

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (NUPEB)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (CBIOL)

Dissertação

**Influência da dieta rica em glúten
sobre a responsividade
comportamental e cardiovascular em
ratos Wistar expostos ao isolamento
social**

Pamela Félix da Silva

Ouro Preto
2022



UFOP

Pamela Félix da Silva

**INFLUÊNCIA DA DIETA RICA EM GLÚTEN SOBRE A RESPONSABILIDADE
COMPORTAMENTAL E CARDIOVASCULAR EM RATOS WISTAR EXPOSTOS
AO ISOLAMENTO SOCIAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Fernanda Cacilda dos Santos Silva

Coorientadores: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr. e Prof.^a Dr.^a. Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de Noronha

Ouro Preto
2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S586i Silva, Pamela Felix da.
Influência da dieta rica em glúten sobre a responsividade comportamental e cardiovascular em ratos Wistar expostos ao isolamento social. [manuscrito] / Pamela Felix da Silva. - 2022.
77 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Cacilda dos Santos Silva.
Coorientadores: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr., Profa. Dra. Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de Noronha.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Glúten. 2. Isolamento social. 3. Estresse. 4. Comportamento. 5. Ansiedade. I. Chianca Jr., Deoclécio Alves. II. Silva, Fernanda Cacilda dos Santos. III. de Noronha, Sylvana Izaura Salyba Rendeiro. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 577.12

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



FOLHA DE APROVAÇÃO

Pamela Félix da Silva

Influência da dieta rica em glúten sobre a responsividade comportamental e cardiovascular em ratos Wistar expostos ao isolamento social

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 27 de outubro de 2022

Membros da banca

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Cacilda dos Santos Silva - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior - Coorientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof^ª. Dr^ª. Sylvana Izaura Salyba Rendeiro de Noronha - Coorientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof^ª. Dr^ª. Sílvia de Paula Gomes - Universidade Federal de Ouro Preto
Prof^ª. Dr^ª. Míriam Carmo Rodrigues Barbosa - Universidade Federal do Espírito Santo

Fernanda Cacilda dos Santos Silva, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 26/01/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Cacilda dos Santos Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 26/01/2023, às 15:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0463543** e o código CRC **882C21CC**.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho, contemplado com bolsa da Ação Emergencial do Programa de Combate a Epidemias/CAPES, foi realizado no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio da Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria José e José Geraldo, à minha irmã Palloma e ao meu esposo Glauco, por acreditarem em mim e serem fonte inesgotável de apoio, incentivo, inspiração e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por estar comigo em todos os momentos, e por me permitir chegar tão longe em minha caminhada acadêmica, sempre amparada por pessoas maravilhosas, que tanto contribuíram ao longo da minha formação.

Aos meus pais, Maria José e José Geraldo, pelo amor incondicional, e por me mostrarem desde cedo que a educação é o melhor caminho, sempre me incentivando e nunca medindo esforços para que eu alcançasse todos os meus sonhos e objetivos. Serei eternamente grata à Deus pelo privilégio de ter vocês como guias nessa jornada tão turbulenta e fascinante que é a vida.

À minha irmã Palloma, minha segunda metade, por ser meu ombro amigo, minha parceira, incentivadora e fiel escudeira. Sem você ao meu lado a vida não teria a mesma graça.

Ao meu esposo Glauco, pela paciência, compreensão, ajuda, conselhos, carinho e amor incondicional. Obrigada por dividir comigo todos os momentos que me permitiram chegar até aqui. Que venham os próximos!

Aos meus professores do Colégio Flecha, do IFMG Ouro Preto e da UFOP, pela dedicação, empenho e profissionalismo. Em tempos de constante desvalorização do professor e da educação, vocês foram resistência em sua missão de ensinar.

Ao professor Dr. Frank Bezerra, por me permitir iniciar minha vida científica no LAFEx. Agradeço pela oportunidade, pela paciência, pelos ensinamentos e aprendizado.

Aos queridos colegas e amigos que fiz no LAFEx: Karina Pena, Nícia Soares, Camila Ramos, Natália Araújo, Keila Campos (*in memoriam*), Mônica Campos, Thales Castro, Thais Lourenço, Lucas Antunes, Obada Zeidan, Pedro Junior, Jonathan Bassaw, Dafne Machado e Clarissa Nardeli. Obrigada pelos momentos de troca e aprendizado, pelas risadas e amizade. Conviver com vocês é uma saudade diária.

À todos os colegas e amigos do LFC, em especial à Gabriela Costa, Fabiana Gomes, Talita Magalhães, Lucas Vieira, Mariana Guedes, Máira Talma e Fernanda Ferreira, os quais pude conviver mais de perto ao longo desses dois anos. Agradeço

pelo apoio e suporte nos experimentos, pelas conversas e risadas nos intervalos, e pela amizade.

Aos técnicos do LFC, Sr. Milton de Paula e Sr.^a Marly Lessa, pela companhia e ajuda, pelas conversas e palavras de incentivo.

Aos professores Dr. Rodrigo Menezes e Dr.^a. Sílvia Gomes pelos ensinamentos e auxílio ao longo dessa caminhada.

Aos meus co-orientadores, professor Dr. Deoclécio Chianca Jr e Dr.^a. Sylvana Noronha pela oportunidade, suporte e ensinamentos.

À minha orientadora, professora Dr.^a. Fernanda Cacilda dos Santos Silva, pela oportunidade de ser sua orientanda, pela paciência e apoio, pelo estímulo e incentivo, pelos ensinamentos e amizade. Seu lado humano, sua entrega e dedicação permitiram que minha jornada fosse produtiva, leve e prazerosa.

Aos colegas Thais Valentim Di Paschoale Ostolin e Dr. Guilherme de Paula Costa, pela ajuda em todas as vezes que precisei encarar o reservatório de nitrogênio líquido. Vocês são uns queridos!

Aos funcionários do Centro de Ciência Animal da UFOP, em especial Érika Cristina Oliveira Siqueira, Lílian dos Reis Fernandes Praça e Lorena Fagundes Coelho, pela atenção e dedicação no fornecimento dos animais, e aos veterinários Hugo Henrique Souza Costa e Bárbara Silva Okano pelo aprendizado e auxílio nos procedimentos experimentais.

Aos professores e membros do Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx) e Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM) por gentilmente permitirem e auxiliarem no uso de equipamentos.

Ao querido amigo e secretário do CBiol, Robsol Santiago Viol, pelo apoio e carinho, por ser sempre prestativo e pelas palavras de otimismo.

À UFOP, ao NUPEB e às instituições de apoio à pesquisa, pela oportunidade de, através da educação pública, crescer como profissional e ser humano.

E aos familiares e colegas que fiz ao longo da minha jornada acadêmica, os quais de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui e concluísse mais essa etapa. Gratidão define meu sentimento por vocês!

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

Hipócrates

RESUMO

As relações sociais são fundamentais para o desenvolvimento humano por promoverem um efeito positivo no bem-estar psicológico e na saúde dos indivíduos. No entanto, durante a pandemia da COVID-19, medidas de distanciamento e isolamento social foram recomendadas pelas autoridades de saúde para minimizar a propagação do vírus SARS-CoV2. O estresse emocional por isolamento social, constitui um fator de risco para doenças cardiovasculares e alterações comportamentais, principalmente dos transtornos de ansiedade. Tais transtornos tanto influenciam quanto são influenciados pelo padrão alimentar, apresentando estreita relação com a homeostase cardiovascular. Em contextos de isolamento social, como ocorrido na pandemia, é plausível que alimentos industrializados contendo glúten (e.g.: massas, biscoitos e produtos de panificação) sejam preferencialmente consumidos, considerando aspectos como maior acessibilidade e palatabilidade, e menor custo e perecibilidade. O glúten, um complexo proteico presente no trigo, centeio e cevada, apresenta relação com a ocorrência de manifestações psiquiátricas e cardiovasculares já observadas na sensibilidade ao glúten celíaca e não celíaca (SGNC). A SGNC ainda não possui causa subjacente estabelecida, mas apresenta prevalência crescente nas últimas décadas, cuja associação com fatores ambientais (i.e: estresse emocional e hábito alimentar) requer investigação. Neste estudo, objetivamos investigar os efeitos da dieta rica em glúten (10% por 5 semanas) sobre a responsividade comportamental e cardiovascular em ratos submetidos ao estresse emocional por isolamento social. Ratos Wistar (pós-desmame; 21 dias) foram divididos em 4 grupos: 1) Dieta livre de glúten (DLG) coletivo; 2) Dieta rica em glúten (DCG) coletivo; 3) DLG isolado e 4) DCG isolado. Ao completar 5 semanas do protocolo dietético, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, seguido pela canulação da artéria femoral para obtenção dos parâmetros cardiovasculares. Após eutanásia, obtivemos: comprimento nasoanal e tecidos adiposos brancos para cálculo dos índices de Lee e de adiposidade. Foi observado que: (i) o consumo de glúten isolado (i.e.: sem associação com o estresse) aumentou o ganho de massa corporal e o consumo alimentar médio diário, e induziu uma resposta comportamental defensiva pontual (relacionada à ansiedade) observada no número de entradas no braço fechado do Labirinto em Cruz Elevado; (ii) a associação da DCG ao estresse emocional por isolamento social induziu maior

consumo alimentar sem causar mudanças no ganho de massa; e (iii) o consumo de glúten isolado ou associado ao estresse não alterou a responsividade cardiovascular. Nossos dados sugerem que o consumo de glúten associado ao estresse emocional por isolamento social por 5 semanas não promove alterações fenotípicas significativas nos parâmetros comportamentais e cardiovasculares em ratos não sensíveis ao glúten.

Palavras-chave: glúten, isolamento social, estresse, comportamento, ansiedade, regulação cardiovascular.

ABSTRACT

Social relationships are fundamental to human development as they have a positive effect on psychological well-being and health. However, during the COVID-19 pandemic, social distancing and isolation measures were recommended by health authorities in order to minimize the spread of the SARS-CoV2 virus. Emotional stress due to social isolation, is a risk factor for cardiovascular diseases and behavioural changes, especially anxiety disorders. Such disorders as interferes as is influenced by the dietary pattern, presenting a close relation with cardiovascular homeostasis. In social isolation contexts, as occurred in pandemic, is plausible that low-cost industrialized foods that contains gluten (e.g. pasta, cookies and bakery products) would be preferentially consumed, considering aspects as higher accessibility and palatability, and lower cost and perishability. Gluten, a protein complex present in wheat, rye and barley, displays relationship with the occurrence of psychiatric and cardiovascular manifestations already observed in celiac and non-celiac gluten sensitivity (NCGS). The NCGS underlying cause remains unknown, but it shows an increasing prevalence in the last decades, whose association with environmental factors (i.e. emotional stress and eating habits) impacts the modern society requires investigation. The aim of this study was to investigate the effects of a high gluten diet (10% for 5 weeks) on behavioural and cardiovascular responsiveness in rats exposed to emotional stress by social isolation. Wistar rats (post-weaning; 21 days) were divided into 4 groups: 1) collective gluten-free diet (cGFD); 2) collective high gluten diet (cHGD); 3) isolated gluten-free diet (iGFD) and 4) isolated high gluten diet (iHGD). After the 5 weeks of the dietary protocol, the animals were submitted to the behavioural tests, followed by femoral artery cannulation to obtain cardiovascular parameters. After euthanasia, nasoanal length and white adipose tissue were obtained for calculating Lee's and adiposity index. It was observed that: (i) isolated gluten consumption (i.e.: without stress association) increased body weight gain and daily food consumption average, and induced a punctual defensive behavioural response (anxiety-related) observed in the number of entries in the closed arm of the Elevated Plus Maze; (ii) the association of HGD with emotional stress due to social isolation induced greater food intake without causing changes in weight gain; and (iii) the isolated gluten intake or associated with stress did not alter cardiovascular responsiveness. Our data suggests that gluten consumption associated with emotional stress due to social isolation,

thought 5 weeks, does not promote significant phenotypic changes in behavioural and cardiovascular parameters in non-gluten-sensitive rats.

Keywords: gluten, social isolation, stress, behavior, anxiety, cardiovascular regulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental	30
Figura 2 – Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	33
Figura 3 – Caixa Claro Escuro (CE).....	34
Figura 4 – Campo Aberto (CA)	35
Figura 5 – Representação do esquema de aquisição de dados pelo LabChart 7.....	36
Figura 6 – Representação da localização dos TAs	37
Figura 7 – Massa corporal basal e efeitos da DCG sobre o ganho de massa corporal e consumo alimentar diário ao longo das cinco semanas de experimentação	39
Figura 8 – LCE: tempo de permanência e número de entradas no braço aberto, braço fechado e quadrante central durante exposição em 300s	41
Figura 9 – Caixa Claro Escuro: tempo de permanência e número de entradas nos compartimentos claro e escuro e tempo de reentrada no compartimento claro durante exposição em 300s.....	43
Figura 10 – Campo Aberto: tempo de permanência e número de quadrantes percorridos no centro e na periferia, nº de explorações verticais e groomings durante exposição em 300s	45
Figura 11 – Efeitos da DCG sobre os parâmetros cardiovasculares FC, PAM, PAS e PAD.	46
Figura 12 – Massa corporal basal e efeitos da DCG associada ao estresse emocional por isolamento social sobre ganho de massa corporal e consumo alimentar diário ao longo das cinco semanas de experimentação.....	49
Figura 13 – LCE: tempo de permanência e número de entradas no braço aberto, braço fechado e quadrante central durante exposição em 300s	52
Figura 14 – Caixa CE: tempo de permanência e número de entradas nos compartimentos claro e escuro e tempo de reentrada no compartimento claro durante exposição em 300s .	54
Figura 15 – Campo Aberto: tempo de permanência e número de quadrantes percorridos no centro e na periferia, tempo e número de groomings e número de explorações verticais durante exposição em 300s	56
Figura 16 – Efeitos da DCG associada ao estresse emocional por isolamento social sobre os parâmetros cardiovasculares FC, PAM, PAS e PAD.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Composição nutricional das dietas utilizadas no protocolo dietético.....	31
Tabela 2 – Efeitos da DCG sobre os parâmetros relativos à composição de gordura corporal de ratos ao longo das cinco semanas de experimentação	40
Tabela 3 – Efeitos da DCG associada ao estresse emocional por isolamento social sobre os parâmetros relativos à composição de gordura corporal de ratos ao longo das cinco semanas de experimentação	50

LISTA DE ABREVIATURAS

- CA:** Campo Aberto
- CE:** Caixa Claro Escuro
- cGFD:** Collective gluten-free diet group
- cHGD:** Collective high gluten diet group
- CRH:** Hormônio liberador de corticotropina
- DC:** Doença Celíaca
- DCG:** Dieta rica em glúten
- DCGc:** Grupo dieta rica em glúten coletivo
- DCGi:** Grupo dieta rica em glúten isolado
- DCV:** Doença Cardiovascular
- DLG:** Dieta livre de glúten
- DLGc:** Grupo dieta livre de glúten coletivo
- DLGi:** Grupo dieta livre de glúten isolado
- FC:** Frequência cardíaca
- HGD:** High gluten diet
- HHA:** Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
- IA:** Índice de adiposidade
- iGFD:** Isolated gluten-free diet group
- iHGD:** Isolated high gluten diet group
- IL:** Índice de Lee
- LCE:** Labirinto em Cruz Elevado
- NCGS:** Non-celiac gluten sensitivity
- OMS:** Organização Mundial da Saúde
- PAD:** Pressão arterial diastólica
- PAM:** Pressão arterial média
- PAP:** Pressão arterial pulsátil
- PAS:** Pressão arterial sistólica

S1: Semana 1 do protocolo dietético e de isolamento

S2: Semana 2 do protocolo dietético e de isolamento

S3: Semana 3 do protocolo dietético e de isolamento

S4: Semana 4 do protocolo dietético e de isolamento

S5: Semana 5 do protocolo dietético e de isolamento

SGNC: Sensibilidade ao glúten não celíaca

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

TAs: Tecidos adiposos abdominais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. ESTRESSE EMOCIONAL E COMPORTAMENTO	21
1.1.1. ESTRESSE EMOCIONAL E TRANSTORNO DE ANSIEDADE	21
1.1.2. ESTRESSE EMOCIONAL E COMPORTAMENTO ALIMENTAR.....	22
1.2. ALIMENTOS HIPERPALATÁVEIS E GLÚTEN	24
1.3. ESTRESSE, CONSUMO ALIMENTAR E REGULAÇÃO CARDIOVASCULAR	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo geral	29
3.2. Objetivos específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Animais	30
4.2. Protocolo dietético.....	30
4.3. Testes comportamentais	32
4.3.1. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	32
4.3.2. Caixa Claro/Escuro (CE).....	33
4.3.3. Campo Aberto (CA)	34
4.4. Canulação da artéria femoral	35
4.5. Registros Cardiovasculares.....	36
4.6. Eutanásia	37
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6. RESULTADOS	38
6.1. Efeitos da dieta rica em glúten sobre os parâmetros biométricos e sobre a responsividade comportamental e cardiovascular em ratos Wistar	38
6.1.1. Efeitos da dieta rica em glúten sobre o consumo alimentar, massa corporal, índices de Lee e adiposidade em ratos.....	38
6.1.2. Efeitos da dieta rica em glúten sobre as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade em ratos	40
6.1.3. Efeitos da dieta rica em glúten sobre responsividade cardiovascular.....	46
6.2. Efeitos da associação entre dieta rica em glúten e estresse emocional por isolamento social sobre os parâmetros biométricos e responsividade comportamental e cardiovascular em ratos Wistar.....	47
6.2.1. Efeitos da associação entre dieta rica em glúten e estresse emocional por isolamento social sobre o consumo alimentar, massa corporal, índices de Lee e adiposidade em ratos.....	47
6.2.2. Efeitos da dieta rica em glúten associada ao estresse emocional por isolamento social sobre as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade em ratos.....	50

6.2.3. Efeitos da dieta rica em glúten associada ao estresse emocional por isolamento social sobre a responsividade cardiovascular	57
7. DISCUSSÃO	59
8. CONCLUSÃO	69
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
10. ANEXO I	77
11. ANEXO II	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. ESTRESSE EMOCIONAL E COMPORTAMENTO

1.1.1. ESTRESSE EMOCIONAL E TRANSTORNO DE ANSIEDADE

As relações sociais são fundamentais para o desenvolvimento humano por promoverem um efeito positivo no bem-estar psicológico e na saúde (1). No entanto, durante a pandemia da COVID-19, o isolamento e o distanciamento social passaram a fazer parte da rotina da população em geral, por terem sido fortemente recomendados pelas autoridades de saúde como medidas de controle à propagação do vírus SARS-CoV2 (2). Neste contexto, a privação do convívio social impactou diretamente a saúde mental dos indivíduos, uma vez que o isolamento configura um desencadeador do estresse emocional (3, 4).

O estresse se caracteriza pela ativação de respostas fisiológicas complexas e coordenadas a estressores psicológicos, fisiológicos ou ambientais que ameaçam a homeostase (5, 6, 7, 8). Os estímulos estressores podem diferir quanto a sua natureza e frequência (9). Os estressores sistêmicos (ou ameaças internas), compreendem mudanças físicas do corpo em resposta a sua interação com o meio externo, enquanto os estressores psicológicos (ou ameaças percebidas), incluem situações que podem levar ao perigo e ameaçar a homeostase, sendo acompanhado de uma resposta emocional de antecipação (9). Quanto à frequência, o estresse pode ocorrer na forma aguda (curto prazo) ou na forma crônica (longo prazo), além de se manifestar de diferentes formas, dentre elas, por mudanças nas relações sociais e com o meio, por condições socioeconômicas adversas ou por condições psiquiátricas crônicas, tais como a depressão e a ansiedade (10).

O mecanismo de resposta ao estresse envolve a atuação do sistema nervoso autônomo (SNA), por meio da ativação simpática, e consequente aumento da frequência cardíaca (FC), pressão arterial (PA), frequência respiratória (FR) e dos níveis de glicose, no intuito de enfrentar o agente estressor. Porém, quando o agente estressor desaparece, a atividade parassimpática predomina, reestabelecendo a homeostase (11). A exposição ao estresse agudo já é associada ao aumento do risco de doença cardiovascular a curto prazo, principalmente entre indivíduos com risco pré-

existente (10). Sob exposição prolongada ou crônica, a homeostase basal não pode ser alcançada, acarretando prejuízos ao organismo, como risco aumentado à vários tipos de câncer, doenças metabólicas e cardiovasculares (5, 10). O estresse emocional decorrente do isolamento social é um fator de grande relevância para transtornos psicológicos (12). Dentre eles, destaca-se o transtorno de ansiedade, que é caracterizado pelo medo transitório, incerteza e apreensão sobre o futuro, podendo variar a frequência e intensidade com que é vivenciada (13). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), durante 2020, primeiro ano da pandemia da COVID-19, a prevalência de ansiedade e depressão aumentou em 25% em todo o mundo (14). No Brasil, 18,6 milhões de pessoas já conviviam com a ansiedade (15), e, segundo um estudo preliminar do Ministério da Saúde, em 2020 a ansiedade foi o transtorno mais presente entre os brasileiros durante a pandemia (16). Foi apontado que o isolamento social na pandemia ativou a sensação de ameaça, levando ao aumento significativo dos níveis de estresse, raiva, confusão e ansiedade (17, 18).

