

Estudo da influência do glúten sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em animais submetidos a modelos de doenças neuropsiquiátricas

Study of the influence of gluten on behavioral and biochemical parameters in animals submitted in models of neuropsychiatric diseases

Marcia Maria de Souza¹, Franciele Krutzsch¹, Késia Pires Viana Silva¹, Camila André Cazarin, Fellippe Ramos Wolff¹, Álex Wilson Valachinski¹

¹UNIVALI – SC

E-mail: Marcia Maria de Souza - msouza@univali.br

Resumo

A presença de glúten na dieta pode ser desencadeante de vários processos fisiopatológicos que culminam em doenças neuropsiquiátricas além dos problemas gastrointestinais. Nos chamados “sensíveis ao glúten não celíacos”, os dados da literatura são divergentes. **Objetivo:** avaliar o efeito dos tratamentos de diferentes dietas relacionadas ao teor de glúten, sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos. **Métodos:** camundongos C56bl/6j (fêmeas, N:7-10) foram submetidos a testes comportamentais de doenças neuropsiquiátricas. Os animais foram divididos em grupos: G1/ ração enriquecida 75% de glúten (DEG), G2/dieta normal (Nuvilab®- DNN) e G3/dieta isenta de glúten (DIG). Para os testes de depressão e ansiedade, foram introduzidos dois grupos adicionais (controles – positivos) que receberam respectivamente Fluoxetina (20mg/kg mg), Diazepam (0.75mg/kg e galantamina (4mg kg/kg). Após o período de tratamento os animais foram submetidos aos testes comportamentais: Open field (Campo aberto), Suspensão pela cauda (TSC), labirinto em cruz elevada (LCE) e esquiva inibitória (TEI). Foram realizados ensaios bioquímicos para verificar a influência da DEG sobre os parâmetros bioquímicos (ALT, AST, glicose de jejum, colesterol total, HDL, TG). **Resultados:** Os resultados demonstraram que DEG desencadeou comportamentos de ansiedade e depressão nos animais, além de déficits de memória. Promoveu também hiperglicemia, aumento do peso corporal, diminuição do HDL e aumento do LDL. Podendo levar à um mau funcionamento das funções hepáticas (AST e ALT). **Conclusão:** Os resultados em conjunto confirmam os efeitos deletérios causado pelo glúten.

Palavras-chave: Glúten. Depressão. Ansiedade. Memória. Ensaios pré-clínicos. Camundongos.

Abstract

*The presence of gluten in the diet can trigger several pathophysiological processes that culminate in neuropsychiatric diseases in addition to gastrointestinal problems. In the so-called “non-celiac gluten-sensitive”, the literature data are divergent. **Objective:** evaluate the effect of treatments of*

different diets related to gluten content, on behavioral and biochemical parameters. Methods: C56bl/6j mice (female, N:7-10) were subjected to behavioral tests for neuropsychiatric disorders. The animals were divided into groups: G1/food enriched with 75% gluten (DEG), G2/normal diet (Nuvilab®-DNN) and G3/gluten-free diet (DIG). For the depression and anxiety tests, two additional groups were introduced (controls - positive) that received respectively Fluoxetine (20mg/kg mg), Diazepam (0.75mg/kg and galanthamine (4mg kg/kg). The animals were submitted to behavioral tests: Open field, Suspension by the tail (TSC), Elevated plus maze (LCE) and Inhibitory Avoidance (TEI). ALT, AST, fasting glucose, total cholesterol, HDL, TG) Results: The results showed that DEG triggered anxiety and depression behaviors in animals, in addition to memory deficits, it also promoted hyperglycemia, increase in body weight, decreased HDL and increased LDL. may lead to a malfunction of liver functions (AST and ALT) Conclusions: The results together confirm the deleterious effects caused by gluten.

Keywords: *Gluten. Depression. Anxiety. Memory. Preclinical trials. Mice.*

INTRODUÇÃO

As tecnologias para a qualidade de vida relacionadas a saúde do indivíduo podem ser visualizadas e melhoradas ao se investigar uma das necessidades básicas de todo ser vivo: a sua alimentação. O trigo é uma das mais importantes culturas de cereais a nível mundial em termos de produção e utilização na alimentação humana, além de ser uma importante fonte de energia, proteína e fibras¹. Glúten é um termo geral empregado para designar as proteínas do trigo, aveia, cevada e centeio² que, ponto de vista bioquímico, é uma mistura de quatro tipos de proteínas, sendo estas: albuminas, globulinas, gliadinas e gluteninas³. A fração tóxica do glúten é a gliadina que é a responsável pelas manifestações clínicas no sistema gastrointestinal e sistema nervoso central (SNC) que caracterizam a Doença celíaca (DC)^{4,5}.

A DC é uma patologia autoimune que atinge principalmente o intestino delgado de pessoas geneticamente sensíveis a dieta com glúten⁶. As manifestações da DC variam de acordo com a faixa etária do paciente. Nas crianças pequenas estão presentes a diarreia, distensão abdominal e problemas de desenvolvimento. Além disso, vômitos, irritabilidade, falta de apetite e mesmo prisão de ventre podem fazer parte do quadro. Na puberdade e adolescência é comum encontrarmos a anemia, baixa estatura e alguns sintomas neurológicos. Já nos adultos, a apresentação clássica da DC é de crises de diarreia acompanhadas de dor e desconforto abdominal⁷. Ao lado dessas manifestações, há também outras mais silenciosas como: anemia por deficiência de ferro, osteoporose, emagrecimento, dermatites, redução dos níveis de cálcio, alterações hepáticas, sintomas neurológicos e prisão de ventre^{7, 8, 9}. Embora a

DC seja geralmente diagnosticada durante a infância, pode aparecer em qualquer idade¹⁰. Nos países desenvolvidos estima-se que 80% dos casos não são diagnosticados, geralmente devido à ausência de sintomas gastrointestinais e ao pouco conhecimento da doença entre a população¹¹.

Em uma parte significativa dos pacientes, a enfermidade é descoberta por acaso, através da realização de endoscopias por suspeita de úlcera duodenal ou refluxo gastroesofágico. Em outros, durante a investigação de deficiências de vitamina B12, ácido fólico, ferro, cálcio e de quadros de anemia e osteoporose, condições frequentes na DC¹².

O tratamento da doença do glúten ou DC, consiste na eliminação definitiva de alimentos que contenham glúten (trigo, cevada e centeio). Essa medida provoca melhora clínica em dias ou semanas, mas as alterações visíveis nas biópsias do intestino delgado podem persistir por meses ou anos. É muito importante corrigir as deficiências de vitaminas e sais minerais e avaliar a densidade dos ossos, a presença de anemia e de déficits de crescimento. A aderência disciplinada a dietas com restrição de glúten não é tarefa simples, porque ele está presente na maioria dos alimentos industrializados. Os que não o contém são geralmente mais caros e difíceis de achar^{9,11,12}.

Atualmente uma nova abordagem relacionada ao glúten tem ganhado significativo interesse. Os chamados “sensíveis ao glúten não celíacos”. Esse grupo é caracterizado por pacientes com presença de sintomas gastrointestinais e extra intestinais quando expostos a dieta com glúten^{13, 14}. Inicialmente pensava-se que o glúten afetava somente o sistema gastrointestinal, causando danos à mucosa e má absorção. Porém, atualmente uma hipótese alternativa tem sido estudada^{9, 15}.

A associação com a DC a disfunções neurológicas é considerada como pouco estudada. Sabe-se que pacientes com DC têm problemas de cognição^{9, 16}. Estudos em pacientes celíacos demonstraram também maior probabilidade do desenvolvimento de sintomas neurológicos, tais como depressão, ansiedade, distúrbios de sono e menor limiar a dor^{17, 18, 19}. Suspeita-se que essa relação pode ser verdadeira já que existe uma relação cada vez mais estreita entre o mau funcionamento do sistema digestivo, sobretudo no que se refere a microbiota, e os distúrbios neurológicos. E, a microbiota de indivíduos com DC é ligeiramente alterada²⁰.

Também há evidências alterações bioquímicas ocorram no perfil lipídico, além de maior suscetibilidade à inflamação e resistência à insulina em indivíduos com DC^{21,22}

apontando que a presença de glúten na dieta pode ser desencadeante de alguns dos processos mencionados. Especificamente com relação ao SNC um estudo recente tem relacionado a DC ao autismo²³. Na área pré-clínica as necessidades são maiores, portanto, estudos que possam comprovar a influência do glúten sobre o desencadeamento de alterações neuropsiquiátricas, bem como alterações bioquímicas em indivíduos não celíacos são importantes. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito dos tratamentos de diferentes dietas (dieta enriquecida com glúten (75%), dieta normal (Nuvilab®) e dieta desprovida de glúten (Alcon®) do desmame a idade adulta (3 meses), sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos em camundongos C56bl/6j (fêmeas, N-7-10) submetidos a testes farmacológicos de doenças neuropsiquiátricas. Salienta-se que nos chamados “sensíveis ao glúten não celíacos” as consequências dessa sensibilidade (mesmo que não imunológica) ainda é pouco estudada e os dados da literatura são divergentes²⁴.

MÉTODOS

O primeiro passo do processo foi a obtenção das diferentes dietas.

Dieta Normal Nuvilab – (DNN) – a ração normal utilizada como parâmetro (controle negativo) para os experimentos é a ração Nuvilab® com 15-16 mm de diâmetro e 30-40 mm de comprimento, cuja composição é: milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, óleo vegetal, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum), vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, sulfato de manganês, sulfato de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT. O total de glúten da ração não foi informado pela empresa.

