

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PRISCILLA VANESSA ALVES SANTOS**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA ORAL NO EPITÉLIO INTESTINAL  
DE RATOS HIPERGLICÊMICOS**

PONTA GROSSA

2020

**PRISCILLA VANESSA ALVES SANTOS**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA ORAL NO EPITÉLIO INTESTINAL  
DE RATOS HIPERGLICÊMICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: **Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski**

Coorientador: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dionízia Xavier Scomparin**

PONTA GROSSA

2020

S237

Santos, Priscilla Vanessa Alves

Efeito da administração de insulina oral no epitélio intestinal de ratos hiperglicêmicos / Priscilla Vanessa Alves Santos. Ponta Grossa, 2020.  
51 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração:  
Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski.  
Coorientadora: Profa. Dra. Dionízia Xavier Scomparin.

1. Diabetes. 2. Epitélio intestinal. 3. Estreptozotocina. 4. Insulina oral. I. Lipinski, Leandro Cavalcante. II. Scomparin, Dionízia Xavier. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

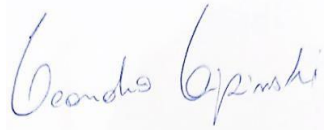
CDD: 616.462

PRISCILA VANESSA ALVES SANTOS

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA ORAL NO EPITÉLIO INTESTINAL  
DE RATOS HIPERGLICÊMICOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na  
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

Ponta Grossa, 31 de março de 2020.



Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski – Orientador  
Doutor em Medicina Veterinária  
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Profa. Dra. Carla Rosa Dubiela  
Doutor em Genética e Melhoramento CESCAGE



Profa. Dra. Márcia Thaís Pochapski  
Doutora em Odontologia  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

“À minha família, meu esposo, minhas filhas e em especial aos meus pais, que através de exemplos diários sempre despertaram a busca pelo conhecimento.”

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida e por sua presença constante.

A família, pelo carinho, paciência e incentivo durante a caminhada. Obrigada por serem presença incessante e meu porto seguro sempre.

Ao Professor Orientador Dr. Leandro Lipinski, grande entusiasta desse projeto, agradeço muito pelos conselhos, pela paciência e compreensão, pela oportunidade de ser sua orientanda e por dividir comigo seus conhecimentos.

A Professora Co orientadora Dr<sup>a</sup> Dionízia Xavier Scomparin, pela atenção, pelo auxílio e pelas dicas compartilhadas.

A Caroliny Stocco, Enfermeira Coordenadora da Vigilância Epidemiológica da Fundação Municipal de Saúde de Ponta Grossa, pela amizade, estímulo, auxílio e companheirismo em toda as horas.

A Me. Adriana Koga e Me. Bruna Carletto pelo carinho, apoio e colaboração em todo o processo de pesquisa.

A todos os colegas da equipe de laboratório, com os quais aprendi muito e compartilhei ricos momentos de aprendizagem e companheirismo.

Aos demais Docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelos ensinamentos, orientações, todos foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram de alguma forma durante toda a caminhada desta pós-graduação.

“Podemos escolher recuar em direção à segurança ou avançar em direção ao crescimento. A opção pelo crescimento tem que ser feita repetidas vezes. E o medo tem que ser superado a cada momento”.

(Abraham Maslow)

## RESUMO

Doença crônica caracterizada por hiperglicemia, o diabetes se tornou um problema de saúde mundial, os hábitos da população nas últimas décadas, contribuíram muito para a atual realidade. Essa doença vem desafiando pesquisadores a encontrarem novos métodos de tratamento mais eficientes e que tragam melhor adesão destes pacientes crônicos, sem os efeitos colaterais presentes hoje. Muitas pesquisas estão sendo realizadas com intuito de chegar a uma fórmula que tenha maior biodisponibilidade no trato digestivo. Este estudo, tem como objetivo avaliar o efeito do tratamento com nanocápsulas de insulina oral em ratos hiperglicêmicos. Métodos: foram utilizados ratos wistar, machos, idade entre 2 e 3 meses, peso médio de 300g, divididos em 4 grupos de 15 animais cada um, todos receberam dieta convencional ad libitum, e foram induzidos a hiperglicemia através da administração de estreptozotocina. O presente estudo demonstrou que a insulina oral administrada através de nanocápsulas contribuiu para a diminuição dos níveis séricos de triglicérides dos animais hiperglicêmicos ( $p < 0.05$ ), também apresentou efeito hipoglicemiante significativo em relação aos que receberam apenas as nanocápsulas ( $p < 0.05$ ), ainda, foi observado alterações significativas no epitélio intestinal. Apesar dos achados nesse estudo, mais pesquisas são necessárias para a compreensão dos efeitos da insulina oral no epitélio intestinal.

**Palavras-chave:** diabetes, epitélio intestinal, estreptozotocina, insulina oral.



## ABSTRACT

The chronic disease characterized by hyperglycemia, diabetes, has become a global health problem, the habits of the population in recent decades have contributed a lot to the current reality. This disease has been challenging scientists to find new methods of more efficient treatments and that bring better adherence to these chronic patients, without the side effects presented today. Many types of research are being conducted to arrive at a formula that has greater bioavailability in the digestive tract. This study aims to evaluate the effect of treatment with oral insulin nanocapsules in hyperglycemic rats. Methods: Male Wistar rats, aged between 2 and 3 months, with the average weight of 300g, divided into 4 groups of 15 animals each, all received a conventional diet ad libitum, and hyperglycemia was induced through the administration of streptozotocin. The present study demonstrated that oral insulin administered through nanocapsules contributed to the decrease in serum triglyceride levels in hyperglycemic animals ( $p < 0.05$ ), also found a significant hypoglycemic effect in relation to those who received only the nanocapsules ( $p < 0.05$ ), in addition, were observed significant changes in the intestinal epithelium. Despite the findings in this study, more research is necessary to understand the effects of oral insulin on the intestinal epithelium.

**Keywords:** diabetes, intestinal epithelium, streptozotocin, oral insulin.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ominous Octet.....	17
Figura 2 - Estrutura e composição epitelial no intestino delgado .....	21
Figura 3 - Estrutura química da estreptozotocina .....	22
Figura 4 - Mecanismo de ação da stz .....	23
Figura 5 - Fotomicrografia do epitélio duodenal .....	29
Gráfico 1 - Peso corporal final .....	31
Gráfico 2 - Evolução do peso corporal .....	31
Gráfico 3 - Estoque de gordura .....	32
Gráfico 4 - Glicemia basal .....	34
Gráfico 5 - Teste de tolerância a glicose .....	35
Gráfico 6 - Teste oral de tolerância à insulina .....	36
Gráfico 7 - Perfil lipídico .....	38
Gráfico 8 - Peso do intestino .....	39
Gráfico 9 - Epitélio intestinal .....	41
Gráfico 10 - Epitélio ileal .....	42
Quadro 1 - Grupos de tratamento.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	American Diabetes Association
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
BGYR	By-pass gástrico em Y de Roux
DG	Diabetes gestacional
DM	Diabete Mellitus
DM1	Diabete Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
FFA2	free fatty acids do tipo 2
GLP1	Glucagon-like peptide 1
GLUT	Transportadores de glicose
IDF	International Diabetes Federation
MHC	Major histocompatibility complex
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young
NAD+	Nicotina adenina dinucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNP	Nanopartículas Poliméricas
PYY	peptídeo YY
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SGLT1	Cotransportador Na <sup>+</sup> /glicose 1
STZ	Estreptozotocina

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{l}$	microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
g	grama
mg/dL	miligramas por decilitro
UI	Unidades Internacionais
$\beta$	Beta

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>CAPÍTULO 1 - OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo Geral.....	16
1.1.2 Objetivos Específicos .....	16
1.2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.2.1 Diabetes .....	16
1.2.2 Papel do Epitélio Intestinal .....	19
1.2.3 Diabetização com Estreptozotocina .....	21
1.2.4 Insulina Oral .....	23
1.2.5 Nanocápsulas Poliméricas .....	24
<b>CAPÍTULO 2 – ARTIGO</b> .....	25
2.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	26
2.1.1 Obtenção das Nanocápsulas Poliméricas Contendo Insulina .....	26
2.1.2 Ensaio Animal.....	27
2.1.3 Indução da Hiperglicemia .....	27
2.1.4 Teste de Tolerância à Glicose .....	28
2.1.5 Análise Bioquímica .....	28
2.1.6 Análise Histológica .....	28
2.1.7 Análise Estatística .....	29
2.2 RESULTADOS.....	29
2.2.1 Peso Corporal.....	29
2.2.2 Gordura.....	32
2.2.3 Glicemia.....	33
2.2.4 Tolerância a Glicose.....	34
2.2.5 Teste de Tolerância à Insulina.....	35
2.2.6 Colesterol/Triglicerídeos.....	36
2.2.7 Peso Intestino (Duodeno, Jejuno e Íleo).....	38
2.2.8 Cripta/Vilos .....	39
<b>CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>APÊNDICE A – DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	50
<b>ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA</b> .....	51

## INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é, possivelmente, uma das doenças mais antigas conhecidas pelo homem. Algumas peculiaridades muito parecidas ao DM foram descritas pelos egípcios 3000 anos atrás. (AHMED, 2002).

