

RAÇÕES COM EXCESSO DE GLÚTEN DE TRIGO ALTERAM A HISTOMORFOLOGIA DO JEJUNO DE RATOS WISTAR

Eduardo Nanni Calvo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Anne Caroline Santa Rosa (PBC), Ghiovani Zanzotti Raniero (PEG), Antonio Roberto Giriboni Monteiro (DAL), Larissa Carla Lauer Schneider, Maria Raquel Marçal Natali (DCM, Orientador), e-mail: mrmnatali@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e de Tecnologia /Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas. Subárea: Morfologia.

Palavras-chave: gliadina, inflamação, intestino delgado.

Resumo:

O glúten é um composto proteico de caráter inflamatório presente em alguns cereais, dentre eles o trigo. A prevalência de intolerâncias ou doenças relacionadas ao consumo desse composto é considerada alta, sendo a sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG) uma patologia que gera quadros de diarreia, constipação, dores abdominais e alterações na morfologia intestinal. O objetivo desse trabalho foi avaliar se a ingestão de glúten de trigo em excesso altera a histomorfologia do jejuno de ratos Wistar. Foram utilizados 24 ratos machos, com 21 dias de idade, distribuídos em três grupos (n= 8) e tratados com ração peletizada para roedores. As rações tiveram os níveis de glúten de trigo manipulados para a formação dos seguintes grupos: grupo SG (0%), grupo padrão CG (14%) e grupo com sobrecarga de glúten EG (42%). Após 69 dias experimentais, foi realizada eutanásia dos animais, retiradas amostras do jejuno e submetidas ao processamento histológico para avaliação morfoquantitativa. A análise estatística dos dados foi realizada pelos testes de análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey, ou teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's de acordo com a normalidade dos dados. Houve um aumento significativo no número de linfócitos intraepiteliais nos grupos CG e EG, comparado ao SG; aumento no número de células caliciformes no grupo CG em relação do SG, e alterações morfométricas da parede jejunal. O consumo de rações com níveis crescentes de glúten de trigo (14%) e (42%) geram inflamação e alteram a histomorfologia do jejuno dos ratos.

Introdução

Nos cereais como trigo, cevada, centeio e aveia, encontra-se o glúten, um conjunto de proteínas de armazenamento chamadas gluteninas e prolaminas (BALAKIREVA; ZAMYATNIN, 2016). As prolaminas do trigo são as mais utilizadas na dieta, conhecidas como gliadinas, as quais são responsáveis pelas propriedades antigênicas do composto (SCHUMANN et al., 2017). São consideradas importantes

condições antigênicas: a Doença Celíaca autoimune (DC) e a sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG), sendo essa última a mais comum; indivíduos apresentam quadros de diarreia, constipação, dores abdominais e alterações intestinais (BALAKIREVA; ZAMYATNIN, 2016). O intestino delgado é o principal local de absorção de nutrientes, e suas túnicas e células presentes no epitélio intestinal podem sofrer alterações diante de condições nutricionais adversas. Destacam-se as células caliciformes, responsáveis pela secreção de mucinas, as quais formam o muco protetor do epitélio e os linfócitos intraepiteliais (LIEs), que formam uma barreira sendo responsáveis pela resposta imunológica contra antígenos do lúmen intestinal. Os peptídeos do glúten quando em contato com o lúmen intestinal desencadeiam respostas inflamatórias e alterações celulares relevantes, sintomas intestinais locais e até mesmo sistêmicos que afetam diretamente a vida dos pacientes são relatados. Nesse sentido, o trabalho objetivou avaliar se a ração com ingestão de níveis crescentes de glúten de trigo alteram as características morfológicas do jejuno de ratos Wistar.

