

Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista
Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Projeto de pesquisa

Efeito da ingestão de produtos sem glúten enriquecidos com frutanos do tipo inulina sobre a microbiota intestinal e parâmetros metabólicos em pacientes celíacos

Alunas: Natália da Silva Valente e Vilani Figueiredo Dias

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Dias Capriles

Coorientadores: Profa. Dra. Daniela Caetano Gonçalves, Prof. Dr. Christian Hoffmann

Santos - SP

2025

Resumo: Os frutanos do tipo inulina (FTI) são frequentemente utilizados na elaboração de produtos sem glúten devido ao seu potencial de melhorar as características físicas, e a composição nutricional dos produtos, e pelos seus potenciais efeitos benéficos à saúde das pessoas com doença celíaca. Assim, este estudo pioneiro tem como objetivo avaliar o efeito da ingestão de produtos sem glúten enriquecidos com FTI sobre a microbiota intestinal e parâmetros metabólicos em pacientes celíacos, por meio de um ensaio clínico triplo-cego, controlado e aleatorizado. Serão recrutados 80 voluntários, entre 18 e 40 anos, de ambos os sexos, portadores de doença celíaca. Os voluntários deverão ingerir diariamente uma porção de pão sem glúten enriquecido com 4g da mistura de inulina e oligofrutose (Orafti-Synergy1) e um sachê contendo 4g da mistura de inulina e oligofrutose, totalizando o consumo de 8g de FTI/ dia, ou o alimento controle (pão e sachê sem a adição de FTI) durante o período de 90 dias. Orientação nutricional será realizada visando a manutenção do padrão alimentar durante todo o período de estudo. Ao início e ao final do período de intervenção serão realizadas coletas de sangue e de fezes, além de avaliação antropométrica e do consumo alimentar. Os grupos serão comparados ao início e final da intervenção quanto à composição da microbiota fecal, produção de ácidos graxos de cadeia curta, parâmetros metabólicos relacionados à fome, saciedade, inflamação, imunomodulação, glicemia e perfil lipídico. Os resultados deste projeto permitirão avaliar o potencial de produtos sem glúten enriquecidos com FTI como nova estratégia terapêutica da dieta isenta de glúten para promover a nutrição e a saúde das pessoas com doença celíaca.

Palavras-chave: Pão sem glúten; doença celíaca; frutanos do tipo inulina; prebiótico; microbiota.

1. Introdução

1.1 Dieta sem glúten

Sabe-se que a característica essencial para uma dieta saudável é ser variada e balanceada. No entanto, algumas situações clínicas requerem dietas adaptadas, como é o caso das desordens relacionadas ao glúten, como alergia ao trigo, sensibilidade não celíaca ao glúten ou ao trigo, e a doença celíaca (DC) (Brouns *et al.* 2019; Cabanillas, 2019). Na doença celíaca inicia-se uma resposta imune, pela ingestão do glúten, causando inflamação da mucosa, atrofia das vilosidades do intestino delgado e aumento da permeabilidade intestinal. É possível que as pessoas tenham distúrbios gastrointestinais, fadiga e anemia, além de aumento dos riscos de osteoporose, doenças autoimunes e câncer. (Tye-Din, et al., 2010). Essas doenças não tem cura, e apresentam como único tratamento cientificamente comprovado, a dieta isenta de glúten por toda a vida.

Glúten é um complexo de proteínas de armazenamento composto pelas prolaminas específicas encontrada nos cereais trigo (gliadinas), centeio (secalinas), cevada (hordeínas), e aveia (aveninas – incluída apenas em alguns países), combinadas às gluteninas (Biesiekierski, 2017). A ingestão de glúten para pessoas com DC é tão grave que produtos o contendo devem ter os rótulos advertidos conforme exigência das Leis nº. 8.543 (Brasil, 2006^a) e nº. 10.674 (Brasil, 2006b).

A dieta sem glúten é composta por alimentos naturalmente isentos de glúten, tais como frutas, vegetais, leguminosas, carnes, leite e derivados, pseudocereais e alguns cereais (como arroz, milho, milheto, sorgo entre outros), além de produtos desenvolvidos com ingredientes substitutos da farinha de trigo e de outras fontes de glúten (Capriles *et al.* 2021), cujo teor de glúten seja inferior a 20 ppm (Codex Alimentarius 2015).

O tratamento requer a orientação de profissional especializado para que os pacientes e seus familiares possam fazer as escolhas alimentares adequadas por meio da seleção de alimentos sem glúten, realizem a leitura atenta dos rótulos dos alimentos e fiquem atentos para evitar a contaminação cruzada entre alimentos que não contem com aqueles que contém glúten (Marasco *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas, houve um expressivo crescimento no número de seguidores da dieta sem glúten, em parte devido ao aumento da prevalência e conscientização sobre os distúrbios relacionados ao glúten, mas principalmente devido à crença generalizada de que

essa dieta é mais saudável e indicada para a perda de peso (Capriles *et al.*, 2021). No entanto, até o momento, nenhum efeito benéfico da ingestão da dieta sem glúten foi demonstrado em indivíduos saudáveis (El Khoury *et al.* 2018; Brouns *et al.*, 2019).

Um levantamento recente, realizado a partir de estudos publicados nos últimos dez anos em diferentes países, mostrou que os pães sem glúten atualmente disponíveis no mercado são caracterizados como produtos de baixa qualidade nutricional, sendo elaborados majoritariamente com matérias primas refinadas, sem enriquecimento nutricional, e caracterizados por apresentarem menor teor de proteína, maior teor de gordura, e alto índice glicêmico, em relação aos produtos similares com glúten (Aguiar *et al.*, 2021). Desse modo, a ingestão frequente de produtos com este perfil nutricional poderia ocasionar um desequilíbrio na homeostase energética e um consequente excesso de peso. Assim, é muito importante melhorar as características nutricionais de pães sem glúten, produto consumido diariamente por 93% dos celíacos brasileiros, de acordo com a pesquisa realizada por Alencar *et al* (2021).

