, Ermacora E, Cavalli R, Saladino V, et al. Long-term remission in patients with dermatitis herpetiformis on a normal diet. *Br J Dermatol*. 2003;149(5):968-71.
31. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002;359(9313):1221-31.
32. Matheson NA. Letter: Multiple sclerosis and diet. *Lancet*. 1974;2(7884):831.
33. Hafner FH. Letter: Gluten-free diet as treatment for multiple sclerosis. *Postgrad Med*. 1976;59(8):20.
34. von Geldern G, Mowry EM. The influence of nutritional factors on the prognosis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(12):678-89.
35. Shor DB, Barzilai O, Ram M, Izhaky D, Porat-Katz BS, Chapman J, et al. Gluten sensitivity in multiple sclerosis: experimental myth or clinical truth? *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1173:343-9.
36. Reichelt KL, Jensen D. IgA antibodies against gliadin and gluten in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2004;110(4):239-41.
37. Hewson DC. Is there a role for gluten-free diets in multiple sclerosis? *Hum Nutr Appl Nutr*. 1984;38(6):417-20.

38. Payne A. Nutrition and diet in the clinical management of multiple sclerosis. *J Hum Nutr Diet.* 2001;14(5):349-57.
39. Carpenter LA, Macias MM. Screening and diagnosis of autism spectrum disorders (ASD). *J S C Med Assoc.* 2006;102(8):271-3.
40. Frye RE, Rossignol D, Casanova MF, Brown GL, Martin V, Edelson S, et al. A review of traditional and novel treatments for seizures in autism spectrum disorder: findings from a systematic review and expert panel. *Front Public Health.* 2013;1:31.
41. Pennesi CM, Klein LC. Effectiveness of the gluten-free, casein-free diet for children diagnosed with autism spectrum disorder: based on parental report. *Nutr Neurosci.* 2012;15(2):85-91.
42. Hsu CL, Lin CY, Chen CL, Wang CM, Wong MK. The effects of a gluten and casein-free diet in children with autism: a case report. *Chang Gung Med J.* 2009;32(4):459-65.
43. Herbert MR, Buckley JA. Autism and dietary therapy: case report and review of the literature. *J Child Neurol.* 2013;28(8):975-82.
44. Marí-Bauset S, Zazpe I, Mari-Sanchis A, Llopis-González A, Morales-Suárez-Varela M. Evidence of the Gluten-Free and Casein-Free Diet in Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review. *J Child Neurol.* 2014.
45. Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, Cooper JD, Downes K, Yang JH, et al. Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *N Engl J Med.* 2008;359(26):2767-77.
46. Cosnes J, Cellier C, Viola S, Colombel JF, Michaud L, Sarles J, et al. Incidence of autoimmune diseases in celiac disease: protective effect of the gluten-free diet. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6(7):753-8.
47. Cohn A, Sofia AM, Kupfer SS. Type 1 diabetes and celiac disease: clinical overlap and new insights into disease pathogenesis. *Curr Diab Rep.* 2014;14(8):517.
48. Dall M, Calloe K, Haupt-Jorgensen M, Larsen J, Schmitt N, Josefsen K, et al. Gliadin fragments and a specific gliadin 33-mer peptide close KATP channels and induce insulin secretion in INS-1E cells and rat islets of langerhans. *PLoS One.* 2013;8(6):e66474.
49. Larsen J, Dall M, Antvorskov JC, Weile C, Engkilde K, Josefsen K, et al. Dietary gluten increases natural killer cell cytotoxicity and cytokine secretion. *Eur J Immunol.* 2014;44(10):3056-67.
50. Funda DP, Kaas A, Bock T, Tlaskalová-Hogenová H, Buschard K. Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. *Diabetes Metab Res Rev.* 1999;15(5):323-7.
51. Pastore MR, Bazzigaluppi E, Belloni C, Arcovio C, Bonifacio E, Bosi E. Six months of gluten-free diet do not influence autoantibody titers, but improve insulin secretion in subjects at high risk for type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(1):162-5.
52. Klemetti P, Savilahti E, Ilonen J, Akerblom HK, Vaarala O. T-cell reactivity to wheat gluten in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Scand J Immunol.* 1998;47(1):48-53.
53. Funda DP, Kaas A, Tlaskalová-Hogenová H, Buschard K. Gluten-free but also gluten-enriched (gluten+) diet prevent diabetes in NOD mice; the gluten enigma in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008;24(1):59-63.
54. Molberg Ø, Sollid LM. A gut feeling for joint inflammation - using coeliac disease to understand rheumatoid arthritis. *Trends Immunol.* 2006;27(4):188-94.

55. Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JE, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2003;107(9):1303-7.
56. Elkan AC, Sjöberg B, Kolsrud B, Ringertz B, Hafström I, Frostegård J. Gluten-free vegan diet induces decreased LDL and oxidized LDL levels and raised atheroprotective natural antibodies against phosphorylcholine in patients with rheumatoid arthritis: a randomized study. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(2):R34.
57. Hafström I, Ringertz B, Spångberg A, von Zweigbergk L, Brannemark S, Nylander I, et al. A vegan diet free of gluten improves the signs and symptoms of rheumatoid arthritis: the effects on arthritis correlate with a reduction in antibodies to food antigens. *Rheumatology (Oxford)*. 2001;40(10):1175-9.
58. Elango R, Ball RO, Pencharz PB. Amino acid requirements in humans: with a special emphasis on the metabolic availability of amino acids. *Amino Acids*. 2009;37(1):19-27.
59. Salazar Quero JC, Espín Jaime B, Rodríguez Martínez A, Argüelles Martín F, García Jiménez R, Rubio Murillo M, et al. [Nutritional assessment of gluten-free diet. Is gluten-free diet deficient in some nutrient?]. *An Pediatr (Barc)*. 2014.
60. Kinsey L, Burden ST, Bannerman E. A dietary survey to determine if patients with coeliac disease are meeting current healthy eating guidelines and how their diet compares to that of the British general population. *Eur J Clin Nutr*. 2008;62(11):1333-42.
61. Marietta EV, Gomez AM, Yeoman C, Tilahun AY, Clark CR, Luckey DH, et al. Low incidence of spontaneous type 1 diabetes in non-obese diabetic mice raised on gluten-free diets is associated with changes in the intestinal microbiome. *PLoS One*. 2013;8(11):e78687.
62. Shepherd SJ, Gibson PR. Nutritional inadequacies of the gluten-free diet in both recently-diagnosed and long-term patients with coeliac disease. *J Hum Nutr Diet*. 2013;26(4):349-58.
63. Saturni L, Ferretti G, Bacchetti T. The gluten-free diet: safety and nutritional quality. *Nutrients*. 2010;2(1):16-34.
64. Theethira TG, Dennis M. Celiac disease and the gluten-free diet: consequences and recommendations for improvement. *Dig Dis*. 2015;33(2):175-82.
65. Cordain L, Miller JB, Eaton SB, Mann N, Holt SH, Speth JD. Plant-animal subsistence ratios and macronutrient energy estimations in worldwide hunter-gatherer diets. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(3):682-92.
66. Accomando S, Cataldo F. The global village of celiac disease. *Dig Liver Dis*. 2004;36(7):492-8.
67. Belderok B. Developments in bread-making processes. *Plant Foods Hum Nutr*. 2000;55(1):1-86.
68. Tovoli F, Masi C, Guidetti E, Negrini G, Paterini P, Bolondi L. Clinical and diagnostic aspects of gluten related disorders. *World J Clin Cases*. 2015;3(3):275-84.
69. Lammers KM, Khandelwal S, Chaudhry F, Kryszak D, Puppa EL, Casolaro V, et al. Identification of a novel immunomodulatory gliadin peptide that causes interleukin-8 release in a chemokine receptor CXCR3-dependent manner only in patients with coeliac disease. *Immunology*. 2011;132(3):432-40.
70. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*. 2006;41(4):408-19.

71. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, et al. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*. 2008;135(1):194-204.e3.
72. Mention JJ, Ben Ahmed M, Bègue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*. 2003;125(3):730-45.
73. Marinou K, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadi E, Stefanadis C. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. *Int J Cardiol*. 2010;138(1):3-8.
74. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97.
75. Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. *Annu Rev Nutr*. 2012;32:261-86.
76. Marketsandmarkets.com. Gluten-free products market by type, sales channel and geography: global trends and forecasts to 2018. Publishing date: may 2013. <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/gluten-free-products-market-738.html>.
77. Marcason W. Is there evidence to support the claim that a gluten-free diet should be used for weight loss? *J Am Diet Assoc*. 2011;111(11):1786.
78. Gaesser GA, Angadi SS. Gluten-free diet: imprudent dietary advice for the general population? *J Acad Nutr Diet*. 2012;112(9):1330-3.
79. Dickey W, Kearney N. Overweight in celiac disease: prevalence, clinical characteristics, and effect of a gluten-free diet. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(10):2356-9.
80. Valletta E, Fornaro M, Cipolli M, Conte S, Bissolo F, Danchielli C. Celiac disease and obesity: need for nutritional follow-up after diagnosis. *Eur J Clin Nutr*. 2010;64(11):1371-2.
81. Miranda J, Lasa A, Bustamante MA, Churrua I, Simon E. Nutritional Differences Between a Gluten-free Diet and a Diet Containing Equivalent Products with Gluten. *Plant Foods Hum Nutr*. 2014;69(2):182-7.
82. Cheng J, Brar PS, Lee AR, Green PH. Body mass index in celiac disease: beneficial effect of a gluten-free diet. *J Clin Gastroenterol*. 2010;44(4):267-71.
83. Jönsson T, Åhrén B, Pacini G, Sundler F, Wierup N, Steen S, et al. A Paleolithic diet confers higher insulin sensitivity, lower C-reactive protein and lower blood pressure than a cereal-based diet in domestic pigs. *Nutr Metab (Lond)*. 2006;3:39.
84. Mortensen LS, Hartvigsen ML, Brader LJ, Astrup A, Schrezenmeir J, Holst JJ, et al. Differential effects of protein quality on postprandial lipemia in response to a fat-rich meal in type 2 diabetes: comparison of whey, casein, gluten, and cod protein. *Am J Clin Nutr*. 2009;90(1):41-8.
85. Mortensen LS, Thomsen C, Hermansen K. Effects of different protein sources on plasminogen inhibitor-1 and factor VII coagulant activity added to a fat-rich meal in type 2 diabetes. *Rev Diabet Stud*. 2010;7(3):233-40.
86. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J*. 2008;29(24):2959-71.

