

## ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM DIFERENTES NÍVEIS DE GLÚTEN

Josué Alves Conceição Júnior (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Anne Caroline Santa Rosa (Mestre PBC/UEM), Maria Raquel Marçal Natali (Coorientadora), Fernanda Losi Alves de Almeida (Orientadora).  
E-mail: flaalmeida@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

### Ciências Biológicas, Morfologia

**Palavras-chave:** glutenina; tecido muscular estriado esquelético; miopatia inflamatória.

### RESUMO

O glúten, em excesso, possui a capacidade de promover respostas de hipersensibilidade, como a sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG) e doença celíaca (DC). Além dos sintomas gastrointestinais, também são descritas manifestações neurológicas e miopatias, principalmente as miopatias inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a ingestão de glúten, em excesso, altera a morfologia do músculo Sóleo de ratos Wistar. Foram utilizados 24 animais, com 21 dias de idade, distribuídos em três grupos (n= 8 por grupo), de acordo com os níveis de glúten da dieta: grupo SG (0%); grupo padrão CG (14%) e grupo EG (42%). Aos 90 dias de idade, os animais foram eutanasiados. Amostras do músculo sóleo foram fixadas em formol 10% tamponado e processadas para inclusão em parafina. Cortes histológicos transversais das amostras foram obtidas em micrótomo e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Azan para avaliação da morfologia geral das fibras musculares e detecção de possíveis alterações patológicas. Nos cortes histológicos das amostras dos grupos CG e EG, foram observadas alterações morfológicas características de miopatia inflamatória, como presença de infiltrados inflamatórios ao redor e no citoplasma de fibras musculares necróticas e endomísio bastante evidente, constituído por tecido conjuntivo frouxo contendo grande quantidade de células com núcleos descondensados, com morfologia típica de fibroblastos. Alterações histológicas também foram observadas nas amostras musculares dos animais do grupo SG, sugerindo que a presença de fibras musculares em degeneração seja consequência de uma baixa ingestão de proteínas na ração ofertada.

### INTRODUÇÃO

O glúten é um complexo proteico encontrado na maioria dos farináceos, como o trigo, cevada e centeio. O glúten, consumido em excesso, pode acarretar respostas de hipersensibilidade, como a sensibilidade não celíaca ao glúten (SNCG) e doença

celíaca (DC). Esses dois quadros clínicos caracterizam-se por complicações intestinais e extraintestinais, como as miopatias inflamatórias (Catassi *et al.*, 2015). As miopatias inflamatórias são um grupo de doenças sistêmicas adquiridas, heterogêneas e caracterizada por fraqueza muscular simétrica progressiva, níveis séricos elevados de enzimas musculares, anormalidades eletromiográficas e infiltrados inflamatórios em biópsias musculares (Selva-O'Callaghan *et al.*, 2007). As miopatias, como manifestações clínicas da DC e da SNCG, são comumente relatadas, mas têm sido pouco caracterizadas. Dentro do espectro de anormalidades observadas em biópsias de pacientes com sensibilidade ao glúten, a inflamação muscular é uma característica comum (Hadjivassiliou *et al.*, 2007). Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar se a ingestão de glúten em excesso altera as características morfológicas do músculo Sóleo de ratos Wistar.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental deste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá, sob o protocolo número 6295090221 (ID 002945). Foram utilizados 24 ratos Wistar machos, com 21 dias de idade, mantidos em biotério sob temperatura controlada ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclos regulares de fotoperíodo de 12 horas (6 horas às 18 horas), recebendo ração e água *ad libitum*. Os animais foram alimentados com ração peletizada e balanceada para roedores e distribuídos aleatoriamente em três grupos ( $n=8$  cada grupo), de acordo com os níveis de glúten da dieta: grupo SG (0%); grupo padrão CG (14%); grupo EG (42%). A ração produzida teve como fornecimento nutricional, por quilograma de produto: 14% de proteína, 79% de carboidratos e 4% de gordura, com umidade de 2,5%, ajustados com base nos grupos experimentais. Após 69 dias de experimento, os animais foram submetidos à eutanásia por meio de aprofundamento anestésico, por via intraperitoneal, com dose letal de 120 mg/kg de peso corporal de Tiopental Sódico® (Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, SP). O músculo sóleo foi dissecado, retirado e pesado. As amostras musculares foram fixadas em formaldeído a 10% tamponado durante 24 horas e submetidas ao processamento histológico para inclusão em parafina. Cortes histológicos semi-seriados transversais (10  $\mu\text{m}$  de espessura) das amostras musculares foram obtidos em micrótomo e submetidos às colorações hematoxilina e eosina (HE) e Azan para avaliação da morfologia das fibras musculares e detecção de possíveis alterações patológicas relacionadas ao glúten. A fotodocumentação com imagens representativas dos cortes histológicos foram obtidas em microscópio óptico (Nikon Eclipse®, Shimjuku, Japão), acoplado em uma câmera de alta resolução (Nikon, Ds-Fi1c, Shimjuku, Japão), utilizando programa específico (NIS-Elements versão 4.0, Praga, República Checa), na objetiva de 40X.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos cortes histológicos, corados em HE, das amostras do músculo Sóleo dos animais dos grupos SG, CG e EG mostrou morfologia preservada das fibras

musculares. Essas fibras apresentaram formato poligonal, coloração acidófila, sendo multinucleadas, com núcleos periféricos. Observou-se o perimísio, constituído por tecido conjuntivo denso não-modelado, envolvendo feixes de fibras musculares e o endomísio ao redor de fibras musculares individuais.