A associação entre estresse e ansiedade afeta negativamente a saúde física e psicológica, levando a um maior risco para o desenvolvimento de hipertensão arterial e doenças cardíacas, além de gerar complicações neuropsiquiátricas como declínio cognitivo, distúrbios afetivos, comportamentais e perceptivos (18). Adicionalmente, o comportamento alimentar é modulado pelo estresse emocional (19), que influencia a escolha sobre a quantidade e a qualidade dos alimentos consumidos, levando ao aumento da ingestão alimentar e ganho de massa corporal, associados à maior preferência por alimentos mais palatáveis, tais como pães, biscoitos, doces, bolos, tortas e massas (20, 21, 22, 23).

1.1.2. ESTRESSE EMOCIONAL E COMPORTAMENTO ALIMENTAR

Assim como o estresse, o comportamento alimentar influencia nos estados de saúde e doença (24). Durante a pandemia da COVID-19, a OMS anunciou diretrizes alimentares que enfatizam a importância do consumo de uma dieta equilibrada, a fim de fortalecer o sistema imunológico e diminuir o risco de doenças crônicas e infecciosas. Para isso, foi recomendado o consumo diário de alimentos frescos variados e não processados para obtenção de micro e macronutrientes essenciais à manutenção da saúde (25). No entanto, o estresse emocional combinado a ansiedade

na pandemia impactou nos hábitos e na rotina alimentar dos indivíduos, gerando grandes mudanças no comportamento alimentar (26).

O estresse influencia no apetite, agindo sobre o desejo de comer e o tipo de alimento escolhido. A ativação do eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), em resposta ao estresse, desencadeia a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH), que medeia a supressão da ingestão alimentar, de modo a desviar os recursos energéticos do organismo para atividades de maior prioridade, como a reação de “luta ou fuga”. Horas depois, há estimulação da fome e do comportamento alimentar mediada por glicocorticóides, a fim de repor a energia utilizada na cascata de reações em resposta ao evento estressor. Sob exposição ao estresse psicológico crônico, a secreção elevada de glicocorticóides pode estimular o aumento do consumo alimentar e consequente ganho de peso excessivo (27).

Já foi demonstrado, em estudo com ratos, que o estresse aumenta o consumo de alimentos palatáveis e ricos em energia (28), por meio da interação desses alimentos com as vias centrais de recompensa (27). Estudos realizados na pandemia apontam maior consumo alimentar durante o isolamento, incluindo massas, farinhas, ovos, alimentos longa vida e congelados, principalmente os *comfort foods* (ou alimentos confortantes), e uma redução no consumo de frutas e vegetais frescos (29, 30). Os *comfort foods* são alimentos industrializados altamente palatáveis que contêm grandes quantidades de carboidratos e/ou gorduras, o que os tornam mais calóricos (22). Entretanto, esses alimentos proporcionam conforto psicológico e alívio emocional gerados pelo estresse, uma vez que promovem feedback negativo mediado por recompensa no eixo HHA, suprimindo-o (27).

Alimentos altamente palatáveis também influenciam, por exemplo, no aumento da produção de serotonina – um neurotransmissor que atua no sistema nervoso desempenhando, entre outras funções, a regulação do sono, da temperatura corporal, do apetite, do humor, da atividade motora e funções cognitivas. A serotonina reduz o estresse, afetando positivamente o humor (31, 32, 33). No entanto, a busca por alimentos confortantes, como fuga para o estresse proveniente do isolamento social, traz consequências negativas à saúde, como aumento do risco de desenvolver inflamação crônica, obesidade e doenças cardiovasculares (34).

1.2. ALIMENTOS HIPERPALATÁVEIS E GLÚTEN

Estudos apontam que, nas últimas décadas, o consumo de alimentos ultraprocessados aumentou consideravelmente em todo o mundo (35), alcançando até 60% da ingestão diária total de energia (36). Esses alimentos são formulações de substâncias alimentares modificadas por processos químicos e transformados em alimentos e bebidas hiperpalatáveis prontos para consumo (37). Já se sabe que o alto consumo de alimentos hiperpalatáveis está relacionado a capacidade destes alimentos em proporcionar a sensação de prazer, levando a uma redução no desconforto emocional gerado pelas situações de estresse (38, 39, 40). Neste sentido, embora a associação direta entre alimentos hiperpalatáveis e glúten não seja usualmente debatida, cabe ressaltar que a maioria desses alimentos contém glúten - um complexo proteico presente em cereais como trigo, centeio e cevada (23, 41). No contexto da pandemia, entende-se que alimentos contendo glúten, os quais já são extensivamente comercializados, sejam preferencialmente consumidos por serem de fácil acesso, baixo custo e mais palatáveis (23, 42).

O glúten é composto por dois grupos proteicos - as prolaminas e glutelinas, os quais conferem capacidade de absorção de água, coesividade, viscosidade e elasticidade à massa (43, 44). Esses grupamentos são caracterizados de acordo com a suas propriedades de solubilidade (frações de Osborne): prolaminas são a fração insolúvel em água e solúvel em etanol, e as glutelinas a fração insolúvel tanto em água quando em etanol (44). Prolaminas e glutelinas se diferem de acordo com as espécies de grãos em que estão presentes, respectivamente: gliadina e glutenina no trigo, secalina e secalinina no centeio e hordeína e herdenina na cevada (45). O glúten presente em produtos de panificação é formado a partir da homogeneização mecânica da mistura entre água e farinha originada, por exemplo, a partir dos grãos de trigo (46) – um dos principais cereais cultivados no mundo (47), e fonte de carboidrato, proteína, fibras, minerais, vitaminas e lipídios na alimentação humana (48). Nesse processo, gliadinas e gluteninas são hidratadas e se associam por meio de ligações químicas, dando origem ao complexo proteico (46).

Ambas frações exibem funções distintas e importantes que conferem qualidade ao produto final. Quando hidratadas, as gliadinas fornecem viscosidade e extensibilidade à massa, enquanto as gluteninas provêm resistência e elasticidade

(43, 49). Por apresentar características funcionais únicas, o glúten possui grande valor comercial, sendo amplamente utilizado pela indústria alimentícia também como aditivo alimentar, a fim de melhorar a textura, retenção de umidade e sabor (41, 49).

Estima-se que o consumo médio de glúten pela população em geral é de cerca de 10-20g/dia nos países ocidentais (50). No entanto, apesar do grande valor nutricional dos grãos que contêm glúten (48, 51, 52), o consumo de glúten afeta adversamente a absorção de água e nutrientes em indivíduos intolerantes à proteína (53), além de apresentar possíveis relações com a ocorrência de manifestações psiquiátricas e cardiovasculares observadas na doença celíaca (DC) e na sensibilidade ao glúten não celíaca (SGNC) (54, 55).

Estudos mostram que pacientes celíacos manifestam depressão associada à ansiedade, maior risco à eventos cardiovasculares e desbalanço do SNA ao consumirem glúten. A disautonomia está relacionada à inflamação intestinal induzida pela hipersensibilidade ao glúten e à má absorção de nutrientes indispensáveis às funções neurológicas (55). Na SGNC, embora não haja ativação do sistema imune, também se observa a ocorrência de sintomas extra-intestinais, como alterações neuropsiquiátricas com implicações comportamentais (56, 57, 58, 59, 60). Nestes casos, a adesão à dieta livre de glúten (DLG) é a principal indicação médica para o tratamento dos distúrbios associados ao glúten (54).

Ademais, é cada vez mais crescente o número de indivíduos saudáveis que aderem à uma DLG sem o diagnóstico de distúrbios associados ao glúten, influenciados pelo entendimento popular de que a ingestão de glúten é prejudicial à saúde (61).

Embora os efeitos negativos do glúten na DC e na SGNC já estejam bem estabelecidos na literatura, há poucos estudos que relatam os efeitos do glúten sobre o funcionamento do organismo de indivíduos saudáveis. Brevemente, estudos pré-clínicos apontam que o consumo de glúten (4,5% por 8 semanas) diminuiu a expressão de PPAR- α e γ (i.e.: fatores de transcrição envolvidos na oxidação do tecido adiposo), e aumentou o ganho de massa corporal e adiposidade em ratos (62, 63, 64). Considerando que o ganho de massa corporal é fator de risco para doenças mentais e cardiovasculares (65, 66), torna-se essencial investigar e melhor compreender os

efeitos da dieta rica em glúten (DCG) sobre a homeostase comportamental e cardiovascular.

1.3. ESTRESSE, CONSUMO ALIMENTAR E REGULAÇÃO CARDIOVASCULAR

O sistema cardiovascular atua nas respostas adaptativas ao estresse, estando sujeito a sofrer influências neuro-humorais (67). Alterações na função cardiovascular, tais como o aumento da FC, da PAM, da contratilidade e do débito cardíaco, são promovidas pela ativação do SNA durante situações aversivas, com o objetivo de preservar o equilíbrio e garantir a sobrevivência. Essas respostas são acompanhadas por alterações endócrinas e comportamentais (8). No entanto, a exposição ao estresse de curto e longo prazo já é associada ao risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) (5, 10). As DCV são um grupo de distúrbios patológicos que afetam o coração e os vasos sanguíneos, a saber: hipertensão, acidente vascular cerebral, aterosclerose, doença arterial periférica e doenças venosas. Segundo a OMS, as DCV são a principal causa de morte no mundo, representando, em 2019, 32% de todas as mortes globais. Dentre os principais fatores de risco para o seu desenvolvimento, destacam-se o padrão alimentar, o estresse e a hipertensão arterial, os quais estão relacionados ao estilo de vida (15).

O estresse também atua como desencadeador de mudanças no comportamento alimentar que, por sua vez, é um fator modificável na prevenção, bem como na gênese das DCV (68). A ingestão inadequada de proteínas, por exemplo, provoca aumento da pressão arterial (69) e do risco à insuficiência cardíaca (69, 70), e quando no início da vida, pode promover aumento da PAM e FC e suas variabilidades, como já demonstrado em estudos em modelo animal (71, 72). Além disso, inadequações no consumo de macronutrientes (proteínas, lipídeos e carboidratos) relacionam-se ao desequilíbrio do SNA, ocorrência de distúrbios cardiometabólicos secundários (i.e.: resistência à insulina, doença coronariana e hipertensão), prejuízo do controle cardiovascular em condições de estresse e aumento da ansiedade (69, 73, 74) – achados que evidenciam a importância da qualidade da dieta sobre o perfil cardiometabólico e comportamental.

Considerando que a responsividade comportamental e cardiovascular podem ser impactadas por fatores ambientais, como alimentação e estresse emocional, e que

o isolamento social potencializa o consumo de produtos hiperpalatáveis que contém glúten, neste trabalho investigamos os efeitos da influência de uma dieta rica em glúten sobre a homeostase comportamental e cardiovascular em ratos saudáveis submetidos ao isolamento social.

2. JUSTIFICATIVA

São eminentes os prejuízos à saúde emocional e psicológica dos indivíduos em virtude do isolamento social na pandemia. E o estresse emocional, decorrente desta medida crucial de controle à propagação da COVID-19, é um fator de risco cardiovascular e desencadeador de mudanças comportamentais, dentre elas o transtorno de ansiedade. Assim como nas relações sociais, a pandemia também impacta nos hábitos alimentares, especialmente se considerarmos o maior consumo de alimentos hiperpalatáveis contendo glúten, como fonte de alívio emocional em meio ao isolamento social na pandemia. O glúten apresenta possíveis relações com a ocorrência de manifestações psiquiátricas e cardiovasculares em indivíduos com sensibilidade ao glúten celíaca e não celíaca. Entretanto, embora haja grande especulação sobre o potencial tóxico do glúten para a população em geral, seus efeitos sobre a saúde comportamental e cardiovascular em indivíduos saudáveis sem o diagnóstico de distúrbios associados ao glúten ainda não foram investigados e, muito menos compreendidos.

Sendo assim, ao considerarmos que o estresse emocional por isolamento social pode tanto impactar a responsividade comportamental e cardiovascular quanto potencializar o consumo de alimentos ricos em glúten, torna-se relevante avaliar os efeitos do glúten sobre a homeostase comportamental e cardiovascular em ratos submetidos ao isolamento social. Ao mimetizar o consumo do glúten associado ao estresse emocional crônico durante a pandemia da COVID-19, podemos compreender os impactos dessa associação sobre as respostas cardiovasculares e comportamentais de indivíduos saudáveis e mitigar eventuais danos associados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos da dieta rica em glúten (10% por 5 semanas) sobre a responsividade comportamental e cardiovascular em ratos Wistar expostos ao estresse emocional por isolamento social.

3.2. Objetivos específicos

Investigar os efeitos do consumo da dieta rica em glúten associada ao isolamento social sobre:

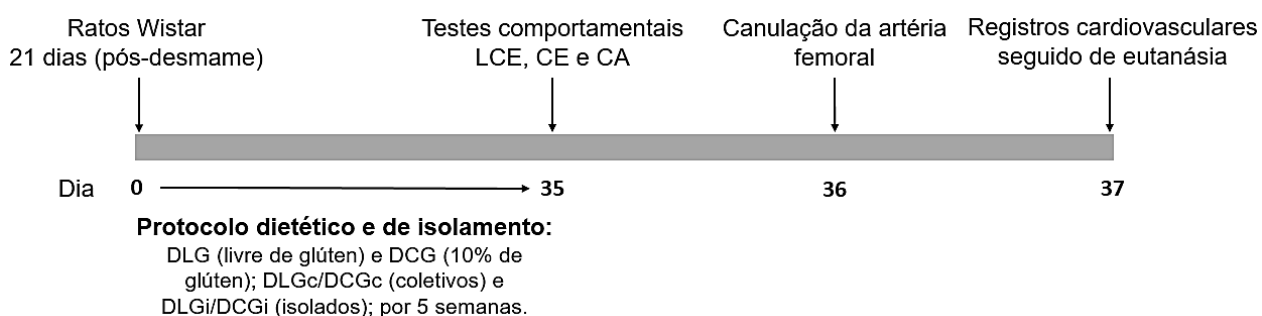
- i. O consumo alimentar, massa corporal e índices de Lee e adiposidade;
- ii. As respostas comportamentais relacionadas à ansiedade;
- iii. Os parâmetros cardiovasculares (frequência cardíaca, pressão arterial média, sistólica e diastólica) em ratos saudáveis.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Ratos Wistar, com 21 dias de vida (correspondente ao período pós-desmame), pesando $\pm 50g$, foram obtidos do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA/UFOP). Os animais foram divididos em grupo dieta livre de glúten (DLG) e grupo dieta rica em glúten (DCG), ofertadas por 5 semanas. Os grupos dieta foram subdivididos em duas condições de criação: coletivos (DLGc e DCGc), com dois animais por gaiola (41cm de comprimento x 34cm de largura x 17cm de altura), e isolados (DLGi e DCGi), com um animal por gaiola (30cm de comprimento x 20cm de largura x 13cm de altura). Os animais foram mantidos no biotério de manutenção do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC), sob temperatura controlada ($22\pm 1^\circ C$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 06h00 da manhã), e tiveram livre acesso à dieta e à água filtrada. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP), sob protocolo nº 9520180121.

Figura 1 – Delineamento experimental



4.2. Protocolo dietético

No pós-desmame (21 dias), todos os animais foram submetidos ao protocolo dietético por 5 semanas, de acordo com a dieta correspondente a cada grupo experimental: os grupos DLGc e DLGi receberam ração AIN-93G livre de glúten e os grupos DCGc e DCGi receberam ração AIN-93G modificada, contendo 10% de glúten. Observa-se na Tabela 01 a composição das dietas. O glúten representa 75-80% das

proteínas do trigo (75), e trabalhos já publicados que investigaram os efeitos do glúten sobre outras variáveis adotaram percentuais entre 4,5% e 10% (76, 77). Diante disso, adotamos o maior valor percentual de glúten (10%) na composição da DCG. Para garantir à similaridade entre as densidades calóricas das dietas, a quantidade de glúten acrescida foi reduzida da quantidade de amido, uma vez que carboidratos e proteínas apresentam a mesma proporção de kcal/g. O consumo alimentar e a massa corporal dos animais foram avaliados semanalmente e as dietas foram pesadas antes de serem servidas e repostas.

Tabela 1 – Composição nutricional das dietas utilizadas no protocolo dietético.

	Dieta AIN-93G livre de glúten (g/kg)	Dieta AIN-93G com glúten (g/kg)
Amido	397,486	264,153
Glúten de Trigo (75%)	0	133,333 (10% de glúten)
Caseína (85%)	200	200
Amido dextrinizado	132	132
Sacarose	100	100
Óleo de soja	70	70
Fibra	50	50
Minerais	35	35
Vitaminas	10	10
L-Cistina	3	3
Colina	2,5	2,5
t-BHQ	0,014	0,014
Kcal/g	3827,944	3787,944

Fonte: PRAG Soluções Comércio e Serviços em Biotecnologias®

Mistura de minerais (g/Kg de mistura): CaCO₃ – 357,0 / KH₂PO₄ – 196,0 / C₆H₅K₃O₇ – 70,78 / NaCl – 74,0 / K₂SO₄ – 46,6 / MgO – 24,0 / C₆H₅FeO₇ – 6,06 / ZnCO₃ – 1,65 / MnCO₃ – 0,63 / CuCO₃ – 0,30 / KIO₃ – 0,01 / Na₂Se O₄ – 0,01,25 / (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O – 0,00795 / H₁₈Na₂O₁₂Si – 1,45 / KCrS₂O₈.12H₂O – 0,275 / LiCl – 0,0174 / H₃BO₃ – 0,0815 / NaF – 0,0635 / NiCO₃ – 0,0318 / NH₄VO₃ – 0,0066 / Sacarose – 221,026.

Mistura de vitaminas (g/Kg de mistura): Ácido Nicotínico – 3,0 / Pantotenato de Cálcio – 1,60 / Piridoxina HCl – 0,70 / Tiamina HCl – 0,60 / Riboflavina – 0,60 / Ácido Folie – 0,20 / D-Biotina – 0,02 / Vitamina B12 – 2,5 / Vitamina E – 15,0 / Vitamina A – 0,80 / Vitamina D3 – 0,25 / Vitamina K – 0,075 / Sacarose – 974,655.

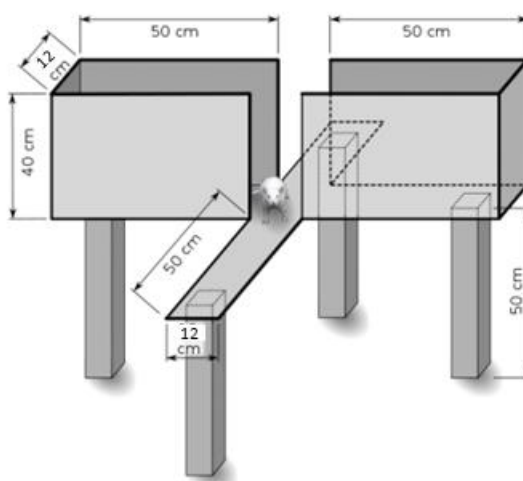
4.3. Testes comportamentais

Ao completar 5 semanas correspondentes ao protocolo dietético, os animais foram submetidos uma única vez aos testes comportamentais Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Caixa Claro Escuro (CE) e Campo Aberto (CA), respectivamente. Na sala de experimentação, o ruído e a temperatura foram controlados e a iluminação permaneceu à 60 lux. Os animais foram ambientalizados à sala por 30 min antes do início do experimento, e os testes foram gravados com auxílio de uma câmera posicionada acima dos aparatos para posterior análise das imagens. A cada troca de animal, os aparatos foram higienizados com álcool 20% para eliminação de estímulos olfatórios.

4.3.1. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE, proposto por Handley e Mithani (1984) (78), consiste em dois braços fechados, com paredes de 40 cm de altura, e dois braços abertos, envoltos por uma proteção acrílica de 01 cm de altura, conectados por um quadrante central. Todos os braços possuem mesma dimensão (50 cm de comprimento x 12 cm de largura) e estão elevados 50 cm do chão. O LCE se fundamenta na preferência dos roedores a locais fechados e escuros (braços fechados) e no medo inato à altura e a locais abertos (braços abertos), os quais impossibilitam o uso da exploração tigmotática (ato de tatear superfícies com as vibrissas) (79). Para a execução do teste, os animais foram posicionados individualmente no quadrante central, de frente para um braço fechado, e permitidos explorar livremente o labirinto por 300s. O tempo de permanência e o número de entradas em casa braço do aparato e no quadrante central foram avaliados. Dessa forma, alterações comportamentais defensivas do tipo ansiedade são interpretadas quando os braços abertos são evitados e os roedores passam mais tempo nos braços fechados do labirinto (80).

Figura 2 – Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

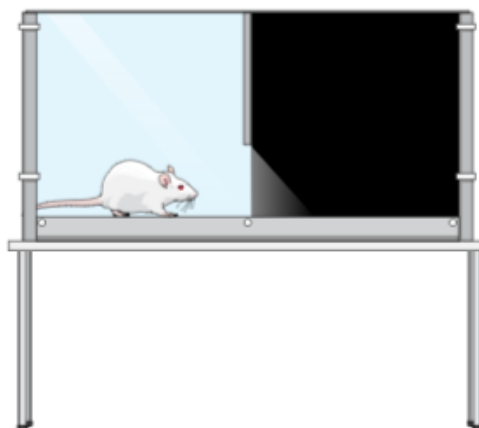


Fonte: Adaptado de *commons.wikimedia.org*.