87. Saelly CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology*. 2012;58(1):15-23.
88. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 2004;84(1):277-359.
89. van der Lans AA, Hoeks J, Brans B, Vijgen GH, Visser MG, Vosselman MJ, et al. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3395-403.
90. Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, von Schulthess GK. Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002;29(10):1393-8.
91. Cohade C, Osman M, Pannu HK, Wahl RL. Uptake in supraclavicular area fat ("USA-Fat"): description on 18F-FDG PET/CT. *J Nucl Med*. 2003;44(2):170-6.
92. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(1):24-36.
93. Lee YH, Jung YS, Choi D. Recent advance in brown adipose physiology and its therapeutic potential. *Exp Mol Med*. 2014;46:e78.
94. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(11):4401-6.
95. Rosenwald M, Wolfrum C. The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte*. 2014;3(1):4-9.
96. Shabalina IG, Petrovic N, de Jong JM, Kalinovich AV, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep*. 2013;5(5):1196-203.
97. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92(6):829-39.
98. Peirce V, Carobbio S, Vidal-Puig A. The different shades of fat. *Nature*. 2014;510(7503):76-83.
99. Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*. 2008;454(7207):1000-4.
100. Boon MR, van den Berg SA, Wang Y, van den Bossche J, Karkampouna S, Bauwens M, et al. BMP7 activates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity only at subthermoneutrality. *PLoS One*. 2013;8(9):e74083.
101. Seale P, Kajimura S, Yang W, Chin S, Rohas LM, Uldry M, et al. Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab*. 2007;6(1):38-54.
102. Kajimura S, Seale P, Spiegelman BM. Transcriptional control of brown fat development. *Cell Metab*. 2010;11(4):257-62.
103. Donahoo WT, Levine JA, Melanson EL. Variability in energy expenditure and its components. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004;7(6):599-605.
104. Hill JO, Wyatt HR, Peters JC. Energy balance and obesity. *Circulation*. 2012;126(1):126-32.

105. Levine JA. Nonexercise activity thermogenesis (NEAT): environment and biology. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004;286(5):E675-85.
106. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature.* 2000;404(6778):652-60.
107. Thompson MP, Kim D. Links between fatty acids and expression of UCP2 and UCP3 mRNAs. *FEBS Lett.* 2004;568(1-3):4-9.
108. Nagy TR, Blaylock ML, Garvey WT. Role of UCP2 and UCP3 in nutrition and obesity. *Nutrition.* 2004;20(1):139-44.
109. Vallerand AL, Pérusse F, Bukowiecki LJ. Stimulatory effects of cold exposure and cold acclimation on glucose uptake in rat peripheral tissues. *Am J Physiol.* 1990;259(5 Pt 2):R1043-9.
110. Shimizu Y, Nikami H, Tsukazaki K, Machado UF, Yano H, Seino Y, et al. Increased expression of glucose transporter GLUT-4 in brown adipose tissue of fasted rats after cold exposure. *Am J Physiol.* 1993;264(6 Pt 1):E890-5.
111. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kameya T, Nakada K, Kawai Y, et al. Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19(1):13-6.
112. Ouellet V, Labbé SM, Blondin DP, Phoenix S, Guérin B, Haman F, et al. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest.* 2012;122(2):545-52.
113. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med.* 2011;17(2):200-5.
114. Hursel R, Westerterp-Plantenga MS. Thermogenic ingredients and body weight regulation. *Int J Obes (Lond).* 2010;34(4):659-69.
115. Bracco D, Ferrarra JM, Arnaud MJ, Jéquier E, Schutz Y. Effects of caffeine on energy metabolism, heart rate, and methylxanthine metabolism in lean and obese women. *Am J Physiol.* 1995;269(4 Pt 1):E671-8.
116. Astrup A, Toubro S, Cannon S, Hein P, Breum L, Madsen J. Caffeine: a double-blind, placebo-controlled study of its thermogenic, metabolic, and cardiovascular effects in healthy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 1990;51(5):759-67.
117. Masuda Y, Haramizu S, Oki K, Ohnuki K, Watanabe T, Yazawa S, et al. Upregulation of uncoupling proteins by oral administration of capsiate, a nonpungent capsaicin analog. *J Appl Physiol (1985).* 2003;95(6):2408-15.
118. Hursel R, Viechtbauer W, Westerterp-Plantenga MS. The effects of green tea on weight loss and weight maintenance: a meta-analysis. *Int J Obes (Lond).* 2009;33(9):956-61.
119. Pinheiro Volp AC, Esteves de Oliveira FC, Duarte Moreira Alves R, Esteves EA, Bressan J. Energy expenditure: components and evaluation methods. *Nutr Hosp.* 2011;26(3):430-40.
120. Ferrannini E. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism.* 1988;37(3):287-301.
121. Akagiri S, Naito Y, Ichikawa H, Mizushima K, Takagi T, Handa O, et al. A Mouse Model of Metabolic Syndrome; Increase in Visceral Adipose Tissue Precedes the Development of Fatty

- Liver and Insulin Resistance in High-Fat Diet-Fed Male KK/Ta Mice. *J Clin Biochem Nutr.* 2008;42(2):150-7.
122. Faintuch BL, Teodoro R, Duatti A, Muramoto E, Faintuch S, Smith CJ. Radiolabeled bombesin analogs for prostate cancer diagnosis: preclinical studies. *Nucl Med Biol.* 2008;35(4):401-11.
 123. de Barros AL, Mota L, Ferreira CeA, Oliveira MC, Góes AM, Cardoso VN. Bombesin derivative radiolabeled with technetium-99m as agent for tumor identification. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(21):6182-4.
 124. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem.* 1974;20(4):470-5.
 125. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem.* 1982;28(10):2077-80.
 126. RODBELL M. METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS. I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM AND LIPOLYSIS. *J Biol Chem.* 1964;239:375-80.
 127. The United States Pharmacopeia: the national formulary; United States Pharmacopeial Convention, Rockville. 34ed. 2011.
 128. Berthol D, Feidt C, Brun Bellut J. Effect of low continuous ⁹⁹Tc intake on its absorption and metabolism in young rats. *J Environ Radioact.* 2003;67(3):169-80.
 129. De Angelis M, Rizzello CG, Fasano A, Clemente MG, De Simone C, Silano M, et al. VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762(1):80-93.
 130. Mitea C, Havenaar R, Drijfhout JW, Edens L, Dekking L, Koning F. Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut.* 2008;57(1):25-32.
 131. Caspary WF. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am J Clin Nutr.* 1992;55(1 Suppl):299S-308S.
 132. Klingenspor M, Herzig S, Pfeifer A. Brown fat develops a brite future. *Obes Facts.* 2012;5(6):890-6.
 133. Klingenberg M, Huang SG. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1415(2):271-96.
 134. Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature.* 1993;366(6457):740-2.
 135. Kopecky J, Clarke G, Enerbäck S, Spiegelman B, Kozak LP. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest.* 1995;96(6):2914-23.
 136. Andrade JM, Frade AC, Guimarães JB, Freitas KM, Lopes MT, Guimarães AL, et al. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. *Eur J Nutr.* 2014;53(7):1503-10.
 137. Wang S, Liang X, Yang Q, Fu X, Rogers CJ, Zhu M, et al. Resveratrol induces brown-like adipocyte formation in white fat through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) α 1. *Int J Obes (Lond).* 2015;39(6):967-76.

138. Saito M, Yoneshiro T. Capsinoids and related food ingredients activating brown fat thermogenesis and reducing body fat in humans. *Curr Opin Lipidol*. 2013;24(1):71-7.
139. Sae-Tan S, Rogers CJ, Lambert JD. Decaffeinated Green Tea and Voluntary Exercise Induce Gene Changes Related to Beige Adipocyte Formation in High Fat-Fed Obese Mice. *J Funct Foods*. 2015;14:210-4.
140. Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T, et al. UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell*. 2005;4(3):147-55.
141. Lee JY, Hashizaki H, Goto T, Sakamoto T, Takahashi N, Kawada T. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α enhances fatty acid oxidation in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;407(4):818-22.
142. Deng T, Shan S, Li PP, Shen ZF, Lu XP, Cheng J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ transcriptionally up-regulates hormone-sensitive lipase via the involvement of specificity protein-1. *Endocrinology*. 2006;147(2):875-84.
143. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*. 2001;50(9):2094-9.
144. Gorla-Bajszczak A, Siegrist-Kaiser C, Boss O, Burger AG, Meier CA. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in lean and obese Zucker rats. *Eur J Endocrinol*. 2000;142(1):71-8.
145. Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism*. 2015;64(1):35-46.
146. Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, Lord RV. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(5):884-9.
147. Park EJ, Lee JH, Yu GY, He G, Ali SR, Holzer RG, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. *Cell*. 2010;140(2):197-208.
148. Kern PA, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(5):E745-51.
149. Ghantous CM, Azrak Z, Hanache S, Abou-Kheir W, Zeidan A. Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:534320.
150. Day L, Augustin M, Batey I, Wrigley C. Wheat-gluten uses and industry needs *Trends in Food Science & Technology*. 2006;17:82-90.