O Diabetes compreende um grupo de distúrbios metabólicos, que tem como característica principal a hiperglicemia. Fundamentalmente, apresenta alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas; apresenta deficiência na secreção da insulina pelo pâncreas e/ou uma deficiência na ação da insulina, e, com o tempo pode afetar a função e a estrutura vascular de diferentes órgãos, principalmente os olhos, rins, sistema nervoso, coração e vasos sanguíneos. (DIAS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2012; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014;).

É uma doença crônica, complexa, que exige atenção médica contínua com estratégias multifatoriais para reduzir o risco, não visando somente o controle glicêmico, e está associada a alguns fatores de risco como a obesidade, histórico familiar, sedentarismo ou diabetes gestacional. (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Dados alarmantes demonstram que, em 2017, existiam aproximadamente, 425 milhões de adultos, entre 20 a 79 anos, diabéticos no mundo, sendo que a perspectiva é que esse número aumente para 629 milhões até 2045. A proporção de pessoas com DM 2 na maioria dos países, está aumentando e mais da metade dos adultos com diabetes vivem em países com baixa e média renda. O maior número de casos da doença concentrou-se na faixa etária entre 40 e 59 anos, e o quadro se agrava quando observamos os estragos causados pelas complicações da doença, que chegaram a 4 milhões de mortes no ano de 2017 e pelo menos US \$ 727 bilhões em gastos com saúde nesse mesmo ano. O Brasil ocupa o 4º lugar entre os 10 Países com maior número de pessoas com diabetes, em 1º lugar está a China, seguida pela Índia (2º) e Estados Unidos (3º), sendo aproximadamente, 12,5 milhões de pessoas com esse diagnóstico. (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

De acordo com dados da Linha Guia de diabetes mellitus do Estado do Paraná (PARANÁ, 2018, p. 13), o número de óbitos por DM entre 2014 e 2016, foi de 3400 mortes por ano, aproximadamente, ou seja, 9 mortes por dia. O número de internações

no SUS entre 2012 e 2016 foi de 42.055, e nos últimos três anos a taxa de mortalidade se manteve.

O DM não é apenas um problema de saúde pública, é uma tragédia social no mundo todo. Por ser uma doença crônica ocasiona muito sofrimento pessoal e, devasta as famílias. (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Diversos aspectos relacionados à sua patogênese permanecem desconhecidos e muitas hipóteses foram e tem sido estudadas tentando estabelecer uma correlação entre o trato gastrointestinal e o DM.

Compreender melhor como ocorre o processo de absorção intestinal do açúcar é muito importante para o controle e tratamento das patologias como a obesidade e o diabetes, reduzindo, desta maneira, as possíveis complicações. (DROZDOWSKI, 2006). Recentemente, foi demonstrado, que o by-pass duodeno jejunal, induziu uma redução de 50% da absorção de glicose mediada por SGLT1, em enterócitos de duodeno e jejuno. (JUROWICH et al., 2013).

Santoro et al. (2008) destacam a inadequação do trato digestivo humano ao padrão alimentar atual, que é rico em alimentos com carga índice glicêmico altos, como fator preponderante para o aumento da obesidade e diabetes na população. Entre o amplo leque de doenças associadas à obesidade, a DM2 é a que apresenta melhor controle após a cirurgia bariátrica. (CUMMINGS, 2004). Em estudo realizado, onde acompanharam 275 pacientes que foram submetidos ao procedimento by-pass gástrico em Y de Roux, além da perda de peso, evidenciaram, após acompanhamento durante 1 ano, que os pacientes apresentavam uma melhora na maioria das comorbidades, ou ainda, que estas foram resolvidas totalmente, e aproximadamente 95% destes pacientes relataram uma melhora significativa na qualidade de vida. (SCHAUER et al., 2000). De acordo com Cummings et al. (2004), o procedimento by-pass gástrico em Y de Roux (BGYR) é um método bastante eficaz para reverter o DM. Os mecanismos que podem explicar a melhora no quadro do DM em pacientes que passaram por procedimentos restritivos como o by-pass incluem: a) perda de peso; b) diminuição da ingestão de calorias; c) alterações na secreção de hormônio pelo intestino ocasionado pelo desvio. (SCHAUER et al., 2003).

Outros dados evidenciam o papel do trato digestivo na evolução do diabetes, como a melhora da hiperglicemia nas primeiras semanas após cirurgias bariátricas, antes que os pacientes percam peso, sugerindo assim, que a remodelação do trânsito

alimento intestinal apresenta papel preponderante neste desfecho. Além disso, terapias que envolvem a modulação ou administração exógena de agonistas de um hormônio produzido no intestino delgado, o glucagon-like peptide 1 (GLP-1), compreendem a última geração de medicamentos para o tratamento do distúrbio metabólico (SJÖSTRÖM et al., 2004; DRUKER, 2011).

Sabe-se, que diabéticos tem menores concentrações de GLP-1 plasmático, principal incretina do nosso organismo. (VILSBOLL et al., 2001). As incretinas são importantes para a homeostase glicêmica, já que incrementam a secreção de insulina pelo pâncreas. (DRUKER, 2011). A baixa concentração desse entero-hormônio, dentre outras causas, pode ser resultado de uma maior capacidade absorptiva do intestino proximal no diabético. Fortalecendo, ainda, a importante correlação entre o trato digestivo e o desenvolvimento de DM2.

Sukhotnik et al. (2011), ao analisar o papel de fatores hormonais, mostraram que a administração oral de insulina promoveu uma reversão da hiperplasia intestinal diabética, inibindo a proliferação celular e o crescimento intestinal no diabetes induzido, pois histologicamente, o tratamento com insulina nos ratos mostra um decréscimo na altura das vilosidades em comparação com os animais diabéticos não tratados.

Observou-se um efeito inibitório da insulina na proliferação do enterócito, que pode ser resultado de uma “*down regulation*” de receptores de insulina no epitélio. Apesar de ser destruída no ambiente ácido do estômago, fragmentos de insulina, biologicamente ativos, ou moléculas de insulina intactas, podem ter modulado a proliferação celular do intestino diabético. (SUKHOTNIK et al., 2011). Os dados então sugerem, um papel dos níveis de insulina circulante, assim como, da expressão de receptores insulínicos na etiologia da hiperplasia intestinal diabética.

Adachi et al. (2003), realizaram estudos em diversos modelos experimentais diabéticos, como o Goto-Kakizaki, rato não obeso e diabético. Nos experimentos foram evidenciados um aumento natural das vilosidades intestinais durante o desenvolvimento dos animais, e conseqüente, aumento da capacidade absorptiva. O resultado foi verificado tanto em ratos modelos experimentais de DM1 (hipoinsulinêmicos) como nos DM2, em relação ao grupo controle. Nos animais diabéticos também houve um aumento da quantidade e atividade das enzimas



sucrase e isomaltase, em relação aos animais controle, justificando, uma maior capacidade absorptiva.

Verdam et al. (2011) publicaram trabalho mostrando que pacientes obesos diabéticos tem maior massa intestinal que pacientes obesos pareados não diabéticos. Dyer et al. (2003) justificam a maior capacidade absorptiva intestinal pela maior expressão de transportadores de monossacarídeos SGLT1, GLUT5, GLUT2 na mucosa intestinal diabética.

As proteínas como a insulina apresentam baixa biodisponibilidade oral, por conta da sua inerente falta de permeabilidade através do epitélio intestinal, sendo assim, desenvolver um sistema que visa fornecer insulina por via oral requer um conhecimento amplo sobre o microambiente da mucosa e fisiologia intestinal. (FONTE et al., 2013, p. 521).

Geralmente, a insulina é administrada via subcutânea, o que minimiza a morbimortalidade, contudo, uma média de 60 % dos pacientes não consegue atingir a longo prazo um nível satisfatório de controle glicêmico. (SAADDINE et al., 2006). Essa dificuldade no controle glicêmico pode ser decorrência da complexidade na administração do tratamento com a insulina, a fase tardia em que a insulina pode ser prescrita, o receio de crises de hipoglicemia e ganho de peso, e ainda, a utilização de agulhas. Diferentes vias de administração da insulina estão sendo testadas na tentativa de superar estes obstáculos no controle do diabetes, e a via oral, continua sendo a favorita para a administração de medicamentos, em razão de ser menos invasiva. (HEINEMANN; JACQUES, 2009).

Diante do que estes estudos revelam, pode-se deduzir que a atuação do trato gastrointestinal no desenvolvimento do diabetes, está cada vez mais instituído, sendo necessário, maior aprofundamento nas pesquisas sobre os mecanismos intrínsecos relacionados à patologia da síndrome metabólica.

## CAPÍTULO 1 - OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 OBJETIVOS

#### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração de Nanocápsulas gastroresistentes de insulina, via oral, em ratos.