Dieta enriquecida em glúten (DEG) – a ração enriquecida em glúten foi elaborada a partir de 300 g da farinha do glúten da marca Foco Alternativo (conhecida como farinha seitan com 75% a mais de glúten conforme indicação do fornecedor), adicionada a 700 g de ração normal (Nuvilab®) utilizada para alimentação dos animais. Os pellets de ração normal foram triturados até a obtenção de um farelo e misturados com a farinha enriquecida com glúten. Água (550 ml) foi adicionado à mistura gradativamente até que se obtivesse uma massa semiúmida e homogênea. Após obtenção da massa, foram produzidos pellets com tamanhos semelhantes à ração normal (15-16 mm de diâmetro e 30-40 mm de comprimento) eles foram

deixados em estufa com temperatura de 100 °C para o cozimento por um período de 48 horas²⁵.

Dieta isenta de glúten (DIG) - a ração isenta em glúten foi cedida pela empresa Alcon®. Trata-se da Alcon Club® a qual foi desenvolvida para pets com problemas relacionados ao glúten. (composição: Alfafa desidratada (35 %), fubá de milho*, farelo de soja*, fibra vegetal (5 %), óleo de soja refinado*, cenoura desidratada, extrato de levedura (fonte de nucleotídeos) (0,7 %), premix vitamínico mineral, beterraba desidratada, aditivo prebiótico (0,2 %), farinha de alga (fonte de DHA - Ômega 3) (0,07 %), vitamina C, aditivo adsorvente de odor (0,03 %), corantes (amarelo tartrazina, azul indigotina, vermelho ponceau), antioxidantes (Etoxiquin, Propilgalato, ácido cítrico, BHA, BHT). *Espécies doadoras de gene: *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces viridochromogenes*). Como o produto são grânulos muito pequenos, os mesmos foram moídos, e umidificados para a produção de pellets de tamanho semelhante aos pellets de ração normal e ração enriquecida, sendo também colocados para cozimento em estufa a 100 °C por um período de 48hs conforme dados da literatura²⁵.

Para os experimentos foram utilizados camundongos C56bl/6j fêmeas (25 a 30g), com 3 meses de idade oriundos do Biotério Central da UNIVALI. Após o desmame (1 mês após o nascimento) os animais foram trazidos e mantidos no biotério setorial em caixas com maravalha (06 animais/caixa) adaptadas a uma Rack Alesco® a qual é provida de sistema de exaustão e ar de forma automatizada. A sala é provida com ciclo claro/escuro de 12 horas e aclimação com a temperatura de 22 ± 2 °C. Os animais foram tratados com água e ração (*conforme a dieta preconizada*), exceto durante os experimentos. Os tratamentos com as dietas foi crônico e, foram feitos após o desmame por 2 meses até os animais atingirem a idade de 3 meses e, prolongou-se até o último dia de experimento. Durante 3 vezes por semana era feita a limpeza das caixas e os animais eram pesados. Também foi controlado a quantidade de ração para cada grupo experimental. Durante os experimentos, os animais foram conduzidos para a sala experimental e permaneceram em ambientação por um período mínimo de uma hora. Os protocolos experimentais desse trabalho foram submetidos ao CEUA/ UNIVALI sendo aprovado pelo parecer CEUA 005/20.

Os animais foram divididos em distintos grupos variando de 8 a 10 sujeitos: G1 (grupo) controle tratado com ração normal e que durante os experimentos

receberam agudamente veículo por via intraperitoneal (solução fisiológica a 0.9), G2 animais tratados com ração normal e que receberam agudamente os controles positivos Fluoxetina 20 mg/kg mg i.p. (para teste de depressão), Diazepam 0.75 mg/kg (para teste de ansiedade) e galantamina (4mg kg/kg) para o teste de memória. G3 grande grupo de animais tratados com ração enriquecida em glúten, que nos experimentos de ansiedade, depressão e memória receberam também de forma aguda os controles positivos formando o subgrupo G4. Numa segunda fase dos experimentos, tivemos o G5 (animais tratados com ração normal e que nos experimentos receberam veículo) e G6 animais tratados com dieta livre de glúten. Os experimentos foram realizados conforme demonstrado na figura 1. Decorrido o desmame e 60 dias após o início dos tratamentos com as diferentes dietas, os animais foram submetidos diariamente (um teste comportamental por dia) a modelos comportamentais diferentes conforme os protocolos adotados. A eutanásia dos mesmos ocorreu após o último teste comportamental.

Primeiramente foi realizado a avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre o sistema motor dos animais submetidos aos testes do campo aberto (*Open Field*). O teste avalia efeitos inespecíficos de substâncias sobre o SNC bem como, o efeito de substâncias sobre o sistema motor dos animais. O aparato utilizado para os experimentos com camundongos é um caixa de madeira (30 x 30 x 15 cm) com a frente de vidro para melhor visualizar os animais. O interior do aparato é subdividido em nove quadrantes. Cada animal foi colocado individualmente no aparato e, durante um período de 6 minutos foram observados os seguintes parâmetros comportamentais: número de cruzamentos dos quadrantes (*Crossings*) e número de tentativas de levantadas de cada animal apoiando o corpo sobre as patas traseiras, o que configura atividade exploratória (*Rearing*) conforme descrito por vários autores^{26,27}.

A avaliação dos parâmetros de ansiedade foi feita utilizando o LCE conforme descrito por De Souza et al.²⁸ e adaptado em nossos laboratórios por Gonçalves et al.²⁹ e Dalmagro et al.³⁰. O aparato ao qual foi utilizado é constituído de madeira, em forma de cruz grega, com dois braços abertos (30 x 5 x 2,5 cm), e dois fechados (30 x 5 x 15 cm), os braços foram conectados por uma área central aberta (5 x 5 cm). O aparato é elevado a uma altura de 50 cm sobre o chão. Os animais foram colocados individualmente no centro do aparato com a cabeça voltada ao braço fechado e observados durante 6 minutos. Durante esse tempo, obteve-se o registro da frequência de entrada e o tempo de permanência nos braços abertos (FEA e TPA,

respectivamente), e nos fechados frequência de entrada e o tempo de permanência nos braços fechados (FEF e TPF, respectivamente). Neste experimento os grupos G1 e G4 foram tratados com o ansiolítico Diazepam (0.75mg/kg) por via intraperitoneal e decorridos 30 minutos, foram avaliados no LCE.

A avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros comportamentais de depressão em animais submetidos ao teste da Suspensão pela Cauda (TSC). Esse teste foi desenvolvido inicialmente por Stéru et al.³¹ com o objetivo de mimetizar o estado de anedonia presente em pacientes depressivos, durante a avaliação de um possível efeito tipo- antidepressivo de um tratamento. Os animais foram submetidos a um aparato de madeira dividido em 4 compartimentos de forma que houvesse isolamento visual e acústico entre cada um deles. Nesse aparato os mesmos foram suspensos pela cauda, a cerca de 60 cm da base do aparato, com o auxílio de fita adesiva colocada a 1-2 cm da ponta da cauda por um período de 6 minutos. Durante esse período foi registrado o tempo total de imobilidade de cada animal. Durante o experimento, inicialmente há uma tentativa de escape da situação que lhe é imposta, e não obtendo êxito assumem uma postura imóvel o que mimetiza a anedonia. Substâncias antidepressivas diminuem o tempo de imobilidade dos animais²⁸. Neste experimento, animais dos grupos G1 e G4 foram tratados com fluoxetina (20mg/kg) por via intraperitoneal e 30 minutos após submetidos ao TSC.

Para a avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre a memória de longa duração dos animais foi utilizado o teste da esquiiva inibitória (TEI) conforme procedimento descrito por Izquierdo et al, (2002)³², adaptado em nossos laboratórios por De Souza et al., (2003)²⁸ e Berté et al. (2018)³³. O aparato consiste em uma caixa automatizada (ALBARSCH®), medindo 50 cm de comprimento, 25 cm de largura e 25 cm de altura, com a fase frontal de vidro. Parte do assoalho da caixa consiste em uma plataforma de madeira com 5 cm de altura. O restante do assoalho é constituído de uma grade de barras de bronze, com 1 cm de diâmetro espaçadas a 1 cm uma das outras, através das quais foi possível aplicar uma diferença de potencial regulável de 0,4 mÅ. Durante a sessão de treino, cada animal foi colocado sobre a plataforma e acionou o cronômetro. Cronometrou-se a latência de descida completa do animal da plataforma. Ao atingir o assoalho com as 4 patas na grade, cada animal recebeu em média 3 choques por 2 segundos até que o animal preferencialmente retornasse para a plataforma. Decorridos 24 horas após a sessão de treino, os animais foram testados. Na sessão de teste repetiu-se o procedimento, mas com omissão dos choques. A diferença da latência de descida entre treino e o teste foi considerado o

índice de memória³¹. Nesse experimento, um grupo distinto de animais tratados com ração normal, recebeu galantamina (4mg/kg) pela via intraperitoneal e 30 min após submetido ao TEI.