ANEXO A: Artigo aceito para publicação

Final Decision made for 2015IJO00386RRR

1 message

ijo@nature.com <ijo@nature.com>
Reply-To: ijo@nature.com
To: rachelhorta.freire@gmail.com

Wed, Sep 2, 2015 at 9:23 AM

Subject: 2015IJO00386RRR Decision Letter

Manuscript Number: 2015IJO00386RRR

Title: Wheat gluten intake increases weight gain and adiposity associated with reduced thermogenesis and energy expenditure in an animal model of obesity.

Authors: Rachel Freire, Luciana Fernandes, Rachel Silva, Bruna Coelho, Laís Araújo, Lucas Ribeiro, João Marcus Andrade, Paulo Lamas, Raquel Araújo, Sergio Santos, Cândido Coimbra, Valbert Cardoso, and JACQUELINE ALVAREZ-LEITE

Dear Dr ALVAREZ-LEITE,

I am very pleased to inform you that your above mentioned manuscript has now been accepted for publication in the *International Journal of Obesity*.

All relevant forms must be returned as soon as possible either via fax: +44 (0)1256 321531 or email: ijo@nature.com.

You can now use a single sign-on for all your accounts, view the status of all your manuscript submissions and reviews, access usage statistics for your published articles and download a record of your refereeing activity for the Nature journals.

In addition, NPG encourages all authors and reviewers to associate an Open Researcher and Contributor Identifier (ORCID) to their account. ORCID is a community-based initiative that provides an open, non-proprietary and transparent registry of unique identifiers to help disambiguate research contributions.

Thank you for submitting your work to the *International Journal of Obesity*.

Yours sincerely

Richard L. Atkinson, M.D.
Editor, *International Journal of Obesity*

Wheat gluten intake increases weight gain and adiposity associated with reduced thermogenesis and energy expenditure in an animal model of obesity

Running title: Wheat gluten associated to increased weight gain

Authors: ¹Rachel Horta Freire; ¹Luciana Rodrigues Fernandes; ¹Rachel Bacha Silva; ¹Bruna Scheer Laignier Coelho; ¹Laís Pires Teixeira de Araújo; ¹Lucas Secchim Ribeiro; ²João Marcus Oliveira Andrade; ³Paulo Marcelo de Andrade Lima; ⁴Raquel Silva Araújo; ⁵Sérgio Henrique Souza Santos; ³Cândido Celso Coimbra; ⁴Valbert Nascimento Cardoso; ¹Jacqueline Isaura Alvarez-Leite

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

²Hospital Universitário Clemente Faria, Universidade Estadual de Montes Claros, Brasil

³Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

⁴Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

⁵Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais

The authors declare no conflict of interest

ABSTRACT

Background/Objectives: The association between gluten and body weight is inconsistent. Previously, we showed that a gluten-free diet reduces weight gain without changing food intake in mice fed high-fat diets. In the present study, we investigated the effects of gluten intake on fat metabolism, thermogenesis and energy expenditure in mice fed a standard or high-fat diet.

Methods: Mice were fed four different experimental diets during eight weeks: a control-standard diet (CD), a CD added with 4.5% of wheat gluten (CD-G), a high-fat diet (HFD) and a HFD added with 4.5% of wheat gluten (HFD-G). After the eight weeks, the mice received ^{99m}Tc-radiolabeled gluten orally to study gluten absorption and biodistribution or they underwent indirect calorimetry. After euthanasia, subcutaneous (SAT) and brown (BAT) adipose tissues were collected to assess thermogenesis-related protein expression. Lipid metabolism was studied in adipocyte cultures from the four groups.

Results: Despite having had the same energy intake, CD-G and HFD-G mice exhibited increased body weight and fat deposits compared to their respective controls. ^{99m}Tc-GLU or its peptides were detected in the blood, liver and visceral adipose tissue (VAT), suggesting that gluten can even reach extra-intestinal organs. Uncoupling protein 1 (UCP1) expression was reduced in the BAT of HFD-G and in the SAT of CD-G and HFD-G mice. Indirect calorimetry showed lower oxygen volume consumption in CD-G and HFD-G groups compared with their controls. In HFD mice, daily energy expenditure was reduced with gluten intake. Gluten also reduced adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and PPAR γ and hormone-sensitive lipase in cultures of isolated adipocytes from HFD mice, while in the CD-G group, gluten intake increased IL-6 expression and tended to increase that of TNF.

Conclusions: Wheat gluten promotes weight gain in animals on both HFD and CD, partly by reducing the thermogenic capacity of adipose tissues.

INTRODUCTION

Gluten is as a protein complex founded in cereals such as wheat, rye, barley and oats. Wheat gluten proteins can be divided into two main fractions: gliadin and glutenins (1, 2). Gluten is a main dietary component in several countries and gluten-free diets have been used by individuals as a method of weight control (3). For this reason, understanding the effect of gluten on lipid metabolism and the possible mechanism of this effect could contribute to nutritional strategies to prevent obesity. Despite the huge popularity of gluten-free diets, an association between gluten and obesity is still inconsistent, and there are few controlled studies in the scientific literature (3, 4).

In 2013, our group published the first controlled study that verified the effects of wheat gluten in a murine model of diet-induced obesity. Animals that were fed gluten-free diets showed a reduction in weight gain and adiposity associated with an up-regulation of PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor alpha), lipoprotein lipase (LPL), hormone sensitive lipase (HSL), and carnitine palmitoyl-transferase-1 (CPT-1) in adipose tissue, which are related to lipolysis and fatty acid oxidation. Moreover, we have previously observed that tumor necrosis concentration (TNF), interleukin (IL)-6 and IL-10 expression and concentration were increased in adipose tissue, suggesting a higher pro-inflammatory profile in mice fed a high-fat gluten-enriched diet (5).

The mechanisms by which wheat gluten causes weight gain and the expansion of adipose tissue depots are still unknown. In the present study, we investigated the mechanisms by which gluten increases adiposity gain by studying the gluten action on thermogenesis, the browning of white adipose tissue and oxygen consumption, as well as gluten intestinal absorption and biodistribution.

METHODS

Animals and diets

The study was approved by the Animal Ethics Committee at the Federal University of Minas Gerais (protocol #5/2013). Eight-week-old male C57BL/6 mice were group-housed (2-5 animals per cage) in a room with a 12h light cycles and a controlled temperature ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$). All mice had free access to food and water. Physical activity was similar among all groups during the experiment and the indirect calorimetry test. The animals were fed four different experimental diets during eight weeks: a control-standard diet (CD group), a CD added with 4.5% of wheat gluten (CD-G group), a high-fat diet (HFD group) to induce obesity, and a HFD added with 4.5% of wheat gluten (HFD-G group). Diets with or without wheat gluten (Granotec, Brazil) supplementation were adjusted to be isocaloric and to present the same nutritional composition. The animals were distributed into the experimental groups based on their initial weight, to insure that their weight was statistically similar among groups.

The body weight of each animal was measured weekly. Food intake was primarily calculated as the difference between food offered and food recovered from the top and bottom (spillage) of the cages at the end of each experimental week. The food consumption in each cage was divided by the number of mice/cage (average of energy intake). The result was given as the average of the energy intake/animal/day. After 8 weeks, oxygen consumption was measured in the mice by indirect calorimetry or the underwent a radioisotope assay using gluten radiolabeled with technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GLU) to study energy expenditure and gluten intestinal absorption

and biodistribution, respectively. The mice were then euthanized under anesthesia to collect blood, liver, visceral (epididymal – VAT), subcutaneous (inguinal – SAT) and brown (interscapular – BAT) adipose tissues. All analysis were performed using randomly-coded samples.

Wheat gluten absorption and biodistribution

Hydrolyzed wheat gluten (Sigma #H6784) was labeled with the radioactive nuclide technetium-99m (^{99m}Tc), according to methods proposed by Faintuch et al. (6) and de Barros et al. (7). Evaluation of the radiolabeled yield was determined *in vitro* using thin layer chromatography, and stability of the radiolabeled complex ^{99m}Tc -GLU *in vivo* was determined using scintigraphic images. For this purpose, C57BL/6 mice images were captured using a gamma-camera (NucleineTM TH 22, Hungary) at 1h, 4h and 6h after gavage of 5.5MBq of ^{99m}Tc -GLU or 5.5MBq of $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Intestinal transit time and absorption were performed in C57BL/6 mice without any previous treatment. The animals received 5.5MBq of ^{99m}Tc -GLU by gavage and their intestinal tract was removed. Images of the stomach and small and large intestine were captured using a gamma-camera at 1h, 2h, 4h and 6h after ^{99m}Tc -GLU administration.

To evaluate the biodistribution of gluten and its peptides in mice after receiving the assigned diet for eight weeks, C57BL/6 mice from the CD-G and HFD-G underwent 5-6h of fasting and then received 5.5MBq of ^{99m}Tc -GLU by gavage. Tissues and organs, such as blood, liver and visceral adipose tissue, were removed 30 min, 1h and 2h after ^{99m}Tc -GLU gavage. The radioactivity was measured using a gamma counter (Wizard, Finland). A standard dose containing a known amount of radioactivity was counted simultaneously to correct for radioactive ^{99m}Tc decay. The final results were expressed as a percentage of the administered dose per gram of tissue or organ (% dose/g).