1.2 Influência da ingestão da dieta sem glúten na microbiota intestinal

Em um estudo controlado, realizado em indivíduos saudáveis que ingeriram uma dieta sem glúten durante um mês, foi observado uma redução nas populações de bactérias benéficas como *Bifidobactérias* e *Lactobacillus* e concomitante aumento da população de bactérias potencialmente patogênicas como *Enterobacterias* e *E. coli*. A dieta sem glúten pareceu ser responsável por uma redução da carga bacteriana benéfica no lúmen do intestino grosso, o que determinou uma diminuição na síntese de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, afetando não somente a composição, mas a função imunológica da microbiota intestinal (De Palma *et al.*, 2009).

A redução na ingestão de fibras alimentares, associadas à dieta sem glúten poderia explicar as alterações observadas na microbiota (Sanz, 2010), uma vez que esses compostos dietéticos constituem uma das principais fontes de energia para a microbiota intestinal. Quando a ingestão de fibras é limitada, como nos produtos da dieta sem glúten, as espécies microbianas competem por substratos e os patógenos oportunistas que podem se multiplicar. Deste modo, a dieta sem glúten é capaz de influenciar a composição da microbiota e sua função imunológica (Melini and Melini, 2019). No que se refere à microbiota intestinal de pacientes celíacos, é possível observar o aumento de *bacteroides spp.* e a diminuição de *Bifidobacterium spp.*, demonstrando prevalência de disbiose (Polo, *et al.*, 2020).

Por isso a adição de probióticos, prebióticos, simbióticos ou pós-bióticos são estratégias alimentares que permitem melhorar a composição dos alimentos que integram a dieta sem glúten (Polo *et al.*, 2020), e assim verificar os efeitos da ingestão destes produtos na microbiota intestinal do hospedeiro. Compreender esse mecanismo permite aos profissionais da saúde um cuidado e tratamento individualizado e assertivo para restaurar a simbiose e a saúde do indivíduo (Flandroy *et al.*, 2018) que necessita ou escolhe aderir a dieta sem glúten.

1.3 Pão sem glúten enriquecido com frutanos do tipo inulina

Dentre os produtos sem glúten, o pão continua sendo o mais investigado em todo o mundo e apesar do expressivo crescimento do mercado de produtos sem glúten indivíduos relatam dificuldade de acesso e insatisfação com sua qualidade sensorial e nutricional (Aguiar *et al.* 2023; Alencar *et al.*, 2021).

A crescente demanda por alimentos com propriedades funcionais estimula o desenvolvimento de vários PSG enriquecidos com ingredientes bioativos e, nesse sentido, realizar pesquisas nesse âmbito é de suma importância para contribuir com a ciência e, por conseguinte, com a saúde da população.

Os frutanos do tipo inulina (FTI) são carboidratos de reserva de frutas e vegetais, constituídos por múltiplas unidades de frutose ligadas por ligações β -(2-1) frutose, frutose. São designados como fibras e prebióticos. Os FTI atendem os atributos de fibra alimentar sendo “componentes da célula vegetal comestível; carboidratos (oligossacarídeos e polissacarídeos); resistência à hidrólise por enzimas alimentares humanas (mamíferos); resistência à absorção no intestino delgado; hidrólise e fermentação (parcial ou total) pelas bactérias no intestino grosso” (Roberfroid, 2007).

Define-se prebióticos como sendo “um substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos do hospedeiro conferindo um benefício à saúde” (Gibson *et al.*, 2017). Devido a sua configuração química, não são digeridos no trato gastrointestinal (TGI) humano e são utilizados como substrato preferencial para fermentação e estimulam o crescimento de bifidobactérias, bactérias promotoras da saúde (Drabińska 2016; Roberfroid, 2007).

Os FTI são encontrados em alimentos, como banana, alho, cebola, arroz, centeio, cevada, trigo, e em especial, na raiz da chicória, principal fonte de extração para o uso em escala industrial (Morreale *et al.*, 2019; Pimentel *et al.*, 2012; contado, 2009). A produção comercial de FTI ocorre por meio da extração das raízes de chicória, utilizando-se água quente, separação e secagem (Pimentel *et al.*, 2012; Roberfroid, 2005).

Ao que se refere a nomenclatura dos FTI, oligofrutose e frutooligossacarídeos são usados para nomear pequenos oligômeros de inulina com GP máx. < 9. Para a identificar os oligômeros e os polímeros, são utilizados os termos inulina ou inulina de cadeia longa ou de alto peso molecular (Roberfroid, 2007). A classificação de acordo com grau de polimerização (GP), se apresenta como: oligofrutose (GP variando de 2 a 8, GP médio de 4), inulina padrão (GP de 10-60, GP médio de 12), inulina de alto peso molecular (GP médio de 25), e inulina enriquecida com oligofrutose (Capriles et.al, 2021).

Considerando seus diferentes graus de polimerização, os FTI podem apresentar diferentes propriedades físico-químicas de acordo com o GP, o que determina diferentes aplicações em alimentos (Franck, 2002; Roberfroid, 2007). Assim, os FTI de cadeia curta são mais solúveis e mais doces que a inulina de cadeia longa e podem ser usados como substitutos do açúcar em produtos com baixo teor calórico. Enquanto a inulina apresenta menor solubilidade, maior viscosidade e por isso pode ser utilizada como substituto de gordura (Drabińska 2016), sem comprometer sabor ou textura de produtos tais como bebidas lácteas, queijos, iogurtes, cremes, molhos e sobremesas lácteas, por promover textura suave e cremosa; além de produtos cárneos com baixo teor de gordura; bem como para incrementar o teor de fibra de snacks e cereais matinais extrusados e de produtos de panificação (Drabińska 2016; Roberfroid, 2007).

Para atender às necessidades nutricionais e promover a saúde dos pacientes celíacos, a suplementação da dieta sem glúten com suplementos bióticos tem grande potencial como importante intervenção nutricional visando a homeostase da microbiota intestinal, o que pode trazer inúmeros benefícios relacionados ao sistema intestinal, imunológico, ósseo entre outros. Recentes revisões de literatura têm demonstrado que apesar da rigorosa adesão à dieta isenta de glúten, os pacientes com doença celíaca apresentam disbiose intestinal (Marasco *et al.* 2020; Polo *et al.* 2020; Krupa-Kozak and Drabinska 2022).