4.3.2. Caixa Claro/Escuro (CE)

A caixa CE, desenvolvida por Crawley e Goodwin (1980), consiste em dois compartimentos em acrílico com tampa na parte superior, sendo o compartimento escuro opaco e o compartimento claro transparente (81). Os compartimentos são conectados por uma parede em comum, com abertura de aproximadamente 10 cm, na qual o animal pode transitar de um lado para o outro. O teste se fundamenta no comportamento inato dos roedores de aversão à luminosidade e no comportamento espontâneo de exploração a ambientes novos, proporcionado pelo próprio aparato (81, 82). Para a execução do teste, os animais foram posicionados individualmente no interior do compartimento claro da caixa, e permitidos explorar livremente o aparato durante 300s após a primeira esquivada para o compartimento escuro (74). O tempo de permanência e o número de entradas em cada compartimento da caixa, bem como o tempo de reentrada no compartimento claro foram avaliados. Dessa forma, alterações comportamentais do tipo ansiedade são interpretadas quando o compartimento claro é evitado e os roedores passam mais tempo no compartimento escuro.

Figura 3 – Caixa Claro Escuro (CE)

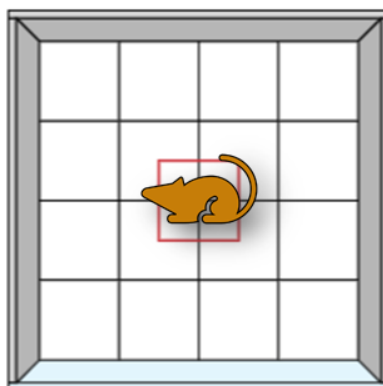


Fonte: plataforma *Mind the Graph* (www.mindthegraph.com).

4.3.3. Campo Aberto (CA)

O CA consiste em uma caixa quadrada (60 cm largura x 60 cm x altura 40 cm de profundidade), com paredes e fundo em acrílico preto. Sua arena é subdividida em segmentos que delimitam os quadrantes centrais e periféricos do aparato (83). O teste se fundamenta no conflito inato dos roedores em explorar ambientes novos (centro), versus se manter em um ambiente seguro (periferia), o qual permite o uso da exploração tigmotática (84, 85). Para a execução do teste, os animais foram posicionados individualmente no centro do aparato e permitidos explorar a arena por 300s. O tempo de exploração e o número de quadrantes percorridos pelo animal no centro e na periferia da arena, bem como o número e tempo de *groomings* (limpeza de qualquer parte da superfície do corpo ou pelo com a língua, dentes e/ou patas dianteiras) (86), permitiram avaliar alterações comportamentais do tipo ansiedade. Além disso, o número de explorações verticais (elevação do corpo, ficando sob as duas patas traseiras, apoiando ou não as patas dianteiras nas paredes do aparato), permitiu avaliar o comportamento exploratório e análise de risco feita pelo animal.

Figura 4 – Campo Aberto (CA)



Fonte: plataforma *Mind the Graph* (www.mindthegraph.com).

4.4. Canulação da artéria femoral

No dia subsequente aos testes comportamentais, foi realizada a canulação da artéria femoral para aquisição dos parâmetros cardiovasculares, cujos registros foram realizados após 24 horas de recuperação cirúrgica. Para tal, os animais foram anestesiados com uma mistura de Cetamina e Xilazina (120 mg/kg + 14 mg/kg; via intraperitoneal; i.p.) e tiveram a região inguinal dissecada até que a artéria femoral ficasse aparente e pudesse ser isolada. Posteriormente, dois fios de sutura foram posicionados por baixo do vaso, isolando a porção inferior e tencionando a porção superior. Foi feita uma pequena incisão no vaso, por onde a cânula foi inserida (cerca de 04 cm) até alcançar a artéria aorta abdominal.

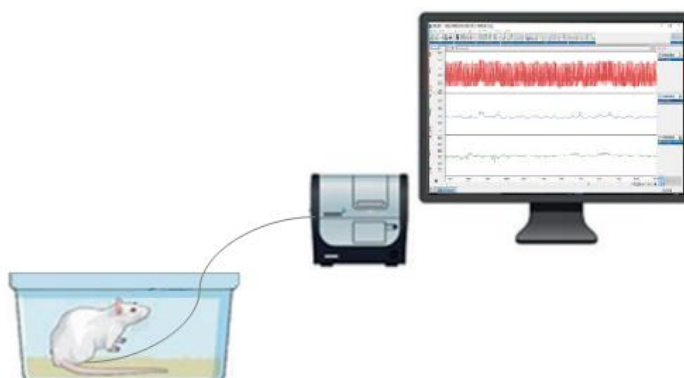
Em seguida, a cânula foi transpassada pelo dorso até a região da escápula, onde foi fixada a uma incisão por meio de sutura. Após o procedimento cirúrgico, foram administrados: Pentabiótico Veterinário (penicilina, estreptomicina, diidroestreptomicina), i.p. em uma dose de 0,1mL contendo 48000UI de penicilina, 20mg de estreptomicina e 20mg de diidroestreptomicina por kg de massa, bem como Ketoflex (cetoprofeno) 1%; 4mg/kg i.p., respetivamente para ação antibiótica, anti-inflamatória e analgésica (87). No período de recuperação pós-cirúrgica (24h), foram tomadas medidas de monitoramento dos animais, atendendo à Resolução Normativa nº 33 do CONCEA, tais como: manutenção dos animais em manta térmica por 30 min logo após a cirurgia para evitar hipotermia, e posteriormente (02 vezes ao dia),

observação da frequência respiratória, verificação da cicatrização das suturas e de eventual presença de hemorragia, bem como avaliação dos movimentos/locomoção, do consumo de água e ração, das características do pelo e do aspecto físico e comportamental do animal (por ex.: se havia secreção óculo-nasal, prostração, vocalização).

4.5. Registros Cardiovasculares

Após 24 horas de recuperação pós-cirúrgica, foram realizados os registros cardiovasculares de pressão arterial e frequência cardíaca. Para tal, salina heparinizada (1:40) foi injetada na cânula arterial do animal, que por sua vez foi conectada a um transdutor de pressão MLT0699 (ADInstruments, Austrália). O transdutor de pressão foi acoplado a um amplificador de sinal ETH-400 (CB Sciences, Inc.) conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália). A transferência dos dados do conversor para o computador foi realizada via placa SCISI e o software Chart for Windows® gerou os registros de pressão arterial pulsátil (PAP) a partir dos dados enviados pelo conversor analógico digital em uma frequência de amostragem de 1000 Hz. Após serem conectados ao sistema, os animais passaram por um período de estabilização dos parâmetros cardiovasculares por cerca de 30 min, seguido do registro por 30 min em condições basais (87).

Figura 5 – Representação do esquema de aquisição de dados pelo LabChart 7

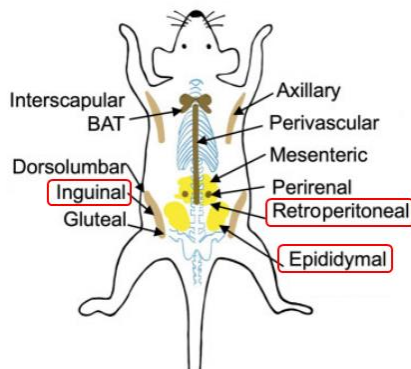


Fonte: Adaptado de Domingos-Souza, 2021.

4.6. Eutanásia

Ao final dos registros cardiovasculares, os animais foram individualmente anestesiados com Isoflurano, por via inalatória em uma dose de 2,5% em 3L/min de O₂, com auxílio de uma capela de exaustão. Em seguida, foi aferido o comprimento nasoanal (para cálculo do índice de Lee), seguido da decapitação, com auxílio de guilhotina, para a retirada dos tecidos adiposos abdominais (TAs) epididimal, retroperitoneal e inguinal (para cálculo do Índice de Adiposidade). Ambos os índices foram utilizados para avaliar a composição corporal dos animais.

Figura 6 – Representação da localização dos TAs



Fonte: Adaptado de Cheong, 2021.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram geradas no Software GraphPad Prism (versão 8.4.2). *Outliers* foram identificados por meio do teste de Grubbs, considerando $\alpha=0,05$, e removidos das análises. Os dados foram avaliados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Para análise estatística dos dados, foram realizados o teste de variância (ANOVA) *Two-way*, seguido do pós-teste de Fisher's LSD (dados paramétricos e não paramétricos), teste *t* não pareado (dados paramétricos) e Mann-Whitney (dados não paramétricos). Os resultados foram expressos em: a) Média \pm Desvio Padrão para dados paramétricos (exceto para os gráficos de Heat Map e a tabela 3 em que houve a padronização da expressão em Mediana e intervalo interquartil), ou b) Mediana e intervalo interquartil [mediana: (1º Quartil - 3º Quartil)] para dados não paramétricos. O nível de significância considerado para as análises foi de $p<0,05$.

6. RESULTADOS

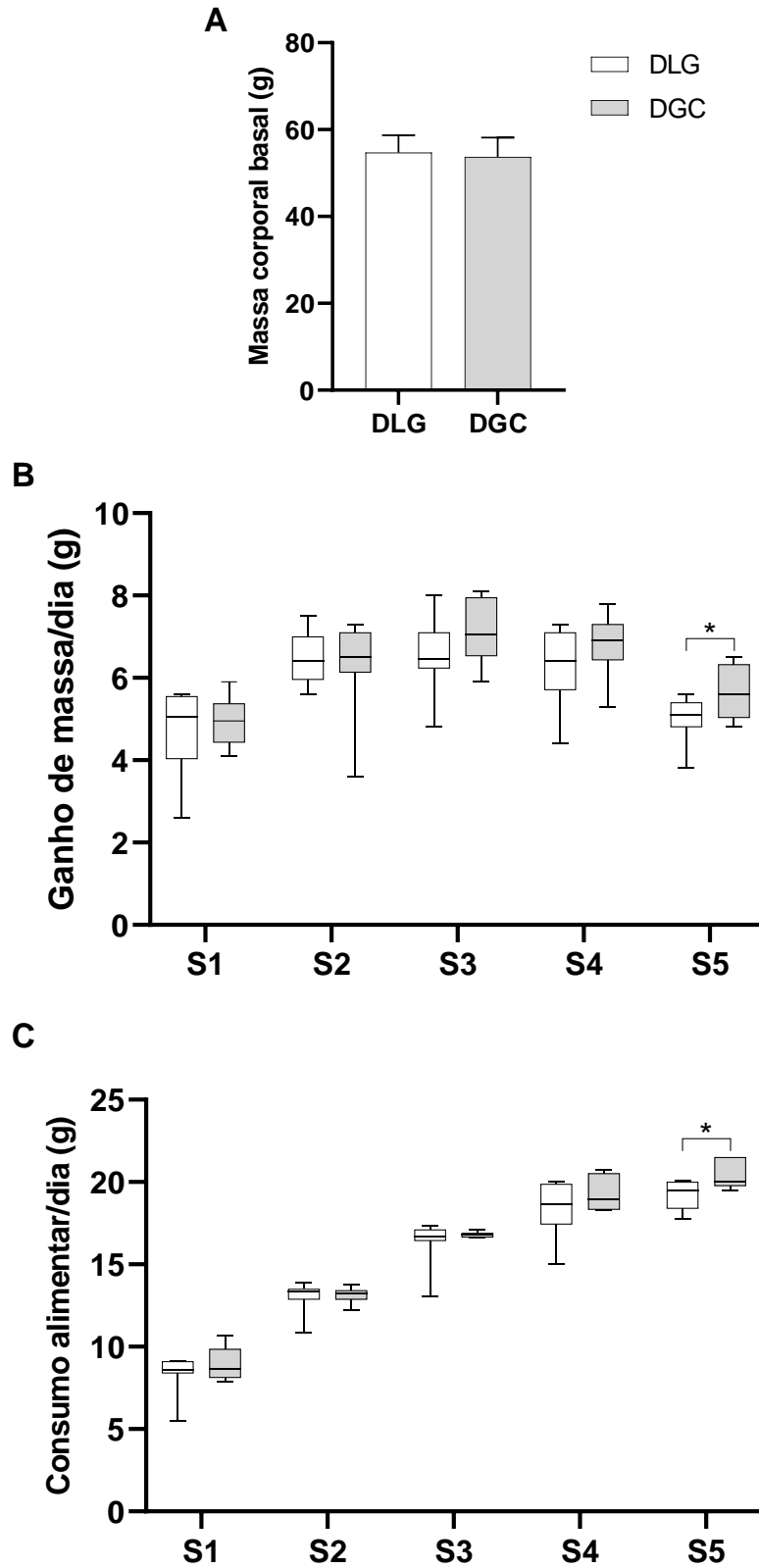
Considerando a escassez de dados sobre os efeitos do glúten em indivíduos saudáveis, primeiramente avaliamos os efeitos isolados do glúten sobre os parâmetros biométricos, responsividade comportamental e cardiovascular em ratos Wistar.

6.1. Efeitos da dieta rica em glúten sobre os parâmetros biométricos e sobre a responsividade comportamental e cardiovascular em ratos Wistar

6.1.1. Efeitos da dieta rica em glúten sobre o consumo alimentar, massa corporal, índices de Lee e adiposidade em ratos

A massa corporal basal, ganho de massa diário e o consumo alimentar, avaliados ao longo das 5 semanas de protocolo dietético, estão representados na Figura 7. No início do experimento os animais apresentaram massa corporal basal semelhante (**DLG**: $54,71 \pm 3,98$; **DCG**: $53,67 \pm 4,50$; $p=0,5542$) (Figura 7A). O *U*-teste Mann-Whitney das amostras independentes indicou maior ganho de massa corporal no grupo DCG na semana 5, quando comparado ao grupo DLG (**S5: DLG** [5,10: (4,80-5,40) g]; **DCG** [5,60: (5,03-6,33) g]; $p=0,0320$) (Figura 7B). Também foi observado aumento no consumo alimentar no grupo DCG na mesma semana quando comparado ao grupo DLG (**S5: DLG** [19,50: (18,39-20,00) g]; **DCG** [20,06: (19,75-21,50) g]; $p=0,0199$) (Figura 7C).

Figura 7 – Massa corporal basal e efeitos da DCG sobre o ganho de massa corporal e consumo alimentar diário ao longo das cinco semanas de experimentação



A: Massa corporal basal (g); B: Ganho de massa/dia (g); C: Consumo alimentar/dia (g). Dados paramétricos: analisados por teste *t* não pareado e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney e expressos em Mediana: Q1-Q3. *Diferença significativa vs. DLG ($p < 0,05$). DLG ($n=12$), DGC ($n=12$).

A Tabela 2 apresenta a massa dos tecidos adiposos abdominais epididimal, retroperitoneal e inguinal, e os índices de Lee e adiposidade dos grupos DLG e DCG. O teste *t* não pareado não indicou diferenças significativas entre os grupos estudados.

Tabela 2 – Efeitos da DCG sobre os parâmetros relativos à composição de gordura corporal de ratos ao longo das cinco semanas de experimentação

Parâmetros (g)	DLG	DCG	p
Epididimal	0,92 ± 0,18	1,03 ± 0,38	0,3657
Retroperitoneal	0,48 ± 0,16	0,59 ± 0,22	0,2032
Inguinal	1,30 ± 0,41	1,44 ± 0,40	0,3970
IA (%)**	2,70 ± 0,59	3,07 ± 0,83	0,2386
IL***	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,3253

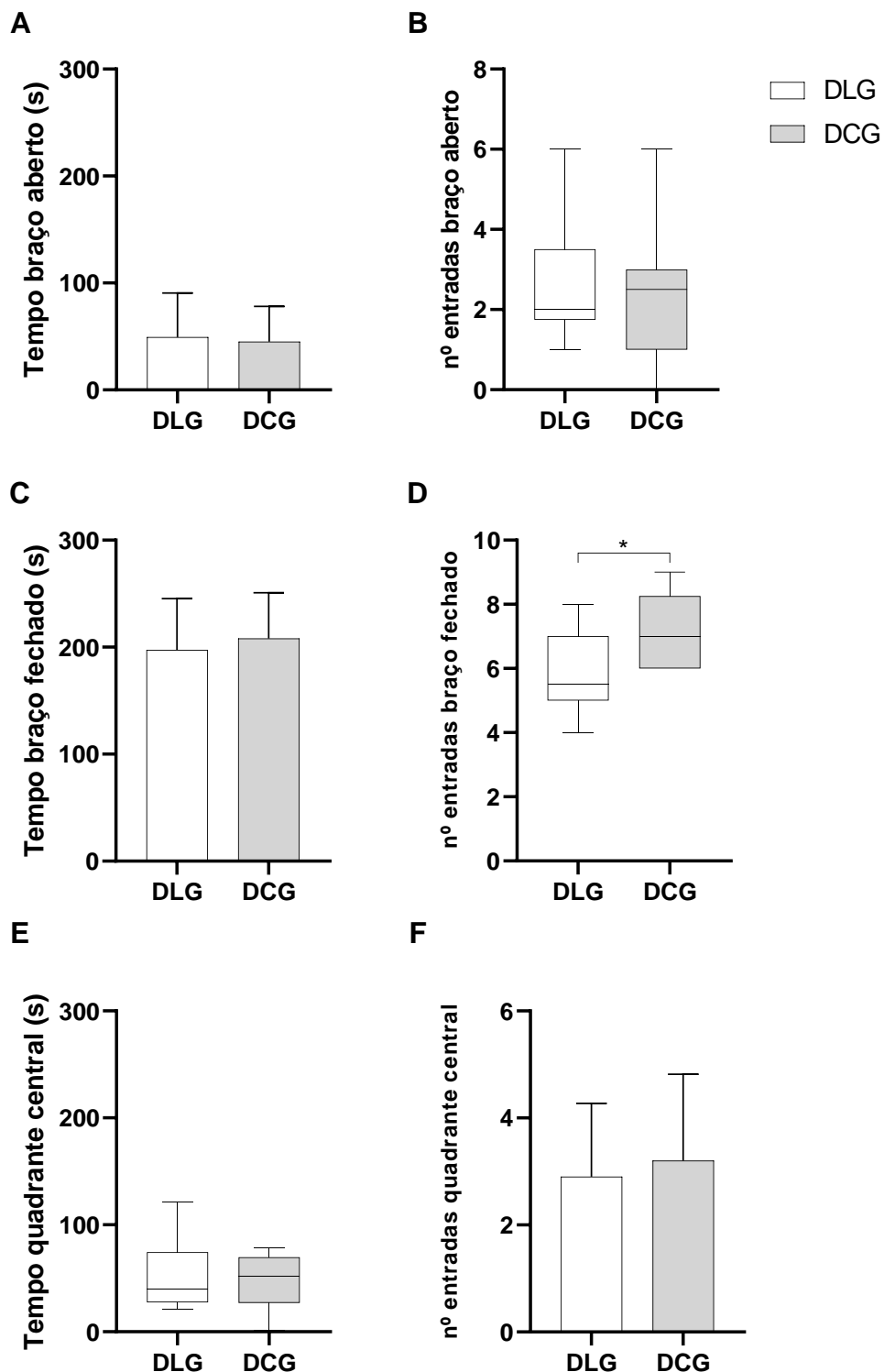
*Dados paramétricos: analisados por teste t não pareado e expressos em média ± DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney e expressos em Mediana: Q1-Q3. *Diferença significativa vs. DLG (p<0,05). DLG (n=11), DCG (n=12). **[(soma TAs (g)) ÷ (peso corporal final(g))] x 100; *** [(peso corporal final (g))^{1/3} ÷ comprimento nasoanal (cm)] x 10.*

6.1.2. Efeitos da dieta rica em glúten sobre as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade em ratos

Para avaliar os efeitos da DCG sobre as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade em ratos, os animais foram submetidos aos testes comportamentais Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Caixa Claro Escuro (CE) e Campo Aberto (CA), respectivamente.

Observa-se na Figura 8 os dados referentes ao teste comportamental LCE. O U-teste Mann-Whitney indicou maior número de entradas dos animais do grupo DCG no braço fechado (**DLG** [5,50: (5,00-7,00)]; **DCG** [7,00: (6,00-8,25)]; p=0,0498) (Figura 8D). Não houve diferença significativa nos grupos estudados quanto ao número de entradas no braço aberto (**DLG** [2,00: (1,75-3,50)]; **DCG** [2,50: (1,00-3,00)]; p=0,9697) (Figura 8B) e no quadrante central (**DLG**: 2,90 ± 1,37; **DCG**: 3,20 ± 1,62; p=0,6601) (Figura 8F). Também não foi observada diferença significativa no tempo de permanência nos braços abertos (**DLG**: 49,30 ± 41,25; **DCG**: 45,00 ± 33,21; p=0,8003) (Figura 8A), nos braços fechados (**DLG**: 197,4 ± 47,89; **DCG**: 208,0 ± 42,84; p=0,6083) (Figura 8C) e no quadrante central (**DLG** [40,00: (27,50-74,25)]; **DCG** [51,50: (27,00-69,50)]; p=0,8958) (Figura 8E).