Energy expenditure estimate

The metabolic rate was estimated using continuous recorders of oxygen consumption (VO_2) and CO_2 released with an open-flow indirect calorimeter (LE405 Gas Analyzer, Panlab Harvard Apparatus, Spain). After the 8th week of the diet, mice were weighed and placed individually into the gas chamber, where they remained for 50 minutes without any external influence. VO_2 was recorded for each minute using a computerized system (Metabolism, Harvard Apparatus, Spain). The final 20 minutes were used for the analysis, while the initial 30 minutes were disregarded to allow the animal to calm and acclimate to the chamber (after the stress of handling), and to avoid the influence of room gases inside the chamber (O_2 and CO_2). The VO_2 and respiratory exchange ratio ($\text{RER}=\text{VCO}_2/\text{VO}_2$) values were used to estimate energy expenditure (EE), using the following equation: $\text{EE} = (3.815 + (1.232 \times \text{RER})) \times \text{VO}_2 \times 1.44$.

VO_2 was measured under two conditions: after an overnight fast and in the fed state. All experiments were conducted during the same period of time to prevent circadian variations (fasting state: 8:00 to 12:00 and fed state: 12:00 to 16:00), and the room temperature was controlled at $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Adipocyte culture

VAT was removed under sterile conditions for adipocyte isolation, according to Rodbell (8). Briefly, approximately 1 g of VAT was digested with collagenase for 40min at 37°C under continuous agitation. The cells were then filtered and washed three times with culture medium (complete DMEM) to remove collagenase and other debris. The infranatant was discarded after each washing stage and centrifugation (500 rpm, for 3 min,

at 4°C). Isolated adipocytes were then resuspended in 6 mL of DMEM. Cell counting was performed in a Neubauer chamber (1.4×10^6 to 1.0×10^7 cells/mL).

The isolated adipocyte-containing solution was incubated in duplicate at 37°C and 5% CO₂ with 1 mL of DMEM for 2 h. After incubation, the infranatant (1.6 mL) was removed, and the plate was stored at -70°C for subsequent RNA extraction and inflammatory and metabolic-related protein analysis by real-time quantitative reverse transcription (qRT-PCR).

Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR

BAT, SAT and adipocytes isolated from VAT were collected for the analysis of gene expression using qRT-PCR. Total RNA from the samples was extracted using TRizol reagent (Invitrogen™/Life Technologies, Grand Island, NY, USA) according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed to obtain cDNA. Samples were placed in the thermocycler at 72°C for 5 min for annealing, then 42°C for 3h and 72°C for 15 min for transcription. mRNA levels were determined using the SYBR Green reagent (Applied Biosystems/Life Technologies, USA) and specific primers in an ABIPrism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems/Life Technologies, USA). Gene expression was normalized to endogenous glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and the results are expressed as the fold increase over control ($2^{-\Delta\Delta CT}$). The primers were:

GAPDH: Fwd: 5'-CTCAAGATTGTCAGCAATGC-3'; Rev: 5'-CAGGATGCCCTTTAGTGGGC-3';

UCP1 (uncoupling protein 1): Fwd: 5'-GTGAACCCGACAACCTCCGAA-3'; Rev: 5'-TGCCAGGCAAGCTGAAACTC-3';

PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha): Fwd: 5'-GTCAACAGCAAAAGCCACAA-3'; Rev: 5'-TCTGGGGTCAGAGGAAGAGA-3';

BMP7 (Bone morphogenetic protein 7): Fwd: 5'-CAGCCTGCAAGATAGCCATT-3'; Rev: 5'-AATCGGATCTCTTCCTGCTC-3';

PRDM16 (PR domain containing 16): Fwd: 5'-CAGCACGGTGAAGCCATTC-3'; Rev: 5'-GCGTGCATCCGCTTGTG-3';

IL-6 (Interleukin-6): Fwd: 5'-ACAACCACGGCCTTCCCTACTT-3'; Rev: 5'-CACGATTTCCCAGAGAACATGTG-3';

TNF (tumor necrosis factor): Fwd: 5'-CGTCGTAGCAAACCACCAAG-3'; Rev: 5'-GAGATAGCAAATCGGCTGACG-3';

Leptin: Fwd: 5'-CCTGTGGCTTTGGTCCTATCTG-3'; Rev: 5'-AGGCAAGCTGGTGAGGATCTG-3';

Adiponectin: Fwd: 5'-AGTTGGATGGCAGGC-3'; Rev: 5'-GTCTCACCTTAGGACCAAGAA-3';

PPAR α : Fwd: 5'-TACCACTATGGAGTCCACGCATGT-3'; Rev: 5'-TTGCAGCTTCGATCACACTTGTCG-3';

PPAR γ Fwd: 5'-ACAGACAAGATTTGAAAGAAGCGGTGA-3'; Rev: 5'-TCCGAAGTTGGTGGGCCAGA-3';

Lipoprotein lipase (LPL): Fwd: 5'-AGTCTGGCCTCGAACTAAACTATGTAT-3'; Rev: 5'-TCCCAGGACACAGGAAGCTAA-3';

Hormone sensitive lipase (HSL): Fwd: 5'-ACCGAGACAGGCCTCAGTGTG-3'; Rev: 5'-GAATCGGCCACCGGTAAAGAG-3';

Carnitine palmitoyl-transferase 1b (CPT1b): Fwd: 5'-TCCCAGGCAAAGAGACAGACTTGC-3'; Rev: 5'-GCAGGCGCGAGCCCTCATAG-3'

Statistical analyses

Sample size was based on previous results published by Soares et al (5). Statistical analyses were performed using the software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA). Normality was evaluated using the Kolmogorov-Sminorv test, and outliers were detected using the Grubb's test. The data were analyzed using the Student's *t* test or a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls multiple comparison test (parametric variables). Non-parametric variables were analyzed using either the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparisons test. Variance was similar between groups that were statistically compared. The results are presented as the mean \pm standard error (parametric variables) or median and interquartile interval (non-parametric variables), with a significance level of 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

Effect of gluten supplementation on food intake and body composition: Energy intake of mice fed high-fat diets (HFD and HFD-G) was greater than energy intake of mice fed standard diets (CD and CD-G). As expected, mice from the HFD groups showed a higher weight gain compared with mice fed the standard diets. The addition of wheat gluten (4.5%) did not alter food intake. Despite the same energy intake, animals from the CD-G and HFD-G groups showed an increased body weight, as well as VAT and SAT expansion, compared with their respective controls (Figure 1).

Wheat gluten absorption and biodistribution in peripheral tissues: We studied gluten intestinal absorption and the kinetics of biodistribution using ^{99m}Tc -radiolabelled gluten (^{99m}Tc -GLU).

Initially, we confirmed the purity of ^{99m}Tc -GLU using chromatography. The results showed a purity of $92.3 \pm 2.1\%$, which is an acceptable level of radiochemical impurities ($^{99m}\text{TcO}_4^-$ and $^{99m}\text{TcO}_2$ mainly). Free technetium ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) is mainly retained in the thyroid because of similar characteristics to the iodide ion, and the *in vivo* stability of ^{99m}Tc -GLU was confirmed by the absence of radioactivity in thyroid images from animals that received ^{99m}Tc -GLU (Figure 2).

The transit of ^{99m}Tc -GLU was analyzed 1h, 2h, 4h and 6h after gavage. After one hour, gluten was found in the stomach and small intestine. After two hours, the non-absorbed fraction reached the ileum and cecum. Four and six hours after gavage, gluten was detected exclusively in the large intestine, representing the fraction that was not digested and absorbed (Figure 3 A-E). ^{99m}Tc -GLU was mainly detected in the blood and liver, but also in VAT, as soon as 30 minutes after gavage. Although the kinetics of ^{99m}Tc -GLU show a slower initial absorption in the HFD-G (30 min) compared to the CD-G group, it becomes similar 1h and 2h after gavage. As result, the total ^{99m}Tc -GLU detected in all sites was similar between CD-G and HFD-G groups (Figure 3 F-H).

Energy expenditure and thermogenesis: Because the increase in total weight and adiposity was not associated with changes in food intake, we investigated if it could be a result of differences in energy expenditure both the fasting and fed states. Indirect calorimetry showed that in the fed state, there were no differences in VO_2

consumption, in the CD groups (CD 23.7±0.7 mL/min/kg vs. CD-G 25.4±0.9 mL/min/kg) or HFD groups (HFD 28.5±0.6 mL/min/kg vs. HFD-G 28.9±1.9 mL/min/kg). Energy expenditure was not different among groups (CD 180.0±12.7 mL/min/kg vs. CD-G 179.2±5.8 mL/min/kg; HFD 195.3±4.0 mL/min/kg vs. HFD-G 191.4±12.9 mL/min/kg). When the fasting state was analyzed, lower basal oxygen consumption was detected in the CD-G and HFD-G groups over time. Although a modest but statistically reduction in oxygen consumption ratio was seen in CD-G group ($p<0.05$), total daily EE was not different comparing CD ad CD-G groups. In the HFD groups, EE was reduced by more than 10% in HFD-G compared to HFD mice (Figure 4).

To further understand the molecular mechanisms supporting the reduced caloric expenditure associated with gluten intake, we studied the expression of molecules associated with thermogenesis in SAT and BAT. In BAT, wheat gluten intake reduced mitochondrial uncoupling protein 1 (UCP1) and increased UCP1 regulator protein PPAR γ coactivator 1-alpha (PGC1 α) expressions in HFD mice. No significant differences were observed in Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) or PR domain containing 16 (PRDM16) expression, both of which are related to the development of brown adipocytes and multilocular morphology. No differences were observed in BMP7 and PRDM16 expression in CD groups (Figure 5).