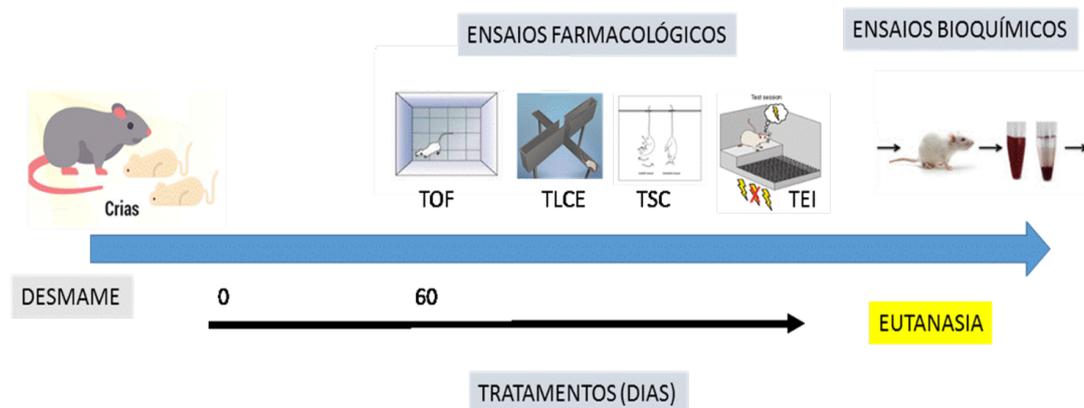
Para os testes bioquímicos o sangue foi coletado. Após anestesia com solução de quetamina e xilazina (1:1) a artéria subclávia foi exposta para coleta do sangue circulante para a avaliação da função hepática (ALT, AST), perfil glicêmico e lipídico (colesterol total, fração LDL e fração HDL).

A avaliação do perfil lipídico e glicemia foi realizada ao final dos experimentos comportamentais. Uma amostra de sangue foi subtraída dos animais pertencentes aos grupos G1 ração enriquecida (foram divididos alguns animais para grupo controle), G2 ração normal (foram divididos alguns animais para o grupo controle) e G3 ração isenta de glúten, em tubos Vacutainer[®] contendo EDTA. As amostras para avaliação de glicemia não tiveram anticoagulante nos tubos de coleta. O plasma foi obtido através de centrifugação e utilizado para determinações de colesterol total, HDL, TG e glicose. As análises foram realizadas no laboratório de análises clínicas da UNIVALI (LEAC), empregando-se o equipamento Cobas Mira (Roche[®]) e Kits Analisa[®]. Para a análise de glicose foi utilizado o método da glicose oxidase, já para colesterol e triglicerídeos utilizou-se o método enzimático. O LDL e VLDL foram calculados por intermédio da fórmula de Friedewald, usada quando a concentração de TG (triglicerídeos) é menor que 400 mg/dL.

Finalmente, para os ensaios paramétricos e bioquímicos os dados obtidos foram apresentados com médias seguidas pelos respectivos erros padrão médio (EMP), e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA), quando necessários, foram seguidos de teste de múltipla comparação a partir dos modelos *post hoc* de Bonferroni e Newman, utilizando o software *GraphPad INSTAT*[®]. Para os testes não paramétricos como o modelo da esquiva inibitória, foi utilizado o teste *pos hoc* de Mann-Whitney e Dunns. Os resultados apresentaram-se como medianas com os intervalos interquartis (75-25).

A linha de tempo relacionada aos ensaios experimentais comportamentais e bioquímicos está representada na figura 1.

Figura 1 - Linha do tempo representativa referente a sequência de experimentos realizados



TOF- Teste do Open Field, TLCE – Teste do labirinto em Cruz elevada (Plus Maze- ansiedade). TSC- teste de suspensão pela cauda (Depressão); TEI – Teste da esquivinha inibitória (memória). Os testes foram realizados por ordem diariamente exceto o TEI que é dividido em sessão de treino e sessão de teste) como os grupos de camundongos fêmeas de 3 meses de idade, conforme dieta estabelecida após o desmame. Ao final dos experimentos os animais foram eutanasiados para procedimento dos testes bioquímicos.

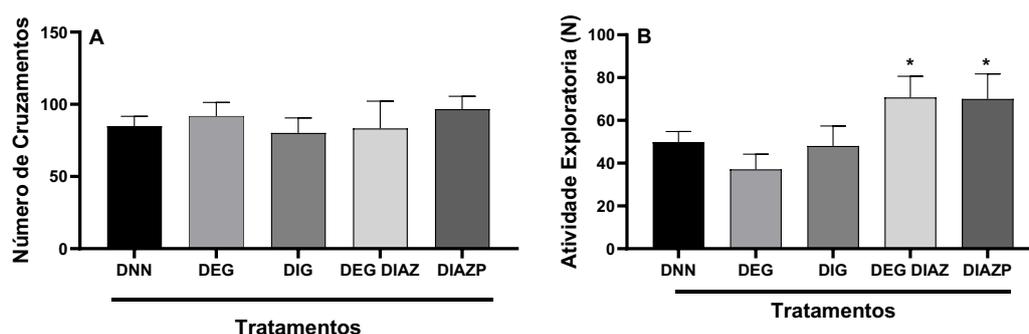
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dos parâmetros comportamentais (cruzamentos e atividade exploratória) do teste do *Open field* estão representados na figura 2. Os resultados demonstraram não haver diferenças estatísticas entre os grupos tratados (Fig. 2-A) quantos aos cruzamentos. Já com relação ao número de atividades exploratórias (*rearings*), os resultados demonstraram que o tratamento dos animais com DEG promoveu uma diminuição desse parâmetro (embora não de forma estatística) o qual foi revertido quando os animais são tratados com diazepam (* $p < 0,05$). (Fig 2-B). E, como era de se esperar, houve aumento de forma significativa (* $p < 0,05$) desse parâmetro comportamental em animais alimentados com DNN que receberam diazepam comparado com animais tratados com DNN e que receberam veículo.

Os resultados relacionados aos parâmetros comportamentais de ansiedade estão demonstrados na figura 3 (A, B, C, D), quando os animais foram submetidos ao teste de ansiedade, o teste do LBC. Observou-se que a frequência de entrada dos braços abertos (FEA) é diminuída nos grupos tratados com DEG e DIG quando se compara com o grupo com DNN + veículo. Entretanto, esse parâmetro é revertido em ambos os grupos quando os animais recebem esses tratamentos mais diazepam ($p < 0.001^{***}$). Também ocorreram diferenças estatísticas no grupo tratado DEG + Diazepam quando comparado com o grupo tratado somente com DEG (### $p < 0.001$) (Fig. 3-A). Com relação ao tempo de permanência nos braços abertos (TPA), observou-se claramente diminuição deste parâmetro no grupo DEG comparado ao

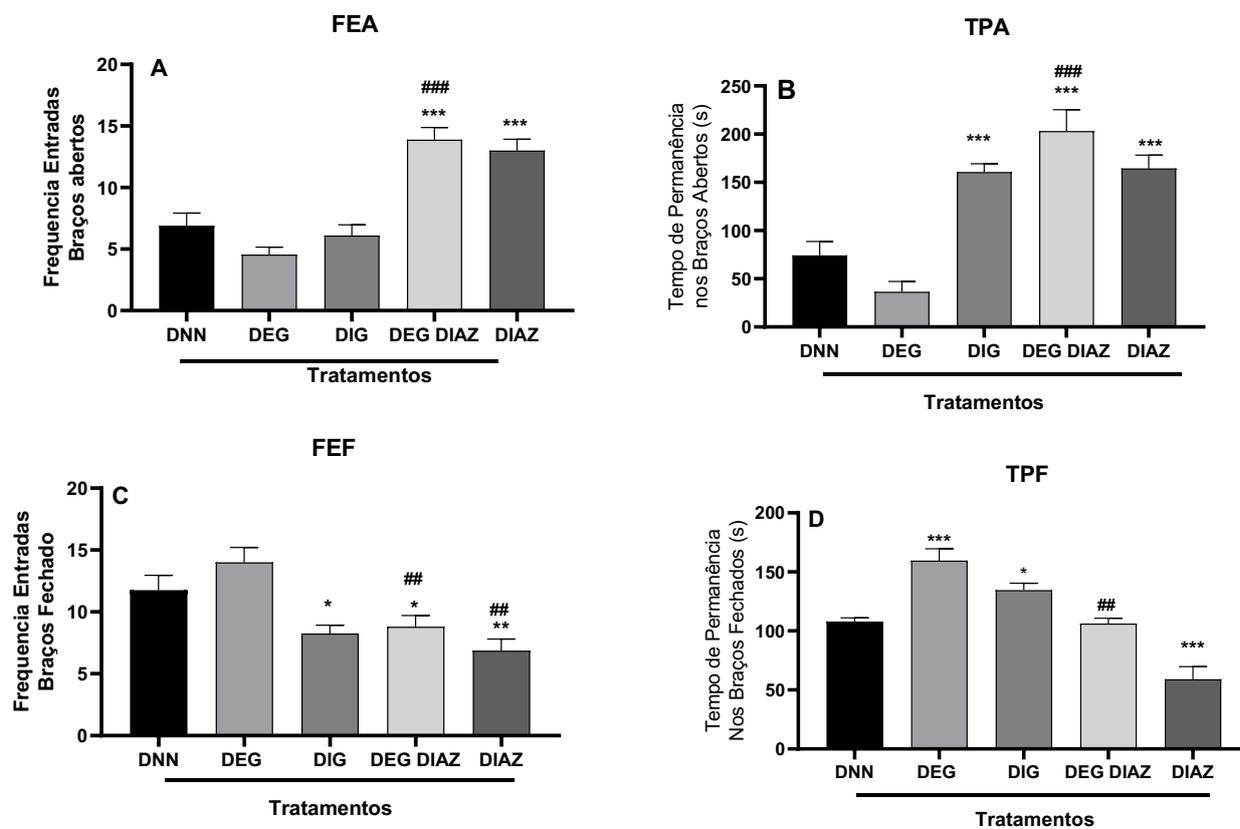
controle tratado DNN (veículo). Porém, esse efeito é revertido com o tratamento dos animais com diazepam (** $p < 0,001$). Animais DIG e, animais com DNN e que recebem diazepam tiveram aumento significativo do TPA (### $p < 0,001$) comparado ao grupo controle DNN e veículo (Fig. 3-B). Como esperado, os parâmetros comportamentais relacionados ao lado fechado também se mostraram significativos com relação aos controles. Na FEF, observou-se aumento do parâmetro comportamental no grupo com DEG comparada com o grupo controle tratado com DNN e veículo. Porém, esse efeito é revertido com o tratamento dos animais com diazepam (** $p < 0,001$). Na FEF, observou-se aumento do parâmetro comportamental no grupo com DEG comparada com o grupo DNN (mesmo sem diferenças estatísticas) e, redução estatística da FEF nos grupos tratados com DIG ($*p < 0,05$), DEG e tratados com diazepam ($*p < 0,05$), DNN e diazepam (** $p < 0,01$) quando comparados com DNN +veículo (Fig.3-C). Quando se observa o FEF os resultados obtidos foram complementares aos demais e estatisticamente significativos. Houve aumento desses parâmetros no grupo tratado com DEG (** $p < 0,001$), DIG ($*p < 0,05$) e, diminuição no grupo tratado com DNN + diazepam (** $p < 0,001$) comparado ao grupo veículo DNN + veículo. Por fim, também foi observado que os animais com r e tratados com diazepam, diferem estatisticamente dos animais com ração enriquecida desprovido desse tratamento (## $p < 0,01$) (Fig. 3-D).