#### 1.1.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da administração oral de nanocápsulas de insulina em animais normoglicêmicos e hiperglicêmicos;

Avaliar os valores bioquímicos de colesterol e triglicerídeos;

Avaliar, histologicamente, o efeito das nanocápsulas de insulina no epitélio intestinal;

Avaliar o desenvolvimento ponderal dos animais testados;

Avaliar diferença do peso do duodeno, jejuno e íleo e do intestino delgado total entre os diferentes grupos;

### 1.2 REVISÃO DA LITERATURA

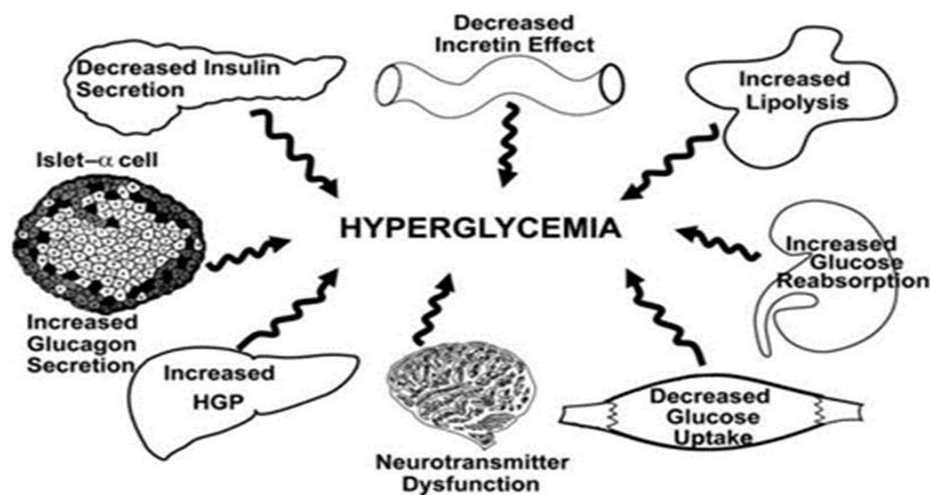
#### 1.2.1 Diabetes

Kaur et al. (2018), se referem ao diabetes como uma doença crônica grave, que pode ocorrer quando o pâncreas não produz insulina suficiente, ou, quando o corpo não utiliza efetivamente a insulina que produz, como consequência, pode levar ao desenvolvimento de doenças incapacitantes, que podem colocar em risco a vida do paciente, contudo, se o diabetes for monitorado corretamente, essas doenças podem ser prevenidas ou adiadas.

A fisiopatologia do diabetes é bastante complexa. Por muito tempo, acreditaram que a resistência à insulina e a queda progressiva da função das células beta pancreáticas, formavam o principal mecanismo envolvido para sua origem, contudo, sabe-se que o processo de diabetização ultrapassa isso, envolvendo mecanismos de

lipólise, hipersecreção de glucagon, aumento da reabsorção renal de glicose, aumento da produção hepática de glicose, disfunção de neurotransmissores e alterações gastrointestinais (deficiência/resistência incretínica). Os oito elementos acima citados constituem o chamado “*Ominous octet*” (Figura 1). (DEFRONZO, 2009; JUROWICH, 2013).

FIGURA 1: OMINOUS OCTET



Fonte: DEFONZO, R. A. From the triumvirate to the “ominous octet”: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, v. 58, p. 773- 795, April, 2009.

A insulina é um hormônio anabólico fundamental para a manutenção da homeostase da glicose, bem como, do crescimento e diferenciação celular. É secretado pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas, logo após as refeições, como resposta ao aumento da concentração dos níveis de glicose e aminoácidos circulantes. (MARTINS, 2016).

A falta da insulina ou a incapacidade das células de responder a ela, ocasiona uma elevação do nível de glicose no sangue ou o que conhecemos como hiperglicemia, que é a principal característica do diabetes. Essa hiperglicemia, se não controlada, a longo prazo pode acarretar inúmeros danos a vários órgãos do corpo, provocando o desenvolvimento de doenças incapacitantes e perigosas para a sobrevivência, como doenças cardiovasculares, neuropatia, nefropatia ou doenças oculares que terminam em retinopatia e cegueira, contudo, se o diabetes for corretamente tratado, essas complicações graves podem ser adiadas ou impedidas.

(INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017 p. 16).

Em situações de normalidade a concentração plasmática de glicose fica entre 70 a 120mg/dl, essa euglicemia se mantém por intermédio de três processos distintos: a ingestão de carboidratos, a produção endógena de glicose e a utilização periférica desta glicose. Cinco a seis horas após uma refeição, não havendo mais ingestão alimentar, o estado de jejum pós-absortivo é basicamente um equilíbrio entre a produção e a utilização de glicose. A glicogenólise hepática observada no estado pósabsortivo inicial, é a responsável pela maior parte da produção da glicose endógena. O estado de jejum persistindo a gliconeogênese se torna importante para manter o equilíbrio, trata-se de um processo metabólico, onde o organismo produz sua própria glicose a partir de fontes que não os carboidratos. Para a manutenção da euglicemia, cinco hormônios são muito importantes: a insulina, o glucagon, a epinefrina, o cortisol e o hormônio do crescimento. A insulina é responsável por baixar os níveis da glicose no sangue através da estimulação de sua captação e utilização pelas células, e, restringindo sua produção endógena. Os demais são hormônios contrarreguladores, opõem-se ao metabolismo da insulina. (KOCHAR, 2003).

A classificação e o diagnóstico do diabetes tem sido objeto de muitos estudos, debates e revisões durante muitas décadas por serem muito complexos. Atualmente o DM é classificado de acordo com a sua etiologia. (OLIVEIRA; VENCIO, 2016, p. 19; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

Diabetes tipo 1, é caracterizada pela destruição das células  $\beta$  produtoras de insulina e localizadas nas ilhotas pancreáticas e isto ocorre por uma reação autoimune na qual o sistema imunológico ataca as células  $\beta$  do organismo. Como resultado deste processo o corpo produz pouco ou nenhuma insulina, acarretando uma deficiência absoluta ou parcial do hormônio. Os motivos destes processos destrutivos ainda não são bem esclarecidos, mas sabe-se que envolve uma combinação de suscetibilidade genética e estímulos ambientais, como por exemplo, infecções virais, toxinas ou hábitos alimentares. (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017, p. 17).

Diabetes tipo 2, caracterizada por um defeito na secreção da insulina ou na ação periférica do hormônio, a DM2 tem sido e ainda continuará a ser, motivo de discussões. O fato é que a DM2 compreende entre 80% a 90% de todos os casos de diabetes. A maioria das pessoas com DM2 apresentam obesidade intra-abdominal (visceral), que está ligada a resistência à insulina, e frequentemente estes indivíduos

apresentam também hipertensão e dislipidemia (triglicerídeos altos e baixos níveis de HDL-colesterol; hiperlipidemia pós-prandial). A DM2 é a forma mais comum de diabetes e está associada ao histórico familiar, idade avançada, obesidade e falta de exercícios. (BAYNES, 2015).

Diabetes gestacional (DG), diagnosticado no 2º ou 3º trimestres da gravidez, potencialmente reversível. Se manifesta durante a gravidez e tem associação com intolerância à ação da glicose. Gestantes que desenvolveram a DG, apresentam um risco maior de desenvolver a DM2 nos anos seguintes. (SOCIEDADE PORTUGUESA DE DIABETOLOGIA, 2014; DIABETES CARE, 2019).

A Sociedade Brasileira de Diabetes (2019), indicou critérios para o diagnóstico clínico do diabetes mellitus, que são igualmente sugeridos pela Associação Americana do Diabetes (ADA), considerando pelo menos uma das seguintes condições: hemoglobina glicada (Hb A1c)  $\geq 6,5\%$ , glicemia de jejum  $\geq 126$  mg/dL (jejum calórico de no mínimo 8h), glicemia  $\geq 200$  mg/dL duas horas após a administração de uma sobrecarga de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose anidra em água e, por fim, a dosagem de uma glicemia aleatória  $\geq 200$  mg/dL em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia.

A atenção à saúde do paciente realizada de forma correta, resultará em uma prevenção efetiva do diabetes, e quando fala-se do diabetes, estamos falando em prevenção no seu início (prevenção primária), prevenção das complicações agudas e crônicas (prevenção secundária), ou ainda, em reabilitação e restrição das incapacidades produzidas pelas complicações da doença (prevenção terciária). (OLIVEIRA; VENCIO, 2017).

### 1.2.2 Papel do Epitélio Intestinal

O intestino delgado estende-se do piloro até o ceco e sua função é de digestão e absorção dos alimentos. Seu epitélio é do tipo cilíndrico alto, formado por células cilíndricas que apresentam função absorptiva e células caliciformes que produzem o muco com função de lubrificar a mucosa intestinal. O epitélio apresenta ainda, estruturas importantes como as vilosidades e a cripta de Lieberkühn. (COELHO, 2005).

O epitélio intestinal a partir do duodeno até o cólon é formado por células chamadas enterócitos, que estão ligadas entre si por junções bem estreitas. O epitélio intestinal é responsável por várias funções, entre elas o transporte e metabolismo de nutrientes. (ARAÚJO; MARTEL., 2009).