Estudo de suplementação com prebióticos (mistura de inulina e oligofrutose - Orafiti-Synergy1) demonstrou o efeito bifidogênico e o potencial para aumentar a absorção de cálcio e ferro em crianças celíacas (Drabińska *et al.*, 2018a, b, 2019). Até o momento, não foi encontrada nenhuma publicação relatando a intervenção nutricional com produtos enriquecidos com FTI em pacientes celíacos; o que pretendemos realizar de modo pioneiro no presente estudo. Para tanto, serão utilizados o pão sem glúten enriquecido com 8% de FTI (Orafiti-Synergy1) desenvolvido em estudos prévios de otimização da composição e aceitabilidade pelo nosso grupo de pesquisa (Capriles & Arêas 2010, 2013).

A inulina e a oligofrutose são as fibras que contribuem com o aumento da viscosidade do bolo alimentar no estômago e no intestino delgado, diminuindo a resposta glicêmica pós-prandial (AACC, 2001).

Capriles e Arêas (2013) foram pioneiros em adicionar elevada quantidade de FTI em PSG, obtendo produtos enriquecidos com 4g da mistura de inulina e oligofrutose (Orafti-Synergy1) na porção de 50% de PSG. Em estudo subsequente, Muniz (2016) mostrou que é possível adicionar até 30% de inulina de alto grau de polimerização ($DP > 23$), combinada a 131,6% de água (base farinha) sem alterar de forma significativa as propriedades físicas e a aceitabilidade de PSG, obtendo produto enriquecido com 4g FTI/ porção. Nos dois estudos foi possível triplicar o teor de fibra em relação ao produto controle, melhorar as propriedades físicas e a aceitabilidade dos PSG, bem como prolongar a maciez e vida de prateleira dos pães.

Até o momento, nenhum estudo avaliou o potencial prebiótico de produtos sem glúten enriquecidos com FTI, quer seja em estudos *in vitro*, *in vivo* ou ensaios clínicos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da ingestão de produtos sem glúten enriquecidos com frutanos do tipo inulina sobre a microbiota intestinal e parâmetros metabólicos em pacientes celíacos.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a ocorrência de disbiose intestinal em celíacos brasileiros adultos.
- Analisar o perfil lipídico, metabólico, inflamatório e **imunológico** de celíacos brasileiros adultos.
- Avaliar o efeito da ingestão de produtos sem glúten enriquecidos com FTI sobre a microbiota intestinal e reversão da disbiose.
- Avaliar o efeito da ingestão de produtos sem glúten enriquecidos com FTI sobre o perfil metabólico, inflamatório e **imunomodulação** dos voluntários portadores de doença celíaca.
- Verificar a influência da ingestão de produtos sem glúten enriquecidos com FTI nos parâmetros de composição corporal, ingestão alimentar, fome e saciedade.

3. Materiais e métodos

3.1 Produtos sem glúten enriquecidos com frutanos do tipo inulina

A intervenção consiste na ingestão diária, por 90 dias, de 50g de PSG enriquecido com 4g FTI no desjejum, pela manhã e consumo de **1 sachê com 4g de FTI** pela tarde, totalizando o consumo diário de 8g FTI. Os pães, possuem curta vida de prateleira. Assim, será realizado um teste prévio para definição das condições de ultracongelamento e armazenamento refrigerado por até 3 meses, com o intuito de definir a vida de prateleira com base em métodos instrumentais e sensoriais de avaliação da qualidade de pães. Esses resultados permitirão definir a frequência de entrega das amostras para os voluntários, e as orientações de como realizar o descongelamento para consumo.

Serão utilizadas as formulações enriquecidas com 8% da mistura de inulina e oligofrutose (Orafti-Synergy1), que é uma combinação de FTI fisiologicamente mais ativos

que as frações individuais (Roberfroid, 2007), e pelo histórico de intervenção em crianças com doença celíaca.

A inulina combinada com oligofrutose (Orafti-Synergy1) comercializada no Brasil, será fornecida pela empresa Benê S.A. Os demais ingredientes para produção dos PSG serão adquiridos no mercado local.

3.2 Ensaio clínico

Ensaio clínico triplo-cego (voluntários, equipe de campo, e responsável pela análise dos dados), controlado e aleatorizado, recrutará 80 voluntários. O cálculo amostral foi obtido de acordo com Hulley (2015). Para a obtenção do cálculo amostral, considerou-se: utilização do teste T de Student; n como sendo o tamanho da amostra; alfa de 0,05; beta de 0,8; ômega de 17,74; o tamanho do efeito esperado como sendo 0,4472, tem-se aproximadamente 80 pacientes ($n=79,7252$). Para a inclusão do estudo, os participantes devem ter entre 18 e 40 anos, de ambos os sexos biológicos, portadores de doença celíaca em tratamento com dieta isenta de glúten há pelo menos 1 ano. Os participantes serão recrutados por meio de redes sociais, além da divulgação nos grupos virtuais de ambulatórios de gastroenterologia das universidades paulistas, além das associações de celíacos. Ainda, como critério de inclusão, os voluntários devem possuir o hábito de consumir algum tipo de PSG no desjejum, pela manhã e realizar lanche da tarde. Como critério de exclusão, não serão aceitos no estudo voluntários que apresentem alguma doença metabólica adicional, gestantes e lactantes, que estejam em tratamento médico e/ou medicamentoso, que façam uso de probióticos, prebióticos, simbióticos, reguladores intestinais ou qualquer outro tipo de suplemento.