Figura 2 - Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros comportamentais (cruzamentos e atividade exploratória) de animais submetidos ao teste do Open Field.



Cada barra representa a média dos experimentos obtidos com camundongos fêmeas de 3 meses de idade (N= 8-10 animais por grupo) seguidos dos respectivos Erros padrão da média (EPM). Asteriscos ($p < 0,05$) demonstram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo controle (DNN). ANOVA seguido pelo teste post hoc de Bonferroni. DNN (Grupo tratado com ração normal e solução fisiológica 0,9%) DEG (grupo tratado dieta enriquecida com glúten 75%), DIG (dieta isenta de glúten) DEG DIAZ (grupo tratado com dieta enriquecida e Diazepam 0,75mg/kg) DIAZP (grupo tratado com DNN e diazepam 0,75mg/kg). A- corresponde ao número de cruzamentos e B- corresponde ao número de atividade exploratória (*Rearing*).

Figura 3 - Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros comportamentais de ansiedade em animais submetidos ao teste de ansiedade no labirinto em cruz elevado (LCE)

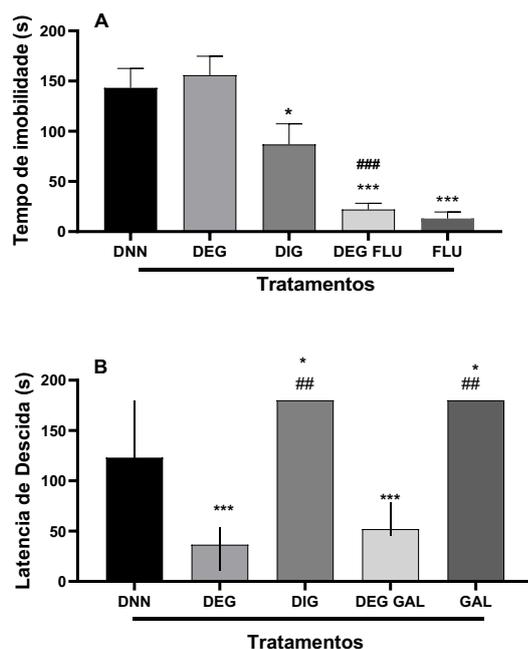


Cada barra representa a média dos experimentos por tratamento, seguido dos respectivos Erros padrão da média (EPM) de experimentos obtidos com camundongos fêmeas de 3 meses de idade (N= 8-10 animais por grupo). Asteriscos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) demonstram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo DNN. Cerquilha (## $p < 0.05$, ### $p < 0.01$, #### $p < 0.001$) demonstram diferenças estatísticas quando comparado ao grupo tratado DEG. ANOVA seguido do teste post hoc de Bonferroni. DNN (Grupo tratado com ração normal e veículo) DEG (grupo tratado com ração enriquecida com glúten 75%), DIG (dieta isenta de glúten) DEG DIAZ (grupo tratado com Ração enriquecida e Diazepam 0,75mg/kg) DIAZP (grupo tratado com ração normal e diazepam 0,75mg/Kg). A= FEA- frequência de entrada nos braços abertos; B=TPA - tempo de permanência nos braços abertos; C=FEF - frequência de entrada nos braços fechados; D= TPF - tempo de permanência nos braços fechados

Os parâmetros comportamentais de depressão estão apresentados na figura 4 A, analisados a partir do teste de Suspensão pela Cauda (TSC). Embora não tenha ocorrido diferenças estatísticas entre os grupos, os resultados demonstraram um leve aumento do tempo de imobilidade dos animais tratados com DEG em relação aos animais tratados com ração normal (DNN). Porém nos grupos tratados com DIG, DNN + Fluoxetina, esse parâmetro é drasticamente e significativamente alterado (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$). Os resultados referentes aos efeitos dos tratamentos sobre a memória em animais submetidos ao teste da esQUIVA inibitória (TEI) são representados na figura 4B. Foi claramente observado que animais tratados com DEG exibiram acentuado e significativo déficit de memória (*** $p < 0.001$) quando

comparados ao grupo DNN +veículo, uma vez que a latência de descida da plataforma do aparato de esquiwa inibitória é significativamente menor. E, curiosamente, esse efeito não foi revertido pelo tratamento com galantamina. Entretanto, os grupos tratados com DIG e DNN + galantamina tiveram aumento significativo da latência de descida (* $p < 0,05$) conforme demonstrado.

Figura 4 - Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre parâmetros comportamentais de depressão (A) e memória (B) em camundongos submetidos aos testes de suspensão pela cauda e teste da esquiwa inibitória.

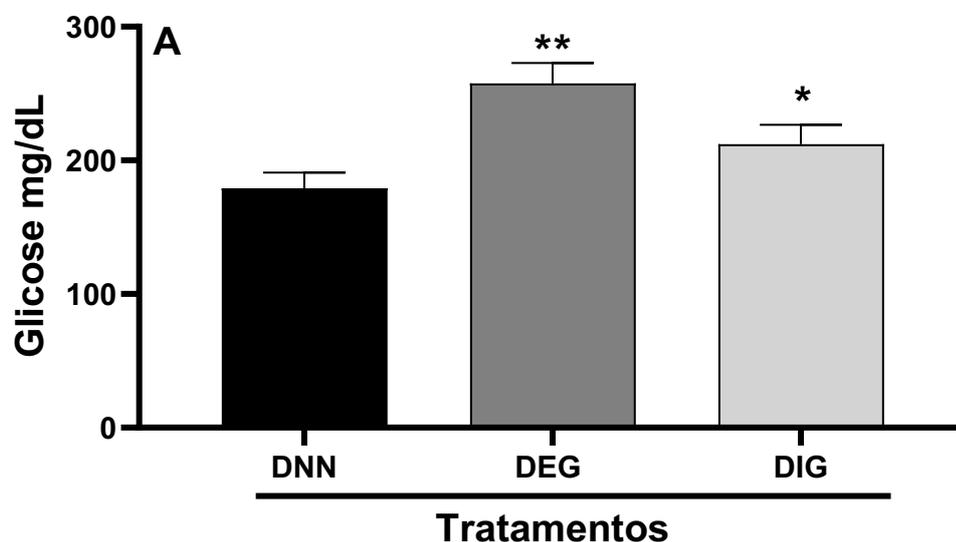


Em **A** cada barra representa a média dos experimentos por tratamento, seguido dos respectivos Erros padrões da média (EPM). Em **B**, cada barra representa a mediana dos experimentos seguidos dos intervalos interquartis (25-75). Asteriscos (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$) demonstram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo DNN. Cerquilhas (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,00$) demonstram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo DEG. ANOVA seguido de teste *post hoc* Bonferroni em A; Dunns e teste de Kruskal-Wallis (KW) em B. DNN- (dieta normal), DEG- (dieta enriquecida com glúten); DIG (dieta isenta em glúten), DEG FLU - (dieta enriquecida com glúten+Fluoxetina 20mg/kg, i.p.), FLU- fluoxetina 20mg/kg, i.p.), DEG GAL-(dieta enriquecida com glúten+Galantamina 4,0mg/kg, i.p.). Ambos os experimentos foram realizados com camundongos fêmeas de 3 meses de idade com N de 8 a 10 sujeitos por grupo