O trato digestivo tem um papel muito importante para o sistema imunológico do organismo e está sempre sendo exposto a antígenos estranhos e outros agentes ambientais. Os processos imunológicos, em sua maioria, ocorrem na mucosa, que é formada pelo epitélio, a lâmina própria subjacente e a mucosa muscular (Figura 2). (MOWAT; AGACE, 2014). O sistema de defesa intestinal é composto por algumas células importantes que tem como característica uma alta taxa de renovação celular. (OLIVEIRA; HAMMES, 2016). Os Enterócitos, representam cerca de 80% de todas as células epiteliais no intestino, elas apresentam junções apertadas bastante eficientes que auxiliam na separação entre conteúdos luminiais e o interior do epitélio, podem atuar como células apresentadoras de antígenos, expressando moléculas MHC (major histocompatibility complex) classe II e receptores do tipo Tol. (RAMIRO et al., 2008). Os enterócitos também estão relacionados ao transporte de glicose através das proteínas SGLT-1 (Co transportador Na<sup>+</sup>/glicose 1) e GLUT-2 (Transportador de glicose 2), o SGLT-1 é expresso no intestino delgado. (BURANTE, 1996; WRIGHT, et al., 2003; OKAMOTO, 2007). As Células caliciformes, são as responsáveis pela produção de mucina intraluminal. As mucinas, eletrólitos e proteoglicanos, compõem o muco que reveste a superfície das vilosidades intestinais, mantendo os inúmeros patógenos separados do epitélio. Este muco pode também aprisionar antígenos e bactérias que podem ser hidrolisados para ficarem menos alergênicos ou ser excretados com auxílio dos movimentos peristálticos intestinais. (ACHESON, 2004; ABBAS et al, 2011). As células enteroendócrinas, são responsáveis pela secreção dos hormônios intestinais. (OLIVEIRA; HAMMES, 2016). A célula de Paneth, são responsáveis pela produção das proteínas antimicrobianas que irão auxiliar na defesa contra micro-organismos invasores. Elas criam uma primeira linha de defesa contra a invasão microbiana. (NATIVIDAD, 2012).

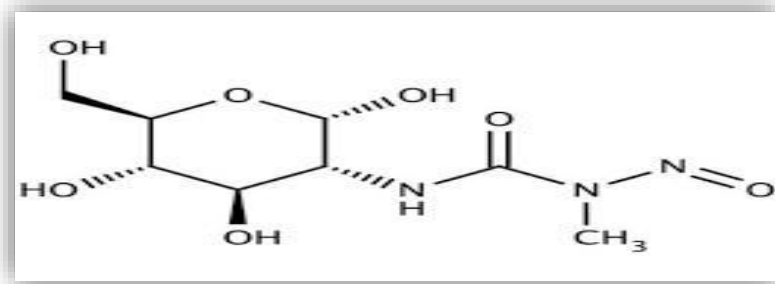
As células L, são células enteroendócrinas, encontradas no íleo e cólon, elas produzem e liberam o peptídeo semelhante ao glucagon (glucagon-like peptide, GLP1) e o peptídeo YY (PYY). O GLP-1 é um hormônio que estimula a liberação da insulina, apresentando um efeito antidiabético, já o PYY, é um hormônio anorexígeno, que pode



Em experimentos onde o diabetes tipo 1 é induzido quimicamente, uma grande quantidade de células  $\beta$  endógenas são destruídas e como consequência pouca insulina endógena é produzida o que leva a hiperglicemia e perda de peso. A indução química do diabetes proporciona um modelo simples e economicamente mais acessível, podendo ser utilizada em roedores e outros animais de maior porte. (DUFRANE et al., 2006). A indução química do diabetes é adequada para testar drogas ou terapias onde o que se espera é baixar a glicose no sangue de forma não-beta-celular dependente, como por exemplo, para testar novas fórmulas de insulina. (JEDERSTROM et al., 2005; SHESHALA et al., 2009).

A Estreptozotocina, estreptozocina, Izostazin ou zanosar (STZ) é um derivado de glucopirranose nitrosoureido sintético isolado de fermentações do *Streptomyces achromogenes* que vem a ser um antibiótico anti-tumor. A Estreptozotocina impede a síntese de ADN em células de mamíferos e células bacterianas. (JOURNAL OF NORTH AMERICA, 2010). Quimicamente a STZ (Figura 3) é um glicosídeo análogo a metilnitrosuréia, capaz de inibir a síntese de insulina. É uma molécula semelhante a glicose, apresenta efeito citotóxico nas células  $\beta$ -pancreáticas. (LENZEN, 2008).

**FIGURA 3:** ESTRUTURA QUÍMICA DA ESTREPTOZOTOCINA

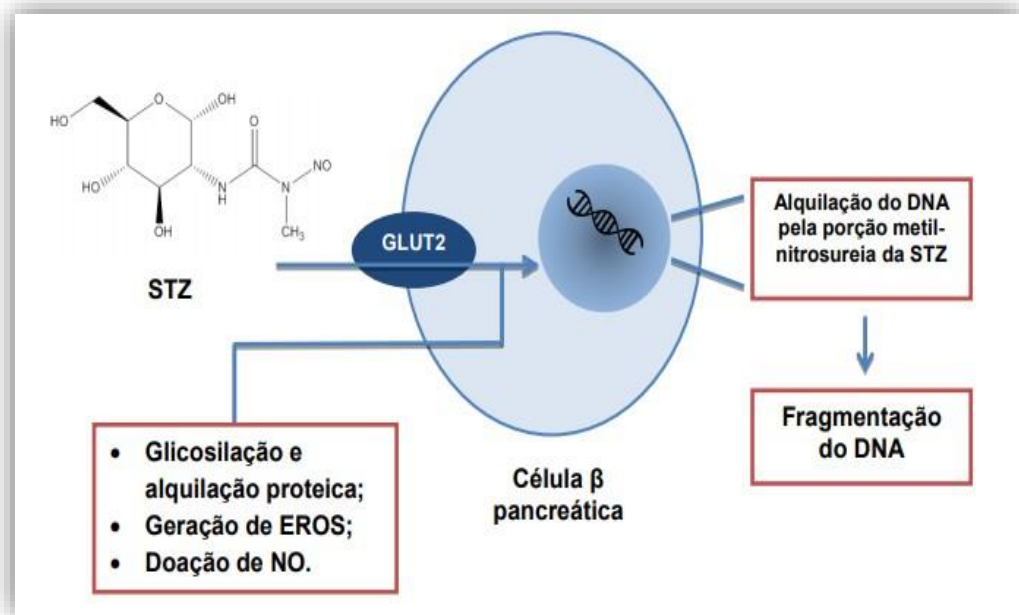


Fonte: LENZEN, S. **The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes.** Diabetologia, v. 51, p. 216–226, 2008.

A STZ é conduzida para o meio intracelular pelo transportador de glicose, isoforma 2 (GLUT2), e irá induzir reações de alquilação que será responsável pela fragmentação do ácido desoxirribonucleico (ADN) (Figura 4). Produzirá ainda a metilação, a redução dos níveis da nicotina adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) e posterior depleção dos estoques energéticos de adenosina trifosfato (ATP). Esta sucessão de eventos está ligada a necrose celular. (LENZEN, 2008; VAREDA, 2013).



**FIGURA 4: MECANISMO DE AÇÃO DA STZ**



Fonte: AL-AWAR, A. et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016.

Segundo Sukhotnik et al. (2011), a indução do diabetes pela STZ, ocasiona o crescimento da mucosa intestinal e aumenta a renovação celular dos enterócitos.

#### 1.2.4 Insulina Oral

A insulina foi isolada pela primeira vez no ano de 1921, por Banting e Best, contudo, a sequência de aminoácidos só foi esclarecida 35 anos mais tarde por Sanger. Ela foi a primeira proteína que teve sua estrutura explicada e com isso permitiu a análise de muitos outros polipeptídios e proteínas biologicamente ativos. (GOULÃO, 2007).

Para o controle do DM1 é usualmente utilizada a injeção subcutânea de insulina diariamente, porém, esse tratamento é de difícil adesão do paciente pelo fato da inconveniência relacionada com a administração de insulina. Além do stress psicológico, muitas vezes causado pela agulha e a dor, existem outros efeitos secundários relacionados, como, ganho de peso, hipoglicemia, edema e lipodistrofia, que estão relacionados a injeção subcutânea de insulina. Para tentar resolver esta dificuldade, pesquisadores estudam um mecanismo de administração de insulina oral.

Esta insulina deverá apresentar similaridades com a função da insulina natural do corpo ou ser comparável as formas injetáveis (FU; QIU; RADICAN, 2009; KADIYALA, et al., 2014; PURNELL, et al., 2013).

Recentes pesquisas com ratos diabéticos, demonstraram que a insulina oral tem competência para modificar o comportamento do epitélio intestinal. (LIPINSK, et al., 2017).

Sukhotnik et al. (2011), concluiu que a administração da insulina oral em ratos, consegue reverter a hiperplasia intestinal diabética, possivelmente resultado de uma “*down regulation*” de receptores de insulina no epitélio.

#### 1.2.5 Nanocápsulas Poliméricas

A utilização de nanopartículas é um campo que está em constante expansão, apresentando um importante papel em várias áreas, como a medicina por exemplo. Estudos recentes mostram sua aplicação inclusive na administração de medicamentos. As Nanopartículas poliméricas (PNP), são partículas sólidas ou dispersões de partículas com tamanho entre 10–1000 nm. (MALLAKPOUR et al., 2016).

Podem ser sintetizadas por diferentes vias, mas, cada uma delas terá como objetivo o encapsulamento de agentes farmacêuticos e sua administração voltada para fins terapêuticos. (BOLLHORST et al., 2017).

As PNP são consideradas uma opção para a administração da insulina, pois aumentam a biodisponibilidade do medicamento. (FONTE, 2013; HIRLEKAR, 2017).

## CAPÍTULO 2 – ARTIGO

*Diabetes Mellitus* (DM) é uma doença metabólica crônica, relacionada com alguns fatores de risco tais como, obesidade, sedentarismo, história familiar ou diabetes gestacional. Quando não tratada adequadamente pode levar ao desenvolvimento de complicações graves, as quais podem ser fatais, gerando altos custos para os sistemas de saúde. (FONTE, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017).

Dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF), demonstraram que, em 2017, existiam aproximadamente 425 milhões de adultos, entre 20 a 79 anos, diabéticos no mundo, sendo que, a perspectiva é que esse número aumente para 693 milhões até 2045. (BAYNES, 2015; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

O tratamento do DM consiste em um sistema heterogêneo, que engloba medidas de educação em saúde, alimentação e atividade física, além da terapêutica medicamentosa. A última inclui o hormônio insulina, que podem ser utilizados de forma isolada ou combinados. (OLIVEIRA; VENCIO, 2017).

Apesar da grande capacidade desse hormônio em reduzir a morbidade e a mortalidade associada ao DM, a adesão ao tratamento com a insulina exógena é bastante deficiente. Tal fato decorre do desconforto e estigma associado ao uso subcutâneo desse fármaco. (CHEN, 2018).

A busca por novas alternativas não invasivas para a administração da insulina tem sido o objetivo de diversos estudos. A administração oral de medicamentos mostra-se viável para garantir que os pacientes tenham uma boa adesão ao tratamento. Porém, a administração oral de medicamentos proteicos/peptídicos, como a insulina, oferece uma baixa biodisponibilidade, devido a sua passagem ineficiente pelo ambiente e epitélio gastrointestinal. (FONTE, 2013; AL RUBEAAN et al. 2016; LIU, 2016).

Na tentativa de aumentar a adesão ao tratamento e melhorar a expectativa de vida dessa população, várias alternativas estão sendo desenvolvidas. O uso da nanotecnologia é um setor que vêm crescendo na área médica devido aos inúmeros benefícios como aumento da biodisponibilidade, biocompatibilidade, menor dose necessária e baixo custo para produção. (MALLAKPOUR et al., 2016).

As nanopartículas poliméricas consistem em sistemas de incorporação de fármacos compostas principalmente por polímeros biodegradáveis. O tamanho reduzido das nanopartículas permite que haja uma maior superfície de contato, com grande quantidade de ativo absorvido. Além disso, essa estrutura mantém a estabilidade de compostos, o tempo de retenção e a penetração intracelular. (DUBEY et al., 2012).

Dentre os polímeros largamente estudados para fim de liberação intestinal, os polímeros derivados do ácido metacrílico, metilmetacrilato e etilacrilato (denominados comercialmente como Eudragit, principalmente em sua formulação S100), são os mais adequados. Esse fato deve-se a dissolução desse polímero em soluções aquosas com pH maior que 7, o que permite a sua passagem pelo estômago de forma inalterada. (CHOURASIA; JAIN, 2003).

Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da administração oral da insulina nanoemcapsulada, através de parâmetros bioquímicos e ponderais, bem como, analisar a histomorfometria do intestino e das gorduras.

## 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1.1 Obtenção das Nanocápsulas Poliméricas Contendo Insulina

O polímero Eudragit® S100 foi previamente dissolvido em tampão fosfato pH 7,4. Em seguida, a insulina foi lentamente adicionada sob agitação magnética, com o auxílio de uma seringa. Essa formulação foi seca utilizando o equipamento *Spray Drying* – LABMAQ, modelo MSD 1.0 (Ribeirão Preto- Brasil). Foram utilizados os seguintes parâmetros operacionais: pressão de ar de atomização de 1,68 kgf.cm<sup>-2</sup>, vazão de 0,022 L.min<sup>-1</sup> e temperatura do ar de saída de 60 ± 5°C. Os pós secos foram cuidadosamente recuperados, pesados e armazenados sob refrigeração até o momento do uso. As nanopartículas sem a presença da insulina foram preparadas como controle negativo. As formulações foram obtidas em triplicata.

### 2.1.2 Ensaio Animal

O protocolo experimental foi previamente submetido à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) – Protocolo número 044/2018.

Foram utilizados 60 ratos Wistar machos, pesando aproximadamente 250 g, mantidos em gaiolas de plástico com ração comercial (Nutival®) e água *ad libitum*, temperatura ( $22 \pm 2$  °C) e ciclo claro/escuro de 12 horas controlados automaticamente. Os animais foram divididos igualmente em 4 grupos (quadro 1): grupo controle (CTRL), hiperglicêmicos (HG), hiperglicêmicos tratados nanopartículas polimérica (HG + NP) e hiperglicêmicos tratados com nanopartículas poliméricas contendo insulina (HG + NPI).

A solução ácida 0,1% foi utilizada como veículo para evitar a degradação polimérica e todos os grupos receberam diariamente 200 µl de solução durante 60 dias. Para os animais tratados com nanopartículas foi administrado concentração correspondente a 4UI.

O desenvolvimento ponderal foi acompanhado durante todo experimento.

Quadro 1: Grupos de tratamento

<b>GRUPO</b>	<b>TRATAMENTO</b>
Controle Normoglicêmico - <b>CTRL</b>	2UI HCL 0,1%
Controle Hiperglicêmico - <b>HG</b>	2UI HCL 0,1%
Hiperglicêmico + nanopartículas – <b>HG+NP</b>	4UI HCL 0,1% + NP
Hiperglicêmico + nanopartículas com insulina – <b>HG + NPI</b>	4UI HCL 0,1% + NPI

Fonte: A autora

### 2.1.3 Indução da Hiperglicemia

A hiperglicemia foi induzida utilizando duas aplicações de 30 mg/kg de estreptozotocina (Cayman chemical company – USA) por via intraperitoneal, com intervalo de 24h. A glicemia de jejum desses animais foi realizada após 1 dia para confirmação. Foram incluídos no trabalho somente animais com valores glicêmicos acima de 250 mg/dl em jejum de 6 horas.

#### 2.1.4 Teste de Tolerância à Glicose

O teste de tolerância à glicose foi realizado em todos os grupos administrando-se 2 mL de solução a 0,5 g/mL de glicose por gavagem. Nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos, a glicemia foi avaliada utilizando glicosímetro portátil (Accu chek® active).

#### 2.1.5 Análise Bioquímica

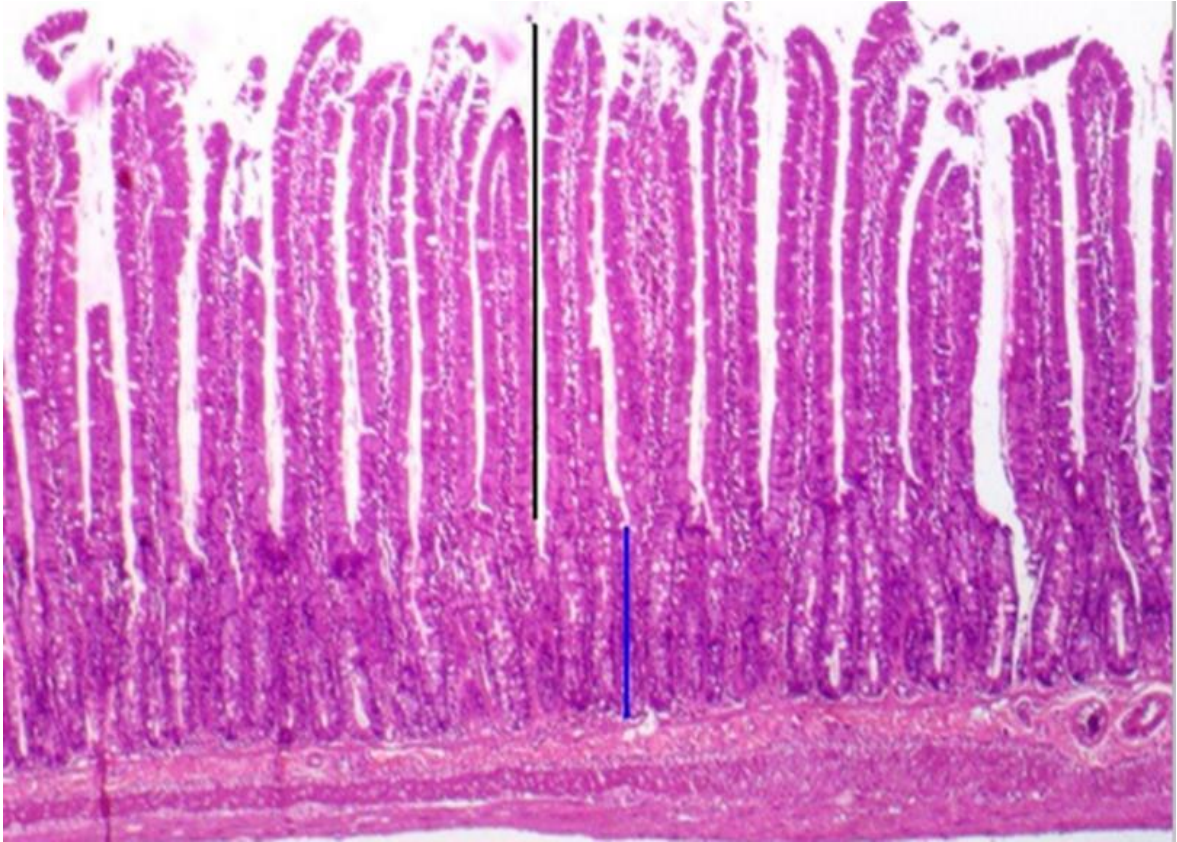
Após 60 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados com superdosagem de cloridrato de quetamina e xilazina, o sangue foi coletado por punção cardíaca, centrifugado em tubo gel separador por 10 min a 2500 rpm. O soro foi acondicionado em tubos de 2mL e mantidos sob refrigeração a - 80°C até o momento da análise. A determinação dos teores séricos de colesterol e triglicerídeos foram realizadas por metodologia enzimática colorimétrica, em analisador bioquímico semiautomático BIO PLUS 200, utilizando kit comercial Ebram produtos laboratoriais Ltda®.