Os voluntários comparecerão a um laboratório clínico do campus Baixada Santista ou do campus São Paulo da UNIFESP em quatro momentos do estudo. No dia 1, será realizada anamnese, recordatório alimentar de 24h (R24h dia anterior), e avaliação de medidas antropométricas (peso, estatura, circunferência da cintura, dobras cutâneas e bioimpedância), e aplicação do questionário de sintomas gastrointestinais. Os voluntários serão acompanhados de modo remoto para a aplicação de um R24h, referente ao final de semana, para totalizar três avaliações na semana anterior a coleta de amostra de fezes, sendo o último referente a véspera do dia da coleta da amostra. Os voluntários serão instruídos a realizar coleta de amostra de fezes (dia 7). Para isso, todos receberão um kit coletor de fezes (Coloff) e serão instruídos sobre como realizar a coleta. No dia 7 os voluntários devem retornar ao laboratório

em jejum, na parte da manhã para coleta de sangue, entrega da amostra de fezes e nova anamnese para aplicação de R24h e retirada dos pães e barrinhas de cereal.

Os voluntários serão alocados por randomização simples em dois grupos, intervenção e controle, mantendo paridade entre número de homens e mulheres, e idade média do grupo, tempo de diagnóstico da doença celíaca e de tratamento com a dieta isenta de glúten de modo a manter os grupos com características homogêneas.

Todos os participantes estarão em tratamento, que é a dieta isenta de glúten. O grupo placebo receberá um **pão sem glúten (sem adição de FTI) e sachê contendo maltodextrina**. E o grupo intervenção receberá o **pão sem glúten acrescido de FTI e sachê contendo FTI**. Assim, o placebo se faz necessário para identificar se as mudanças ocorridas no organismo do grupo intervenção são decorrentes dos frutanos (fibra alimentar inulina e oligofrutose), garantindo a validade e a confiabilidade dos resultados. Serão orientados aos voluntários substituições de consumo de alguns alimentos padrão por estes produtos oferecidos. As recomendações de armazenamento e consumo serão oferecidas juntamente com a entrega dos pães e **dos sachês**. Será entregue também aos voluntários um novo kit de coleta de fezes, a ser coletado no dia 49, novos formulários para preenchimento de diário alimentar, a serem preenchidos nos dias 46 e 48. No dia 50, os voluntários retornam ao laboratório na parte da manhã e em jejum, trazendo a amostra de fezes e diários alimentares. Será realizada nova coleta de sangue e medidas antropométricas. No dia 95, os voluntários retornam ao laboratório na parte da manhã e em jejum, trazendo a amostra de fezes coletadas no dia 94 e diários alimentares. Será realizada nova coleta de sangue e medidas antropométricas. Durante os 90 dias, haverá contato semanal com os voluntários para dúvidas, relatos e conferência do protocolo de ingestão de pães. Caso o tratamento se mostre eficaz ao final do estudo, o mesmo tratamento será disponibilizado ao grupo controle. Após a finalização do estudo, os mesmos procedimentos aplicados ao grupo cujo resultado foi mais efetivo, será disponibilizado para os outros grupos

3.3 Coleta de soro/ plasma

Um profissional de enfermagem, biomédico ou farmacêutico clínico realizará a coleta das amostras de sangue por punção venosa do braço (**15mL**), no laboratório da Profa. Daniela Caetano Gonçalves, Rua Silva Jardim, 136. Após a coleta em tubos com a tampa amarela apropriados, com o nome de cada paciente e a data da coleta, o material será embalado e colocado em cooler de transporte para ser levado ao laboratório das análises clínicas.

Entregue o material à equipe, tais amostras serão armazenadas a -20°C para análises posteriores. As amostras serão centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o soro/plasma será armazenado em microtubos plásticos e estocado em freezer a -80°C para posterior análise. O ideal é que os exames sejam feitos após a coleta, se não for possível, o material, já centrifugado, será refrigerado e analisado assim que possível. O material será analisado no setor de bioquímica. As concentrações séricas de glicose, colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteínas de alta densidade (HDL) e triacilglicerol serão quantificadas, utilizando-se kits comerciais (Glicose liquiform ref. 133, TTriglicérides Liquiformref. 87, HDL LE ref. 98, LDL Liquiform ref. 111). Após as análises, o resíduo será etiquetado e armazenado em sacos brancos e será descartado como resíduo do tipo A pelo responsável técnico do laboratório.

3.4 Avaliação do conteúdo plasmático de hormônios metabólicos e biomarcadores inflamatórios e de imunomodulação

A aferição do conteúdo plasmático de hormônios e biomarcadores de inflamação (Amilina, Peptídeo-C, Grelina, GIP, GLP-1, Glucagon, IL-6, Insulina, Leptina, MCP-1, PP, PYY, TNF-alfa, IL1 β e IL6) será realizada em três momentos (início do estudo, 45 e 90 dias após ingestão dos produtos). Será feita incubação da amostra de soro com mistura de microesferas MagPlex® cobertas com diferentes anticorpos por 2 horas; detecção dos antígenos-alvo ligados às microesferas com uma mistura de anticorpos de captura biotinilados e incubação por 1 hora; seguido de incubação com *streptavidina* marcada com *phycoerithrin* por 30 minutos. As microesferas serão, então, identificadas por meio da *phycoerithrin* usando-se o instrumento Luminex® MAGPIX (Life Technologies). Após a leitura do aparelho, os valores de cada hormônio e adipocina serão analisados no software *Analyst* 5.1 e, posteriormente, relativizados pela concentração de proteína total.

As análises referentes a imunomodulação envolvem linfócitos, macrófagos, neutrófilos, células T CD4+, células TCD8+ e células B.