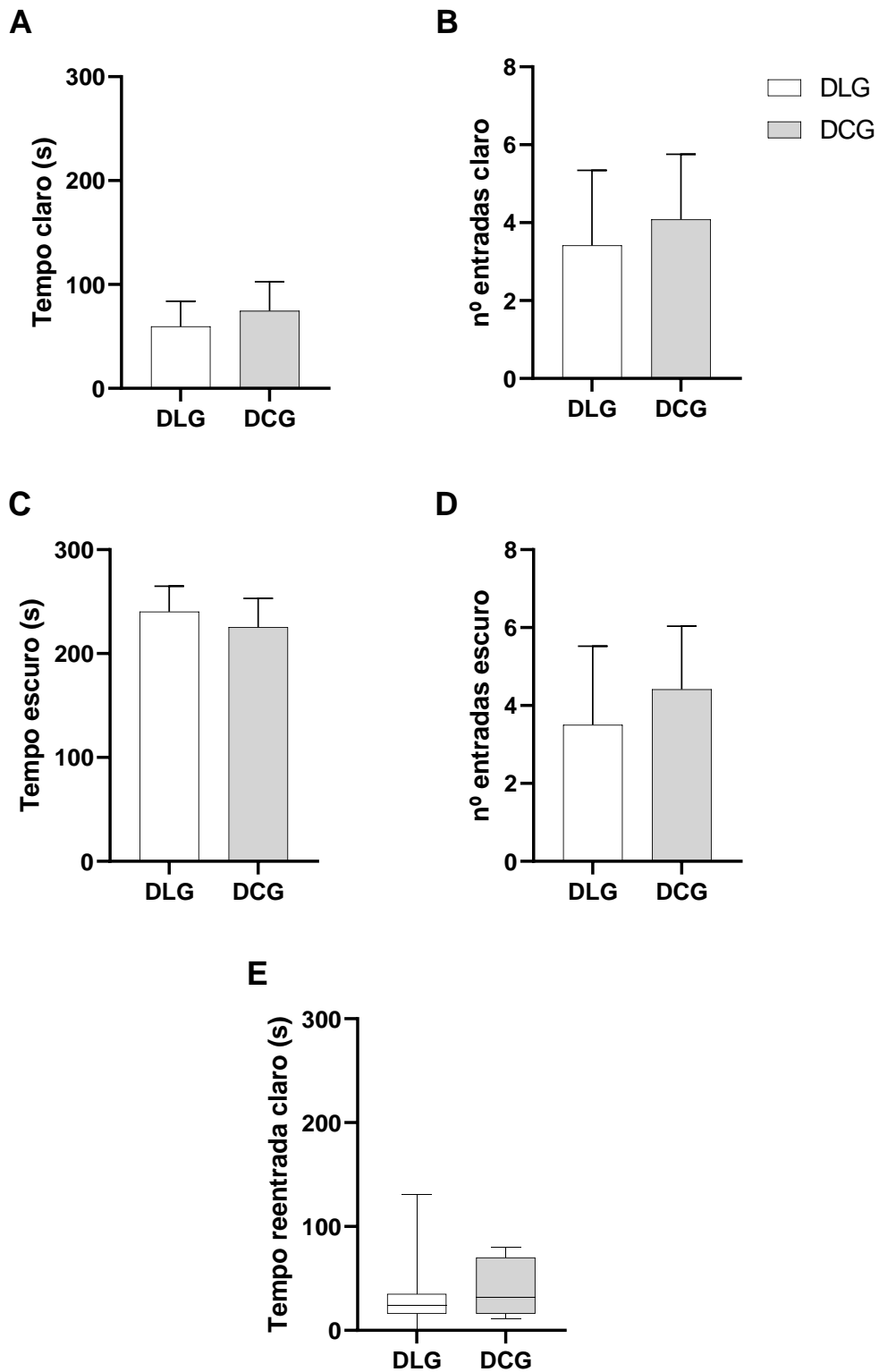
Figura 8 – LCE: tempo de permanência e número de entradas no braço aberto, braço fechado e quadrante central durante exposição em 300s



A: Tempo no braço aberto (s); B: nº de entradas no braço aberto; C: Tempo no braço fechado (s); D: nº de entradas no braço fechado; E: Tempo no quadrante central (s); F: nº de entradas no quadrante central. Dados paramétricos: analisados por teste t não pareado e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney e expressos em Mediana: Q1-Q3. * Diferença significativa vs. DLG ($p < 0,05$). DLG (n=10), DCG (n=10).

A partir dos dados avaliados na Caixa Claro Escuro, o teste *t* não pareado indicou não haver diferenças significativas no tempo de exploração no compartimento claro (**DLG**: $59,58 \pm 24,36$; **DCG**: $74,67 \pm 27,85$; $p=0,1719$) (Figura 9A), no compartimento escuro (**DLG**: $240,4 \pm 24,36$; **DCG**: $225,3 \pm 27,85$; $p=0,1719$) (Figura 9C), bem como no tempo de reentrada no compartimento claro (**DLG**: $31,73 \pm 34,99$; **DCG**: $37,64 \pm 26,65$; $p=0,5083$) (Figura 9E). Ainda, o teste não apontou diferença significativa quanto ao número de entradas no compartimento claro (**DLG**: $3,42 \pm 1,93$; **DCG**: $4,08 \pm 1,68$; $p=0,3759$) (Figura 9B) e no compartimento escuro (**DLG**: $3,50 \pm 2,02$; **DCG**: $4,42 \pm 1,62$; $p=0,2335$) (Figura 9D) entre os grupos estudados.

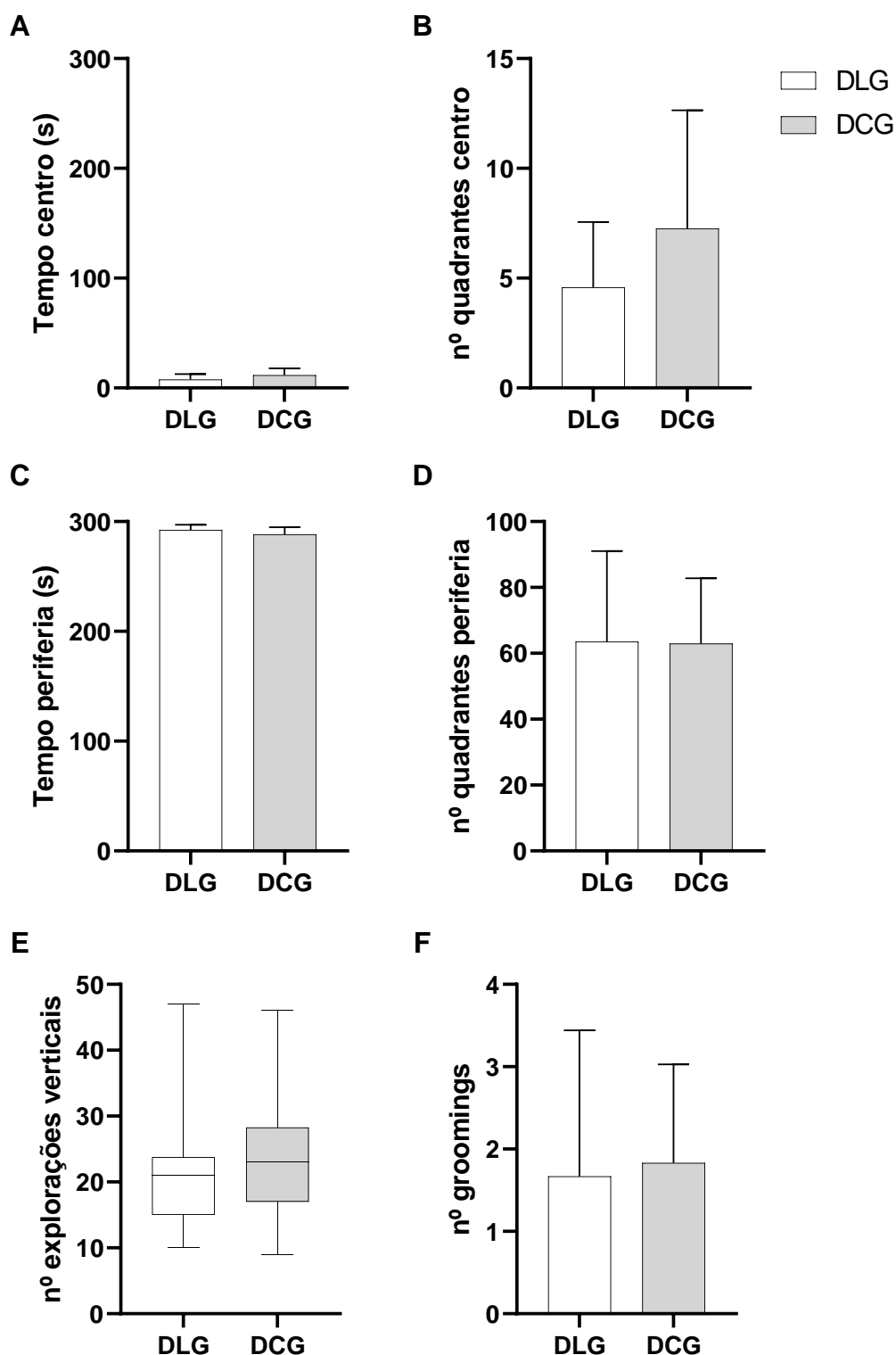
Figura 9 – Caixa Claro Escuro: tempo de permanência e número de entradas nos compartimentos claro e escuro e tempo de reentrada no compartimento claro durante exposição em 300s



A: Tempo claro (s); B: nº entradas claro; C: Tempo escuro (s); D: nº entradas escuro; E: Tempo reentrada claro (s). Dados paramétricos: analisados por teste *t* não pareado e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney e expressos em Mediana: Q1-Q3. *Diferença significativa vs. DLG ($p < 0,05$). DLG ($n=12$), DCG ($n=12$), exceto gráfico E (DLG $n=11$; DCG $n=11$).

A partir dos dados avaliados no Campo Aberto, o teste *t* não pareado não indicou diferença significativa no tempo de permanência no centro (**DLG**: $7,67 \pm 4,87$; **DCG**: $11,58 \pm 6,36$; $p=0,1044$) (Figura 10A) e na periferia do aparato (**DLG**: $292,30 \pm 4,87$; **DCG**: $288,40 \pm 6,36$; $p=0,1044$) (Figura 10C). Também não foi observada diferença significativa no número de quadrantes percorridos no centro (**DLG**: $4,58 \pm 2,97$; **DCG**: $7,25 \pm 5,40$; $p=0,1478$) (Figura 10B) e na periferia (**DLG**: $63,50 \pm 27,51$; **DCG**: $62,92 \pm 19,88$; $p=0,9531$) (Figura 10D). O *U*-teste Mann-Whitney não indicou diferença significativa quanto ao número de explorações verticais: **DLG** [21,00: (15,00-23,75)]; **DCG** [23,00: (17,00-28,25)]; $p=0,2971$] (Figura 10E), e o teste *t* não pareado também não indicou diferença significativa quanto ao número de groomings (**DLG**: $1,67 \pm 1,77$; **DCG**: $1,83 \pm 1,19$; $p=0,7898$) (Figura 10F) entre os grupos estudados.

Figura 10 – Campo Aberto: tempo de permanência e número de quadrantes percorridos no centro e na periferia, nº de explorações verticais e groomings durante exposição em 300s



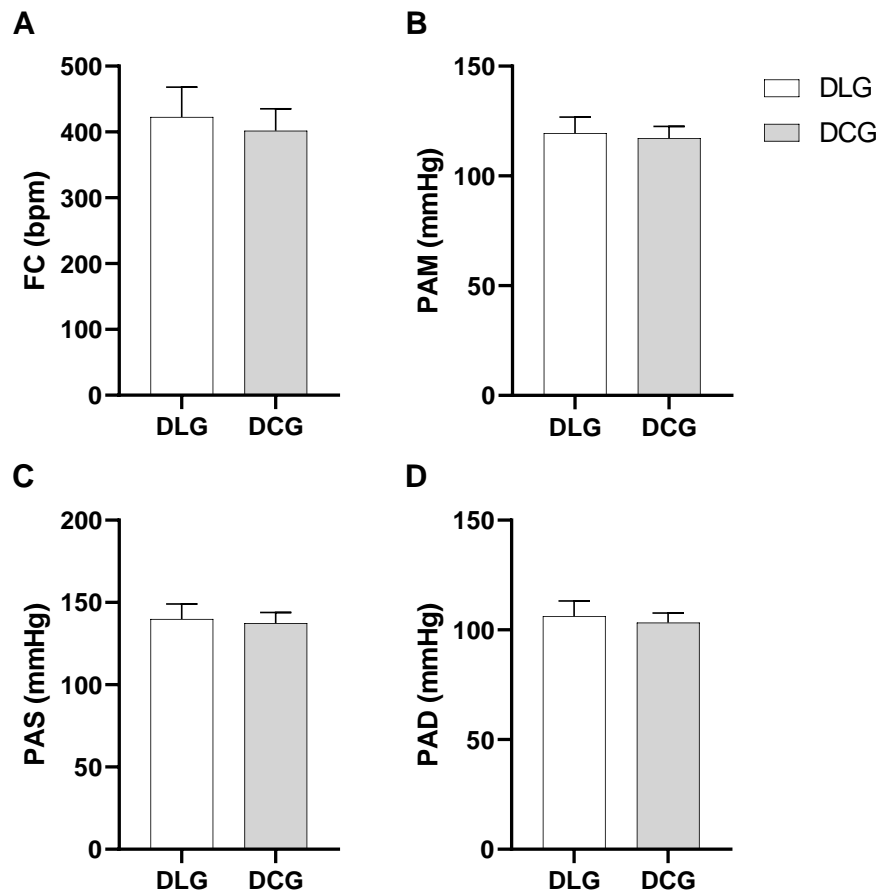
A: Tempo centro (s); B: nº entradas centro; C: Tempo periferia (s); D: nº entradas periferia; E: nº explorações verticais; F: nº groomings. Dados paramétricos: analisados por teste *t* não pareado e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney e expressos em Mediana: Q1-Q3. *Diferença significativa vs. DLG ($p < 0,05$). DLG ($n=12$), DCG ($n=12$), exceto gráfico E (DLG $n=11$; DCG $n=12$).

6.1.3. Efeitos da dieta rica em glúten sobre responsividade cardiovascular

Para avaliar os efeitos da DCG sobre a responsividade cardiovascular foram realizadas as medidas de FC, PAM, PAS e PAD após 5 semanas de protocolo dietético.

Os dados de registro dos parâmetros cardiovasculares estão representados da Figura 11. O teste *t* não pareado indicou que a DCG não alterou a FC (**DLG**: $422,8 \pm 45,47$; **DCG**: $401,7 \pm 33,40$; $p=0,3680$) (Figura 11A), a PAM (**DLG**: $119,5 \pm 7,30$; **DCG**: $117,2 \pm 5,44$; $p=0,5380$) (Figura 11B), a PAS (**DLG**: $140,0 \pm 9,05$; **DCG**: $137,4 \pm 6,47$; $p=0,5761$) (Figura 11C) e a PAD (**DLG**: $106,1 \pm 7,02$; **DCG**: $103,3 \pm 4,37$; $p=0,4121$) (Figura 11D).

Figura 11 – Efeitos da DCG sobre os parâmetros cardiovasculares FC, PAM, PAS e PAD



A: FC (bpm); B: PAM (mmHg); C: PAS (mmHg); PAD (mmHg). Dados paramétricos: analisados por teste *t* não pareado e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney e expressos em Mediana: Q1-Q3. *Diferença significativa vs. DLG ($p<0,05$). DLG (n=7), DCG (n=6).

6.2. Efeitos da associação entre dieta rica em glúten e estresse emocional por isolamento social sobre os parâmetros biométricos e responsividade comportamental e cardiovascular em ratos Wistar.

Após avaliarmos os efeitos isolados do glúten, avaliamos os efeitos da DCG associada ao estresse emocional por isolamento social sobre os parâmetros biométricos e sobre a responsividade comportamental e cardiovascular em ratos Wistar.

6.2.1. Efeitos da associação entre dieta rica em glúten e estresse emocional por isolamento social sobre o consumo alimentar, massa corporal, índices de Lee e adiposidade em ratos.

Com o objetivo de verificar se os animais obtiveram consumo alimentar adequado ao longo do protocolo dietético, foram realizadas análises intragrupos em relação ao ganho de massa corporal (Figura 12B) e ao consumo alimentar (Figuras 12D e 12F), comparando-se as semanas subsequentes (S2 à S5) com a semana 1 (S1).

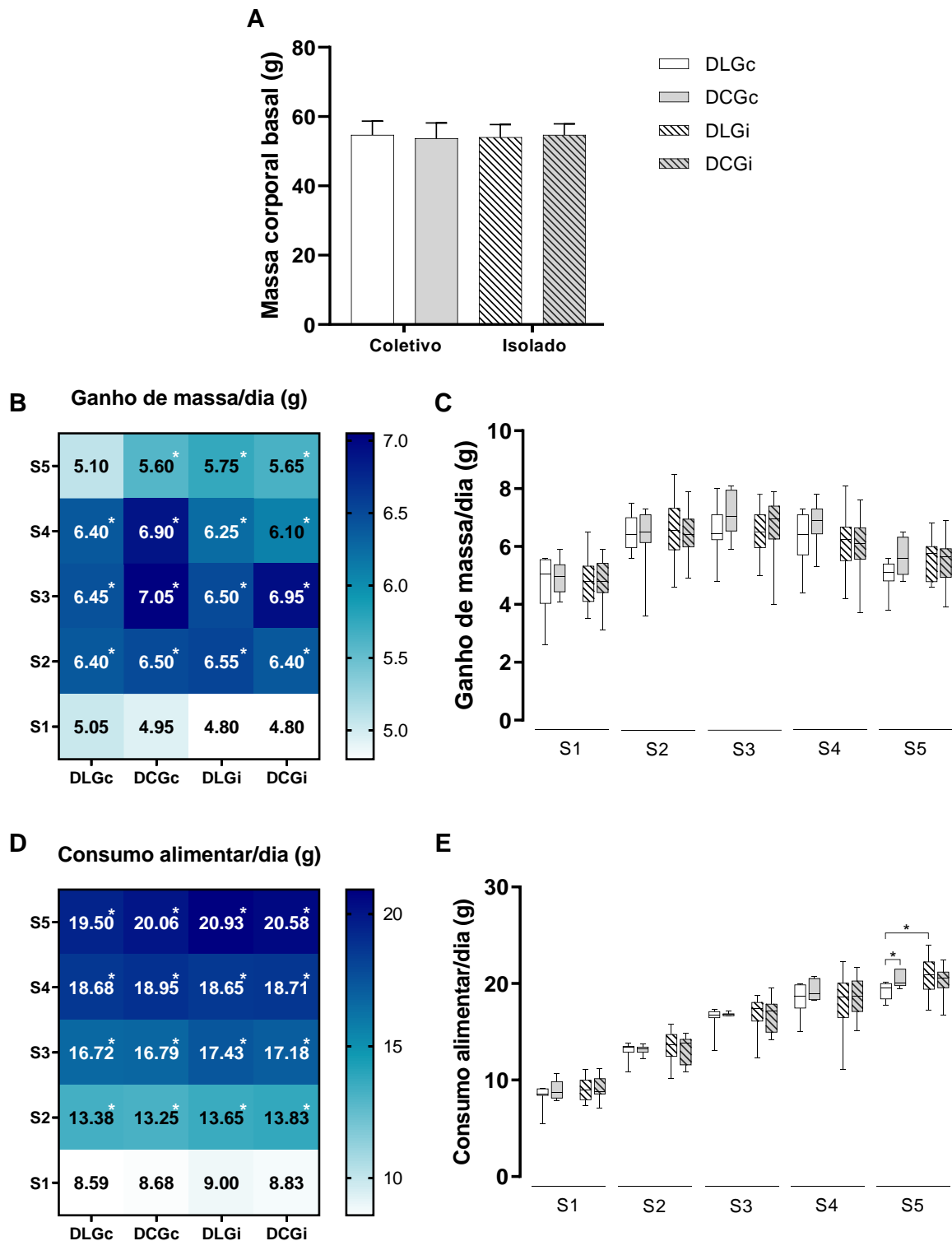
No início do experimento todos os animais apresentaram massa corporal basal semelhante (**DLGc**: $54,71 \pm 3,98$; **DCGc**: $53,67 \pm 4,50$; **DLGi**: $54,00 \pm 3,71$; **DCGi**: $54,71 \pm 3,16$; $p=0,5710$) (Figura 12A). Todos os grupos apresentaram aumento do ganho de massa corporal diário ao longo das semanas (Figura 12B): **DLGc** (S2: $p<0,0001$; S3: $p<0,0001$ e S4: $p=0,0002$); **DCGc** (S2: $p=0,0043$; S3: $p<0,0001$; S4: $p<0,0001$ e S5: $p=0,0150$); **DLGi** (S2: $p<0,0001$, S3: $p<0,0001$; S4: $p=0,0005$ e S5: $p<0,0114$); **DCGi** (S2: $p<0,0001$; S3: $p<0,0001$, S4: $p<0,0045$ e S5: $p<0,0208$). A análise intragrupos também demonstrou que todos os grupos apresentaram aumento do consumo alimentar ao longo das semanas (Figura 12D): **DLGc** (S2: $p<0,0001$; S3: $p<0,0001$; S4: $p<0,0001$; S5: $p<0,0001$); **DCGc** (S2: $p<0,0001$; S3: $p<0,0001$; S4: $p<0,0001$; S5: $p<0,0001$); **DLGi** (S2: $p<0,0001$; S3: $p<0,0001$; S4: $p<0,0001$; S5: $p<0,0001$); **DCGi** (S2: $p<0,0001$; S3: $p<0,0001$; S4: $p<0,0001$ e S5: $p<0,0001$).

Em seguida, foi avaliado o efeito da DCG associada ao estresse por isolamento social sobre os mesmos parâmetros. Observa-se na Figura 12C os valores do ganho

de massa corporal diário ao longo das semanas. O teste ANOVA *Two-way* indicou que a dieta, o estresse e a interação (dieta x estresse) não alteraram este parâmetro.