#### 2.1.6 Análise Histológica

Após a eutanásia, foram retirados fragmentos de intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) com 10 cm cada e a totalidade das gorduras retroperitoneal, epididimal e mesentérica e pesados em balança de precisão e em seguida armazenadas em formol 10% para fixação.

O material foi processado, seccionado em micrótomo com espessura de 3 µm e corado com Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação do comprimento e largura do vilão e profundidade de cripta (fig. 5). Em seguida, as seções histológicas foram fotografadas com microscópio Olympus DP72 utilizando o programa CellSens Standard. As análises foram realizadas em triplicata.

FIGURA 5: FOTOMICROGRAFIA DO EPITÉLIO DUODENAL ANALISADA EM AUMENTO DE 10X.  
(L1- DISTÂNCIA ENTRE O ÁPICE DA VILOSIDADE E O INÍCIO DA SUBMUCOSA; L2- PROFUNDIDADE DA CRIPTA



Fonte: A autora.

### 2.1.7 Análise Estatística

A avaliação estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prisma Versão 7.0 pela análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguido de teste Kolmogorov-Smirnov, com intervalo de variância em 95% ( $p \leq 0,05$ ).

## 2.2 RESULTADOS

### 2.2.1 Peso Corporal

Todos os animais que receberam estreptozotocina (STZ) e foram considerados aptos para o estudo, apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) no desenvolvimento ponderal em relação ao controle (gráfico 1). Conforme observado no gráfico 2, após a indução com STZ os animais tiveram redução de peso nas primeiras 4 semanas, e nas 4 semanas seguintes mantiveram os pesos demonstrando uma adaptação.

No processo de indução química do diabetes tipo 1, muitas células  $\beta$  endógenas são destruídas, e desse modo, há pouca produção endógena de insulina, levando a hiperglicemia e perda de peso (KING, 2012), corroborando com os dados encontrados nesse trabalho.

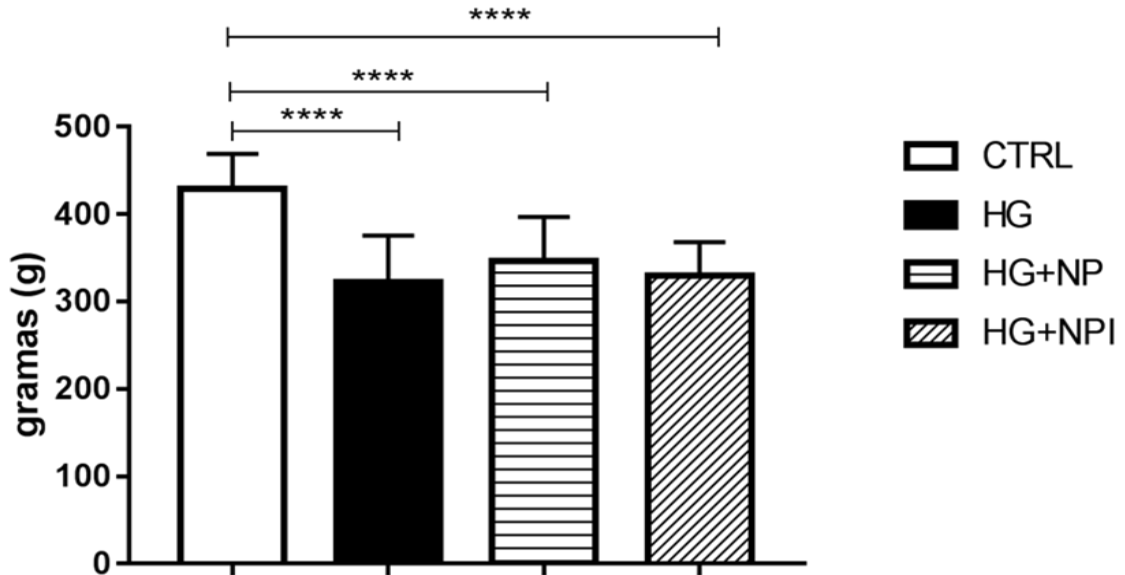
Conforme estudo realizado induzindo o diabetes tipo 2, através de dieta hiperlipídica e uma baixa dose de STZ em ratos Wistar, foi observado a redução na massa corporal destes animais, sem ganho expressivo ao longo do experimento. Essa perda de peso após a administração da STZ já era esperada, pois, a utilização desta em ratos, leva ao desenvolvimento de hiperglicemia, poliúria e a perda de peso. (CORREIA-SANTOS, 2012).

Similarmente, Rani et al. (2019), avaliaram os efeitos da utilização de nanopartículas com glicirrizina e timoquinona, em ratos Wistar fêmeas hiperglicêmicas e observaram diminuição de peso após administração da STZ e efeitos positivos do tratamento.

Sendo assim, os efeitos dos tratamentos no peso corporal dos animais, mostraram que, durante a primeira semana de tratamento, os animais diabéticos não demonstraram variação significativa no peso corporal, contudo, o peso dos animais do grupo HG, diminuiu significativamente a partir do 14º dia ( $p < 0.01$ ) e 21º ( $p < 0.001$ ) respectivamente, em relação aos grupos controle. Esses resultados demonstram que a indução a hiperglicemia utilizando a STZ leva a diminuição do peso corporal.

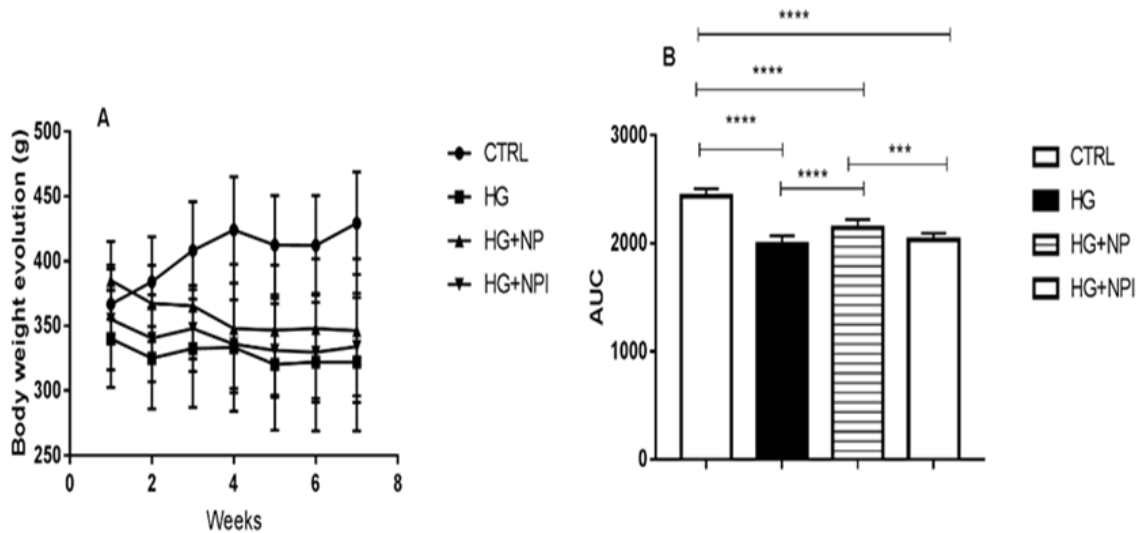


**GRÁFICO 1:** EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM NANOPARTÍCULAS CONTENDO INSULINA NO PESO CORPORAL FINAL DE ANIMAIS HIPERGLICÊMICOS. OS DADOS SÃO A MÉDIA  $\pm$  DPM. OS SÍMBOLOS SOBRE AS BARRAS INDICAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  E \*\*\*\* $P < 0.0001$



Fonte: A autora

**GRÁFICO 2:** EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM NANOPARTÍCULAS CONTENDO INSULINA SOBRE A EVOLUÇÃO DO PESO CORPORAL EM ANIMAIS HIPERGLICÊMICOS. OS DADOS SÃO A MÉDIA  $\pm$  DPM. OS SÍMBOLOS SOBRE AS BARRAS INDICAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS. A- EVOLUÇÃO DO PESO QUINZENAL; B- ÁREA SOB A CURVA DO GRÁFICO A. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  E \*\*\*\* $P < 0.0001$