Materiais e Métodos

Após aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (UEM), foram utilizados 24 *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, machos, com idade de 21 a 90 dias, pesando inicialmente entre 45 a 60g. Distribuídos aleatoriamente em três grupos (n= 8) conforme os níveis de glúten de trigo presentes nas rações: grupo SG (0%), grupo padrão CG (14%) e grupo com sobrecarga de glúten EG (42%). Após 69 dias foi realizada eutanásia dos animais por meio de aprofundamento anestésico com sobrecarga de 120mg/kg de peso corporal de Tiopental Sódico®, realizada a laparotomia para retirada das amostras do jejuno que foram submetidas ao processamento histológico para avaliação morfoquantitativa. Lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina foram utilizadas para análise morfológica e morfométrica das túnicas da parede jejunal e quantificação dos linfócitos intraepiteliais (LIEs). A reação histoquímica por meio do Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) para visualização das células caliciformes produtoras de mucinas neutras. Para a análise morfológica e morfométrica da parede intestinal foram capturadas imagens em objetiva de 10X e mensurados túnicas, vilos e criptas em 100 pontos aleatórios/animal, com os resultados expressos em µm. Para a análise do número de LIEs, foram capturadas imagens em objetiva de 40X e quantificadas todas as células presentes em 30 campos/animal; e para o índice de células caliciformes, foram capturadas imagens em objetiva de 20X, e quantificadas todas as células presentes ao longo do epitélio em 2.000 enterócitos/animal. A análise estatística dos dados foi realizada por teste K-S para verificação da normalidade, seguidos pelos testes de análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey, ou teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's, conforme os resultados de normalidade.

Resultados e Discussão

O padrão morfológico dos elementos que compõem a parede jejunal não diferiu entre os grupos, sendo mantida a organização histológica típica. Na morfometria

jejunal avaliada pela coloração HE constatou-se diferenças significativas que variaram entre os grupos (tabela 1). Com exceção da altura dos vilos, todos os parâmetros avaliados sofreram alterações ($p < 0,05$) nos grupos CG e EG em relação ao SG. Indivíduos que consomem glúten apresentam alterações na mucosa, sendo a atrofia das vilosidades e o alongamento das criptas características marcantes na condição de sensibilidade ao glúten (DI SABATINO et al., 2015). Yu e colaboradores (2022) identificaram em jejuno de camundongos as mesmas características encontradas para as vilosidades e criptas intestinais.

Tabela 1. Morfometria (μm) da parede jejunal total, das túnicas mucosa, submucosa, muscular externa, altura dos vilos e profundidade das criptas de ratos alimentados com rações em níveis de glúten (trigo) apresentados como 0% (SG), 14% (CG) e 42% (EG).

Parâmetros (μm)	SG	CG	EG
Parede total	747 $\pm$ 2,66	686,2 $\pm$ 3,19 ^a	740,9 $\pm$ 3,33 ^b
Mucosa	654,2 $\pm$ 2,26	598,4 $\pm$ 2,78 ^a	636,8 $\pm$ 2,93 ^{ab}
Submucosa	27,38 $\pm$ 0,18	25,92 $\pm$ 0,21 ^a	27,66 $\pm$ 0,26 ^b
Musc. Externa	66,28 $\pm$ 0,81	62,86 $\pm$ 0,64 ^a	76,16 $\pm$ 0,66 ^{ab}
Alt. dos vilos	444,5 $\pm$ 1,76	441,3 $\pm$ 2,16	421 $\pm$ 2,28 ^{ab}
Prof. das criptas	96,39 $\pm$ 0,66	85,14 $\pm$ 0,47 ^a	91,06 $\pm$ 0,56 ^{ab}

Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão. Análise de Variância One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey considerando $p < 0,05$. Letras distintas representam $\neq$ estatística significativa, onde a = difere de SG; b = difere de CG (n=7-8/grupo).