Os valores do consumo alimentar diário ao longo das semanas nos grupos experimentais estão representados na Figura 12E. O teste ANOVA *Two-way* indicou que a interação (dieta x estresse) influenciou no consumo alimentar na S5 [$F_{(1,48)} = 4,952$; $p=0,0308$], embora tal parâmetro não tenha sido afetado pela dieta, nem pelo estresse isoladamente. O pós-teste de Fisher's LSD revelou, aumento do consumo alimentar no grupo DCGc quando comparado ao DLGc ($p=0,0430$), assim como no grupo DLGi quando comparado ao DLGc ($p=0,0071$).

Figura 12 – Massa corporal basal e efeitos da DCG associada ao estresse emocional por isolamento social sobre ganho de massa corporal e consumo alimentar diário ao longo das cinco semanas de experimentação



A: Massa corporal basal (g); B, C: Ganho de massa/dia (g); D, E: Consumo alimentar/dia (g). Dados paramétricos: analisados por teste *t* não pareado ou ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Fisher's LSD e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por U-teste Mann-Whitney ou ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Fisher's LSD e expressos em Mediana: Q1-Q3. *Diferença significativa ($p < 0,05$). DLG [coletivo ($n=12$), isolado ($n=14$)], DCG [coletivo ($n=12$), isolado ($n=14$)].

A Tabela 3 apresenta os dados das medidas biométricas dos grupos experimentais. O teste ANOVA *Two-way* indicou que a dieta, o estresse e a interação (dieta x estresse) não alteraram estes parâmetros.

Tabela 3 – Efeitos da DCG associada ao estresse emocional por isolamento social sobre os parâmetros relativos à composição de gordura corporal de ratos ao longo das cinco semanas de experimentação

Parâmetros (g)	DLGc	DCGc	DLGi	DCGi	p
Epididimal	[0,90: (0,77-1,06)]	[1,02: (0,65-1,40)]	[0,92: (0,76-1,36)]	[0,88: (0,68-1,27)]	> 0,05
Retroperitoneal	[0,44: (0,43-0,55)]	[0,63: (0,34-0,73)]	[0,51: (0,38-0,68)]	[0,37: (0,31-0,58)]	> 0,05
Inguinal	[1,15: (1,01-1,54)]	[1,40: (1,15-1,67)]	[1,37: (1,18-2,00)]	[1,36: (1,03-1,48)]	> 0,05
IA (%)**	[2,57: (2,14 - 3,00)]	[3,15: (2,19 - 3,77)]	[2,84: (2,49 - 3,85)]	[2,54: (2,12 - 3,30)]	> 0,05
IL***	[0,29: (0,28 - 0,30)]	[0,30: (0,29 - 0,30)]	[0,29: (0,28 - 0,31)]	[0,29: (0,28 - 0,30)]	> 0,05

Dados paramétricos: analisados por ANOVA *Two-way*, seguido do pós-teste de Fisher's LSD e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por ANOVA *Two-way*, seguido do pós-teste de Fisher's LSD e expressos em Mediana: Q1-Q3. *Diferença significativa ($p < 0,05$). DLG [coletivo ($n=11$), isolado ($n=13$)], DCG [coletivo ($n=12$), isolado ($n=10$)]. **[(soma TAs (g)) \div (peso corporal final(g))] \times 100; *** [(peso corporal final (g))^{1/3} \div comprimento nasoanal (cm)] \times 10.

6.2.2. Efeitos da dieta rica em glúten associada ao estresse emocional por isolamento social sobre as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade em ratos.

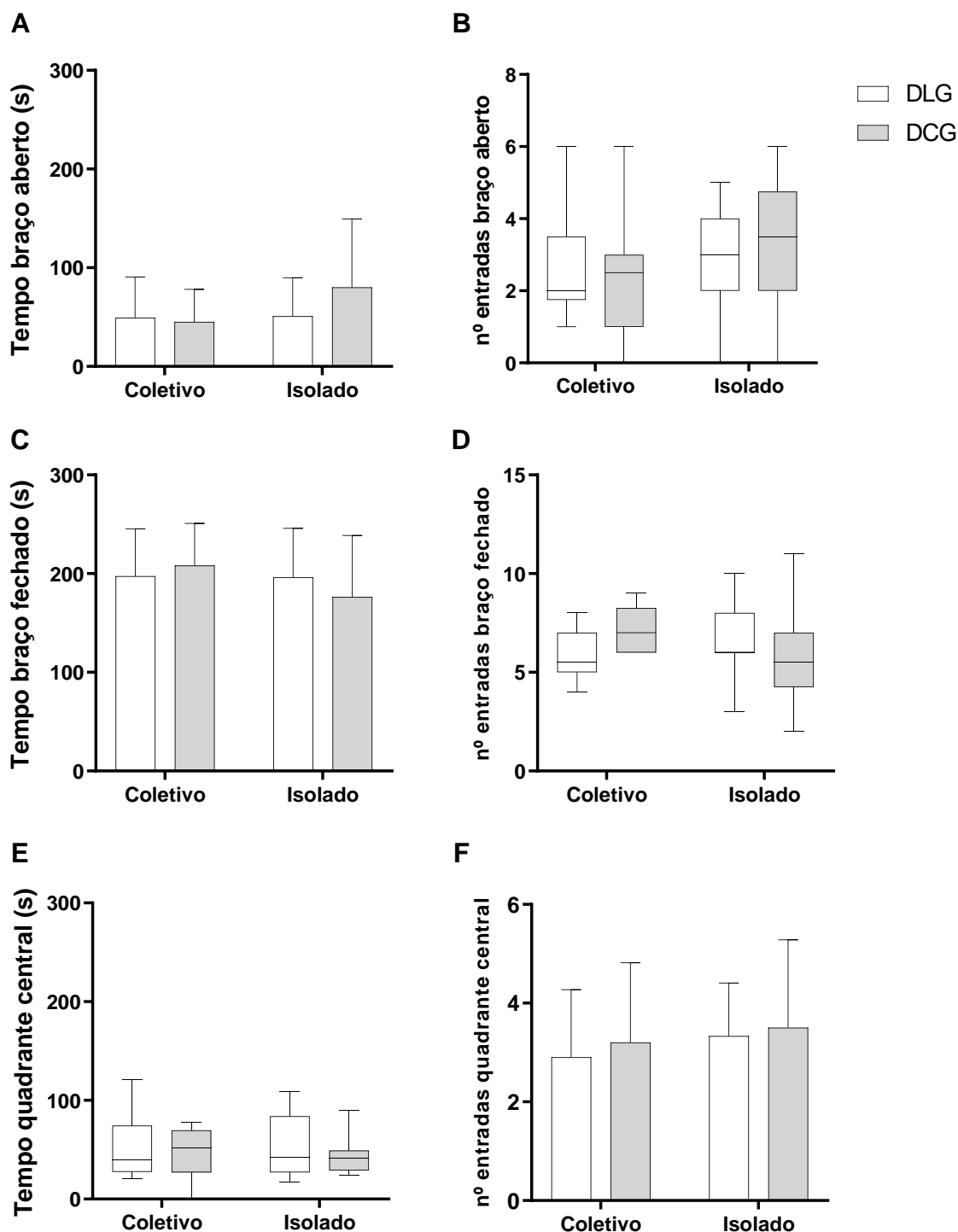
Para avaliar os efeitos da associação entre a DCG e o estresse por isolamento social sobre as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade, os ratos foram submetidos aos testes comportamentais Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Caixa Claro Escuro (CE) e Campo Aberto (CA), respectivamente.

A Figura 13 apresenta os dados dos parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade no LCE. O teste ANOVA *Two-way* indicou que a dieta, o estresse e a interação (dieta x estresse) não alteraram o tempo de permanência no braço aberto (**DLGc**: 49,30 \pm 41,25; **DCGc**: 45,00 \pm 33,21; **DLGi**: 50,92 \pm 38,88; **DCGi**: 80,18 \pm 69,32. Dieta [$F_{(1,39)} = 0,7223$; $p=0,4006$]; estresse [$F_{(1,39)} = 1,569$; $p=0,2178$]; interação [$F_{(1,39)} = 1,306$; $p=0,2601$]; Figura 13A), no braço fechado (**DLGc**: 197,4 \pm 47,89; **DCGc**: 208,0 \pm 42,84; **DLGi**: 196,1 \pm 49,84; **DCGi**: 176,3 \pm 62,44. Dieta [$F_{(1,39)} =$

0,08544; $p=0,7716$]; estresse [$F_{(1,39)} = 1,100$; $p=0,3008$]; interação [$F_{(1,39)} = 0,9314$; $p=0,3404$]; Figura 13C) e no quadrante central (**DLGc** [40,00: (27,50-74,25)]; **DCGc** [51,50: (27,00-69,50)]; **DLGi** [42,50: (27,00-83,75)]; **DCGi** [41,00: (29,00-49,00)]. Dieta [$F_{(1,39)} = 0,8146$; $p=0,3723$]; estresse [$F_{(1,39)} = 0,04626$; $p=0,8308$]; interação [$F_{(1,39)} = 0,03266$; $p=0,8575$]; Figura 13E).

Também não foi observada alteração no número de entradas no braço aberto (**DLGc** [2,00: (1,75-3,50)]; **DCGc** [2,50: (1,00-3,00)]; **DLGi** [3,00: (2,00-4,00)]; **DCGi** [3,50: (2,00-4,75)]. Dieta [$F_{(1,39)} = 0,1541$; $p=0,6967$]; estresse [$F_{(1,39)} = 1,480$; $p=0,2311$]; interação [$F_{(1,39)} = 0,6189$; $p=0,4362$]; Figura 13B), no braço fechado (**DLGc** [5,50: (5,00-7,00)]; **DCGc** [7,00: (6,00-8,25)]; **DLGi** [6,00: (6,00-8,00)]; **DCGi** [5,50: (4,25-7,00)]. Dieta [$F_{(1,39)} = 0,2884$; $p=0,5943$]; estresse [$F_{(1,39)} = 0,4340$; $p=0,5139$]; interação [$F_{(1,39)} = 3,378$; $p=0,0737$]; Figura 13D) e no quadrante central (**DLGc**: $2,90 \pm 1,37$; **DCGc**: $3,20 \pm 1,62$; **DLGi**: $3,27 \pm 1,10$; **DCGi**: $3,50 \pm 1,78$. Dieta [$F_{(1,39)} = 0,3304$; $p=0,5687$]; estresse [$F_{(1,39)} = 0,5379$; $p=0,4677$]; interação [$F_{(1,39)} = 0,006286$; $p=0,9372$]; Figura 13F).

Figura 13 – LCE: tempo de permanência e número de entradas no braço aberto, braço fechado e quadrante central durante exposição em 300s

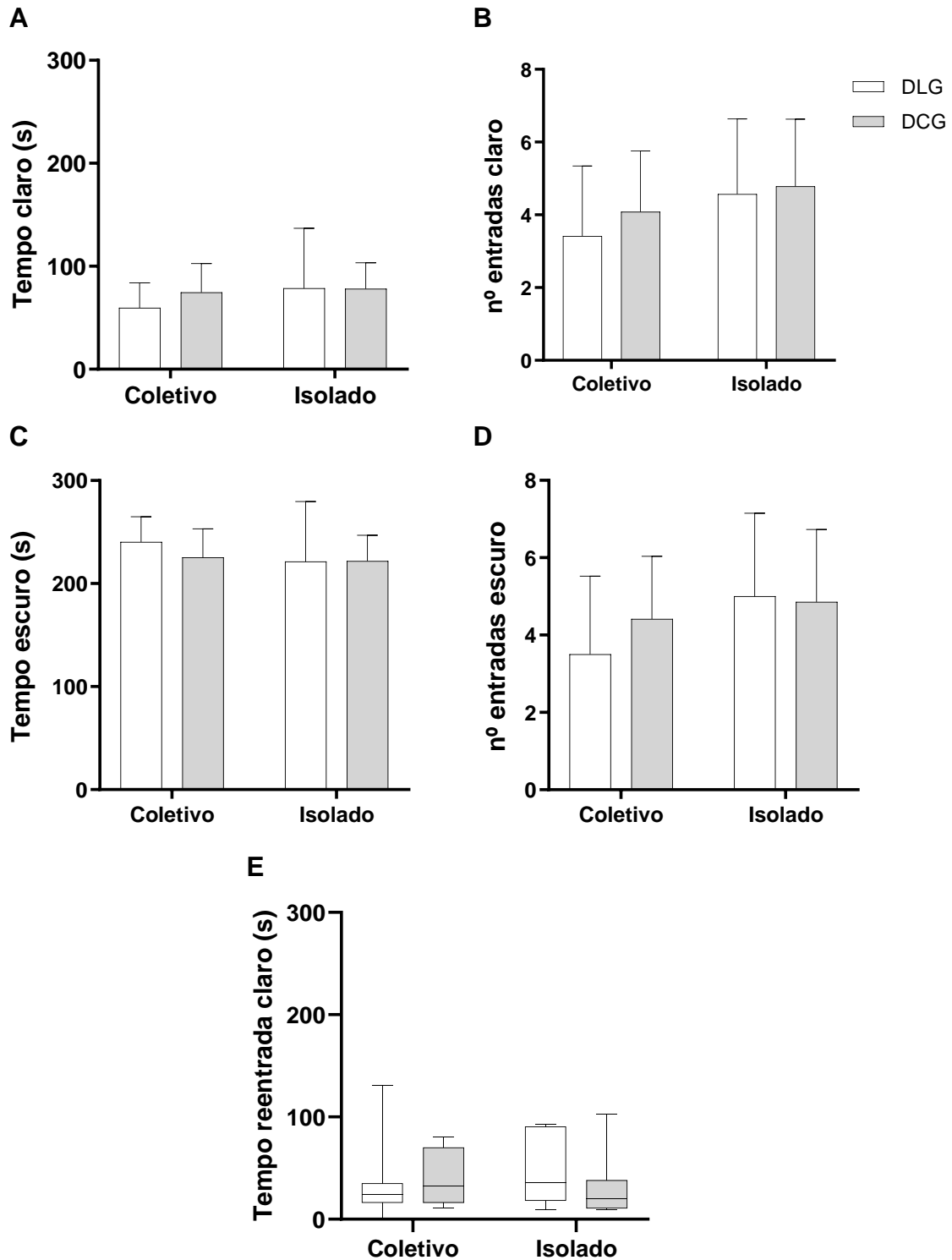


A: Tempo no braço aberto (s); B: nº de entradas no braço aberto; C: Tempo no braço fechado (s); D: nº de entradas no braço fechado; E: Tempo no quadrante central (s); F: nº de entradas no quadrante central. Dados paramétricos: analisados por ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Fisher's LSD e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Fisher's LSD e expressos em Mediana: Q1-Q3. *Diferença significativa ($p < 0,05$). DLG [coletivo ($n=10$), isolado ($n=12$)], DCG [coletivo ($n=10$), isolado ($n=11$)] (gráficos A,C,E); DLG [coletivo ($n=10$), isolado ($n=11$)], DCG [coletivo ($n=10$), isolado ($n=12$)] (gráficos B,D,F).

Os dados dos parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade na caixa CE estão representados na Figura 14. O teste ANOVA *Two-way* indicou que a dieta, o estresse e a interação (dieta x estresse) não alteraram o tempo de permanência no compartimento claro (**DLGc**: $59,58 \pm 24,36$; **DCGc**: $74,67 \pm 27,85$; **DLGi**: $78,57 \pm 58,32$; **DCGi**: $78,21 \pm 25,06$. Dieta [$F_{(1,48)} = 0,4987$; $p=0,4835$]; estresse [$F_{(1,48)} = 1,168$; $p=0,2852$]; interação [$F_{(1,48)} = 0,5483$; $p=0,4626$]; Figura 14A) e no compartimento escuro (**DLGc**: $240,4 \pm 24,36$; **DCGc**: $225,3 \pm 27,85$; **DLGi**: $221,4 \pm 58,32$; **DCGi**: $221,8 \pm 25,06$. Dieta [$F_{(1,48)} = 0,4987$; $p=0,4835$]; estresse [$F_{(1,48)} = 1,168$; $p=0,2852$]; interação [$F_{(1,48)} = 0,5483$; $p=0,4626$]; Figura 14C).

Também não foi observada alteração no número de entradas no compartimento claro (**DLGc**: $3,42 \pm 1,93$; **DCGc**: $4,08 \pm 1,68$; **DLGi**: $4,57 \pm 2,06$; **DCGi**: $4,79 \pm 1,85$. Dieta [$F_{(1,48)} = 0,7013$; $p=0,4065$]; estresse [$F_{(1,48)} = 3,117$; $p=0,0839$]; interação [$F_{(1,48)} = 0,1849$; $p=0,6691$]; Figura 14B), no compartimento escuro (**DLGc**: $3,50 \pm 2,03$; **DCGc**: $4,42 \pm 1,62$; **DLGi**: $5,00 \pm 2,15$; **DCGi**: $4,86 \pm 1,87$. Dieta [$F_{(1,48)} = 0,5169$; $p=0,4756$]; estresse [$F_{(1,48)} = 3,251$; $p=0,0777$]; interação [$F_{(1,48)} = 0,9691$; $p=0,3298$]; Figura 14D) e no tempo de reentrada no compartimento claro (**DLGc** [24,00: (16,00-35,00)]; **DCGc** [32,00: (16,00-70,00)]; **DLGi** [36,00: (18,00-90,50)]; **DCGi** [20,00: (10,50-38,00)]. Dieta [$F_{(1,44)} = 0,2141$; $p=0,6459$]; estresse [$F_{(1,44)} = 0,2939$; $p=0,5905$]; interação [$F_{(1,44)} = 1,214$; $p=0,2765$]; Figura 14E).

Figura 14 – Caixa CE: tempo de permanência e número de entradas nos compartimentos claro e escuro e tempo de reentrada no compartimento claro durante exposição em 300s



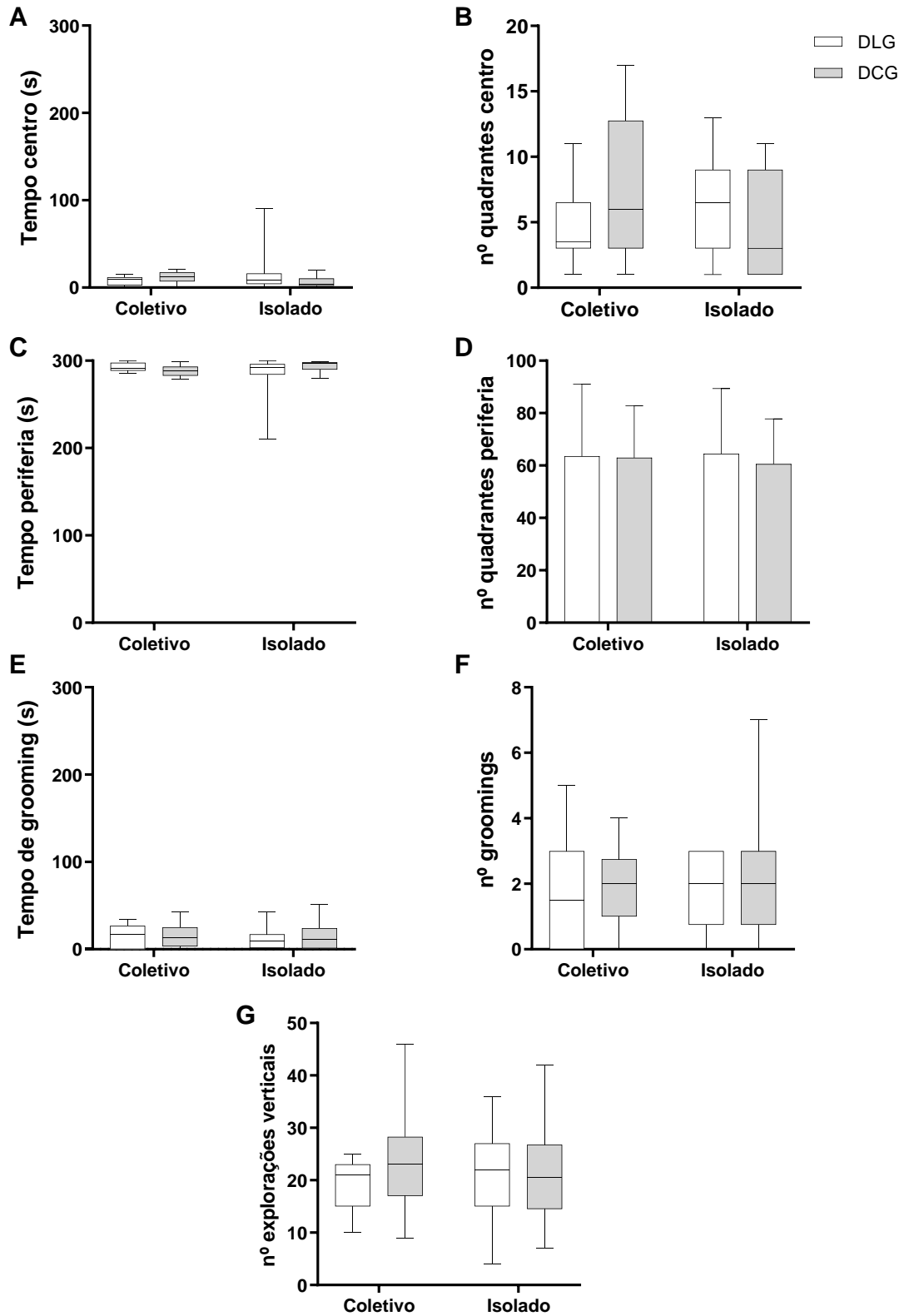
A: Tempo claro (s); B: nº entradas claro; C: Tempo escuro (s); D: nº entradas escuro; E: Tempo reentrada claro (s). Dados paramétricos: analisados por ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Fisher's LSD e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Fisher's LSD e expressos em Mediana: Q1-Q3. *Diferença significativa ($p < 0,05$). DLG [coletivo ($n=12$), isolado ($n=14$)], DCG [coletivo ($n=12$), isolado ($n=14$)], exceto gráfico E (DLG [coletivo ($n=11$), isolado ($n=13$)], DCG [coletivo ($n=11$), isolado ($n=13$)]).