In SAT, no differences were observed in PGC1 α and PRDM16 expression; however, we found a decrease of UCP1 and BMP7 expression in both groups fed with gluten-rich diets (CD-G and HFD-G), which was associated with the differentiation of white into brown adipocytes in SAT (Figure 5).

Effect of wheat gluten on adipocyte expression: We studied the expression of molecules related to lipid metabolism and adipokine homeostasis in adipocyte cultures from mice in the four groups. In CD mice, wheat gluten intake increased the expression of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and showed a tendency to increase TNF ($p=0.06$). No differences were observed in leptin and adiponectin. In HFD mice, only adiponectin expression was reduced in the HFD-G group. No alterations were detected for metabolic-related proteins in the CD groups. In HFD mice, gluten led to a reduction in PPAR α , PPAR γ and in hormone-sensitive lipase (HSL) expression (Figure 6).

DISCUSSION

In the present study, we confirmed the obesogenic effects of wheat gluten that were observed previously by Soares et al (5), and demonstrated that such an effect can also be detected in animals that received a standard diet. Despite having had the same energy intake, weight gain was approximately 20% higher in mice fed gluten-enriched diets compared to the respective gluten-free groups. Adipose tissue depots were increased by approximately 30% in CD-G and HFD-G groups. No other controlled studies using animal models or clinical trials have evaluated the obesogenic effects of gluten intake. A study with pigs showed a greater weight gain among animals fed a cereal-based diet containing gluten; however, it was a non-controlled study, and the effects of gluten could not be measured (9).

It is not clear if the effects of dietary gluten on body weight are result of direct action on adipose tissue, or if it is a consequence of the systemic inflammatory profile caused by its presence in the gastrointestinal tract. In the present study, we investigated if gluten is detected in adipose tissue, an essential condition for a (possible) direct effect of gluten on that tissue. We hypothesized that mechanisms linked to a direct effect of gluten or its

peptides could be involved in promoting weight gain. In support of this, Drago et al. (10), showed that the gluten peptide gliadin increases intestinal permeability, permitting it to reach extra-intestinal organs and alter the expression of inflammatory cytokines.

In our study we detected the presence of radiolabelled gluten in the circulation and peripheral organs, including VAT, which suggested that this protein and its fractions could also act directly on these tissues. The small presence of gluten peptides in the circulation is in agreement with the low digestibility of this protein related to its glutamine and proline content. Gluten peptides were shown to present more than 50 toxic epitopes, exerting cytotoxic, immunomodulatory and gut-permeating activities, with the 33-mer gliadin fragment being the most immunogenic (12). It is possible that, after oral intake, such peptides would act on adipose tissue and induce specific changes in cell metabolism.

We investigated the possible mechanisms of gluten's effect on weight gain, including thermogenesis and the browning process in BAT and SAT. In the fasting state, gluten intake in HFD mice reduced VO_2 and energy expenditure compared to mice fed HFD without gluten, suggesting that there was reduced thermogenesis. This phenomenon was also observed in CD-G mice, although to a lesser extent. In the fed state, the effect of gluten intake was not observed. We believe that because of the increased energy expenditure caused by the thermic effect of food, the smaller but significant effect of gluten on basal metabolism could be masked. To better characterize thermogenesis and browning, we studied important thermogenesis-linked proteins in BAT and SAT. BAT contains multilocular adipocytes, with a large amount of mitochondria and a high expression of UCP1 (13). This protein has been negatively related to the development of obesity, because the genetic ablation of BAT leads to obesity (14) and induced expression of UCP prevents obesity in mice (15). This protein dissipates proton motive force from oxidative phosphorylation as heat instead of ATP production (16, 17). However, UCP1 is not expressed in classical white adipocytes, but it is present in brite adipocytes ('brown-in-white' or 'beige' adipocytes). These cells are adipocytes that develop in the subcutaneous adipose tissue in a process referred to as 'browning' (18). We found a reduced UCP1 expression in all adipose tissue from mice fed gluten diets, except in BAT of the CD-G group. In SAT, gluten also reduced BMP7 expression in CD-G and HFD-G animals. This protein induces extensive 'browning' of white adipose tissue, regardless of the environmental temperature (19). BMP7 is important for brown adipocyte differentiation and UCP1 expression and it increases in energy expenditure (20). Thus, reduction in BMP7 and UCP1 expression is in agreement with the reduction of VO_2 consumption observed in CD-G and HFD-G animals. Moreover, we also found increased PGC1 α expression in the BAT of the HFD-G group. This protein seems to be the most important regulatory protein in BAT thermogenesis. PGC1 α activates key mitochondrial enzymes in the respiratory chain and UCP1 expression, and also induces mitochondrial biogenesis. PGC1 α is a well-known UCP1 inducer. Nevertheless, it has been shown that reduction of UCP1 could increase the expression of molecules involved in thermogenesis (including PGC1 α), suggesting that this may be a compensatory increase of PGC-1 α expression (21).

We confirmed our previous results, showing that weight gain observed with gluten intake is associated with the reduced PPAR α , PPAR γ and HSL expression, and we showed that this effect is observed in adipose tissue and also in cultures of isolated adipocytes. PPARs play an important role in lipid metabolism and energy homeostasis. PPAR α and PPAR γ downregulation reduce fatty acid oxidation-related genes (22) and HSL expression (23), respectively. We found that PPAR α downregulation in HFD-G could reduce intracellular triglycerides lipolysis and the consequent increase in fat accumulation. Moreover, the reduction of PPAR γ

observed in HFD-G could be related to the downregulation of adiponectin expression by adipocytes (24). Adiponectin is an anti-inflammatory adipokine and its levels negatively correlate with visceral fat accumulation. Evidence indicates that adiponectin protects against obesity-linked metabolic dysfunction (25). In the CD-G mice, weight and adiposity gains were associated with reduced VO₂ consumption that could be related to downregulation of UCP1 and BMP7 in SAT and upregulation of the proinflammatory cytokines IL-6 and TNF in adipocytes from VAT. IL-6 and TNF are pro-inflammatory cytokines that have a central role in inflammation and their increased secretion contributes to metabolic dysfunction in obesity (25). TNF participates in obesity-related systemic insulin resistance by inhibiting the insulin receptor tyrosine kinase in muscle and fat (26). IL-6 levels are positively correlate with adiposity (27) and its increase is predictive of the development of type 2 diabetes (28).

In HFD mice fed a gluten diet, the obesogenic effect of wheat gluten was more prominent than in CD mice. The pro-inflammatory adipokine leptin regulates feeding behavior through the central nervous system. Its levels in the blood positively correlate with adipose mass, indicating the occurrence of leptin resistance in obese individuals (25). It could be expected that leptin expression would be higher in CD-G and HFD-G compared with their respective controls, because body weight was higher in those mice. However, leptin is secreted mainly by subcutaneous adipose tissue that was not used in our adipocyte cultures (29). Results from our adipocyte cultures are in agreement with the results found in adipose tissue by Soares et al. (5) showing the reduction of PPAR α and PPAR γ are associated with the reduction of HSL in HFD-G mice. These results support our hypothesis that gluten intake affects lipid metabolism in adipocytes of obese mice.

As mentioned above, HFD-G and CD-G presented different profiles of adipokine production in adipocyte cultures. In CD mice, only the pro-inflammatory cytokines TNF and IL-6 were increased in the CD-G group, while in HFD mice, fat metabolism enzyme expression was more affected by gluten. These results suggest that gluten could act on different pathways and is more intense in the presence of metabolic alterations linked to obesity. The causes of such effects were not explored in the present study and deserve future investigations.

Our study supports the hypothesis that gluten intake (4.5% of diet) can contribute to an acceleration of body weight gain that results from a reduction in energetic expenditure. The present results open a field of study that will help us to understand the association between gluten or gluten peptides and fat metabolism.

We conclude that gluten or its peptides could reach extra-intestinal organs, such as liver and VAT, supporting a direct effect on those sites. Moreover, the inclusion of wheat gluten in isocaloric diets decreases thermogenesis, browning and energy expenditure, and accelerates weight gain and adiposity in CD-G and, mainly, in HFD-G mice.

Acknowledgments: This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PRPq (Pro-reitoria de Pesquisa of UFMG), FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). We thank Maria Helena Alves for animal care and all LABiN (Laboratório de Aterosclerose e Bioquímica Nutricional) members for their contributions and assistance.

REFERENCES

1. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 2007;24(2):115-9.