3.6 Análises e/ou procedimentos de biomarcadores da imunomodulação

3.6.1 Procedimento de estimulação in vitro de sangue total com lipopolissacarídeos (LPS)

Com resultados comparados à amostra controle com Solução Salina (PBS) de acordo com o método de Abbasi. *et al* (2013). A estimulação *in vitro* será utilizada como um procedimento preparatório para induzir a ativação das células imunes presentes no sangue total recém-coletado. O objetivo é verificar a capacidade funcional dessas células, observando se apresentam maior ou menor responsividade ao estímulo. Para a realização do procedimento, serão coletados 5 mL de sangue total, obtidos por punção venosa, em tubo estéril com anticoagulante. É essencial que o sangue seja fresco, não tenha sido congelado previamente e seja manipulado imediatamente após a coleta. Durante o transporte até o local de processamento, o material será mantido sob resfriamento leve, entre 4 °C e 10 °C, evitando variações bruscas de temperatura. Logo após a chegada ao laboratório, o sangue será fracionado em alíquotas e exposto ao lipopolissacarídeo (LPS). O LPS atua como um agente estimulador do sistema imune inato, desencadeando a produção de mediadores inflamatórios e permitindo avaliar o grau de ativação ou responsividade das células presentes no sangue do participante. Após o período de incubação previamente definido no protocolo laboratorial, as amostras estimuladas serão então processadas conforme os métodos analíticos específicos do estudo. A estimulação com LPS, portanto, não constitui uma análise independente, mas um **passo preparatório fundamental** para gerar o material biológico necessário às avaliações subsequentes.

3.6.2 Isolamento de neutrófilos

Serão realizados após a incubação, onde será transferido 5 mL de sangue em tubos falcon contendo 3 mL de Histopack 1077 e 3 mL de Histopack 1119 que será centrifugado por 30 min a 400 G. Após a centrifugação serão separados o plasma e os neutrófilos. O plasma será armazenado em tubos Eppendorf de 2000 µL e congelado a -80°C para análise posterior, enquanto os neutrófilos serão transferidos para outro tubo falcon 15 mL onde será acrescentado 5 mL de PBS e centrifugado a 400 G por 10 min, sobrenadante será descartado e as células serão ressuspensas com 1 mL (PBS) para purificar as células e contadas com a ajuda de um microscópio óptico e a câmara de Neubauer.

3.6.3 Ensaio de fagocitose

Será utilizada para avaliar a capacidade das células do sistema imunológico, como macrófagos e neutrófilos, de engolfar e digerir partículas estranhas, como bactérias. será utilizado o kit CytoSelect™ 96-Well Phagocytosis Assay (E. coli Substrate), que permite quantificar a

fagocitose de *E. coli* pelas células. As células isoladas são incubadas com partículas de *E. coli* marcadas, presentes no kit. As células fagocitam as partículas durante o período de incubação, geralmente de 1 a 2 horas a 37°C. Após a incubação, um leitor de microplacas avaliará a absorbância, indicando o número de partículas fagocitadas.

3.6.4 Ensaio de produção de peróxido de hidrogênio

Essa técnica será utilizada para medir a capacidade das células imunes de gerar espécies reativas de oxigênio, a produção de peróxido é uma parte crítica da resposta oxidativa, que contribui para a destruição de microrganismos fagocitados, ou seja, avalia a eficácia da resposta imune inata das células analisadas. O kit CytoSelect™ 96-Well Phagocytosis Assay (*E. coli* Substrate) será novamente empregado para essa análise.

3.7 Análise de biomarcador da inflamação

3.7.1 Proteína C-reativa (PCR)

Com o objetivo de complementar a avaliação do estado inflamatório dos participantes, a dosagem do marcador inflamatório da proteína C-reativa (PCR) foi inserida e será realizada com o Kit Proteína C-Reativa (PCR) – Labtest.

3.5 Avaliação de ácidos graxos de cadeia curta fecais e de composição da microbiota intestinal

Os participantes serão instruídos a coletar de 20 a 30 g de amostra fecal diretamente em frasco estéril de acordo com procedimentos técnicos pré-estabelecidos (Carli 2008) e, em seguida, mantê-los refrigerados a 4°C por até 12 horas. Entregue o material à equipe, tais amostras serão armazenadas a -20°C para análises posteriores. A análise de ácidos graxos de cadeia curta será realizada em parceria com a Profª. Dra. Elizabeth A. F. S. Torres da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP), e a composição da microbiota intestinal empregando o sequenciamento do gene 16S rRNA será realizada em parceria com o Prof. Dr. Christian Hoffman, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

A quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) das fezes será realizada de acordo com o método proposto Zhao *et al.* (2005), utilizando ácido clorídrico para obtenção do sobrenadante. As frações lipídicas dos tecidos, bem como a dosagem de AGCC das fezes serão analisados por cromatografia gasosa (GC), acoplada a um ionizador de chama (FID) (VARIAN GC 3900).

O perfil de ácidos graxos será identificado por comparação do tempo de retenção na chama iônica, usando um padrão conhecido de ésteres metílicos (FAME) (Supelco, 37 componentes, Sigma Aldrich) para os tecidos, e um padrão conhecido de mistura de AGCC livres (Volátil free Acid mix, Sigma-Aldrich) para as fezes.

Serão feitas diluições para obtenção das soluções padrões. Uma alíquota de cada amostra será injetada com auxílio de seringa em sistema Sprites no cromatógrafo em fase gasosa (Shimadzu GC-2014 Scientific Instruments-Inc-Japan), a 145° C a ser realizado em parceria com a Profa. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres, na Faculdade de Saúde Pública da USP. Cada ácido graxo presente será identificado e quantificado por comparação com os tempos de retenção e concentrações dos AGCC nas soluções padrões. Os cálculos serão feitos pelo microcomputador acoplado ao sistema de cromatografia gasosa equipado com o software GCSolution® (Shimadzu GC-2014 Scientific Instruments-Inc-Japan).

O sequenciamento do DNA extraído e amplificado será realizado em um sequenciador Illumina. As etapas são quebra da parede celular bacteriana, purificação do DNA e quantificação. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação dos DNAs extraídos serão o 515F e o 806R com adição de sequência de código de barras (barcodes) e de adaptadores para sequenciamento Illumina. A região V4 do gene 16S rRNA será utilizada como alvo para identificar espécies bacterianas presentes nas amostras. Os produtos de PCR serão purificados e quantificados por fluorometria, seguido as análises de bioinformática e posterior análise estatística.