No que tange aos testes bioquímicos, com relação a glicemia, os resultados demonstraram que tanto o tratamento dos animais com ração enriquecida (DEG) ($p < 0,01$) quanto com ração isenta em glúten (DIG) ($p < 0,05$) promoveram aumento da glicemia quando comparados com animais tratados com ração normal (DNN) Porém, a hiperglicemia ocorre de forma mais acentuada nos animais com DEG. A percentagem de aumento glicêmico calculado respectivamente para os grupos DEG e DIG foi de 44,5% e 24,8%. A glicemia elevada nos animais tratados com DEG pode

estar relacionada pela maior ingestão de ração comparado aos outros grupos. (Fig. 5)

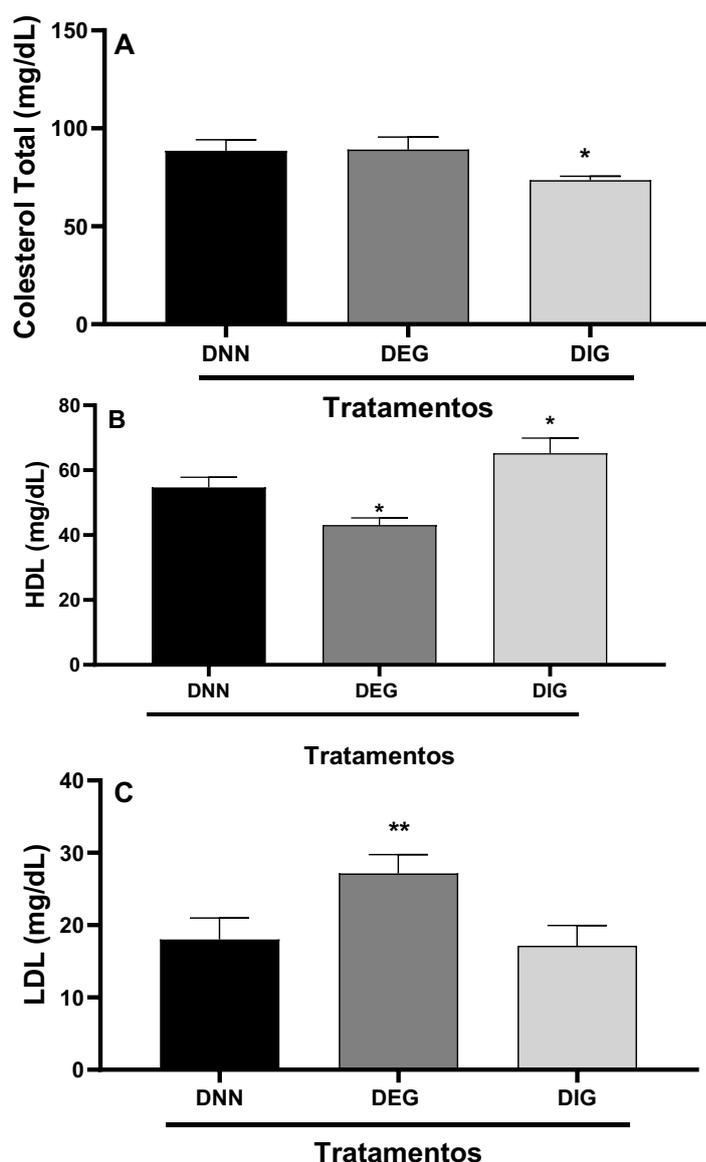
Figura 5 - Avaliação do efeito dos tratamentos sobre a glicemia dos animais.



Cada barra representa a média dos grupos experimentais e os respectivos erros padrões da média (EPMs). Asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) demonstram diferenças estatísticas quando comparado com o grupo que recebeu DNN. ANOVA seguida do teste post-hoc BONFERRONI. Cada grupo foi constituído de 8 a 10 camundongos fêmeas de 3 meses de idade.

Os resultados relacionados ao perfil lipídico dos animais tratados com os diferentes tipos de ração são demonstrados na figura 6. Com relação ao colesterol total, quando comparado ao controle (DNN) foi observado diminuição significativa deste parâmetro ($p < 0,05$) somente no grupo tratado com DIG (Fig 6A). Em relação ao HDL, foi observado um maior aumento desse parâmetro no grupo tratado com DIG, e diminuição no grupo tratado com DEG ($p < 0,05$) (Fig 6B). No que tange ao LDL, foi observado aumento significativo, no grupo tratado com DEG ($p < 0,01$) e não alteração desse parâmetro no grupo tratado com DIG (Fig 6C) quando comparado ao controle.

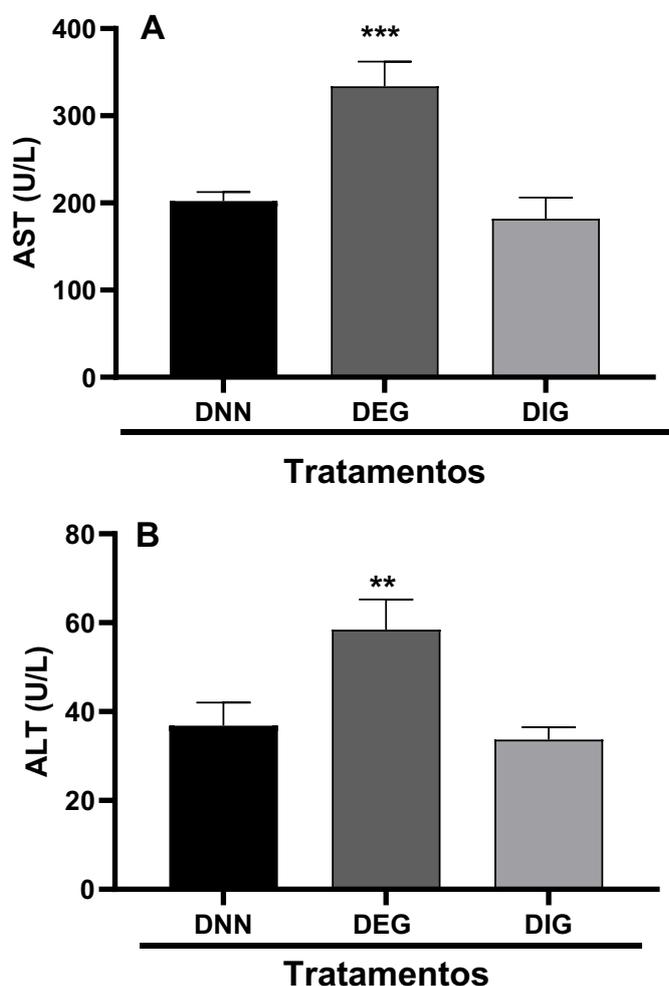
Figura 6 - Avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre o perfil lipídico (colesterol total, HDL e LDL) dos animais.



Cada barra representa a média dos tratamentos seguidos dos respectivos erros padrões da média (EPM). Os planos A, B e C representam respectivamente os resultados referentes ao colesterol total, as frações HDL e LDL. Asteriscos denotam diferenças estatísticas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) quando comparado com o grupo que recebeu ração normal (DNN). ANOVA seguido de teste *post-hoc* de BONFERRONI. Camundongos fêmeas de 3 meses de idade, N-8 a 10 sujeitos por grupo.

Na figura 7 estão representados os resultados referentes aos efeitos dos tratamentos sobre a função hepática dos animais. Observa-se que, comparado ao grupo tratado com DNN, houve aumento considerável e significativo nas aminotransferases AST (** $p < 0.001$) (Fig. 7A) e ALT (** $p < 0.001$) (Fig 7B) dos animais tratados com DEG. O grupo tratado com DIG não demonstrou alterações estatísticas consideráveis dos parâmetros avaliados.

Figura 7 - Efeito dos tratamentos sobre a função hepática dos animais através das alterações das aminotransferases (AST e ALT).



Cada barra representa a média dos tratamentos seguidos dos respectivos erros padrões da média (EPM). Os planos A e B correspondem respectivamente aos resultados referentes aos níveis de AST (Plano A) e ALT (Plano B). Asteriscos denotam diferenças estatísticas (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) quando comparado com o grupo que recebeu dieta normal (DNN). ANOVA seguido de teste *post-hoc* de BONFERRONI. Camundongos fêmeas de 3 meses de idade, N-8 a 10 sujeitos por grupo.

Finalmente na tabela 01 é encontrado os resultados referentes à análise dos pesos dos animais nos diferentes grupos de tratamentos. Os resultados demonstraram que houve aumento significativo do peso ($p < 0.05$) dos animais em todos os grupos quando compara-se início do tratamento e final do tratamento, entretanto, o grupo tratado com DEG teve aumento significativo do peso corporal quando comparado com o grupo que recebeu ração DNN ($p < 0.05$).

Tabela 1 - Avaliação da relação de peso dos animais e dos órgãos com base no tratamento realizado

	DIETA NORMAL (DNN) (média peso g)	DIETA ENRIQUECIDA COM GLÚTEN (DEG) (média peso g)	DIETA ISENTA DE GLÚTEN (média peso g)
Peso corporal inicial	^a 22,55±0.34	^a 23,13±0.12	^a 23,80±0.71
Peso corporal final	^b 28,55±0.44**	^b 32,55±0.34**/##	^b 26,55±0.87*

^a - Peso dos animais no início do tratamento, ^b - Peso dos animais no final do tratamento. Asteriscos *denotam diferenças entre início do tratamento (*p< 0,05; **p< 0,01) # denotam diferenças entre grupos (## p<0,01). Camundongos fêmeas de 3 meses de idade, N-8 a 10 sujeitos por grupo.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente pelas dietas nutricionais, que podem ser utilizadas como uma forma de intervenção terapêutica para as patologias do SNC, bem como como profilaxia das mesmas ³⁴. Os nutrientes presentes nos alimentos podem tanto, auxiliar de forma adjuvante as terapias de processos patológicos do SNC, como por exemplo, alimentos ricos em L- triptofano serem indicados para os casos de depressão³⁵, quanto podem ser os protagonistas no desenvolvimento de algumas disfunções neurológicas, e o glúten se encaixa nessa suposição¹⁴. Por exemplo, vários artigos têm reportado a relação do glúten com os transtornos do espectro autista, um distúrbio do desenvolvimento com alta representação na população mundial^{36, 37}.