2. Shewry PR, Halford NG, Belton PS, Tatham AS. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002;357(1418):133-42.
3. Marcason W. Is there evidence to support the claim that a gluten-free diet should be used for weight loss? *J Am Diet Assoc.* 2011;111(11):1786.
4. Gaesser GA, Angadi SS. Gluten-free diet: imprudent dietary advice for the general population? *J Acad Nutr Diet.* 2012;112(9):1330-3.
5. Soares FL, de Oliveira Matoso R, Teixeira LG, Menezes Z, Pereira SS, Alves AC, et al. Gluten-free diet reduces adiposity, inflammation and insulin resistance associated with the induction of PPAR-alpha and PPAR-gamma expression. *J Nutr Biochem.* 2013;24(6):1105-11.
6. Faintuch BL, Teodoro R, Duatti A, Muramoto E, Faintuch S, Smith CJ. Radiolabeled bombesin analogs for prostate cancer diagnosis: preclinical studies. *Nucl Med Biol.* 2008;35(4):401-11.
7. de Barros AL, Mota L, Ferreira CeA, Oliveira MC, Góes AM, Cardoso VN. Bombesin derivative radiolabeled with technetium-99m as agent for tumor identification. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(21):6182-4.
8. ROBBELL M. METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS. I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM AND LIPOLYSIS. *J Biol Chem.* 1964;239:375-80.
9. Jönsson T, Ahrén B, Pacini G, Sundler F, Wierup N, Steen S, et al. A Paleolithic diet confers higher insulin sensitivity, lower C-reactive protein and lower blood pressure than a cereal-based diet in domestic pigs. *Nutr Metab (Lond).* 2006;3:39.
10. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A, Sapone A, et al. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol.* 2006;41(4):408-19.
11. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol.* 2006;176(4):2512-21.
12. Fasano A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev.* 2011;91(1):151-75.
13. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359.
14. Lowell BB, S-Susulic V, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, et al. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature.* 1993;366(6457):740-2.
15. Kopecky J, Clarke G, Enerbäck S, Spiegelman B, Kozak LP. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest.* 1995;96(6):2914-23.
16. Klingenberg M, Huang SG. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1415(2):271-96.
17. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(1):24-36.
18. Klingenspor M, Herzig S, Pfeifer A. Brown fat develops a bright future. *Obes Facts.* 2012;5(6):890-6.
19. Boon MR, van den Berg SA, Wang Y, van den Bossche J, Karkampouna S, Bauwens M, et al. BMP7 activates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity only at subthermoneutrality. *PLoS One.* 2013;8(9):e74083.
20. Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature.* 2008;454(7207):1000-4.
21. Kontani Y, Wang Y, Kimura K, Inokuma KI, Saito M, Suzuki-Miura T, et al. UCP1 deficiency increases susceptibility to diet-induced obesity with age. *Aging Cell.* 2005;4(3):147-55.
22. Lee JY, Hashizaki H, Goto T, Sakamoto T, Takahashi N, Kawada T. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α enhances fatty acid oxidation in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;407(4):818-22.
23. Deng T, Shan S, Li PP, Shen ZF, Lu XP, Cheng J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma transcriptionally up-regulates hormone-sensitive lipase via the involvement of specificity protein-1. *Endocrinology.* 2006;147(2):875-84.
24. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, et al. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes.* 2001;50(9):2094-9.
25. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):85-97.
26. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest.* 1994;94(4):1543-9.
27. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(5):1313-6.
28. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001;286(3):327-34.
29. Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, Lord RV. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(5):884-9.

FIGURE

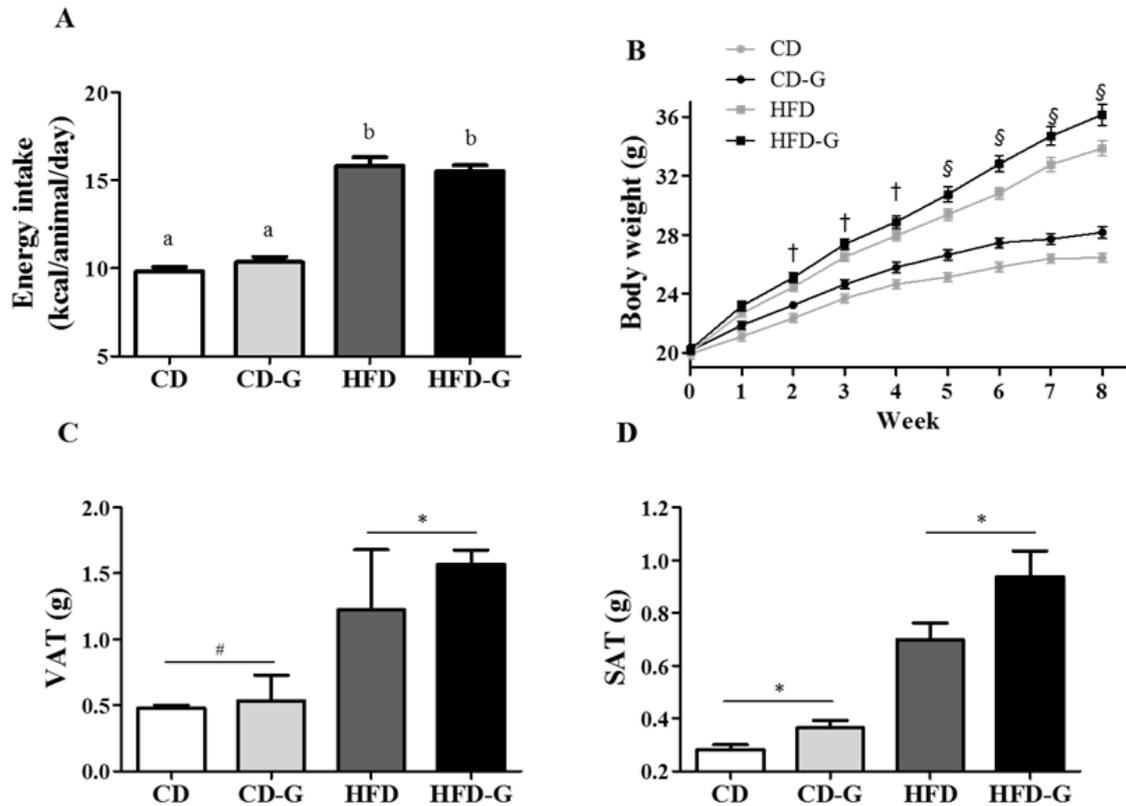


Figure 1: Average energy intake, body weight and adiposity of CD, CD-G, HFD and HFD-G mice. A: Estimated average of the energy intake per cage, in calories/animal/day, n=12/12/20/18 cages. Kruskal-Wallis test + Dunn's test. The different letters indicate p<0.05. B: Weekly body weight (g), n= 44/46/43/42. One-way ANOVA + Newman-Keuls post-test (p<0.05). † Statistical difference between CD and HFD. § Statistical difference among four groups. C: Visceral adipose tissue weight (g), n=44/46/43/42; # Bars present median and line interquartile interval - Mann-Whitney test; p<0.05. D: Subcutaneous adipose tissue weight (g), n=26/25/25/24. Student's t test, *p<0.05. CD (control-standard diet); CD-G (control-standard diet + wheat gluten); HFD (high-fat diet); HFD-G (high-fat diet + wheat gluten). Except for Figure 6C (CD and CD-G groups), bars represent the mean and vertical lines represent standard error.

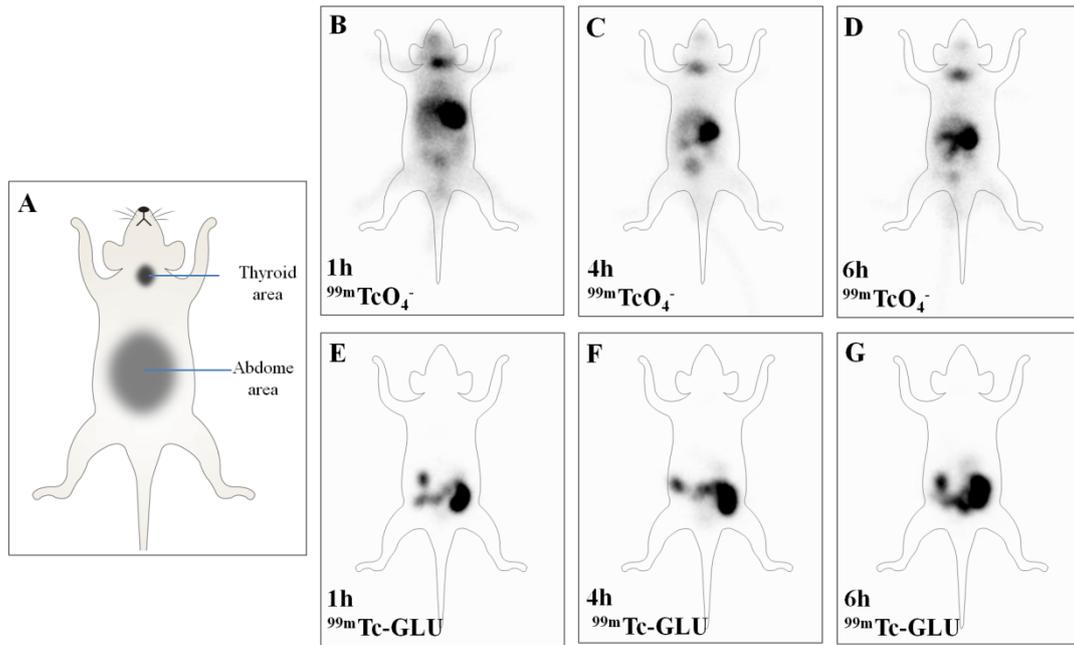


Figure 2: *In vivo* scintigraphic images obtained using a gamma-camera. A: Schematic figure representing how the animal was disposed. B-D: Scintigraphic images of C57Bl/6 mice captured using a gamma-camera at 1h (B), 4h (C) and 6h (D) after gavage of 5.5MBq of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (n=3). E-G: Scintigraphic images captured using a gamma-camera at 1h (E), 4h (F) and 6h (G) after gavage of 5.5MBq of $^{99m}\text{Tc-GLU}$ (n=4).