3.6 Avaliação antropométrica e composição corporal

As medidas antropométricas dos participantes serão realizadas no laboratório clínico da UNIFESP, nos campus Baixada Santista e/ou São Paulo. Para garantir precisão, os participantes serão orientados, conforme protocolo de preparo para a realização das medidas. A massa corporal (peso) será obtida com uma balança antropométrica calibrada, com precisão de 100 gramas, e a altura será medida utilizando um estadiômetro, com precisão de 0,01 metros,

permitindo o cálculo do índice de massa corporal (IMC) através da fórmula ($IMC = \text{peso} / \text{altura}^2$). As circunferências de punho, quadril, abdômen serão realizadas utilizando uma fita métrica inelástica, com precisão de 0,1 cm. A composição corporal será analisada por meio do exame de bioimpedância elétrica (BIA), utilizando um Analisador de Bioimpedância calibrado (Biodynamics Corporation, Shoreline, WA®). Este método estimará a massa de gordura e a massa livre de gordura. Todos os participantes serão orientados conforme protocolo de preparo para realização do exame de bioimpedância elétrica (BIA). O exame será realizado com o participante em posição supina, com braços e pernas afastados a 30-45 graus do tronco, e eletrodos adesivos serão aplicados no pulso e tornozelo direitos.

3.7 Análise dos sintomas gastrointestinais

O Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS) será utilizado para avaliar sintomas gastrointestinais específicos de pacientes com doença celíaca. O questionário é validado para a população brasileira e amplamente utilizado como patient reported outcomes (PROs) para pessoas com doença celíaca. Este instrumento de avaliação é composto por 15 perguntas divididas em 5 domínios sintomáticos: Refluxo, Dor abdominal, Indigestão (dispepsia), Diarreia e Constipação. Para o cálculo é usada uma Escala Likert de 7 pontos (1 = sem sintomas, 7 = sintomas intensos/frequentes). Essa ferramenta será empregada para monitorar e comparar os sintomas gastrointestinais dos participantes antes, durante e após a intervenção, (Canestaro *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2016).

3.8 Devolutiva dos resultados

Ao final do estudo, todos os participantes terão acesso aos resultados finais da pesquisa por meio do e-mail.

3.9 Pipelines utilizados para realizar a pesquisa

Pipeline de Metagenômica: I. analisar a composição da microbiota intestinal e identificar desequilíbrios (disbiose) em pacientes celíacos. II. Comparar a microbiota intestinal antes e depois da intervenção com produtos sem glúten enriquecidos com FTI.

Pipeline de Metabolômica: identificar e quantificar metabólitos presentes em amostras biológicas (sangue), a fim de avaliar o perfil metabólico. II. Avaliar as mudanças no perfil metabólico antes e depois da intervenção com produtos sem glúten enriquecidos com FTI.

Pipeline de Análise de Dados Lipídicos: avaliar o perfil lipídico, que pode incluir análise de lipídios no sangue.

Pipeline de imunomodulação: a imunomodulação será investigada por meio da resposta inflamatória induzida em sangue total após estímulo com LPS, permitindo avaliar a capacidade funcional das células imunes frente ao desafio. O material obtido após a incubação será utilizado para determinar o perfil de citocinas e demais mediadores relacionados à ativação do sistema imune.

Pipeline de Análise de Dados de Composição Corporal: avaliar as mudanças na composição corporal dos participantes.

Pipeline de Análise de Dados de Ingestão Alimentar: avaliar os padrões de ingestão alimentar dos voluntários.

Pipeline de Análise de Dados de Satisfação e Saciedade: avaliar os níveis de fome e saciedade dos participantes.

3.10 Tratamento antes de realizar a pesquisa versus após

Atualmente, o único tratamento seguro e cientificamente comprovado para a doença celíaca, é a dieta isenta de glúten por toda a vida. Com isso é possível evitar os sintomas e complicações associadas a esta patologia. Assim, recrutaremos participantes que já estão habituados a esta dieta há pelo menos um ano. A principal alteração desta dieta é a exclusão do consumo de cereais que contêm glúten da alimentação, ou seja, trigo, centeio e cevada, e os seus derivados como produtos de panificação e massas alimentícias. Dentre os produtos sem glúten, o pão é o mais consumido pelos celíacos brasileiros, em frequência diária por 93% dos participantes da pesquisa de Alencar *et al* (2021). Assim, o pão sem glúten já faz parte dos hábitos de consumo desta população. Portanto, nossa intervenção não provocará alterações no tratamento. Iremos fornecer um pão sem glúten a ser consumido diariamente de manhã, e um sachê contendo a mistura de inulina com oligofrutose a ser consumido diariamente à tarde.

3.14 Informações sobre o biorrepositório e descarte de material

A Resolução 441/11 Art. °1 item II afirma: “Art.: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais”. Dessa forma, o pesquisador responsável por tal serviço é a Profa. Dra. Vanessa Dias Capriles, cujo endereço eletrônico é vanessa.capriles@unifesp.br, do Departamento de Biociências. O endereço é Edifício Mariângela Duarte, na Rua Silva Jardim, nº 136, em Santos - SP, CEP: 11015-020. O telefone é (11) 3885-4255. As amostras de sangue e fezes serão utilizadas apenas para as análises previstas no estudo. Após seu processamento, todo o material será inutilizado, serão acondicionadas em recipientes apropriados, identificados como resíduo biológico e descartado conforme normas de biossegurança, como resíduo biológico do Grupo A, por meio dos procedimentos adotados pela instituição (autoclavagem e posterior eliminação segura).

4. Análise dos dados

A definição do tempo de armazenamento congelado dos pães será realizada pela verificação da estabilidade das características de textura instrumental e sensorial, com o auxílio de testes de comparação de médias e da análise fatorial múltipla, que será realizada no software XLSTAT (Addinsoft, USA). As variáveis de caracterização dos grupos controle e intervenção no momento pré-intervenção (*baseline*) serão comparadas por teste *t* de Student para variáveis contínuas e por Qui-Quadrado (χ^2) para variáveis categóricas. Os efeitos da intervenção serão avaliados pelo teste GLM (General Linear Model). Estes testes serão realizados no programa Statistica (Tibco Software Inc., USA).