Nos cortes histológicos do músculo Sóleo, corados em HE e em Azan, dos animais dos grupos CG, SG e EG, o endomísio mostrou-se bastante evidente, constituído por tecido conjuntivo frouxo contendo grande quantidade de células com núcleos descondensados, com morfologia típica de fibroblastos. Na periferia dos cortes histológicos, foram observados espessamento do tecido conjuntivo do epimísio em alguns locais, com presença de infiltrados inflamatórios ao redor e no citoplasma de fibras musculares necróticas. Algumas fibras musculares alteradas também foram identificadas na região mais interna desse músculo.

Nesse estudo, o músculo Sóleo dos animais com ração padrão (CG) e excesso de glúten (EG) mostrou alterações morfológicas de acordo com as descritas na literatura. As miopatias inflamatórias são manifestações clínicas da sensibilidade não-celíaca ao glúten (SNCG). Dentro do espectro de anormalidades observadas em biópsias musculares de pacientes com sensibilidade ao glúten, observam-se infiltrados inflamatórios associados à necrose e degeneração de fibras musculares, infiltrado de células inflamatórias no endomísio, fibrose e sarcoplasma basofílico (Hadjivassiliou *et al.*, 2007; Rouvroye *et al.*, 2020).

Os cortes histológicos dos animais alimentados com dieta isenta de glúten (SG) também apresentaram as mesmas alterações morfológicas observadas nos grupos CG e EG. Nesse estudo, no preparo da ração padrão (grupo CG), a fonte de glúten como componente proteico foi o trigo, sendo substituído por arroz, no grupo SG. Assim, a ração do grupo SG apresenta menor teor de proteínas do que as rações com glúten. A manutenção da massa muscular depende de um equilíbrio entre a síntese de proteínas musculares e a sua degradação. Os aminoácidos essenciais são estimuladores potentes da síntese proteica. A perda de massa muscular pode ser causada pela redução da síntese proteica, aumento na taxa de degradação das proteínas musculares ou a uma combinação entre diminuição da síntese proteica e aumento na taxa de degradação (Gordon; Kelleher; Kimball, 2013). Dessa forma, nossos resultados sugerem que a presença de fibras em processo de degeneração nos cortes histológicos do músculo Sóleo dos animais alimentados como dieta sem glúten estão relacionadas à baixa ingestão de proteínas na dieta, componentes essenciais para a síntese proteica e manutenção da massa muscular.

## CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a ingestão de ração com glúten (grupos CG e EG) promoveu alterações musculares características de miopatia inflamatória no músculo Sóleo de ratos Wistar. A ração sem glúten resultou em alterações histológicas relacionadas à baixa ingestão de proteínas na dieta, como degradação de fibras musculares.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa PIBIC/CNPq-FA-UEM por ter concedido a bolsa para esta pesquisa. Gostaria de agradecer à professora Dra. Fernanda Losi Alves de Almeida pela oportunidade e pela confiança. Fiel orientadora, sem ti, este trabalho não seria possível. Rendo meus agradecimentos também à Dra. Ana Paula de Santi Rampazzo, responsável pelo laboratório de Histologia da Universidade Estadual de Maringá e, sem a ajuda da doutora, meu projeto não teria avançado.

## REFERÊNCIAS

CATASSI, C.; ELLI, L.; BONAZ, B.; BOUMA, G.; CARROCCIO, A.; CASTILLEJO, G.; CELLIER, C.; CRISTOFORI, F.; DE MAGISTRIS, L.; DOLINSEK, J.; DIETERICH, W.; FRANCAVILLA, R.; HADJIVASSILIOU, M.; HOLTMEIER, W.; KÖRNER, U.; LEFFLER, D.A.; LUNDIN, K.E.; MAZZARELLA, G.; MULDER, C.J.; PELLEGRINI, N.; ROSTAMI, K.; SANDERS, D.; SKODJE, G.I.; SCHUPPAN, D.; ULLRICH, R.; VOLTA, U.; WILLIAMS, M.; ZEVALLOS, V.F.; ZOPF, Y.; FASANO, A. Diagnosis of Non-Celiac Gluten Sensitivity (NCGS): The Salerno Experts' Criteria. **Nutrients**, v. 7, n. 6, p. 4966-4977, jun. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26096570/>. Acesso em: 31 ago. 2023.

GORDON, B.S.; KELLEHER, A.R.; KIMBALL, S.R. Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 45, n. 10, p. 2147-2157, out. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23769967/>. Acesso em: 31 ago. 2023.

HADJIVASSILIOU, M.; CHATTOPADHYAY, A. K.; GRÜNEWALD, R. A.; JARRATT, J. A.; KANDLER, R. H.; RAO, D. G.; SANDERS, D. S.; WHARTON, S. B.; DAVIES-JONES, G. A. Myopathy associated with gluten sensitivity. **Muscle Nerve**, v. 35, n. 4, p. 443–450, abr. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17143894/>. Acesso em: 31 ago. 2023.

ROUVROYE, M. D.; ZIS, P.; VAN DAM, A. M.; ROZEMULLER, A. J. M.; BOUMA, G.; HADJIVASSILIOU, M. The Neuropathology of Gluten-Related Neurological Disorders: A Systematic Review. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 822, mar. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32244870/>. Acesso em: 31 ago. 2023.

SELVA-O'CALLAGHAN, A.; CASELLAS, F.; DE TORRES, I.; PALOU, E.; GRAU-JUNYENT, J. M.; VILARDELL-TARRÉS, M. Celiac disease and antibodies associated with celiac disease in patients with inflammatory myopathy. **Muscle Nerve**, v. 35, n. 1, p. 49–54, dez. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16967485/>. Acesso em: 31 ago. 2023.