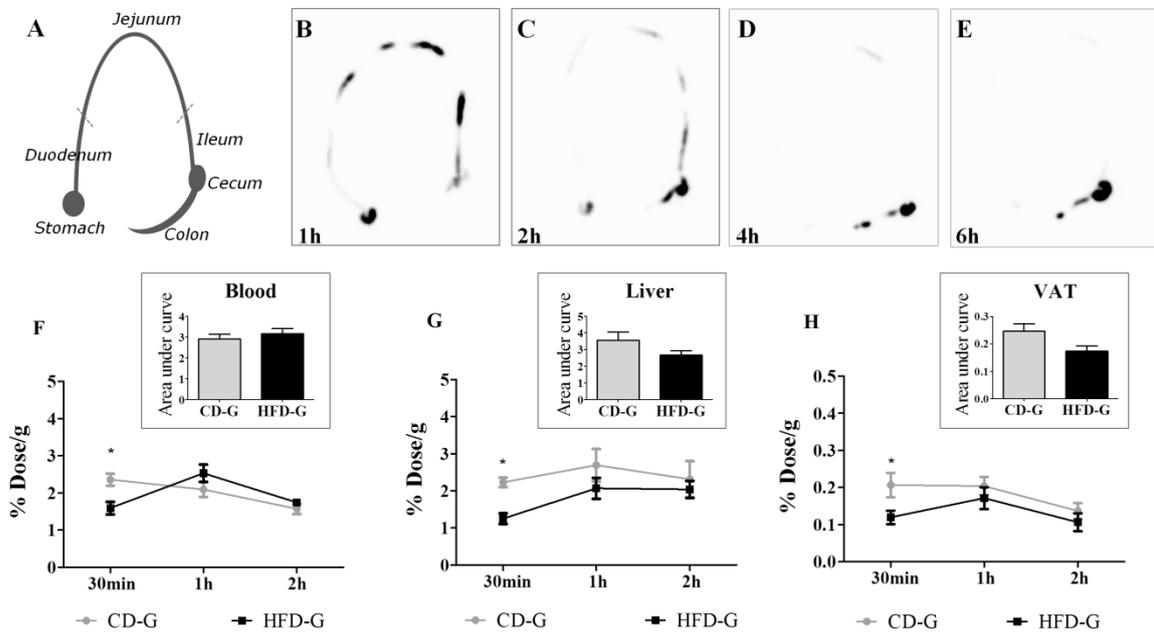


Figure 3: Scintigraphic images of the intestinal tract and biodistribution of wheat gluten radiolabeled with Technetium ($^{99m}\text{Tc-GLU}$) in the blood, liver and visceral adipose tissue (VAT). A: Schematic representing experiments how the gastrointestinal tract was disposed. B-E: Scintigraphic images of the stomach and small and large intestine captured using a gamma-camera at 1h (B), 2h (C), 4h (D) and 6h (E) after gavage of 5.5MBq of $^{99m}\text{Tc-GLU}$ (n=3 per time). F-H: The absorption kinetics of $^{99m}\text{Tc-GLU}$ and the area under curve for blood, liver and visceral adipose tissue (VAT). CD-G (control-standard diet + wheat gluten); HFD-G (high-fat diet + wheat gluten); n=6 per group per time. Statistical test: *p<0.05 (Student's t test). Results are expressed as the mean (dots and bars) and standard error (vertical lines).

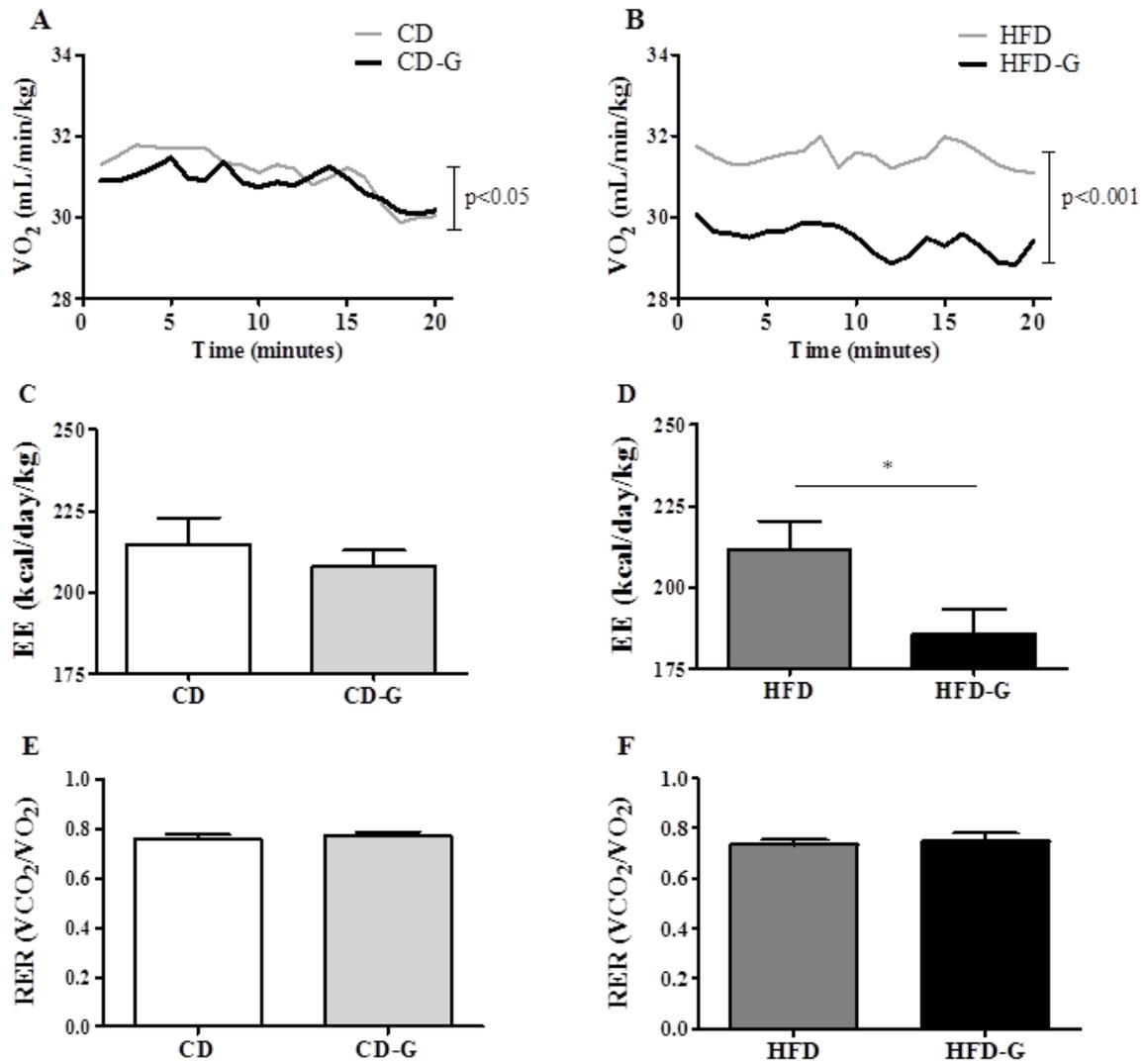


Figure 4: Oxygen consumption (VO₂), mean energy expenditure (EE) and respiratory exchange ratio (RER) of CD, CD-G, HFD and HFD-G mice in the fasting state. A, B: The oxygen consumption measurement of CD and HFD groups (mL/min/kg). Statistical test: Paired student's t test. Lines represent the mean of each minute. C, D: Energy expenditure (EE) of CD and HFD groups (kcal/day/kg). E, F: Respiratory exchange ratio (RER=VCO₂/VO₂) of CD and HFD groups. CD (control-standard diet); CD-G (control-standard diet + wheat gluten); HFD (high-fat diet); HFD-G (high-fat diet + wheat gluten). * p<0.05 (Student's t test). Bars represent the mean and vertical lines represent standard error; n=9/10/15/15.