A ingestão média diária de glúten em uma dieta ocidental é considerada de 5 a 20g / dia e tem sido implicada em vários distúrbios centrais e periféricos. O glúten é a principal proteína de armazenamento dos grãos de trigo. É uma mistura complexa de várias proteínas relacionadas, mas distintas, principalmente a gliadina e a glutenina. Proteínas de armazenamento semelhantes existem como secalina no centeio, hordeína na cevada e aveninas na aveia e são coletivamente chamadas de "glúten"³⁹, entretanto, é o glúten de trigo um nutriente relacionado às manifestações sintomáticas presentes em pacientes com sensibilidade a ele, tanto os sintomas periféricos sistêmicos (sobretudo os gastrintestinais) quanto os sintomas neurológicos^{14,39}.

No presente trabalho, as relações entre o glúten e parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade, depressão e memória, bem como algumas alterações bioquímicas foram analisadas em animais (camundongos) submetidos a diferentes dietas: dieta normal dos animais fornecida pelo biotério, dieta com farinha de trigo enriquecida com glúten (75%) e uma dieta desprovida do glúten do trigo, com o objetivo de ampliarmos os estudos relacionados aos efeitos desse nutriente tão

comum na alimentação. As pesquisas com animais nessa área são bastante escassas na literatura. O *designer* e o uso de modelos de camundongos que reproduzem as principais características das doenças humanas são fundamentais para avançar nossa compreensão da patogênese das doenças e para testar novas estratégias terapêuticas. Somente recentemente foi validado um modelo animal de DC, o camundongo transgênico DQ8-Dd-villina-IL-15 de DC ⁴⁰, que foi projetado com base no conhecimento adquirido no estudo de amostras intestinais de pacientes com CD, uma realidade muito distante em nossas instituições de pesquisa devido ao alto custo de produção em biotérios.

Especificamente na DC, os sintomas psiquiátricos, como ansiedade, depressão, déficits de memória entre outros, são considerados sintomas extra intestinais potencialmente desafiadores que podem ocorrer antes ou depois do diagnóstico de DC⁴¹. São condições psiquiátricas mais comuns, diagnosticadas em adultos e pacientes pediátricos com DC com predominância no sexo feminino^{41,42}. Na literatura encontramos um único trabalho realizado *in vivo* relacionando o glúten a modificações comportamentais, em camundongos ⁴³, porém com resultados contraditórios, havendo, portanto, a necessidade de explorar mais profundamente o tema.

Com relação à ansiedade e depressão, dados recentes apresentados na literatura têm demonstrado que tais distúrbios psiquiátricos se encontram respectivamente presentes em 62,7% e 34,9% de pacientes celíacos^{43,44}. No presente estudo, para avaliar os parâmetros comportamentais de ansiedade, os animais com diferentes dietas foram submetidos aos testes do *Open-Field* e teste do labirinto em Cruz elevado, ambos testes comportamentais utilizados na pesquisa de substâncias psicoativas ansiolíticas⁴⁵. Primeiramente observou-se que o parâmetro número de atividade exploratória dos animais submetidos ao Open Field foi reduzido nos animais com ração enriquecida em glúten, tendo a reversão deste efeito quando os animais recebem o ansiolítico diazepam. Esses resultados foram reforçados no teste do labirinto em cruz elevado, os parâmetros de ansiedade FEF e TPF encontram-se significativamente aumentados nos grupos tratados com ração enriquecida. No experimento, o medo natural dos animais a ambientes abertos e sua preferência pelos lados fechados do aparato são aumentados nesse grupo, com reversão desse comportamento quando é administrado o ansiolítico benzodiazepínico diazepam. Também é claramente verificado que os animais com ração isenta em glúten têm esses parâmetros diminuídos.

A relação glúten e depressão foi avaliada no presente estudo, através do teste de suspensão pela cauda. O teste da suspensão pela cauda (TSC) desenvolvido por Stéru e colaboradores em 1985^{31,46}. Trata-se de um teste de desespero comportamental semelhante ao teste do nado forçado (TNF), mas com características melhores em termos de analogia de comportamento. O TNF e o TSC têm sido muito usados para avaliar a atividade antidepressiva na fase pré-clínica, devido a sua fácil utilização, grande reprodutibilidade entre os laboratórios e a sua grande habilidade de detectar um grande espectro de agentes antidepressivos⁴⁶. Segundo Stéru (1985)³¹ um animal submetido a uma situação estressante e inescapável apresenta dois tipos de comportamentos alternados, a agitação, característica da tentativa de escape da situação de estresse, e a imobilidade cuja analogia com a depressão é feita pelo estado de anedonia presente nos pacientes. Fármacos antidepressivos, comumente utilizados na clínica, independente do mecanismo farmacodinâmico que possuam, promovem nos animais diminuição do tempo de imobilidade^{31,46}. Nossos resultados demonstraram que no TSC, os animais com dieta enriquecida, apresentaram um tempo de imobilidade superior aos animais controles tratados com ração normal, e surpreendentemente animais tratados com dieta isenta em glúten apresentam significativamente, um tempo de imobilidade menor. No teste observa-se também o efeito do tratamento da fluoxetina. Já há muito tempo, em meados de 1950⁴⁷, foi observado que a dieta sem glúten melhorava o humor em pacientes celíacos. E, em um estudo de revisão foi reportado uma prevalência pontual de depressão significativamente maior em pacientes adultos com DC na maioria dos estudos publicados^{48,49}.

O sistema motor possibilita a realização dos movimentos e a avaliação dos efeitos dos tratamentos sobre o sistema motor dos animais é imprescindível em testes comportamentais para evitar falsos negativos, já que para as avaliações o sistema motor dos animais deve estar intacto³¹. No presente estudo, o parâmetro “crossings” (cruzamentos) no teste do *Open field* foi realizado para avaliação da performance motora dos animais nos diferentes tratamentos. Foi verificado que não houveram alterações motoras dos animais em nenhum dos tratamentos. Entretanto, em pacientes com DC, sintomas como dormência nas pernas, câimbras musculares e dores ósseas, podem alterar padrões de movimentação dos indivíduos. Além disso, uma das formas mais comuns das manifestações neurológicas da sensibilidade ao glúten é a ataxia cerebelar⁵⁰. Suas principais consequências são a perda de coordenação motora e planejamento dos movimentos. A maior parte dos estudos

também mostra a alta prevalência de anticorpos antigliadina (AGA) em pacientes com ataxias esporádicas em comparação com indivíduos saudáveis⁵¹. Desta forma, uma investigação mais aprofundada sobre os efeitos do glúten sobre a motricidade dos animais poderá ser futuramente realizada utilizando testes motores mais específicos como por exemplo o teste do *Rota-rod*, planejado em nossos estudos, porém não executados.

Neste estudo, os efeitos do glúten sobre a memória dos animais foram avaliados utilizando-se o teste da esQUIVA-INIBITÓRIA (TEI). Trata-se de um teste de memória aversiva de fácil utilização e com reprodutibilidade de resultados. A memória aversiva é estabelecida quando animais ao descerem da plataforma do aparato nas sessões de treino, recebem choque de amplitude baixas e quando são testados o mesmo procedimento é efetuado, porém com omissão de choques. A latência de descida entre as sessões de treino e teste são considerados índices de memória e tratamentos que facilitam a memória levam os animais a permanecerem por mais tempo sobre a plataforma enquanto tratamentos que prejudicam a memória impedem que o animal tenha a recordação dos choques^{32,33}. Nossos estudos demonstraram que os animais com ração enriquecida com glúten exibem um prejuízo de memória significativo e, animais com dieta isenta em glúten, ao contrário, tem facilitação da memória da esQUIVA INIBITÓRIA com perfil comportamental e farmacológico semelhante aos animais com dieta normal tratados com galantamina, um medicamento utilizado na terapêutica da Doença do Alzheimer. A literatura aponta que a ingestão de glúten pode trazer dano neurológico silencioso, afetando a tomada de decisão, velocidade do processo cognitivo, atenção e memória e essas deficiências cognitivas podem ser amenizadas após adoção de uma dieta livre de glúten⁵².

Também foi objetivo do presente estudo avaliar o efeito do glúten sobre alguns padrões bioquímicos dentro das nossas possibilidades. Optamos por avaliar o perfil glicêmico, o perfil lipídico e o sistema hepático através da análise das transaminases (TGO e TGP), atualmente denominadas aminotransferases (AST e ALT). As transaminases são enzimas intracelulares que atuam catalisando diversas reações, principalmente no fígado, mas que também se encontram em outros tecidos do organismo, quando estão elevadas constituem um biomarcador importante indicando que existe algum problema, muito provavelmente no fígado. A elevação dos níveis de transaminases é encontrada em pacientes com DC e fazem parte de uma série de sintomas e /ou alterações como diarreia crônica, distensão abdominal,

flatulência, anemia ferropriva, osteoporose de início precoce, hipocalcemia, assim como na deficiência de ácido fólico e vitaminas lipossolúveis que definem o diagnóstico⁵³.