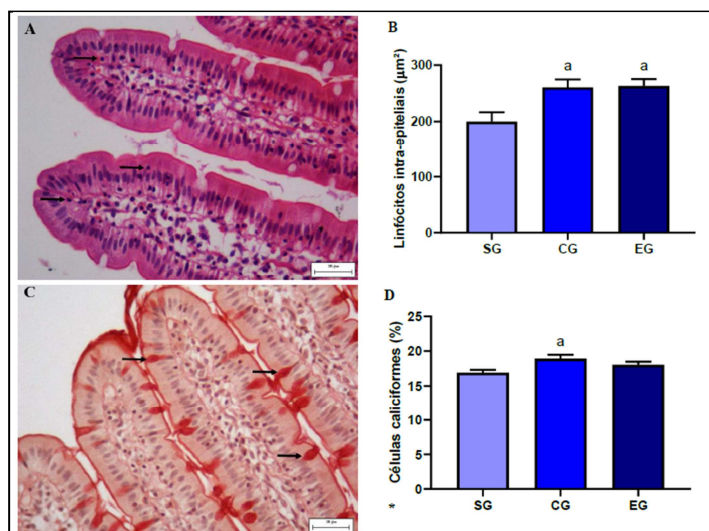


Figura 1 – Mucosa jejunal de ratos alimentados com rações com diferentes níveis de glúten: SG, CG e EG. **A.** Linfócitos intraepiteliais (seta), HE (40X). **B.** Número de LIEs/ μm^2 . **C.** Células caliciformes (setas), P.A.S. (40X). **D.** Índice de células caliciformes (%). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão submetidos à Análise de Variância One-way ANOVA seguido de pós-teste de Tukey e *Kruskal-Wallis seguido pelos pós-teste de Dunn's, considerando $p < 0,05$. Letras distintas representam $\neq$ estatística significativa, onde a= difere de SG; b= difere de CG (n=7-8/grupo).

A figura 1 apresenta resultados referentes a quantificação das células da mucosa jejunal: número de linfócitos intraepiteliais (LIEs) e índice de células caliciformes. O número de LIEs evidenciado pelo aumento ($p > 0,05$) no grupo CG e EG em relação ao SG corrobora os achados de Ferrari e colaboradores (2021), que descrevem sobre as frações de gliadina, que agem como antígeno luminal, assim, os LIEs (figura 1.A) migram para o epitélio e expressam citocinas pró-inflamatórias para conter a ativação imunológica. Também, associado à defesa da barreira intestinal, as células caliciformes (figura 1.C) aumentou para superexpressar a produção de muco neutro, afim de bloquear a penetração, fixação epitelial e translocação de bactérias para o tecido hospedeiro frente à inflamação (JOHANSSON; HANSSON, 2016).

Conclusões

O consumo de rações com níveis crescentes de glúten de trigo (14%) e (42%) geram inflamação e alteram a histomorfologia do jejuno de ratos.

Agradecimentos

Ao CNPq/FA/UEM pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica e apoio financeiro.

Referências

BALAKIREVA A. V., ZAMYATNIN A. A. Properties of gluten intolerance: gluten structure, evolution, pathogenicity and detoxification capabilities. **Nutrients**, v. 8, n. 10, p. 644. 2016.

DI SABATINO; et al. New insights into immune mechanisms underlying autoimmune diseases of the gastrointestinal tract. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 12, p. 1161–1169. 2015.

FERRARI, E.; et al. Probiotics supplements reduce stress and gut inflammation associated with gliadin intake in a mouse model of gluten sensitivity. **Nutrients**, v.13, n. 4, p. 1221. 2021.

JOHANSSON, M. E. V.; HANSSON, G. C. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. **In Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 10, p. 639–649. 2016.

SCHUMANN, M., et al. Celiac Disease: Role of the epithelial barrier. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 150-162. 2017.

YU, T.; et al. Wheat amylase trypsin inhibitors aggravate intestinal inflammation associated with celiac disease mediated by gliadin in BALB/c mice. **Foods**, v. 11, n. 11, p. 1559. 2022.