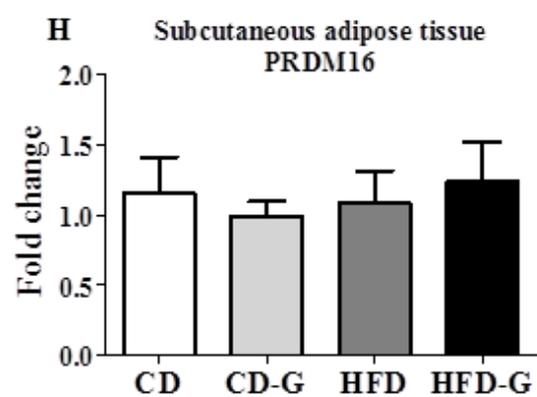
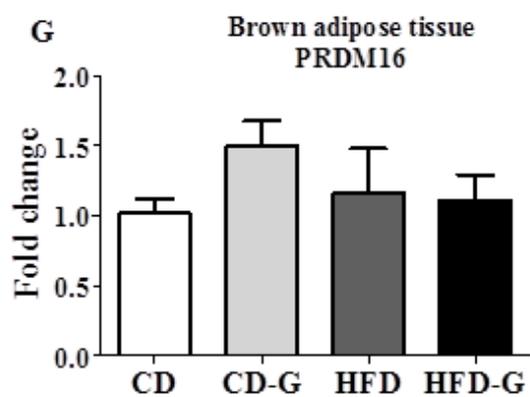
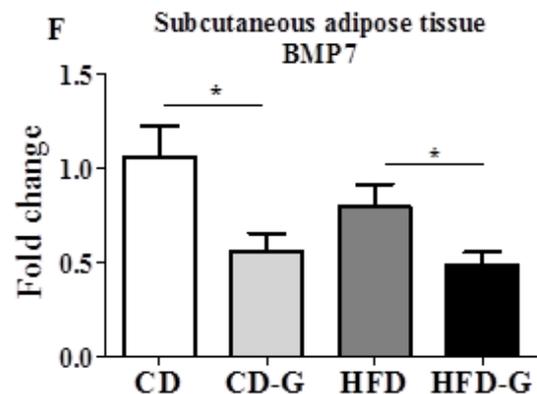
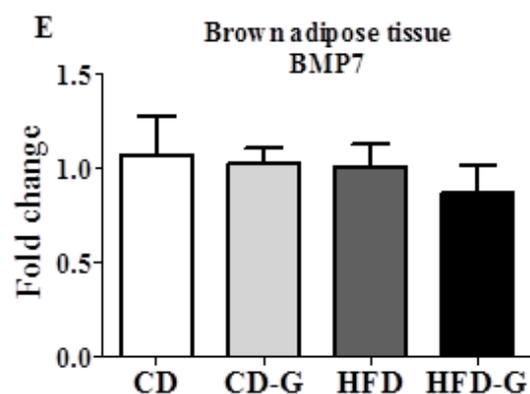
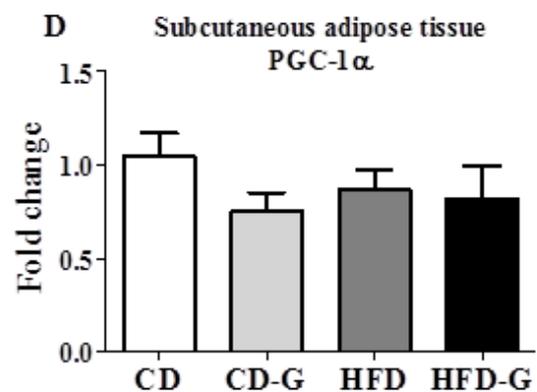
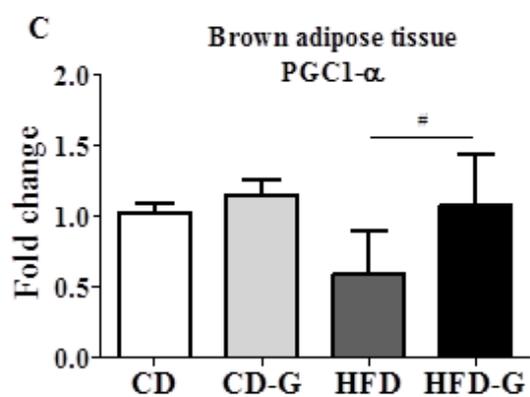
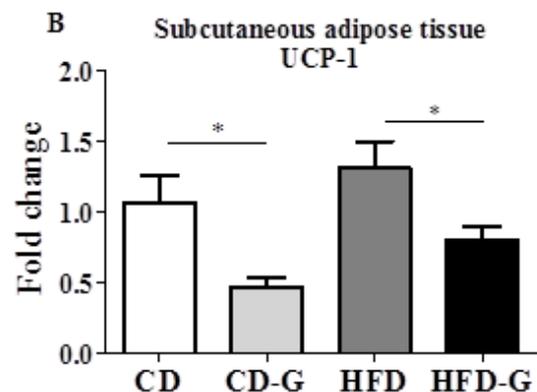
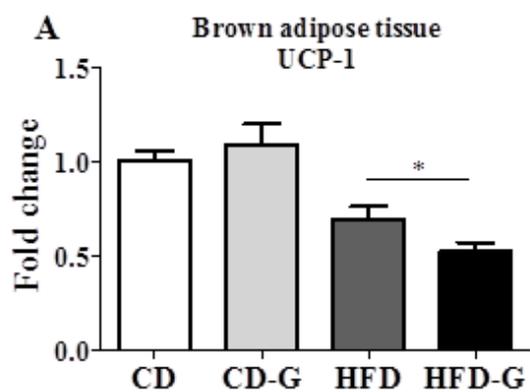


Figure 5: Expression of thermogenesis-related proteins in the brown adipose tissue (BAT) and subcutaneous adipose tissue (SAT) of CD, CD-G, HFD and HFD-G mice. UCP1: uncoupling protein 1; PGC1 α : peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha; BMP7: bone morphogenetic protein 7; PRDM16: PR domain containing 16. Analyses were performed using qRT-PCR. CD (control-standard diet); CD-G (control-standard diet + wheat gluten); HFD (high-fat diet); HFD-G (high-fat diet + wheat gluten). A: n=9/10/10/11; B: n=6/7/7/7; C: n=8/10/10/11; D: n=7/7/7/7; E: n=5/5/5/5; F: n=6/7/7/7; G: n=5/5/5/5; H: n=6/7/7/7. *p<0.05 (student's t test), # p<0.05 (Mann-Whitney test). Bars represent the mean and vertical lines represent the standard error except for Figure 5C which shows the median and interquartile interval, respectively. Reference value (fold change=1) for mice fed control diet (CD and CD-G) is the mean of values of CD group mice. For mice fed high fat diet (HFD and HFD-G) fold change = 1 is the mean of HFD group mice.

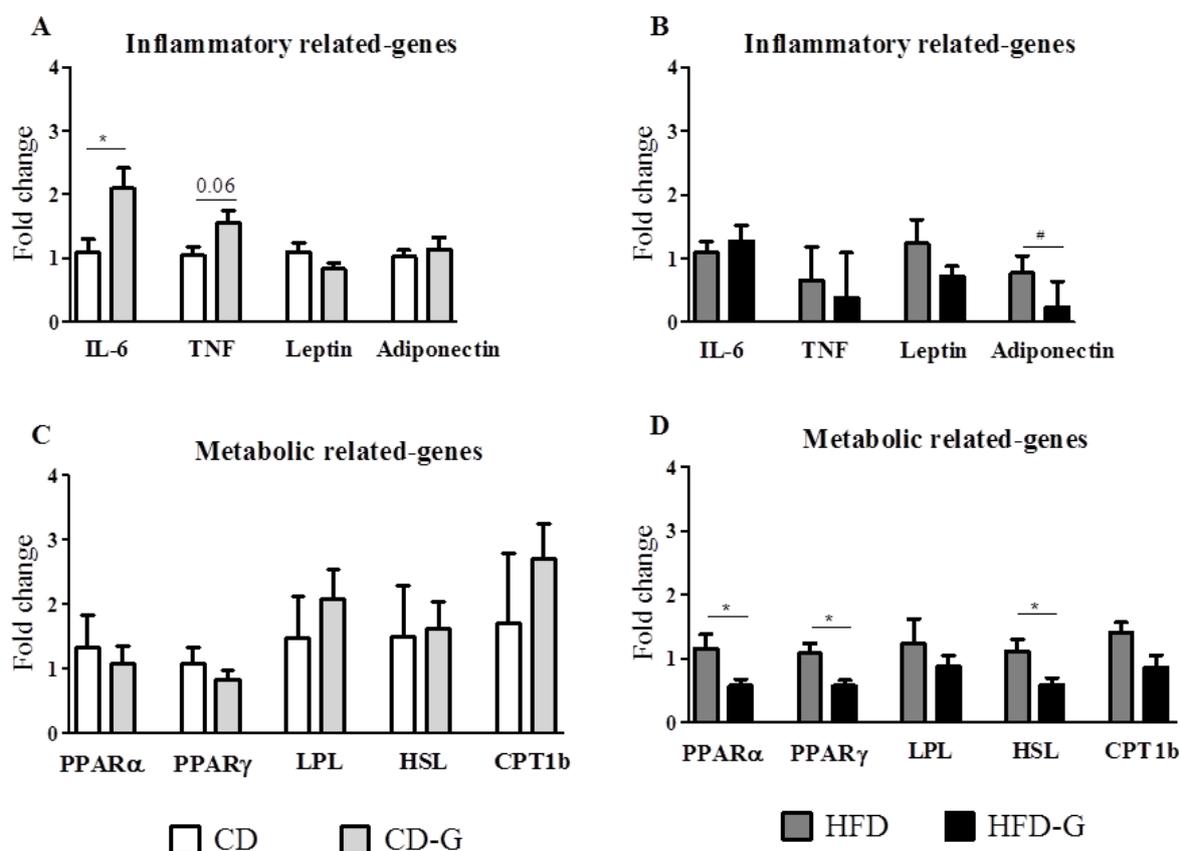


Figure 6: Effects of wheat gluten on inflammatory and metabolic-related gene expression in culture of adipocytes from CD, CD-G, HFD and HFD-G mice. A and B: Inflammatory-related gene expression in adipocyte cultures from (A) CD (control-standard diet) and CD-G (control-standard diet + wheat gluten) or (B) HFD (high-fat diet) and HFD-G (high-fat diet + wheat gluten). C and D: Metabolic-related gene expression in adipocyte culture from (C) CD and CD-G and in (D) HF and HFD-G. IL-6: interleukin 6 TNF: tumor necrosis factor; PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor alpha; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor gamma; LPL: lipoprotein lipase. HSL: hormone-sensitive lipase. CPT1: carnitine palmitoyl transferase-1. Analyses were performed using qRT-PCR; A: n=5/6; B: n=8/7, C: n=5/6; D n= 8/8. Statistical test: *p<0.05 (Student's t test) and #p<0.05 (Mann-Whitney test). Bars represent the mean and vertical lines represent standard error, except for Figure 6A (leptin) and Figure 6B (TNF and adiponectin), which represent median and interquartile interval, respectively. Reference value (fold change=1) for mice fed control diet (CD and CD-G) is the mean of values of CD group mice. For mice fed high fat diet (HFD and HFD-G) fold change = 1 is the mean of HFD group mice.