Com relação ao perfil glicêmico os resultados do desse estudo demonstraram que a glicemia dos animais submetidos a dieta de ração enriquecida é muito superior à do grupo tratado com ração normal e ração isenta em glúten, apesar de ocorrer aumento da glicemia em todos os grupos, provavelmente devido ao aumento da ingesta alimentar. Estudos tem demonstrado que o glúten parece ser um determinante potencialmente importante no diabetes tipo 1 (T1D) e no diabetes tipo 2 (T2D). A ingestão de glúten afeta a microbiota e aumenta a permeabilidade intestinal e há evidências de que os peptídeos do glúten, após cruzarem a barreira intestinal, tornam o meio mais inflamatório e, em contato com o pâncreas onde afetam a sua morfologia e podem induzir o estresse das células beta ao aumentar a secreção de insulina estimulada por glicose e palmitato⁵⁴.

O perfil lipídico dos indivíduos também é importante para ser avaliado em dietoterapia. Em um estudo, pacientes com DC apresentaram alterações no perfil lipídico. Homens e mulheres tiveram um aumento significativo no HDL e uma diminuição significativa na razão LDL / HDL^{54,55}. No presente estudo foi demonstrado que a dieta enriquecida com glúten aumenta significativamente os níveis de LDL e diminui também de forma significativa os níveis de HDL dos animais testados, comparados com animais do grupo controle.

Pacientes com DC em uma dieta sem glúten podem apresentar redução do ganho de gordura, da inflamação e da resistência à insulina, resultando na prevenção do desenvolvimento da obesidade e de distúrbios metabólicos⁵⁶. Em adição, a retirada do glúten da dieta parece proporcionar benefícios para problemas de memória e concentração, depressão e ansiedade, insônia, doenças inflamatórias e diabetes.^{57,58} No presente estudo foi demonstrado que o peso corporal dos animais quando avaliado no último dia de tratamento foi significativamente aumentado no grupo com dieta não enriquecida, embora tenhamos observado maior ingesta alimentar no grupo tratado com dieta isenta em glúten indicando preferência pela ração Alcon® (resultados não mostrados). A literatura tem mostrado que qualidade de vida dos celíacos, após o início do tratamento, é reduzida, o que leva à baixa adesão à dieta isenta de glúten. Além disso, essas dietas sem glúten, sem acompanhamento adequado por nutricionista acarretam outros déficits como: aumento do risco de

doenças cardiovasculares, metabólicas, sobrepeso e obesidade, o que poderia explicar o observado em nossos estudos⁵⁸.

CONCLUSÃO

Sumarizando os resultados em conjunto nos permitem corroborar com a literatura no que tange a ensaios pré-clínicos envolvendo o glúten principalmente no que tange aos seus efeitos em situações em que a sensibilidade a este nutriente não seja de caráter imunológico como ocorre na DC. Desta forma pode-se sugerir que o glúten contido em uma dieta, quando elevado, pode interferir em parâmetros comportamentais relacionados a distúrbios neuropsiquiátricos como a depressão e ansiedade, além promover déficits cognitivos e de aprendizagem.

Agradecimentos

Os autores Franciele Krutzsch, Késia Pires Viana Silva e Álex Wilson Valachinski agradecem ao programa de bolsas de Iniciação científica UNIEDU/art 171 e, Camila André Cazarin e Fellippe Wolff agradecem ao CNPq e CAPES respectivamente. Agradecemos também a empresa ALCON[®] pelo fornecimento da dieta livre de glúten para os tratamentos.

REFERÊNCIAS

1. Anjum FM, Khan MR, Din A, Saeed M, Pasha I, Arshad MU. Wheat Gluten: High Molecular Weight Glutenin SubunitS–Structure, Genetics, and Relation to Dough Elasticity. *Journal of Food Science* [Internet]. 2007 Mar 31 [cited 2020 Oct 25];72(3):56–63. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00292.x>. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3841.2007.00292.x>
2. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [Internet]. 2005 [cited 2020 Oct 25];40(1):1–19. DOI <https://doi.org/10.1097/00005176-200501000-00001>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15625418/>.
3. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* [Internet]. 2006 Sep 07 [cited 2020 Oct 25];24(2):115–119. DOI <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17008153/>.
4. McGough N, Cummings JH. Coeliac disease: a diverse clinical syndrome caused by intolerance of wheat, barley and rye. *Proceedings of the Nutrition Society* [Internet]. 2005 [cited 2020 Oct 25];64(4):434–450. DOI <https://doi.org/10.1079/pns2005461>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16313685/>.

5. Işıkay S, Kocamaz H, Sezer S, Özkars MY, Işıkay N, Filik B, Şan M, Kanmaz A. The Frequency of Epileptiform Discharges in Celiac Disease. *Pediatr Neurol*. 2015 Jul;53(1):78–82. DOI; 10.1016/j.pediatrneurol.2015.02.006. Epub 2015 Apr 3. PMID: 26092417.
6. Stoven S, Murray JA, Marietta E. Celiac disease: advances in treatment via gluten modification. *Clinical Gastroenterology and hepatology* [Internet]. 2012 [cited 2020 Oct 25];10(8):859–862. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.06.005>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22728383/>.
7. Guandalini S, Assiri A. Celiac disease: a review. *JAMA Pediatrics* [Internet]. 2014 [cited 2020 Oct 25];168(3):278–8. DOI <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.3858>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24395055/>.
8. Crowe SE. Putting celiac disease in perspective: Pathogenesis, comorbidity and transition of care. *United European Gastroenterology Journal* [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct 25];8(2):129–130. DOI <https://doi.org/10.1177/2050640620908460>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32213063/>.
9. Fedor I, Zold E, Barta Z. The extraintestinal spectrum of gluten sensitivity. *Orvosi Hetilap* [Internet]. 2019 [cited 2020 Oct 25];160(34):1327–1334. DOI <https://doi.org/10.1556/650.2019.31493>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31423827/>.
10. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [Internet]. 2012 [cited 2020 Oct 25];54(1):136–160. DOI <https://doi.org/10.1097/mpg.0b013e31821a23d0>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22197856/>.
11. Lionetti E, Francavilla R, Pavone P, et al. The neurology of coeliac disease in childhood: what is the evidence? A systematic review and meta-analysis. *Wiley Online Library* [Internet]. 2010 Jul 08 [cited 2020 Oct 26];52(8):700–707. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2010.03647.x>. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1469-8749.2010.03647.x>
12. Makovicky P, Makovicky P, Caja F, Rimarova K, Samasca G, Vannucci L. Celiac disease and gluten-free diet: past, present and future. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench* [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct 26];13(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7069540/>.
13. Nijeboer P, Mulder CJ, Bouma G. Non-celiac gluten sensitivity: hype, or new epidemic?. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* [Internet]. 2013 [cited 2020 Oct 26];157:21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23693012/>.
14. Bathrellou E, Kontogianni MD, Panagiotakos DB. Celiac disease and non-celiac gluten or wheat sensitivity and health in later life: A review. *Maturitas* [Internet]. 2018 Mar 30 [cited 2020 Oct 26];112:29–33. DOI <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.03.014>. Available from: [https://www.maturitas.org/article/S0378-5122\(18\)30029-X/fulltext](https://www.maturitas.org/article/S0378-5122(18)30029-X/fulltext)
15. Ford RP. The gluten syndrome: a neurological disease. *Medical Hypotheses*. 2009;73(3):438–440. doi: 10.1016/j.mehy.2009.03.037. Epub 2009 Apr 29.