Os efeitos da intervenção na microbiota intestinal serão avaliados por medidas de alfa e beta diversidade, assim como para as possíveis mudanças em taxons presentes na microbiota dos voluntários. Beta diversidade será medida usando distâncias Unifrac ponderada e não ponderada (Lozupone et al. 2010), seguida de testes de PERMANOVA para determinar influências globais na microbiota. Taxons serão identificados e agrupados em Amplicon Sequence Variants (ASV). ASVs e medidas de alfa diversidade, como diversidade filogenética de Faith, serão analisadas por testes paramétricos e não paramétricos adequados, e quando possível por GLM para determinar o efeito da intervenção em grupos específicos da microbiota gastrointestinal. As análises bioinformáticas serão conduzidas usando o software Qiime (Caporaso et al. 2010).

4.1 Análise dos eventos adversos

Será realizado um plano de acompanhamento e de análise de eventos adversos que incluirão o sistema de notação e os critérios de avaliação empregados. O sistema de notação será o padrão, isto é, os eventos serão classificados como I. leve: sintomas leves e transitórios que não tenham interferência considerável na qualidade de vida do paciente e que não demandem atuação médica ou algum tratamento específico; II. moderado: sintomas moderados que afetem a qualidade de vida do paciente, pode ser necessário o médico, mas que o paciente não sofra risco à saúde severo, esses sintomas são tratáveis e reversíveis; III. grave: sintomas graves que apresentem risco severo à saúde, é necessário que o médico atue imediatamente, caso contrário, pode haver complicação séria e danos permanentes ao paciente.

Os participantes deverão fazer o registro alimentar e caso sintam algum sintoma diferente - como I. leve: flatulências, aumento da frequência de evacuações, desconforto abdominal leve e eructação; II. moderado: dor abdominal, diarreia, náusea, vômitos persistentes e moderados; III. grave: diarreia grave, desidratação, anafilaxia e outros - deverão informar o pesquisador e/ou relatar ao próprio médico. Em caso de eventos adversos moderados ou graves, o participante da pesquisa deverá ser tratado com o médico e poderá ser retirado do estudo. Os dados relatados serão analisados periodicamente ao longo do estudo e haverá controle de qualquer evento que tenha acontecido por meio de relatórios.

4.2 Critérios de encerramento ou suspensão da pesquisa e análises interinas

De modo antecipado, a pesquisa pode ser encerrada caso os resultados conclusivos sejam encontrados antes do término planejado. Não são esperados riscos para a pesquisa, mas, para a segurança dos participantes, haverá conferência dos relatórios de efeitos adversos relatados, caso existam, para que, dessa forma, o tratamento possa ser considerado eficaz ou não.

5. Aspectos éticos

O protocolo experimental do projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP e cadastrado na plataforma Brasil para aprovação da análise sensorial e do ensaio clínico. O estudo com seres humanos será iniciado somente após a obtenção de parecer favorável. Os participantes voluntários serão convidados ao estudo com consentimento informado através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O protocolo experimental

será cadastrado na plataforma REBEC de ensaios clínicos. Os voluntários serão informados a respeito da composição dos pães, evitando assim, que consumam algo que não gostem ou que tenham alergia (possíveis alergênicos: leite e ovo).

6. Resultados esperados

Verificar a viabilidade de produtos sem glúten como veículos de compostos bioativos prebióticos, considerando o impacto de sua ingestão na microbiota intestinal e parâmetros metabólicos e de imunomodulação. Este estudo pioneiro, poderá auxiliar a elaboração de nova estratégia terapêutica auxiliar a dieta isenta de glúten para promover a nutrição e a saúde das pessoas com doença celíaca. O conhecimento gerado, auxiliará no delineamento de novos estudos clínicos do nosso grupo de pesquisa, como de outros grupos que pesquisam este tema.

7. Financiamento

Este projeto é financiado com a bolsa de doutorado direto da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo 2023/09345-2) e está vinculado ao auxílio à pesquisa da FAPESP (processo 2021/06643-7), modalidade Jovem Pesquisadora Fase 2, de responsabilidade da orientadora. O projeto também é financiado com a bolsa de doutorado do Conselho Nacional Científico e Tecnológico - CNPq (processo 174209/2024-0).

Referências

Aguiar, E. V., Santos, F. G., Krupa-Kozak, U., & Capriles, V. D. (2023). Nutritional facts regarding commercially available gluten-free bread worldwide: Recent advances and future challenges. *Critical reviews in food Science and nutrition*, 63(5), 693–705. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1952403>

Alencar, N. M. M., Araújo, V. A., Faggian, L., da Silveira Araújo, M. B., & Capriles, V. D. (2021). What about gluten-free products? An insight on celiac consumers' opinions and expectations. *Journal of Sensor Studies*, 36(4). <https://doi.org/10.1111/joss.12664> Biesiekierski JR. What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2017;32(S1):78–81.

Brasil - Lei nº 8543 de 23 de dezembro de 1992. Determina a impressão e advertência de alimentos que contenham glúten. www.anvisa.gov.br. Consultado em 14 de julho de 2023a.

Brasil - Lei nº 10674 de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten. www.anvisa.gov.br. Consultado em 14 de julho de 2023b.

Brunos F, van Roo G, Sheryl P, Rösti S, Yonkers D. Adverse Reaction to Wheat or Wheat Components. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019;18(5):1437–52.

Cabanillas B. Gluten-related disorders: Celiac disease, wheat allergy, and nonceliac gluten sensitivity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019;1–16.

Canestaro, W. J., Edwards, T. C., & Patrick, D. L. (2016). Systematic review: patient reported outcome measures in coeliac disease for regulatory submissions. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 44(4), 313-331.

Capriles, VD; Arêas, JAG. (2010). Barras de amaranto enriquecidas com frutanos: aceitabilidade e valor nutricional. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 60, 291 - 297.

Capriles, V.D., Arêas, J.A.G. (2013). Effects of prebiotic inulin-type fructans on structure, quality, sensory acceptance and glycemic response of gluten-free breads. *Food & Function* 4 (1), 104-110.