Na Figura 15 estão representados os dados referentes aos parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade no CA. O teste ANOVA *Two-way* indicou que a dieta, o estresse e a interação (dieta x estresse) não alteraram o tempo de permanência no centro (**DLGc** [9,00: (2,50-11,50)]; **DCGc** [12,00: (7,00-17,25)]; **DLGi** [8,00: (4,00-16,00)]; **DCGi** [3,50: (2,00-10,25)]. Dieta [$F_{(1,47)} = 0,3975$; $p=0,5314$]; estresse [$F_{(1,47)} = 0,05243$; $p=0,8199$]; interação [$F_{(1,47)} = 2,935$; $p=0,0933$]; Figura 15A) e na periferia (**DLGc** [291,0: (288,5-297,5)]; **DCGc** [288,0: (282,8-293,0)]; **DLGi** [292,0: (284,0-296,0)]; **DCGi** [296,5: (289,8-298,0)]. Dieta [$F_{(1,47)} = 0,3975$; $p=0,5314$]; estresse [$F_{(1,47)} = 0,05243$; $p=0,8199$]; interação [$F_{(1,47)} = 2,935$; $p=0,0933$]; Figura 15C).

Também não foi observada alteração no número de quadrantes percorridos no centro (**DLGc** [3,50: (3,00-6,50)]; **DCGc** [6,00: (3,00-12,75)]; **DLGi** [6,50: (3,00-9,00)]; **DCGi** [3,00: (1,00-9,00)]. Dieta [$F_{(1,48)} = 0,07295$; $p=0,7883$]; estresse [$F_{(1,48)} = 0,2918$; $p=0,5916$]; interação [$F_{(1,48)} = 4,622$; $p=0,0366$]; Figura 15B) e na periferia (**DLGc**: $63,50 \pm 27,51$; **DCGc**: $62,92 \pm 19,88$; **DLGi**: $64,43 \pm 24,96$; **DCGi**: $60,57 \pm 17,21$). Dieta [$F_{(1,48)} = 0,1242$; $p=0,7261$]; estresse [$F_{(1,48)} = 0,01264$; $p=0,9110$]; interação [$F_{(1,48)} = 0,06750$; $p=0,7961$]; Figura 15D).

Ainda, o teste ANOVA *Two-way* indicou que a dieta, o estresse e a (interação dieta x estresse) não alteraram o tempo de grooming (**DLGc** [17,00: (0,00-26,75)]; **DCGc** [13,50: (3,25-25,00)]; **DLGi** [9,00: (1,50-17,00)]; **DCGi** [11,00: (1,00-24,00)]. Dieta [$F_{(1,46)} = 0,1030$; $p=0,7497$]; estresse [$F_{(1,46)} = 0,1072$; $p=0,7448$]; interação [$F_{(1,46)} = 0,004636$; $p=0,9460$]; Figura 15E) e número de groomings (**DLGc** [1,50: (0,00-3,00)]; **DCGc** [2,00: (1,00-2,75)]; **DLGi** [2,00: (0,75-3,00)]; **DCGi** [2,00: (0,75-3,00)]. Dieta [$F_{(1,48)} = 0,3602$; $p=0,5512$]; estresse [$F_{(1,48)} = 0,1072$; $p=0,7448$]; interação [$F_{(1,48)} = 0,04763$; $p=0,8282$]; Figura 15F), bem como o número de explorações verticais (**DLGc** [21,00: (15,00-23,75)]; **DCGc** [23,00: (17,00-28,25)]; **DLGi** [22,00: (15,00-27,00)]; **DCGi** [20,50: (14,50-26,75)]. Dieta [$F_{(1,46)} = 0,9476$; $p=0,3354$]; estresse [$F_{(1,46)} = 0,002474$; $p=0,9605$]; interação [$F_{(1,46)} = 0,9563$; $p=0,3332$]; Figura 15G) no CA.

Figura 15 – Campo Aberto: tempo de permanência e número de quadrantes percorridos no centro e na periferia, tempo e número de groomings e número de explorações verticais durante exposição em 300s



A: Tempo centro (s); B: nº entradas centro; C: Tempo periferia (s); D: nº entradas periferia; E: tempo de grooming; F: nº groomings; G: nº explorações verticais. Dados paramétricos: analisados por ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Fisher's LSD e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos:

analisados por ANOVA *Two-way*, seguido do pós-teste de Fisher's LSD e expressos em Mediana: Q1-Q3. *Diferença significativa ($p < 0,05$). DLG [coletivo ($n=12$), isolado ($n=13$)], DCG [coletivo ($n=12$), isolado ($n=14$)], gráficos A,C; DLG [coletivo ($n=12$), isolado ($n=14$)], DCG [coletivo ($n=12$), isolado ($n=14$)], gráficos B,D,F; DLG [coletivo ($n=12$), isolado ($n=13$)], DCG [coletivo ($n=12$), isolado ($n=13$)], gráfico E; DLG [coletivo ($n=11$), isolado ($n=13$)], DCG [coletivo ($n=12$), isolado ($n=14$)], gráfico G.

6.2.3. Efeitos da dieta rica em glúten associada ao estresse emocional por isolamento social sobre a responsividade cardiovascular

Para avaliar os efeitos da associação entre a DCG e o estresse por isolamento social sobre os parâmetros cardiovasculares, foram realizadas medidas de FC, PAM, PAS e PAD. Os valores da FC dos diferentes grupos estão representados da Figura 16A (**DLGc**: $422,83 \pm 45,47$; **DCGc**: $401,71 \pm 33,40$; **DLGi**: $408,65 \pm 72,62$; **DCGi**: $393,94 \pm 28,52$). O teste ANOVA *Two-way* indicou que a dieta [$F_{(1,17)} = 0,6359$; $p=0,4362$], o estresse [$F_{(1,17)} = 0,2388$; $p=0,6313$] e a interação (dieta x estresse) [$F_{(1,17)} = 0,02035$; $p=0,8882$] não alteraram a FC.

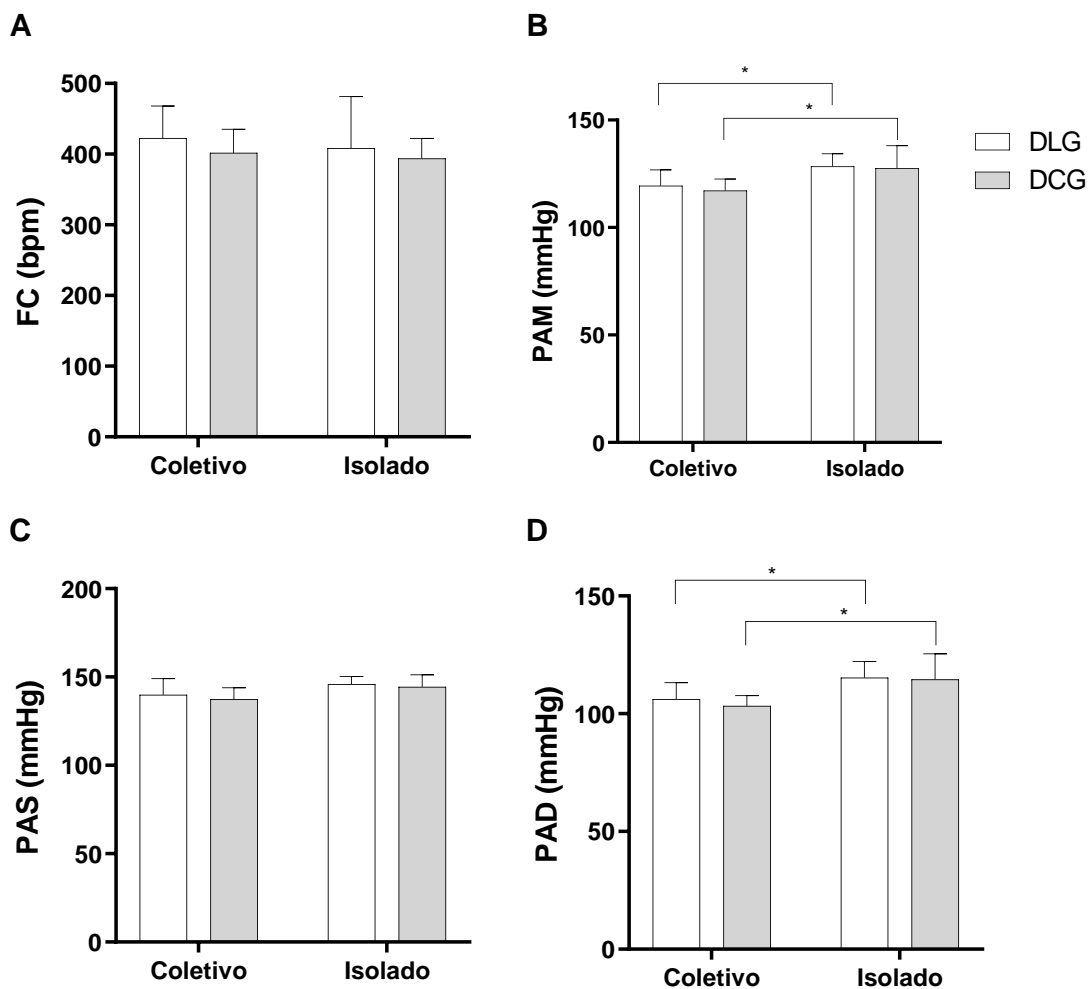
Observa-se na Figura 16B os dados da PAM nos diferentes grupos experimentais (**DLGc**: $119,46 \pm 7,30$ mmHg; **DCGc**: $117,15 \pm 5,44$ mmHg; **DLGi**: $128,46 \pm 5,90$ mmHg; **DCGi**: $127,57 \pm 10,52$ mmHg). O teste ANOVA *Two-way* indicou que o estresse [$F_{(1,17)} = 9,186$; $p=0,0075$] afetou a PAM, embora a dieta [$F_{(1,17)} = 0,2481$; $p=0,6248$] e a interação (dieta x estresse) [$F_{(1,17)} = 0,04908$; $p=0,8273$] não tenham afetado tal parâmetro. O pós-teste de Fisher's LSD revelou aumento da PAM no grupo DLGi quando comparado ao grupo DLGc ($p=0,0417$), assim como aumento da PAM no grupo DCGi quando comparado ao grupo DCGc ($p=0,0499$).

Na Figura 16C estão representados os dados da PAS nos diferentes grupos experimentais (**DLGc**: $140,00 \pm 9,05$; **DCGc**: $137,44 \pm 6,47$; **DLGi**: $145,88 \pm 4,42$; **DCGi**: $144,46 \pm 6,87$). O teste ANOVA *Two-way* indicou que a dieta [$F_{(1,17)} = 0,3662$; $p=0,5531$], o estresse [$F_{(1,17)} = 3,842$; $p=0,0666$] e a interação (dieta x estresse) [$F_{(1,17)} = 0,02976$; $p=0,8651$] não alteraram a PAS.

Observa-se na Figura 16D os dados da PAD nos diferentes grupos experimentais (**DLGc**: $106,14 \pm 7,02$ mmHg; **DCGc**: $103,31 \pm 4,37$ mmHg; **DLGi**: $115,26 \pm 6,98$ mmHg; **DCGi**: $114,61 \pm 10,86$ mmHg). O teste ANOVA *Two-way* indicou que o estresse [$F_{(1,17)} = 10,24$; $p=0,0052$] afetou a PAD, embora a dieta [$F_{(1,17)} = 0,2972$; $p=0,5928$] e a interação (dieta x estresse) [$F_{(1,17)} = 0,1164$; $p=0,7371$] não

tenham afetado tal parâmetro. O pós-teste de Fisher's LSD revelou aumento da PAD no grupo DLGi quando comparado ao grupo DLGc (DLGi vs. DLGc; $p=0,0386$), assim como aumento da PAM no grupo DCGi quando comparado ao grupo DCGc ($p=0,0344$).

Figura 16 – Efeitos da DCG associada ao estresse emocional por isolamento social sobre os parâmetros cardiovasculares FC, PAM, PAS e PAD



A: FC (bpm); B: PAM (mmHg); C: PAS (mmHg); PAD (mmHg). Dados paramétricos: analisados por ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Fisher's LSD e expressos em média \pm DP. Dados não paramétricos: analisados por ANOVA Two-way, seguido do pós-teste de Fisher's LSD e expressos em Mediana: Q1-Q3. *Diferença significativa ($p < 0,05$). DLG [coletivo ($n=7$), isolado ($n=5$)], DCG [coletivo ($n=6$), isolado ($n=3$)].

7. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos os efeitos da DCG (10%), ofertada por cinco semanas, bem como da sua associação ao estresse emocional por isolamento social sobre os parâmetros biométricos, cardiovasculares e comportamentais em ratos Wistar. Nossos principais achados demonstram que: (i) o consumo de glúten aumentou o ganho de massa corporal e o consumo alimentar diário na última semana do protocolo experimental e induziu uma resposta comportamental ansiogênica pontual observada pelo número de entradas no braço fechado do LCE; (ii) a associação do consumo de glúten ao estresse emocional por isolamento social induziu maior consumo alimentar sem causar mudanças no ganho de massa e (iii) o consumo de glúten isolado ou associado ao estresse não alterou a responsividade cardiovascular, contrapondo o entendimento de que o glúten é maléfico para a saúde mental e cardiovascular da população em geral.

O glúten é um complexo proteico que compõe sementes de cereais, como o trigo, comumente utilizados na produção de pães, bolos e massas à base de farinha (88), os quais estão extensivamente presentes na rotina alimentar dos indivíduos. Já se sabe que indivíduos celíacos e sensíveis ao glúten, quando expostos ao glúten da dieta, manifestam sintomas intestinais, tais como diarreia, disbiose intestinal e cólica abdominal, e extra-intestinais, tais como depressão associada a ansiedade e desbalanço do SNA (55, 56, 57, 58, 59, 60). Neste contexto, a dieta livre de glúten é adotada como tratamento dos distúrbios associados à esta proteína (89). No entanto, nos últimos anos tem havido um interesse crescente pelos alimentos livres de glúten por pessoas sem diagnóstico de distúrbios associados ao glúten, por acreditarem que esses produtos são mais saudáveis do que os produtos convencionais ou que eles são eficientes para perda de peso, mesmo sem um consenso científico acerca dessas afirmações (90, 91).

Como na literatura ainda não há dados que fundamentem os efeitos do glúten, isoladamente, sobre a responsividade comportamental e cardiovascular, iniciamos este trabalho investigando os efeitos da DCG (10%) sobre estes parâmetros. Na semana cinco (S5) do protocolo dietético houve aumento do consumo alimentar e da massa corporal no grupo DCG, embora a massa dos tecidos adiposos abdominais e os índices de Lee e adiposidade não tenham apresentado diferença significativa entre

os grupos, sugerindo que 5 semanas de protocolo nutricional são capazes de induzir alterações do padrão alimentar de animais submetidos à DCG, mas que os efeitos sobre o ganho de massa requerem uma investigação mais prolongada.

Trabalhos já publicados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a composição dietética e o tempo de administração do protocolo dietético influenciam no aumento sustentado do ganho de massa corporal, dos TAs e do índice de adiposidade (74, 92). Outros estudos também demonstraram a influência do consumo de glúten na composição corporal e consumo alimentar em modelo animal. Soares e colaboradores (2013) avaliaram os efeitos da retirada do glúten em camundongos C57BL/6 (8 semanas de vida) submetidos a obesidade induzida por dieta hiperlipídica por 8 semanas. O grupo dieta hiperlipídica livre de glúten apresentou redução do ganho de massa sem alteração da ingestão alimentar quando comparado ao grupo dieta hiperlipídica contendo 4,5% de glúten (64). Contudo, os autores não esclareceram se houve diferença na densidade calórica de ambas as dietas (i.e.: se o glúten foi substituído por outro nutriente mantendo as dietas isocalóricas, ou adicionado à dieta, aumentando a densidade calórica desta em relação à dieta livre de glúten). Portanto, uma menor densidade calórica, e não a ausência de glúten propriamente dita, poderia repercutir em menor ganho de massa corporal nos animais do grupo dieta hiperlipídica livre de glúten. Utilizando-se do mesmo protocolo experimental do estudo supracitado, Freire e colaboradores (2016) observaram aumento no ganho de massa corporal e da adiposidade epididimal e inguinal em animais tratados com glúten (4,5%) quando comparados ao grupo controle (62). Já Aguilar e colaboradores (2020), para investigar os efeitos do glúten na progressão da aterosclerose durante a obesidade, trataram camundongos C57BL/6 knockout para ApoE (ApoE^{-/-}) com uma dieta contendo glúten (4,5%) por 10 semanas. A ingestão de glúten aumentou o ganho de massa e a adiposidade dos animais tratados (63). Diante desses dados, é possível que um período de protocolo dietético superior a cinco semanas reflita no aumento sustentado do consumo alimentar e massa corporal observados nos animais tratados com a DCG em nosso estudo.

Adicionalmente, investigamos os efeitos do glúten sobre a responsividade comportamental em ratos saudáveis. Observamos que os animais que consumiram a DCG apresentaram uma resposta comportamental defensiva pontual (relacionada à ansiedade) representada pelo aumento no número de entradas no braço fechado do

LCE. Os transtornos de humor já são apontados como manifestações extra-intestinais na doença celíaca (DC) (57) e na sensibilidade ao glúten não celíaca (SGNC) em estudos em humanos (93).

Daynes e colaboradores (1956) sugeriram uma possível relação entre o glúten e a ocorrência de transtornos de humor e sintomas psiquiátricos em pacientes não celíacos (94), e Volta e colaboradores (2014), observaram que pacientes com suspeita de SGNC apresentavam manifestações sistêmicas, dentre elas ansiedade, cerca de algumas horas a um dia após a ingestão de glúten (95). Nesses casos, a adesão a uma dieta livre de glúten é a principal recomendação médica como tratamento para transtornos de humor (96).

Addolorato e colaboradores (2001) estudaram pacientes com DC antes e após um ano em uma DLG e observaram que a ansiedade, que estava predominantemente reativa, diminuiu após adesão à dieta sem glúten (97). Já Collin e colaboradores (2008) avaliaram se pacientes com DC sofriam de sintomas psiconeuróticos e se o tratamento com uma DLG teria impacto sobre os sintomas, observando que a pontuação para ansiedade somática foi maior antes do tratamento do que após um ano de tratamento com uma DLG (98). Kurppa e colaboradores (2014) investigaram os benefícios de uma DLG em pacientes assintomáticos com marcadores sorológicos de DC. A retirada do glúten da dieta refletiu na redução da ansiedade nos pacientes que receberam uma DLG quando comparados ao grupo que recebeu uma DCG (99). Canova e colaboradores (2021) investigaram a qualidade de vida e a ansiedade em pacientes com DC após um e dois anos de adesão à DLG e observaram melhora significativa na pontuação para ansiedade entre os pacientes que aderiram à dieta quando comparado aos pacientes que não aderiram, os quais tiveram a pontuação para qualidade de vida piorados (100).

Embora a isenção do glúten da dieta tenha refletido em melhora no quadro de ansiedade como demonstrado nos estudos anteriores, esses resultados podem ser discordantes. No estudo de Zingone e colaboradores (2010), uma DLG não induziu nenhuma melhora nas escalas de ansiedade entre os pacientes celíacos não tratados e os tratados há pelo menos um ano com uma DLG (101), assim como Rostami-Nejad e colaboradores (2020), que observaram que a duração de uma DLG não teve efeito na melhora do quadro de ansiedade em pacientes celíacos (102). Diante do exposto

é natural que haja discrepâncias sobre os benefícios ou malefícios do consumo de glúten entre indivíduos sensíveis à tal proteína e indivíduos saudáveis, e neste sentido nosso trabalho traz um novo entendimento acerca do consumo de uma DCG em indivíduos saudáveis. Nesta análise pré-clínica, identificamos que uma carga de 10% de glúten durante 5 semanas afeta pontualmente o comportamento defensivo relacionado à ansiedade em ratos saudáveis. Porém, mais estudos são necessários para uma melhor precisão e compreensão do significado biológico deste achado, principalmente considerando um maior tempo de exposição à esta dieta para constatação da conservação deste fenótipo.

Em nosso trabalho, também investigamos os efeitos do glúten sobre a responsividade cardiovascular em ratos Wistar e observamos que a DCG não promoveu alterações nos parâmetros cardiovasculares durante o período de avaliação. Embora sejam escassos os dados acerca dos efeitos do glúten sobre os parâmetros cardiovasculares, a correlação entre padrões alimentares e distúrbios cardiovasculares já é bem estabelecida (103). Trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa já mostraram que o padrão alimentar altera a regulação cardiovascular em modelo animal. Oliveira (2004) e Rodrigues (2012), em estudos realizados com ratos Fischer, observaram que uma dieta hipoproteica (6% de proteína) por 5 semanas levou ao aumento da PAM e FC e da variabilidade de ambos os parâmetros (71, 72). Outro estudo realizado com ratas Fischer submetidas a restrição alimentar severa (com oferta de 40% da dieta padrão) observou diminuição da PAM e FC basais após período de 14 dias de protocolo dietético (104).