16. Makhlof S, Messelmani M, Zaouali J, Mrissa R. Cognitive impairment in celiac disease and non-celiac gluten sensitivity: review of literature on the main cognitive impairments, the imaging and the effect of gluten free diet. *Acta Neurologica Belgica* [Internet]. 2018 [cited 2020 Oct 26];118(1):21-27. DOI <https://doi.org/10.1007/s13760-017-0870-z>. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13760-017-0870-z>
17. Hees NJ, Does WV, Giltay EJ. Coeliac disease, diet adherence and depressive symptoms. *Journal of Psychosomatic Research*. 2013;74(2):155-160. doi: 10.1016/j.jpsychores.2012.11.007. Epub 2012 Dec 6.
18. Zingone F, Siniscalchi M, Capone P, et al. The quality of sleep in patients with coeliac disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2010;32(8):1031-1036. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04432.x.
19. Hauser W, Janke KH, Klump B, Gregor M, Hinz A. Anxiety and depression in adult patients with celiac disease on a gluten-free diet. *World Journal of Gastroenterology*. 2020 Jun 14;16(22):2780-2787. doi: 10.3748/wjg.v16.i22.2780.
20. Jarbrink-Sehgal E, Andreasson A. The gut microbiota and mental health in adults. *Current Opinion in Neurobiology*. 2020;62:102-114. doi: 10.1016/j.conb.2020.01.016.
21. Soares LC, Matoso RO, Teixeira LG, et al. Gluten-free diet reduces adiposity, inflammation and insulin resistance associated with the induction of PPAR-alpha and PPAR-gamma expression. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2013;24(6):1105-1111. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.08.009. Epub 2012 Dec 17.
22. Sharma N, Bhatia S, Chunduri V, Kaur S, Sharma S, Kapoor P. Pathogenesis of Celiac Disease and Other Gluten Related Disorders in Wheat and Strategies for Mitigating Them. *Frontiers in Nutrition*. 2020 Feb 07;7:7. doi: 10.3389/fnut.2020.00006. eCollection 2020.
23. Juneja M, Venkatakrisnan A, Kapoor S, Jain R. Autism Spectrum Disorders and Celiac Disease: Is there an Association?. *Indian Pediatrics*. 2018;55(10):912-914.
24. Sabatino AD, Corazza GR. Nonceliac gluten sensitivity: sense or sensibility?. *Annals of Internal Medicine* [Internet]. 2012 Feb 21 [cited 2020 Oct 26];156(4):309-311. DOI <https://doi.org/10.7326/0003-4819-156-4-201202210-00010>. Available from: [doi/10.7326/0003-4819-156-4-201202210-00010](https://doi.org/10.7326/0003-4819-156-4-201202210-00010)
25. Reeves, PG, Nielsen, FH, Fahey GC. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, v. 123, p. 1939-1951, 1993. doi: 10.1093/jn/123.11.1939.
26. Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods Mol Biol*. 2019;1916:99-103. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_9.
27. Bonomini TJ, Holzmann I, Thiesen LC et al. Neuropharmacological and acute toxicological evaluation of ethanolic extract of *Allamanda cathartica* L. flowers and plumieride. *Regulatory Toxicology Pharmacology*, 2017;91:9-19. doi: 10.1016/j.yrtph.2017.10.005. Epub 2017 Oct 4.
28. De Souza, M.M. et al. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In Bresolin, T. M. B.; Cechinel Filho, V. (Organizadores). *Ciências Farmacêuticas. Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*, Itajaí: Editora UNIVALI, 2003.

29. Gonçalves, AE, Burguer C, Amoah SK et al., The antidepressant-like effect of Hedyosmum brasiliense and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. *European Journal of Pharmacology*; 2012;15; 674(2-3);307-14. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.11.009. Epub 2011 Nov 12.
30. Dalmagro, A. P.; Camargo, A.; Severo Rodrigues, A. L.; Zeni, A. L. B. Involvement of PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway in the antidepressant-like and neuroprotective effects of Morus nigra and its major phenolic, syringic acid. *Chemico-Biological Interactions*; 2019;12;108-14.
31. Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 1985;85:367-370. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00428203>
32. Izquierdo, L. A.; Barros, D. M.; Vianna, M. R.; Coitinho, A.; De David E Silva, T.; Choi, H.; Moletta, B.; Medina, J. H.; Izquierdo, I. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cellular and Molecular Neurobiology*; 2002;22; 269-287. doi: 10.1023/a:1020715800956.
33. Berté T, Dalmagro AP, Zimath PL et al., Taraxerol as a possible therapeutic agent on memory impairments and Alzheimer's disease: Effects against scopolamine and streptozotocin-induced cognitive dysfunctions. *Steroids*, v.4, p. 5-11, 2018. Doi. 10.1016/j.steroids.2018.01.002.
34. Casella G, Pozzi R, Cigognetti M, et al. Mood disorders and non-celiac gluten sensitivity. *Minerva Gastroenterol Dietol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Jun 6];63(1):32-37. DOI <https://doi.org/10.23736/s1121-421x.16.02325-4>. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27647538/>.
35. Strasser B, Gostner JJ, Fuchs D. Mood, food, and cognition: role of tryptophan and serotonin. *Opin Clin Nutr Metab Care*. 2016;19(1):55-61. doi: 10.1097/MCO.0000000000000237.
36. Ghalichi F, Ghaemmaghami J, Malek A, et al. Effect of gluten free diet on gastrointestinal and behavioral indices for children with autism spectrum disorders. A randomized clinical trial. 2016;12(4):436-442. doi: 10.1007/s12519-016-0040-z. Epub 2016 Jun 10.
37. Lee R, J Corley M, Pang A, et al. A modified ketogenic gluten-free diet with MCT improves behavior in children with autism spectrum disorder. *Physiol Behav*. 2018 May 22;1(18):205-211. doi: 10.1016/j.physbeh.2018.02.006. Epub 2018 Feb 5.
38. Monteiro M, Santos A, Rito R et al. TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA SOBRE INTERVENÇÕES NUTRICIONAIS. *Paulista de Pediatria*. 2020 Nov 26;38(1):262-280. doi.org/10.1590/1984-0462/2020/38/2018262.
39. Biesiekierski JR. What is gluten? *J Gastroenterol Hepatol*. 2017 Mar 10;32(1):78-81. doi: 10.1111/jgh.13703.
40. Abadie V, Khosla C, Jabri B. A Mouse Model of Celiac Disease. *Curr Protoc*. 2022 Aug;2(8):e515. doi: 10.1002/cpz1.515.
41. Guedes N, Silva L, Bessa C, et al. Quadros de ansiedade e depressão: estudo de fatores psicoafetivos, familiares e cotidianos em indivíduos celíacos. *Rev. Bras. Enferm*. 2020;73(1). <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2020-0086>.

42. Nejad Rostami, Leter R, Bresser L, et al. Anxiety Symptoms in Adult Celiac Patients and the Effect of a Gluten-Free Diet: An Iranian Nationwide Study. *Inflammatory Intestinal Diseases*. 2020;5(1). doi: 10.1159/000505657. Epub 2020 Jan 24.
43. Takahashi M, Fukunaga H, Kaneto H, et al. Behavioral and pharmacological studies on gluten exorphin A5, a newly isolated bioactive food protein fragment, in mice. *Jpn J Pharmacol*. 2000 Nov;84(3):259-65. doi: 10.1254/jjp.84.259.
44. Losurdo G, Principi M, Iannone A, Amoroso A, Ierardi E, Di Leo A, Barone M. Extra-intestinal manifestations of non-celiac gluten sensitivity: An expanding paradigm. *World J Gastroenterol*. 2018 Apr 14;24(14):1521-1530. doi: 10.3748/wjg.v24.i14.1521
45. Kumar Vijender, Bhat Zulfiqar, Kumar Dinesh. Animal models of anxiety: a comprehensive review. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;68(2):175-183. doi: 10.1016/j.vascn.2013.05.003.
46. Planchez B, Surget A, Belzung C. Animal models of major depression: drawbacks and challenges. *J Neural Transm (Vienna)*. 2019;126(11):1383-1408. doi: 10.1007/s00702-019-02084-y. Epub 2019 Oct 4.
47. Ménard C, Hodes GE, Russo SJ. Pathogenesis of depression: Insights from human and rodent studies. *Neuroscience*. 2016 May 3;321:138-162. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.05.053. Epub 2015 May 30
48. Slim M, Rico-Villademoros F, Calandre EP Psychiatric Comorbidity in Children and Adults with Gluten-Related Disorders: A Narrative Review. *MDPI NUTRIENTS*. 2018;10(7):875-890. doi: 10.3390/nu10070875.
49. Brietzke E, Cerqueira RO, Mansur RB, McIntyre RS. Gluten related illnesses and severe mental disorders: a comprehensive review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018 Jan;84:368-375. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.08.009. Epub 2017 Aug 19.
50. Vinagre-Aragón A, Zis P, Grunewald RA, Hadjivassiliou M. Movement Disorders Related to Gluten Sensitivity: A Systematic Review *Nutrients*. 2018 Aug 8;10(8):1034. doi: 10.3390/nu10081034.
51. Masafumi I, Fumi M, Hideyuki S, et al., Gluten sensitivity in Japanese patients with adult-onset cerebellar ataxia. *Intern Med*. 2006;45(3):135-40. doi: 10.2169/internalmedicine.45.1351.
52. Yelland G. Gluten-induced cognitive impairment ("brain fog") in coeliac disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;1(1):90-93. doi: 10.1111/jgh.13706.
53. Silva T, Sudbrack da Gama E, Furlanetto, T W. Diagnóstico de doença celíaca em adultos. *Revista da Associação Médica Brasileira*, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 122-126, 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-42302010000100027>.
54. Serena G, Bain M, Lu E, et al. O papel do glúten na doença celíaca e no diabetes tipo 1. *National Library of Medicine*, [S. l.], p. 7 (9), 26 ago. 2015. DOI 10.3390 / nu7095329. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26343710/>. Acesso em: 1 jun. 2021. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302008000900009>
55. Valvano M, Longo S, Stefanelli G, Frieri G, Viscido A, Latella G. Celiac Disease, Gluten-Free Diet, and Metabolic and Liver Disorders. *Nutrients*. 2020 Mar 28;12(4):940. doi: 10.3390/nu12040940.

56. Brar P, Kwon G, Holleran S, et al. Change in lipid profile in celiac disease: beneficial effect of gluten-free diet. *Am J Med.* 2006;119(9):786-90. doi: 10.1016/j.amjmed.2005.12.025.
57. Partichelli, Carolina et al. Avaliação do efeito de uma dieta com restrição ao glúten em parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo, mcp1- e leptina em indivíduos com sobrepeso-obesidade. *RBONE - Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, [s. l.], p. 379, 2019. Disponível em: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7067584>. Acesso em: 1 jun. 2021.
58. Melini V, Melini F. Gluten-Free Diet: Gaps and Needs for a Healthier Diet. *Nutrients.* 2019 Jan 15;11(1):170. doi: 10.3390/nu11010170.

Submissão: 26/07/2022

Aprovação: 19/05/2023