Capriles, V. D., Santos, F. G., & Aguiar, E. V. (2021). Innovative gluten-free breadmaking. In C. Galanakis. (Ed.), *Trends in wheat and bread making* (pp. 371–404). Academic Press. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821048-2.00013-1>

Codex Alimentarius. Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. 2015 p. 1–3.

Contado, EWN da F. Obtenção, caracterização e utilização dos frutanos de tubérculos do yacon (persons intolerant persons intolerant). 2009. 144 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *British Journal of Nutrition*. 2009;102(8):1154–60.

Drabińska N, Jarocka-Cyrta E, Markiewicz LH, Krupa-Kozak U. (2018a). The Effect of Oligofructose-Enriched Inulin on Faecal Bacterial Counts and Microbiota Associated Characteristics in Celiac Disease Children Following a Gluten-Free Diet: Results of a Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*. 12;10(2):201.

Drabińska N, Jarocka-Cyrta E, Złotkowska D, Abramowicz P, Krupa-Kozak U. (2019). Daily oligofructose-enriched inulin intake impacts bone turnover markers but not the cytokine profile in pediatric patients with celiac disease on a gluten-free diet: Results of a randomised, placebo-controlled pilot study. *Bone*, 122:184-192.

Drabińska N, Krupa-Kozak U, Ciska E, Jarocka-Cyrta E. (2018b). Plasma profile and urine excretion of amino acids in children with celiac disease on gluten-free diet after oligofructose-enriched inulin intervention: results of a randomised placebo controlled pilot study. *Amino Acids*. 50(10):1451-1460.

Drabińska, N., Zieliński, H., & Krupa-Kozak, U. (2016). Technological benefits of inulin-type fructans application in gluten-free products—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 149-157.

El Khoury D, Balfour-Ducharme S, Joey IJ. A Review on the Gluten-Free Diet: Technological and Nutritional Challenges. *Nutrients*. 2018;10(10).

Figueiredo-Ribeiro, R. D. C. L., Pessoni, R. A. B., Itaya, N. M., & Fialho, M. B. (2022). Polímeros de frutose: importância para a nutrição e saúde humana. *Evidência*, 22(1), 9-24.

Flandroy L, Poutahidis T, Berg G, Clarke G, Dao M-C, Decaestecker E, *et al.* The impact of human activities and lifestyles on the interlinked microbiota and health of humans and of ecosystems. *Science of The Total Environment*. 2018; 627:1018–38.

Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S287-S291. doi:10.1079/BJN/2002550

Hulley, S. B., Cummings, S. R., Browner, W. S., Grady, D. G., & Newman, T. B. (2015). *Delineando a pesquisa clínica-4*. Artmed Editora.

Kleessen, B., Schwarz, S., Boehm, A., Fuhrmann, H., Richter, A., Henle, T., & Krueger, M. (2007). Jerusalem artichoke and chicory inulin in bakery products affect faecal microbiota of healthy volunteers. *British Journal of Nutrition*, 98(3), 540-549.

Krupa-Kozak, Urszula, and Natalia Drabińska. "Gut Microbiota and A Gluten-Free Diet." (2022): 243-255.

Lozupone, Catherine, Manuel E. Lladser, Dan Knights, Jesse Stombaugh, e Rob Knight. 2010. "UniFrac: An Effective Distance Metric for Microbial Community

Comparison". Comments and Opinion. The ISME Journal. 9 de setembro de 2010. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.133>.

Marasco G, Cirotta GG, Rossini B, Lungaro L, Di Biase AR, Colecchia A, Volta U, De Giorgio R, Festi D, Caio G. (2020). Probiotics, Prebiotics and Other Dietary Supplements for Gut Microbiota Modulation in Celiac Disease Patients. *Nutrients*. 2;12(9):2674.

Melini V, Melini F. Gluten-Free Diet: Gaps and Needs for a Healthier Diet. *Nutrients*. 2019;11(1).

Morreale, F., Benavente-Gil, Y., Rosell, C.M., 2019. Inulin enrichment of gluten free breads: Interaction Between inulin and Yeasts. *Food Chemistry* 278, 545–551.

Muniz DG. Pão sem glúten enriquecido com inulina: um estudo de otimização do novo produto e comparação de suas propriedades físicas, aceitabilidade de prateleira e resposta glicêmica com suas opções de pão. Dissertação de mestrado. UNIFESP, 2016.

Pimentel, Tatiana Colombo; Garcia, Sandra; Prudêncio, Sandra Helena. Aspectos Funcionais, De Saúde E Tecnológicos De Frutanos Tipo Inulina. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, [S.l.], v. 30, n. 1, aug. 2012. ISSN 19839774. Available at: < <https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/28593>>.

Polo, A, Arvora, K, Amer, H, Di Cagno, R, De Angelis, M, Gobbetti, M. (2020). Gluten-free diet and gut microbiome. *Journal of Cereal Science* 95, 103058

Reimer, R. A., Soto-Vaca, A., Nicolucci, A. C., Mayengbam, S., Park, H., Madsen, K. L., ... & Vaughan, E. E. (2020). Effect of chicory inulin-type fructans-containing snack bars on the human gut microbiota in low dietary fiber consumers in a randomized crossover trial. *The American Journal of clinical nutrition*, 111(6), 1286-1296.

Roberfroid MB. Introduzindo frutanos do tipo inulina. *Br J Nutr*. (2005) Abr;93 Supl 1:S13-25. doi: 10.1079/bjn20041350. PMID: 15877886.

Roberfroid MB. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr*. (2007) Nov;137(11 Suppl):2493S-2502S. doi: 10.1093/jn/137.11.2493S. PMID: 17951492.

Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult humans. *Gut Microbes*. 2010;1(3):135–7.

Souza, G. S. *et al.* Translation And Validation Of The Brazilian Portuguese Version Of The Gastrointestinal Symptom Rating Scale (GSRS) Questionnaire. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 53, n. 3, p. 146–151, set. 2016.

Tye-Din, J. A., Stewart, J. A., Dromey, J. A., Beissbarth, T., van Heel, D. A., Tatham, A., ... & Anderson, R. P. (2010). Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitomes in gluten in celiac disease. *Science translational medicine*, 2(41), 41ra51- 41ra51.