Em se tratando dos efeitos do glúten sobre a responsividade cardiovascular, Lebowitz e colaboradores (2017) avaliaram a associação da ingestão de glúten a longo prazo (durante 26 anos de acompanhamento) com o desenvolvimento de doença coronariana incidente em adultos sem DC e risco de doença cardíaca coronariana. Os autores concluíram que a ingestão dietética de glúten não foi associada ao risco de doença coronariana e que a adesão à DLG pode resultar na redução do consumo de grãos integrais benéficos, o que pode aumentar o risco para doença cardiovascular (105). Kim e colaboradores (2017) avaliaram a associação entre a adesão da DLG e a probabilidade de risco elevado de doença cardiovascular (DCV) e síndrome metabólica em indivíduos não celíacos entre 2009 e 2014 e descreveram que a DLG não foi associada a menor prevalência de risco de DCV. Uma explicação para esse

achado, segundo os autores, seria o elevado consumo de carboidratos e açúcares por parte dos adeptos à DLG, bem como a deficiência de vitaminas, minerais (i.e.: níveis inadequados de vitaminas do complexo B, magnésio, zinco, selênio, folato, cálcio, ferro) e fibras nos produtos isentos de glúten quando comparados aos que contêm glúten (106).

Ademais, Kolesárová e colaboradores (2021), ao avaliarem os efeitos do consumo de produtos de panificação isentos de glúten, durante 06 semanas, sobre os níveis pressóricos (PAS e a PAD) e sobre os níveis séricos de eletrólitos (sódio, potássio e cloreto) em indivíduos saudáveis, concluíram que a retirada do glúten, embora tenha reduzido os níveis séricos de sódio e cloreto e aumentado os níveis de potássio, não alterou a pressão arterial (107). Nesse sentido, os estudos acerca dos efeitos do glúten sobre os parâmetros cardiovasculares ainda são escassos, mas sugerem que tal complexo proteico não compromete a regulação cardiovascular em indivíduos saudáveis, corroborando nossos achados.

Considerando os possíveis impactos das medidas de biossegurança da COVID-19 sobre os hábitos alimentares e as relações sociais da população mundial, nosso trabalho investigou os efeitos da associação entre a DCG (10%) e o estresse emocional por isolamento social sobre a responsividade comportamental e cardiovascular em ratos. Primeiramente, realizamos análises intragrupos do ganho de massa corporal e consumo alimentar entre a semana 1 (S1) e as semanas subsequentes (S2 à S5), a fim de verificar se os animais obtiveram consumo alimentar adequado ao longo do protocolo dietético.

Nas avaliações intragrupos, todas as semanas foram diferentes da S1, confirmando ganho de massa e consumo alimentar adequados ao desenvolvimento dos animais. Também, observamos que a DCG e o estresse foram capazes de induzir o aumento do consumo alimentar na S5, embora o ganho de massa corporal, a massa dos tecidos adiposos e os índices de Lee e adiposidade não tenham apresentado diferença significativa entre os grupos estudados. Conforme considerado na análise dos efeitos do glúten isoladamente, é possível que um período superior a cinco semanas de protocolo dietético sustente o aumento do consumo alimentar e do ganho de massa corporal dos animais tratados com uma DCG, como já descrito na literatura (62, 63, 64).

Contudo, não devemos desconsiderar alguns resultados contrastantes. Shetty e colaboradores (2020) avaliaram os efeitos do consumo de glúten (100mg/kg, 200mg/kg e 400mg/kg dissolvido em 1% de goma acácia) sobre a massa corporal em ratos Wistar por 90 dias e observaram que os ratos que consumiram glúten não apresentaram aumento significativo deste parâmetro ao longo do tempo de dieta quando comparado ao grupo controle (108). Resultado semelhante foi observado por Henriques e colaboradores (2021), em um estudo em mulheres não celíacas em que a ingestão de glúten (20g/dia), durante 6 semanas, não alterou a massa corporal, a composição corporal e o gasto energético (109).

Adicionalmente, embora já se saiba que o estresse induz alterações nos parâmetros biométricos (22), estudos acerca dos efeitos da exposição ao estresse emocional por isolamento social sobre o ganho de massa corporal, a massa dos tecidos adiposos e o consumo alimentar também trazem resultados divergentes. Ros-Simó e colaboradores (2012) observaram que camundongos CD1 expostos ao isolamento por 7 semanas, a partir do pós-desmame, atingiram menor ganho de massa corporal quando comparado aos controles (110). Sun e colaboradores (2014) observaram que o isolamento social por 8 semanas foi capaz de induzir aumento da adiposidade (TAs marrom, epididimal, retroperitoneal e inguinal) e redução do consumo alimentar em camundongos C57BL/6J adultos (12 semanas de idade), embora o ganho de massa corporal não tenha sido diferente entre os grupos (111).

Já Nagy e colaboradores (2002) avaliaram os parâmetros de composição corporal em camundongos C57BL/6J (3 semanas de idade), expostos ao isolamento social por 9 semanas e observaram que os animais alojados individualmente apresentaram redução da massa corporal quando comparado ao grupo controle, embora não tenha havido diferença significativa entre os grupos quanto a massa dos TAs (epididimal, retroperitoneal e inguinal) (112). Sakakibara e colaboradores (2012) avaliaram os efeitos da exposição por 13 semanas ao estresse por isolamento social nas alterações fisiológicas em camundongos C57BL/6J (4 semanas de vida) e observaram que o estresse foi capaz de estimular o aumento do consumo alimentar ao longo do experimento, da gordura visceral (mesentérica e peritesticular) e do ganho de massa corporal na semana 13 do protocolo dietético (113).

Dessa forma, nossos dados sugerem que o glúten isoladamente ou associado ao estresse emocional induz modificação do padrão alimentar no período de 5 semanas de exposição, cujas diferenças em relação aos resultados encontrados na literatura podem estar relacionadas ao modelo experimental, a linhagem e a idade dos animais utilizados nos experimentos. Além disso, em nosso estudo, especulamos que o isolamento social possa ter aumentado os níveis plasmáticos de glicocorticóides, cujas consequências fisiológicas incluem perda de massa muscular e massa óssea, as quais estão associadas a exposição crônica ao estresse (114). Já foi demonstrado que camundongos expostos ao estresse crônico por contenção apresentaram diminuição da massa corporal e aumento dos níveis de corticosterona quando comparados aos animais controle (115, 116, 117). Neste contexto, mais investigações são necessárias para melhor compreender os mecanismos por trás dos efeitos do estresse por isolamento social sobre a composição corporal dos animais, principalmente ao considerar as consequências fisiológicas do aumento crônico dos níveis plasmáticos de corticosterona - hormônio liberado na resposta ao estresse.

Para investigar se a associação entre a DCG e o estresse emocional influenciariam na resposta comportamental defensiva relacionada à ansiedade, submetemos os animais aos testes comportamentais LCE, caixa CE e CA, respectivamente. Nossos resultados mostraram que a interação dieta e estresse emocional não foi capaz de induzir comportamento do tipo ansiedade nos grupos experimentais, apesar da DCG isoladamente ter sido capaz de induzir um comportamento ansiogênico pontual. Huang e colaboradores (2017) demonstraram que o tempo de 5 semanas de exposição ao estresse por isolamento social, a partir do pós-desmame (21 dias), foi capaz de levar ao aumento da ansiedade no teste CA em camundongos C57BL/6J (118), evidenciando o efeito do estresse emocional sobre a responsividade comportamental.

Outros estudos também demonstraram aumento da ansiedade no LCE e CA em roedores após isolamento social por 3, 7 e 8 semanas, a partir do pós-desmame (110, 119, 120). No entanto, alguns resultados são contrastantes. Pietropaolo e colaboradores (2008) não encontraram efeito do isolamento sobre a ansiedade no LCE e CA em camundongos C57BL/6J quando expostos ao isolamento por 4 semanas pós-desmame (121). Da mesma forma, Kaneda e colaboradores (2021), em estudo com ratos Wistar no pós-desmame, não encontraram efeito do isolamento

sobre a ansiedade durante a exposição ao CA. Para os autores, a falta de efeito sobre o comportamento do tipo ansiedade pode ser devido ao estágio de desenvolvimento dos animais (122).

No presente estudo, também é possível que a idade dos animais tenha influenciado, ao menos em parte, na análise comportamental, visto que os animais foram mantidos sobre isolamento social do 21^o ao 35^o dia de vida, e os testes comportamentais foram realizados quando os animais atingiram o 56^o dia de vida, diferentemente da idade relatada em outros estudos. Ros-Simó e colaboradores (2012) avaliaram o comportamento do tipo ansiedade em camundongos CD1, com 74 dias de vida, submetidos ao isolamento social por 7 semanas, e observaram que os animais isolados passaram menos tempo nos braços abertos do LCE quando comparado aos controles, indicando um comportamento ansiogênico (110). Por sua vez, Djordjevic e colaboradores (2012) submeteram ratos Wistar, com 3 meses de idade, ao estresse por isolamento social com duração de 21 dias. Após este período, os animais foram submetidos ao teste CA, e foi observado que o estresse crônico diminuiu a preferência dos animais pela zona central do aparato, indicando um comportamento mais ansioso (123).

Berry e colaboradores (2012) também observaram comportamento ansiogênico em camundongos C57BL/6J, com 3 meses de vida, submetidos ao isolamento social por 3 semanas. Os animais isolados passaram significativamente mais tempo no braço fechado do LCE e na periferia do CA, e mostraram maior frequência de groomings (comportamento de autolimpeza) no CA (124). Apesar de nossos resultados serem contrastantes com a literatura particularmente relacionada ao estresse emocional em ratos adultos, os estudos envolvendo o consumo de glúten e o estresse emocional ainda são inconsistentes. Sendo assim, mais estudos acerca dos efeitos do glúten associado ao estresse sobre as respostas comportamentais defensivas são necessários para melhor compreensão da influência dessa interação em modelos experimentais e posterior translação destes achados em indivíduos saudáveis. Nesse sentido, este trabalho propõe o início de uma investigação acerca desses aspectos, trazendo resultados pré-clínicos importantes.

O estresse emocional é reconhecido como um potencial fator de risco para doenças cardiovasculares (125), e a exposição de forma crônica aumenta o consumo

de alimentos palatáveis (126). A dieta, por sua vez, influencia diversos fatores de risco cardiometabólicos, e as alterações induzidas pelo estresse sobre a ingestão alimentar também comprometem a saúde cardiovascular (68). Nesse sentido, no presente estudo, avaliamos os efeitos da associação entre a DCG e o estresse emocional por isolamento social sobre os parâmetros hemodinâmicos em animais saudáveis, por meio da canulação da artéria femoral. Corroborando outros estudos, nossos achados demonstram o efeito do estresse emocional no aumento da PAM e PAD em ratos, embora a FC e a PAS não tenham sido alteradas.

Cruz e colaboradores (2016), avaliaram os efeitos do isolamento social por 3 semanas sobre os parâmetros hemodinâmicos de ratos Wistar adolescentes (28 dias) e adultos (60 dias). Foi observado que o estresse por isolamento social induziu o aumento da PAM, PAS e PAD em ratos adolescentes, enquanto em ratos adultos houve aumento da PAD e diminuição da PAS. Embora não tenham observado alterações significativas na FC em ambos os grupos, os dados evidenciam as consequências cardiovasculares do estresse emocional crônico (127). Entretanto, estudos empregando outras metodologias para registro dos parâmetros hemodinâmicos e em períodos de exposição distintos, demonstraram dados contrastantes. Por meio do método de telemetria, avaliado por 30 min por 14 dias, Tsvirkun e colaboradores (2012) mostraram que o isolamento social por 2 semanas não levou a alterações significativas na FC, PAS e PAD em ratos Wistar com idade entre 5 e 6 semanas (128), enquanto o aumento da FC basal foi observado em estudos com ratazanas da pradaria após isolamento social por 4 semanas (129, 130).

Por sua vez, Maslova e colaboradores (2009), relataram aumento da PAS em ratos Wistar, com 21 dias, após um período de isolamento social de 6 semanas por meio do método de medição indireta (131). Desse modo, nossos resultados contribuem para o entendimento de que, embora o estresse altere a responsividade cardiovascular, o consumo de glúten não exerce o mesmo efeito em ratos saudáveis, ao menos no período de tempo avaliado.

Assim, nossos resultados sugerem que o consumo de glúten isoladamente ou associado ao estresse emocional causa aumento do consumo alimentar. Além disso, o consumo isolado de glúten induz o aumento do ganho de massa, além de pontualmente desencadear um comportamento ansiogênico, mas em associação ao

estresse emocional por isolamento social durante cinco semanas não reflete em alterações significativas sobre o ganho de massa, bem como sobre os parâmetros comportamentais e cardiovasculares em ratos.

Devido às dificuldades inerentes à execução deste trabalho durante o período pandêmico, o número amostral referente às análises cardiovasculares constitui uma limitação do nosso trabalho. Contudo, destacamos que tal limitação não dirime a relevância deste estudo, haja vista que nossos dados trazem novo conhecimento sobre os efeitos do consumo de glúten e sua associação ao estresse crônico (i.e.: estresse emocional por isolamento social) sobre a homeostase comportamental e cardiovascular, apontando que tanto o tempo de exposição (dietética e do evento estressor) quanto o tipo de estresse empregado ainda necessitam ser extensivamente investigados. Ademais, novos estudos que investiguem os efeitos do glúten sobre os aspectos morfológicos e biomoleculares destes e outros sistemas fisiológicos, são fundamentais para determinação da ocorrência dos potenciais malefícios do glúten em indivíduos saudáveis, os quais embora sejam midiaticamente alegados, até então não apresentam evidências científicas robustas.

8. CONCLUSÃO

Considerando o tempo de protocolo experimental de 5 semanas, nossos resultados sugerem que: (i) o consumo de glúten (10%) isoladamente promove aumento do ganho de massa corporal e do consumo alimentar médio diário, bem como uma resposta comportamental ansiogênica pontual em ratos saudáveis, (ii) a associação do consumo do glúten ao estresse emocional por isolamento social induz maior consumo alimentar sem causar mudanças no ganho de massa corporal, nem sobre as respostas comportamentais, e (iii) tanto o consumo de glúten isolado quanto associado ao estresse não altera a responsividade cardiovascular. Dessa forma, o consumo de glúten associado ao estresse emocional por isolamento social não promove alterações significativas nos parâmetros comportamentais e cardiovasculares em ratos durante um protocolo de 5 semanas. Nossos dados trazem evidências científicas que questionam o senso comum de que o consumo de glúten é maléfico a saúde mental e cardiovascular de qualquer indivíduo.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Birmingham WC, Holt-Lunstad J. Social aggravation: Understanding the complex role of social relationships on stress and health-relevant physiology. *Int J Psychophysiol.* 2018;131:13-23.
2. Thombs BD, Kwakkenbos L, Carrier ME, Bourgeault A, Tao L, Harb S, et al. Protocol for a partially nested randomised controlled trial to evaluate the effectiveness of the scleroderma patient-centered intervention network COVID-19 home-isolation activities together (SPIN-CHAT) program to reduce anxiety among at-risk scleroderma patients. *J Psychosom Res.* 2020;135:110132.
3. Lakhan R, Agrawal A, Sharma M. Prevalence of Depression, Anxiety, and Stress during COVID-19 Pandemic. *J Neurosci Rural Pract.* 2020;11(4):519-25.
4. Holt-Lunstad J, Smith TB, Baker M, Harris T, Stephenson D. Loneliness and social isolation as risk factors for mortality: a meta-analytic review. *Perspect Psychol Sci.* 2015;10(2):227-37.
5. Qin HY, Cheng CW, Tang XD, Bian ZX. Impact of psychological stress on irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* 2014;20(39):14126-31.
6. Yisireyli M, Wulamu W, Aili A, Li Y, Alimujiang A, Aipire A, et al. Chronic restraint stress induces esophageal fibrosis with enhanced oxidative stress in a murine model. *Exp Ther Med.* 2019;18(2):1375-83.
7. de Menezes RC, Zaretsky DV, Sarkar S, Fontes MA, Dimicco JA. Microinjection of muscimol into the periaqueductal gray suppresses cardiovascular and neuroendocrine response to air jet stress in conscious rats. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology.* 2008;295(3):R881-90.
8. Dos Reis DG, Fortaleza EA, Tavares RF, Corrêa FM. Role of the autonomic nervous system and baroreflex in stress-evoked cardiovascular responses in rats. *Stress.* 2014;17(4):362-72.
9. Daviu N, Bruchas MR, Moghaddam B, Sandi C, Beyeler A. Neurobiological links between stress and anxiety. *Neurobiol Stress.* 2019;11:100191.
10. Osborne MT, Shin LM, Mehta NN, Pitman RK, Fayad ZA, Tawakol A. Disentangling the Links Between Psychosocial Stress and Cardiovascular Disease. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2020;13(8):e010931.
11. Bustamante-Sánchez Á, Tornero-Aguilera JF, Fernández-Elías VE, Hormeño-Holgado AJ, Dalamitros AA, Clemente-Suárez VJ. Effect of Stress on Autonomic and Cardiovascular Systems in Military Population: A Systematic Review. *Cardiol Res Pract.* 2020;2020:7986249.
12. Pietrabissa G, Simpson SG. Psychological Consequences of Social Isolation During COVID-19 Outbreak. *Front Psychol.* 2020;11:2201.
13. Cohen BE, Edmondson D, Kronish IM. State of the Art Review: Depression, Stress, Anxiety, and Cardiovascular Disease. *Am J Hypertens.* 2015;28(11):1295-302.
14. Organization WH. Cardiovascular diseases (CVDs) 2021 [Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))].
15. Brasil MdSd. Realidade pela pandemia pode gerar transtornos mentais e agravar os quadros existentes 2021 [Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2021-1/outubro/realidade-imposta-pela-pandemia-pode-gerar-transtornos-mentais-e-agravar-quadros-existentes>].
16. Brasil MdSd. Resultados preliminares de pesquisa sobre saúde mental são divulgados 2020 [Available from: <https://www.gov.br/casacivil/pt-br/assuntos/noticias/2020/setembro/resultados-preliminares-de-pesquisa-sobre-saude-mental-sao-divulgados>].
17. Yanguas J, Pinazo-Henandis S, Tarazona-Santabalbina FJ. The complexity of loneliness. *Acta Biomed.* 2018;89(2):302-14.
18. Salari N, Hosseini-Far A, Jalali R, Vaisi-Raygani A, Rasoulpoor S, Mohammadi M, et al. Prevalence of stress, anxiety, depression among the general population during the COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis. *Global Health.* 2020;16(1):57.
19. López-Taboada I, González-Pardo H, Conejo NM. Western Diet: Implications for Brain Function and Behavior. *Front Psychol.* 2020;11:564413.

20. Krolow R, Noschang C, Arcego DM, Huffell AP, Marcolin ML, Benitz AN, et al. Sex-specific effects of isolation stress and consumption of palatable diet during the prepubertal period on metabolic parameters. *Metabolism*. 2013;62(9):1268-78.
21. Sumis A, Cook KL, Andrade FO, Hu R, Kidney E, Zhang X, et al. Social isolation induces autophagy in the mouse mammary gland: link to increased mammary cancer risk. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(10):839-56.
22. Ulrich-Lai YM, Fulton S, Wilson M, Petrovich G, Rinaman L. Stress exposure, food intake and emotional state. *Stress*. 2015;18(4):381-99.
23. Monteiro CA, Cannon G, Levy RB, Moubarac JC, Louzada ML, Rauber F, et al. Ultra-processed foods: what they are and how to identify them. *Public Health Nutr*. 2019;22(5):936-41.
24. Cena H, Calder PC. Defining a Healthy Diet: Evidence for The Role of Contemporary Dietary Patterns in Health and Disease. *Nutrients*. 2020;12(2).
25. WHO WHO-. Nutrition advice for adults during the COVID-19 outbreak. 2020.
26. Cecchetto C, Aiello M, Gentili C, Ionta S, Osimo SA. Increased emotional eating during COVID-19 associated with lockdown, psychological and social distress. *Appetite*. 2021;160:105122.
27. Sominsky L, Spencer SJ. Eating behavior and stress: a pathway to obesity. *Front Psychol*. 2014;5:434.
28. Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology*. 2004;145(8):3754-62.
29. Robinson E, Boyland E, Chisholm A, Harrold J, Maloney NG, Marty L, et al. Obesity, eating behavior and physical activity during COVID-19 lockdown: A study of UK adults. *Appetite*. 2021;156:104853.
30. Bracale R, Vaccaro CM. Changes in food choice following restrictive measures due to Covid-19. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2020;30(9):1423-6.
31. Spence C. Comfort food: A review. *International journal of gastronomy and food science*. 2017;9:105-9.
32. Ma Y, Ratnasabapathy R, Gardiner J. Carbohydrate craving: not everything is sweet. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2017;20(4):261-5.
33. Feijó FdM. Serotonina e controle hipotalâmico da fome: uma revisão. In: Bertoluci M, CEr, Cíntia, editor. *Revista da Associação Médica Brasileira* [online]. 2011. p. págs. 74-7.
34. Salazar-Fernández C, Palet D, Haeger PA, Román Mella F. The Perceived Impact of COVID-19 on Comfort Food Consumption over Time: The Mediation Role of Emotional Distress. *Nutrients*. 2021;13(6).
35. Chen X, Zhang Z, Yang H, Qiu P, Wang H, Wang F, et al. Consumption of ultra-processed foods and health outcomes: a systematic review of epidemiological studies. *Nutr J*. 2020;19(1):86.
36. Srour B, Fezeu LK, Kesse-Guyot E, Allès B, Méjean C, Andrianasolo RM, et al. Ultra-processed food intake and risk of cardiovascular disease: prospective cohort study (NutriNet-Santé). *BMJ*. 2019;365:l1451.
37. Lawrence MA, Baker PI. Ultra-processed food and adverse health outcomes. *BMJ*. 2019;365:l2289.
38. Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav*. 2007;91(4):449-58.
39. Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, et al. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(20):11696-701.
40. Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE. Chronic stress and comfort foods: self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun*. 2005;19(4):275-80.
41. Mumolo MG, Rettura F, Melissari S, Costa F, Ricchiuti A, Ceccarelli L, et al. Is Gluten the Only Culprit for Non-Celiac Gluten/Wheat Sensitivity? *Nutrients*. 2020;12(12).
42. Coletro HN, Mendonça RD, Meireles AL, Machado-Coelho GLL, Menezes MC. Ultra-processed and fresh food consumption and symptoms of anxiety and depression during the COVID - 19 pandemic: COVID Inconfidentes. *Clin Nutr ESPEN*. 2022;47:206-14.

43. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 2007;24(2):115-9.
44. Passali M, Josefsen K, Frederiksen JL, Antvorskov JC. Current Evidence on the Efficacy of Gluten-Free Diets in Multiple Sclerosis, Psoriasis, Type 1 Diabetes and Autoimmune Thyroid Diseases. *Nutrients.* 2020;12(8).
45. Sdepanian VL, de Morais 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.
46. Wang P, Jin Z, Xu X. Physicochemical alterations of wheat gluten proteins upon dough formation and frozen storage—A review from gluten, glutenin and gliadin perspectives. *Trends in Food Science & Technology.* 2015;46(2):189-98.
47. Neto AAO, Santos CMR. A cultura do trigo. In: Conab) CNdA, editor. 2017
48. Giraldo P, Benavente E, Manzano-Agugliaro F, Gimenez E. Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis. *Agronomy.* 2019;9(7):352.
49. Biesiekierski JR. What is gluten? *J Gastroenterol Hepatol.* 2017;32 Suppl 1:78-81.
50. Cohen IS, Day AS, Shaoul R. Gluten in Celiac Disease—More or Less? *Rambam Maimonides Med J.* 2019;10(1).
51. Kaur P, Singh Sandhu K, Singh Purewal S, Kaur M, Kumar Singh S. Rye: A wonder crop with industrially important macromolecules and health benefits. *Food Res Int.* 2021;150(Pt A):110769.
52. Farag MA, Xiao J, Abdallah HM. Nutritional value of barley cereal and better opportunities for its processing as a value-added food: a comprehensive review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022;62(4):1092-104.
53. Day L, Augustin M, Batey I, Wrigley C. Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends in food science & technology.* 2006;17(2):82-90.
54. Kutlu T. Gluten-free diet: is it really always beneficial? *Turk Pediatri Ars.* 2019;54(2):73-5.
55. Przybylska-Felus M, Furgala A, Zwolinska-Wcislo M, Mazur M, Widera A, Thor P, et al. Disturbances of autonomic nervous system activity and diminished response to stress in patients with celiac disease. *J Physiol Pharmacol.* 2014;65(6):833-41.
56. Porcelli B, Verdino V, Bossini L, Terzuoli L, Fagiolini A. Celiac and non-celiac gluten sensitivity: a review on the association with schizophrenia and mood disorders. *Auto Immun Highlights.* 2014;5(2):55-61.
57. Lindfors K, Ciacci C, Kurppa K, Lundin KEA, Makharia GK, Mearin ML, et al. Coeliac disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2019;5(1):3.
58. Potter MDE, Brienesse SC, Walker MM, Boyle A, Talley NJ. Effect of the gluten-free diet on cardiovascular risk factors in patients with coeliac disease: A systematic review. *J Gastroenterol Hepatol.* 2018;33(4):781-91.
59. Lach G, Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Anxiety, Depression, and the Microbiome: A Role for Gut Peptides. *Neurotherapeutics.* 2018;15(1):36-59.
60. Daulatzai MA. Non-celiac gluten sensitivity triggers gut dysbiosis, neuroinflammation, gut-brain axis dysfunction, and vulnerability for dementia. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2015;14(1):110-31.
61. Zanini B, Mazzoncini E, Lanzarotto F, Ricci C, Cesana BM, Villanacci V, et al. Impact of gluten-free diet on cardiovascular risk factors. A retrospective analysis in a large cohort of coeliac patients. *Dig Liver Dis.* 2013;45(10):810-5.
62. Freire RH, Fernandes LR, Silva RB, Coelho BS, de Araújo LP, Ribeiro LS, et al. Wheat gluten intake increases weight gain and adiposity associated with reduced thermogenesis and energy expenditure in an animal model of obesity. *Int J Obes (Lond).* 2016;40(3):479-86.
63. Aguilar EC, Navia-Pelaez JM, Fernandes-Braga W, Soares FLP, Dos Santos LC, Leonel AJ, et al. Gluten exacerbates atherosclerotic plaque formation in ApoE. *Nutrition.* 2020;75-76:110658.
64. 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.

65. Powell-Wiley TM, Poirier P, Burke LE, Després JP, Gordon-Larsen P, Lavie CJ, et al. Obesity and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2021;143(21):e984-e1010.
66. Perry C, Guillory TS, Dilks SS. Obesity and Psychiatric Disorders. *Nurs Clin North Am*. 2021;56(4):553-63.
67. Wasmund WL, Westerholm EC, Watenpaugh DE, Wasmund SL, Smith ML. Interactive effects of mental and physical stress on cardiovascular control. *J Appl Physiol* (1985). 2002;92(5):1828-34.
68. Morera LP, Marchiori GN, Medrano LA, Defagó MD. Stress, Dietary Patterns and Cardiovascular Disease: A Mini-Review. *Front Neurosci*. 2019;13:1226.
69. Silva FC, de Menezes RC, Chianca DA. The implication of protein malnutrition on cardiovascular control systems in rats. *Front Physiol*. 2015;6:246.
70. Virtanen HEK, Voutilainen S, Koskinen TT, Mursu J, Tuomainen TP, Virtanen JK. Intake of Different Dietary Proteins and Risk of Heart Failure in Men: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circ Heart Fail*. 2018;11(6):e004531.
71. Oliveira EL, Cardoso LM, Pedrosa ML, Silva ME, Dun NJ, Colombari E, et al. A low protein diet causes an increase in the basal levels and variability of mean arterial pressure and heart rate in Fisher rats. *Nutr Neurosci*. 2004;7(4):201-5.
72. Rodrigues FA, Chianca DA, Gonçalves Fernandes L. Malnutrition affects the pressor response to microinjection of L-glutamate into the RVLM of awake rats. *Biol Res*. 2012;45(4):337-43.
73. Abreu AR, de Abreu AR, Santos LT, de Souza AA, da Silva LG, Chianca DA, et al. Blunted GABA-mediated inhibition within the dorsomedial hypothalamus potentiates the cardiovascular response to emotional stress in rats fed a high-fat diet. *Neuroscience*. 2014;262:21-30.
74. Noronha SSR, Lima PM, Campos GSV, Chirico MTT, Abreu AR, Figueiredo AB, et al. Association of high-fat diet with neuroinflammation, anxiety-like defensive behavioral responses, and altered thermoregulatory responses in male rats. *Brain Behav Immun*. 2019;80:500-11.
75. Pronin D, Börner A, Weber H, Scherf KA. Wheat (*J Agric Food Chem*. 2020;68(46):13247-56.
76. Menta PLR, Andrade MER, Leocádio PCL, Fraga JR, Dias MTS, Cara DC, et al. Wheat gluten intake increases the severity of experimental colitis and bacterial translocation by weakening of the proteins of the junctional complex. *Br J Nutr*. 2019;121(4):361-73.
77. Ragi ME, El Mallah C, Toufeili I, Obeid O. Concomitant lysine and phosphorus addition to a wheat gluten protein diet highly amplified growth measures of rats. *Nutrition*. 2019;63-64:69-74.
78. Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1984;327(1):1-5.
79. Treit D, Menard J, Royan C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993;44(2):463-9.
80. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2(2):322-8.
81. Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav*. 1980;13(2):167-70.
82. Bourin M, Hascoët M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol*. 2003;463(1-3):55-65.
83. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res*. 2002;134(1-2):49-57.
84. Lovick TA, Zangrossi H. Effect of Estrous Cycle on Behavior of Females in Rodent Tests of Anxiety. *Front Psychiatry*. 2021;12:711065.
85. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003;463(1-3):3-33.
86. Garcia AM, Martinez R, Brandão ML, Morato S. Effects of apomorphine on rat behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav*. 2005;85(4):440-7.

87. Silva FC, Guidine PA, Machado NL, Xavier CH, de Menezes RC, Moraes-Santos T, et al. The role of dorsomedial hypothalamus ionotropic glutamate receptors in the hypertensive and tachycardic responses evoked by Tityustoxin intracerebroventricular injection. *Neurotoxicology*. 2015;47:54-61.
88. Zhang L, Andersen D, Roager HM, Bahl MI, Hansen CH, Danneskiold-Samsøe NB, et al. Effects of Gliadin consumption on the Intestinal Microbiota and Metabolic Homeostasis in Mice Fed a High-fat Diet. *Sci Rep*. 2017;7:44613.
89. Lebowohl B, Ludvigsson JF, Green PH. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ*. 2015;351:h4347.
90. Miranda J, Lasa A, Bustamante MA, Churruga 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.
91. Xhakollari V, Canavari M, Osman M. Why people follow a gluten-free diet? An application of health behaviour models. *Appetite*. 2021;161:105136.
92. de Noronha SR, Campos GV, Abreu AR, de Souza AA, Chianca DA, de Menezes RC. High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. *Behav Brain Res*. 2017;316:38-46.
93. Volta U, Caio G, Karunaratne TB, Alaedini A, De Giorgio R. Non-coeliac gluten/wheat sensitivity: advances in knowledge and relevant questions. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(1):9-18.
94. DAYNES G. Bread and tears; naughtiness, depression and fits due to wheat sensitivity. *Proc R Soc Med*. 1956;49(7):391-4.
95. Volta U, Bardella MT, Calabrò A, Troncone R, Corazza GR, Sensitivity SGfN-CG. An Italian prospective multicenter survey on patients suspected of having non-celiac gluten sensitivity. *BMC Med*. 2014;12:85.
96. Aljada B, Zohni A, El-Matary W. The Gluten-Free Diet for Celiac Disease and Beyond. *Nutrients*. 2021;13(11).
97. Addolorato G, Capristo E, Ghittoni G, Valeri C, Mascianà R, Ancona C, et al. Anxiety but not depression decreases in coeliac patients after one-year gluten-free diet: a longitudinal study. *Scand J Gastroenterol*. 2001;36(5):502-6.
98. Collin P, Kaukinen K, Mattila AK, Joukamaa M. Psychoneurotic symptoms and alexithymia in coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2008;43(11):1329-33.
99. Kurppa K, Paavola A, Collin P, Sievänen H, Laurila K, Huhtala H, et al. Benefits of a gluten-free diet for asymptomatic patients with serologic markers of celiac disease. *Gastroenterology*. 2014;147(3):610-7.e1.
100. Canova C, Rosato I, Marsilio I, Valiante F, Zorzetto V, Cataudella G, et al. Quality of Life and Psychological Disorders in Coeliac Disease: A Prospective Multicentre Study. *Nutrients*. 2021;13(9).
101. Zingone F, Siniscalchi M, Capone P, Tortora R, Andreozzi P, Capone E, et al. The quality of sleep in patients with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;32(8):1031-6.
102. Rostami-Nejad M, Taraghikhah N, Ciacci C, Pourhoseingholi MA, Barzegar F, Rezaei-Tavirani M, et al. Anxiety Symptoms in Adult Celiac Patients and the Effect of a Gluten-Free Diet: An Iranian Nationwide Study. *Inflamm Intest Dis*. 2020;5(1):42-7.
103. Casas R, Castro-Barquero S, Estruch R, Sacanella E. Nutrition and Cardiovascular Health. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12).
104. de Souza AMA, West CA, de Abreu ARR, Pai AV, Mesquita LBT, Ji H, et al. Role of the Renin Angiotensin System in Blood Pressure Allostasis-induced by Severe Food Restriction in Female Fischer rats. *Sci Rep*. 2018;8(1):10327.
105. Lebowohl B, Cao Y, Zong G, Hu FB, Green PHR, Neugut AI, et al. Long term gluten consumption in adults without celiac disease and risk of coronary heart disease: prospective cohort study. *BMJ*. 2017;357:j1892.
106. Kim HS, Demyen MF, Mathew J, Kothari N, Feurdean M, Ahlawat SK. Obesity, Metabolic Syndrome, and Cardiovascular Risk in Gluten-Free Followers Without Celiac Disease in the United

- States: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2014. *Dig Dis Sci*. 2017;62(9):2440-8.
107. Kolesárová A, Gažarová M, Kopčecová J, Mrázová J, Zeleňáková L. Evaluation of the gluten-free bakery products consumption in relation to hypertension as risk factor for cardiovascular disease. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2021;2021:920-4.
 108. Shetty R, Rai M, Chandrashekar R, Kalal BS. Diabetogenic effect of gluten in Wistar albino rats: a preliminary preclinical screening. *Med Pharm Rep*. 2020;93(1):47-52.
 109. Henriques HKF, Fonseca LM, de Andrade KS, Shivappa N, Hébert JR, Ferreira AVM, et al. Gluten-Free Diet Reduces Diet Quality and Increases Inflammatory Potential in Non-Celiac Healthy Women. *J Am Coll Nutr*. 2021:1-9.
 110. Ros-Simó C, Valverde O. Early-life social experiences in mice affect emotional behaviour and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;102(3):434-41.
 111. Sun M, Choi EY, Magee DJ, Stets CW, During MJ, Lin EJ. Metabolic Effects of Social Isolation in Adult C57BL/6 Mice. *Int Sch Res Notices*. 2014;2014:690950.
 112. Nagy TR, Krzywanski D, Li J, Meleth S, Desmond R. Effect of group vs. single housing on phenotypic variance in C57BL/6J mice. *Obes Res*. 2002;10(5):412-5.
 113. Sakakibara H, Suzuki A, Kobayashi A, Motoyama K, Matsui A, Sayama K, et al. Social isolation stress induces hepatic hypertrophy in C57BL/6J mice. *J Toxicol Sci*. 2012;37(5):1071-6.
 114. van der Valk ES, Savas M, van Rossum EFC. Stress and Obesity: Are There More Susceptible Individuals? *Curr Obes Rep*. 2018;7(2):193-203.
 115. Jeong JY, Lee DH, Kang SS. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2013;28(4):288-96.
 116. Tsuchimine S, Matsuno H, O'Hashi K, Chiba S, Yoshimura A, Kunugi H, et al. Comparison of physiological and behavioral responses to chronic restraint stress between C57BL/6J and BALB/c mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020.
 117. Shoji H, Miyakawa T. Differential effects of stress exposure via two types of restraint apparatuses on behavior and plasma corticosterone level in inbred male BALB/cAJcl mice. *Neuropsychopharmacol Rep*. 2020;40(1):73-84.
 118. Huang Q, Zhou Y, Liu LY. Effect of post-weaning isolation on anxiety- and depressive-like behaviors of C57BL/6J mice. *Exp Brain Res*. 2017;235(9):2893-9.
 119. Bledsoe AC, Oliver KM, Scholl JL, Forster GL. Anxiety states induced by post-weaning social isolation are mediated by CRF receptors in the dorsal raphe nucleus. *Brain Res Bull*. 2011;85(3-4):117-22.
 120. Zhang Y, Zu X, Luo W, Yang H, Luo G, Zhang M, et al. Social isolation produces anxiety-like behaviors and changes PSD-95 levels in the forebrain. *Neurosci Lett*. 2012;514(1):27-30.
 121. Pietropaolo S, Singer P, Feldon J, Yee BK. The postweaning social isolation in C57BL/6 mice: preferential vulnerability in the male sex. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008;197(4):613-28.
 122. Kaneda Y, Kawata A, Suzuki K, Matsunaga D, Yasumatsu M, Ishiwata T. Comparison of neurotransmitter levels, physiological conditions, and emotional behavior between isolation-housed rats with group-housed rats. *Dev Psychobiol*. 2021;63(3):452-60.
 123. Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Radojicic MB. Effects of chronic social isolation on Wistar rat behavior and brain plasticity markers. *Neuropsychobiology*. 2012;66(2):112-9.
 124. Berry A, Bellisario V, Capoccia S, Tirassa P, Calza A, Alleve E, et al. Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(6):762-72.
 125. Steptoe A, Kivimäki M. Stress and cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*. 2012;9(6):360-70.
 126. Groesz LM, McCoy S, Carl J, Saslow L, Stewart J, Adler N, et al. What is eating you? Stress and the drive to eat. *Appetite*. 2012;58(2):717-21.
 127. Cruz FC, Duarte JO, Leão RM, Hummel LF, Planeta CS, Crestani CC. Adolescent vulnerability to cardiovascular consequences of chronic social stress: Immediate and long-term effects of social isolation during adolescence. *Dev Neurobiol*. 2016;76(1):34-46.

128. Tsvirkun D, Bourreau J, Mieuset A, Garo F, Vinogradova O, Larina I, et al. Contribution of social isolation, restraint, and hindlimb unloading to changes in hemodynamic parameters and motion activity in rats. *PLoS One*. 2012;7(7):e39923.
129. Grippo AJ, Lamb DG, Carter CS, Porges SW. Social isolation disrupts autonomic regulation of the heart and influences negative affective behaviors. *Biol Psychiatry*. 2007;62(10):1162-70.
130. Grippo AJ, Carter CS, McNeal N, Chandler DL, Larocca MA, Bates SL, et al. 24-hour autonomic dysfunction and depressive behaviors in an animal model of social isolation: implications for the study of depression and cardiovascular disease. *Psychosom Med*. 2011;73(1):59-66.
131. Maslova LN, Bulygina VV, Amstislavskaja TG. [Social isolation and social instability in adolescence in rats: immediate and long-term physiological and behavioral effects]. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*. 2009;59(5):598-609.

10. ANEXO I



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Implicações do consumo de dieta rica em glúten e do isolamento social sobre a responsividade cardiovascular e comportamental em ratos Wistar", protocolada sob o CEUA nº 9520180121 (ID 000532), sob a responsabilidade de **Fernanda Cacilda dos Santos Silva e equipe; Deoclecio Alves Chianca Junior; Sylvana I.S. Rendeiro de Noronha; Rodrigo Cunha Alvim de Menezes; Pamela Félix da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 19/03/2021.

We certify that the proposal "Implications of gluten-rich diet intake and social isolation on cardiovascular and behavioral responsiveness in Wistar rats", utilizing 113 Heterogenics rats (113 males), protocol number CEUA 9520180121 (ID 000532), under the responsibility of **Fernanda Cacilda dos Santos Silva and team; Deoclecio Alves Chianca Junior; Sylvana I.S. Rendeiro de Noronha; Rodrigo Cunha Alvim de Menezes; Pamela Félix da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 03/19/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [03/2021](#) a [03/2023](#) Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Centro de Ciência Animal](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [21 a 21 dias](#)

N: [113](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [50 a 70 g](#)

Local do experimento: Todos os procedimentos descritos serão realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC/UFOP).

Ouro Preto, 11 de maio de 2021

Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

11. ANEXO II



República Federativa do Brasil
 Ministério da Educação
 Universidade Federal de Ouro Preto
 Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
 Pró-Reitoria de Graduação
 Pró-Reitoria de Extensão
 Pró-Reitoria de Assuntos Comunitários e Estudantis
 Diretoria de Relações Internacionais

Certificamos que o trabalho **INFLUÊNCIA DA DIETA RICA EM GLÚTEN SOBRE A RESPONSABILIDADE CARDIOVASCULAR E COMPORTAMENTAL EM RATOS WISTAR EXPOSTOS AO ISOLAMENTO SOCIAL**, de autoria de PAMELA FELIX DA SILVA, FERNANDA CACILDA DOS SANTOS SILVA, DEOCLÉCIO ALVES CHIANCA JÚNIOR, SYLVANA IZAURA SALLYBA RENDEIRO DE NORONHA, RODRIGO CUNHA ALVIM DE MENEZES, ROBERTO FARINA DE ALMEIDA, SÍLVIA DE PAULA GOMES, FABIANA APARECIDA RODRIGUES GOMES, GABRIELA DIAS CARVALHO DA COSTA, LUCAS GABRIEL VIEIRA e TALITA ALVES FARIA MARTINS MAGALHÃES, foi apresentado no VI MOSTRA DA PÓS-GRADUAÇÃO do ENCONTRO DE SABERES – UFOP, realizado de 29 de Novembro a 03 de Dezembro de 2021.

Ouro Preto, 03 de Dezembro de 2021.

Autenticidade



Código: 163967123661bb65c4c85ab

Prof. Marcos Eduardo Carvalho G. Knupp Pró-Reitor de Extensão e Cultura	Prof.ª Dr.ª Tânia Rosari Garbin Pró-Reitora de Graduação	Renata Guerra de Sá Cora Pró-Reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Arquibaldo Pinheiro Schultz Diretora de Relações Internacionais	Natalia de Souza Lisboa Pró-reitora de Assuntos Comunitários e Estudantis	



Este certificado foi gerado eletronicamente e sua autenticidade poderá ser atestada informando o código em www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados