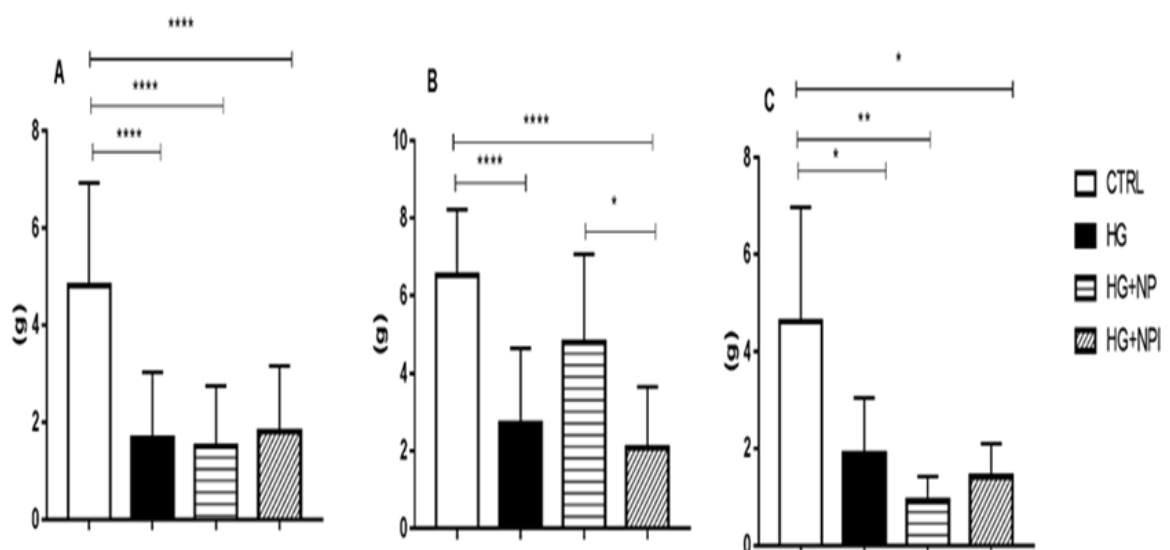
Fonte: A autora

### 2.2.2 Gordura

A redução do peso nas gorduras epididimais e mesentérica foi observada em todos os animais que receberam STZ em relação ao controle (gráfico 3). Os animais do grupo HG-NP apresentaram um aumento da gordura retroperitoneal em relação ao grupo HG-NPI (gráfico 3 B). Este fato pode ter ocorrido devido a estrutura do envoltório polimérico após ser degradado formar ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). O aumento da gordura retroperitoneal no grupo HG-NP no final do experimento reforça os dados encontrados no peso e a área sobre a curva.

Segundo Moreira et al. (2012), aproximadamente 90% dos AGCC são absorvidos por células presentes no cólon (colonócitos), o butirato por ex., é quase totalmente usado como fonte de energia nas células intestinais, e o restante irá atingir a circulação portal, sendo assim, os AGCC podem fornecer calorias a mais o que contribui para o ganho de peso na forma de gordura.

**GRÁFICO 3:** EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM NANOPARTÍCULAS CONTENDO INSULINA NO ESTOQUE DE GORDURA DE RATOS HIPERGLICÊMICOS. OS DADOS SÃO A MÉDIA  $\pm$  DPM. OS SÍMBOLOS SOBRE AS BARRAS INDICAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS. A- ESTOQUE DE GORDURA EPIDIDIMAL; B- ESTOQUE DE GORDURA RETROPERITONEAL E C- ESTOQUE DE GORDURA MESENTÉRICA. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  E \*\*\*\* $P < 0.0001$



Fonte: A autora

### 2.2.3 Glicemia

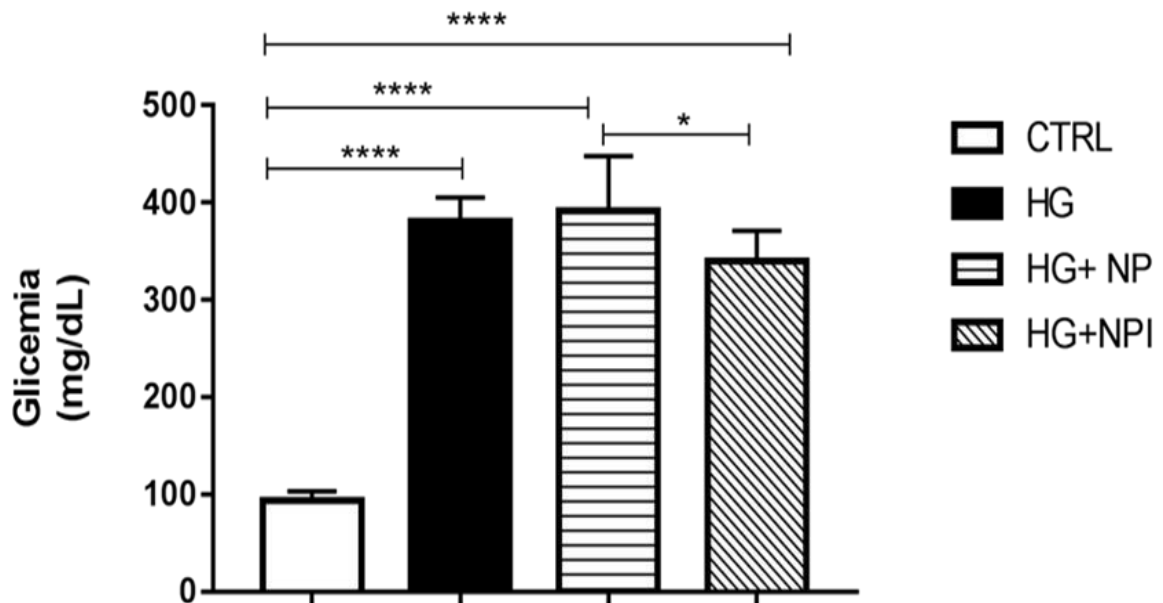
O gráfico 4 apresenta os dados de glicemia basal dos animais. Pode-se observar um efeito hipoglicemiante no grupo HG-NPI, estes animais tiveram redução significativa em relação ao grupo HG-NP ( $p < 0.05$ ). Esse efeito pode estar relacionado a absorção intestinal e liberação da insulina, já que o polímero apresenta características gastroresistentes, permitindo a liberação da insulina no intestino delgado.

Os resultados apresentados nesse trabalho corroboram com Malathi et al. (2015), que avaliaram a eficiência de nanopartículas de PLGA (Poly lactic-co-glycolic acid), na administração oral da insulina em ratos hiperglicêmicos induzidos com STZ, onde os níveis de glicose diminuíram significativamente em animais que receberam as nanopartículas com insulina oral, em comparação aos que receberam insulina livre. Em nosso trabalho a redução não foi tão acentuada, contudo a dose utilizada era 5 vezes menor.

Segundo Fang et al. (2019), obtiveram nanoesferas de fitalato de hidroxipropil metilcelulose e demonstraram que houve um efeito hipoglicemiante nos animais tratados com as nanopartículas. Esse resultado pode estar relacionado com a maior superfície de contato, devido ao menor tamanho de partícula e aumento da absorção de insulina pelo epitélio intestinal.

Do mesmo modo, Wu et al. (2012), desenvolveram nanopartículas contendo insulina, Eudragit RS e poli (ácido láctico co-glicólico) recobertas com fitalato de hidroxipropil metilcelulose. Os resultados mostraram que houve uma liberação maior da insulina em pH alcalino e os níveis de glicose no sangue permaneceram baixos por um tempo prolongado.

**GRÁFICO 4:** FEITO DO TRATAMENTO ORAL COM NANOPARTÍCULAS CONTENDO INSULINA NA GLICEMIA BASAL DE RATOS HIPERGLICÊMICOS. OS DADOS SÃO A MÉDIA  $\pm$  DPM. OS SÍMBOLOS SOBRE AS BARRAS INDICAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  E \*\*\*\* $P < 0.0001$



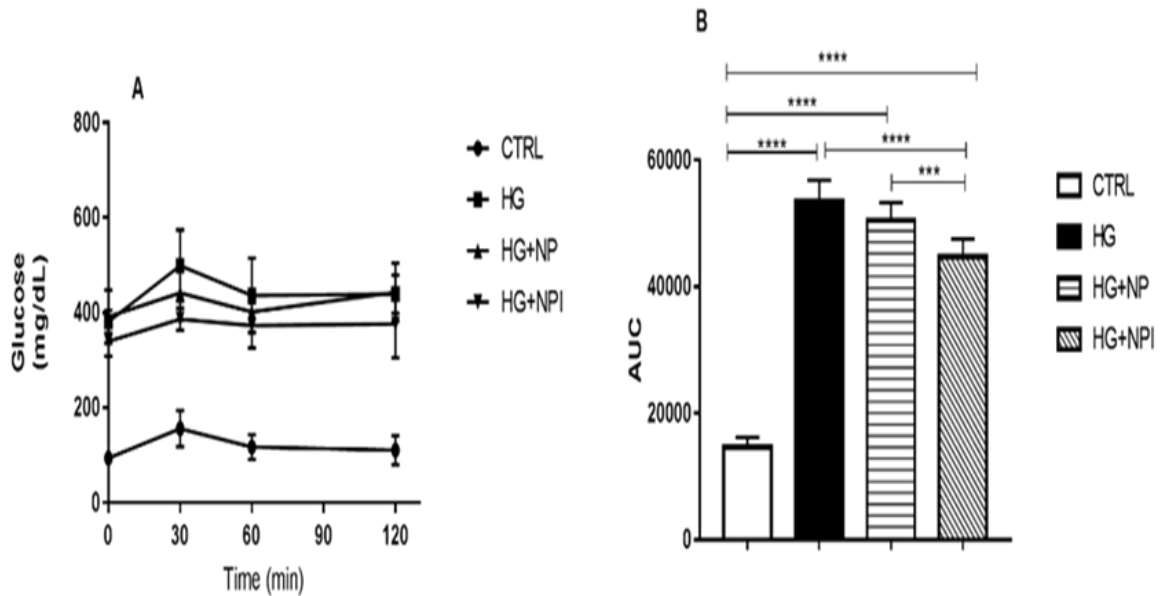
Fonte: A autora

#### 2.2.4 Tolerância a Glicose

O teste de tolerância a glicose mostrou que houve um aumento da glicemia em todos os grupos (gráfico 5).

O gráfico 5 apresenta os resultados do teste de tolerância a glicose. Pode-se observar que os grupos tratados com STZ mostraram um aumento pronunciado na glicemia durante o teste. O gráfico 5 B apresenta a área sob a curva do gráfico 5, pode-se observar que o grupo que recebeu nanocápsulas contendo insulina, apresentou uma discreta diminuição na área ( $p < 0.05$ ), mostrando que o tratamento com as nanocápsulas contendo insulina melhora a sensibilidade a insulina, melhorando consequentemente a resposta.

**GRÁFICO 5:** EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM NANOPARTÍCULAS CONTENDO INSULINA NO TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE DE ANIMAIS HIPERGLICÊMICOS. OS DADOS SÃO A MÉDIA  $\pm$  DPM. OS SÍMBOLOS SOBRE AS BARRAS INDICAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS. A- CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE POR TEMPO; B- ÁREA SOB A CURVA. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  E \*\*\*\* $P < 0.0001$

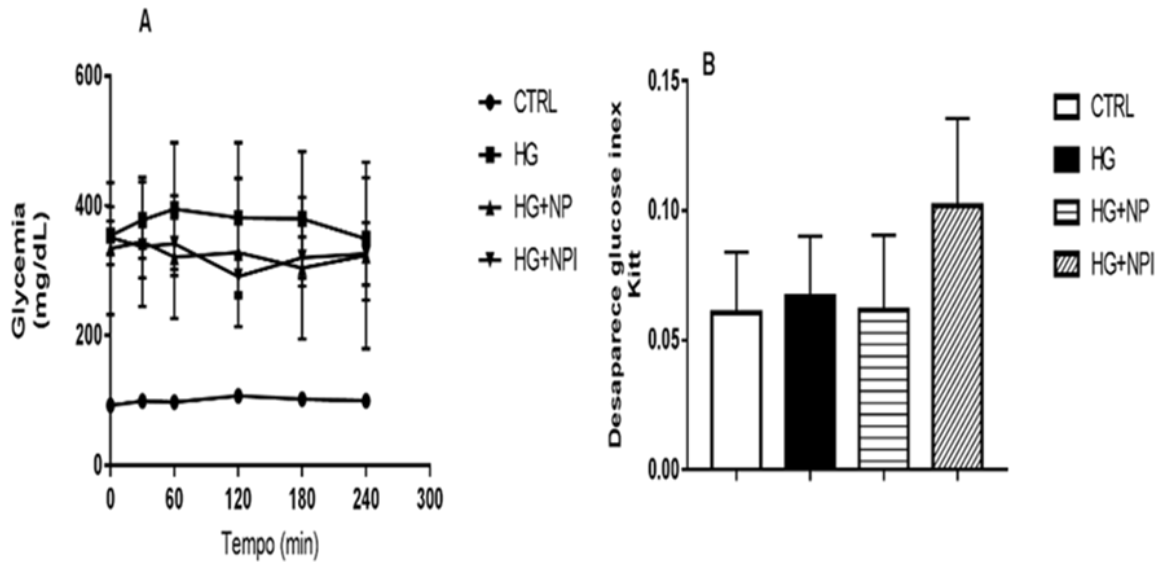


Fonte: A autora

### 2.2.5 Teste de Tolerância à Insulina

O gráfico 6 apresenta os dados do teste de tolerância oral à insulina. Pode-se observar no gráfico 6 A, que o grupo controle apresenta uma menor concentração de glicose durante todo o teste, já o grupo que recebeu STZ, todos os três grupos apresentaram aumento de glicemia durante todo o teste. O gráfico 6 B apresenta o índice de decaimento da glicose, por se tratar de um teste oral, onde os animais receberam a insulina por gavagem o decaimento da glicose foi semelhante em todos os grupos, não observamos um decaimento expressivo como ocorre quando a insulina é administrada por via parenteral.

**GRÁFICO 6:** FEITO DO TRATAMENTO ORAL COM NANOPARTÍCULAS CONTENDO INSULINA NO TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À INSULINA EM RATOS HIPERGLICÊMICOS. OS DADOS SÃO A MÉDIA  $\pm$  DPM. OS SÍMBOLOS SOBRE AS BARRAS INDICAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS. A- GLICEMIA EM TEMPO; B- ÍNDICE DE DESAPARECIMENTO DA GLICOSE. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  E \*\*\*\* $P < 0.0001$



Fonte: A autora

## 2.2.6 Colesterol/Triglicerídeos

O Gráfico 7 A apresenta os dados de colesterol total. O teste de ANOVA não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

Diabetes é um fator de risco isolado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares além de amplificar o efeito de outros fatores de risco como hipercolesterolemia. O fenótipo clássico da dislipidemia associada a diabetes é a presença de altos níveis de triglicerídeos e LDL-c e baixos níveis de HDL-c. Entretanto, o valor do colesterol total não apresenta alteração importante nos pacientes diabéticos em relação aos não-diabéticos. (MOORADIAN, 2009; SCHOFIELD, 2016).

O gráfico 7 B mostra que a concentração sérica de triglicerídeos encontra-se elevada no grupo HG em relação aos demais. O grupo HG-NPI apresentou diminuição na concentração sérica de triglicerídeos mantendo os níveis semelhante aos do grupo controle ( $p < 0.05$ ).

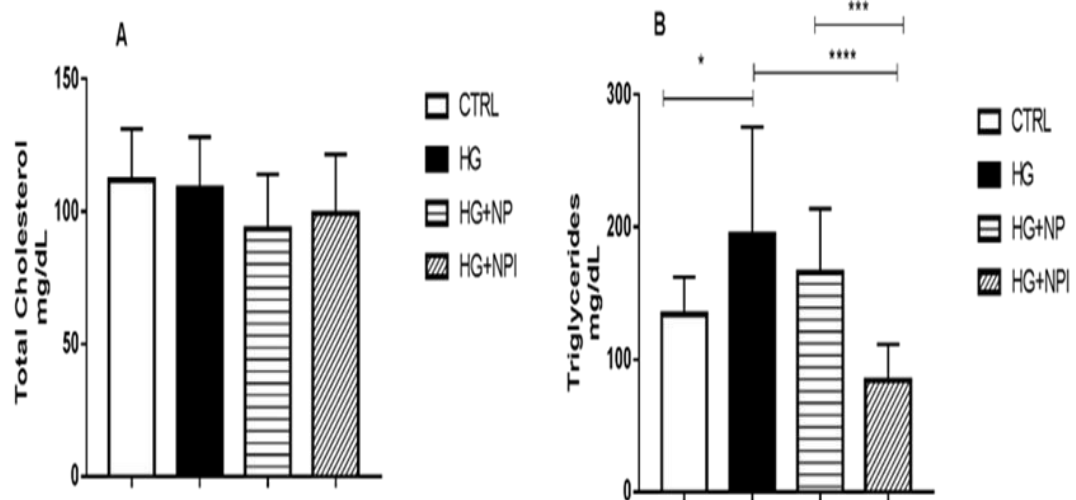
O *diabetes mellitus* está associado à vários distúrbios metabólicos, como o metabolismo lipídico que é muito afetado, conferindo níveis elevados de triglicerídeos e colesterol total, e baixos níveis de HDL-C. (Elberry, 2015).

Essa característica é consequência da deficiência de insulina, ou da resistência periférica a insulina, que leva ao aumento da atividade de lipases intracelulares, aumentando, assim, a quantidade de ácidos graxos não esterificados circulantes. Altos níveis circulantes desses ácidos graxos agem de forma a aumentar a produção hepática de triglicerídeos, associada a aumento da secreção de apolipoproteína B (apoB). (MOORADIAN, 2009; SCHOFIELD, 2016).

Enquanto as alterações da insulina estimulam a atividade de lipases intracelulares, há uma inibição da ação de lipases responsáveis por remover os triglicerídeos da circulação, contribuindo, então, para que haja um aumento lipídico pós prandial. A insulina, quando administrada por via subcutânea, tem como característica o aumento dos níveis de HDL-c e redução dos níveis circulantes de triglicerídeos. (MOORADIAN, 2009; SCHOFIELD, 2016).

Os resultados encontrados neste estudo para triglicerídeos, corroboram com Kumari, et al. (2020) que estudaram a utilização de nanopartículas contendo insulina em ratos hiperglicêmicos induzidos com STZ. A pesquisa demonstrou uma diminuição do triglicerídeo nos animais tratados com nanopartículas de ouro recoberta com polissacarídeo extraído da maçã.

**GRÁFICO 7:** FEITO DO TRATAMENTO ORAL COM NANOPARTÍCULAS CONTENDO INSULINA NO PERFIL LIPÍDICO DE ANIMAIS HIPERGLICÊMICOS. OS DADOS SÃO A MÉDIA  $\pm$  DPM. OS SÍMBOLOS SOBRE AS BARRAS INDICAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS. A- COLESTEROL TOTAL SÉRICO; B- TRIGLICERÍDEOS SÉRICOS. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  E \*\*\*\* $P < 0.0001$



Fonte: A autora

### 2.2.7 Peso intestino (Duodeno, Jejuno e Íleo)

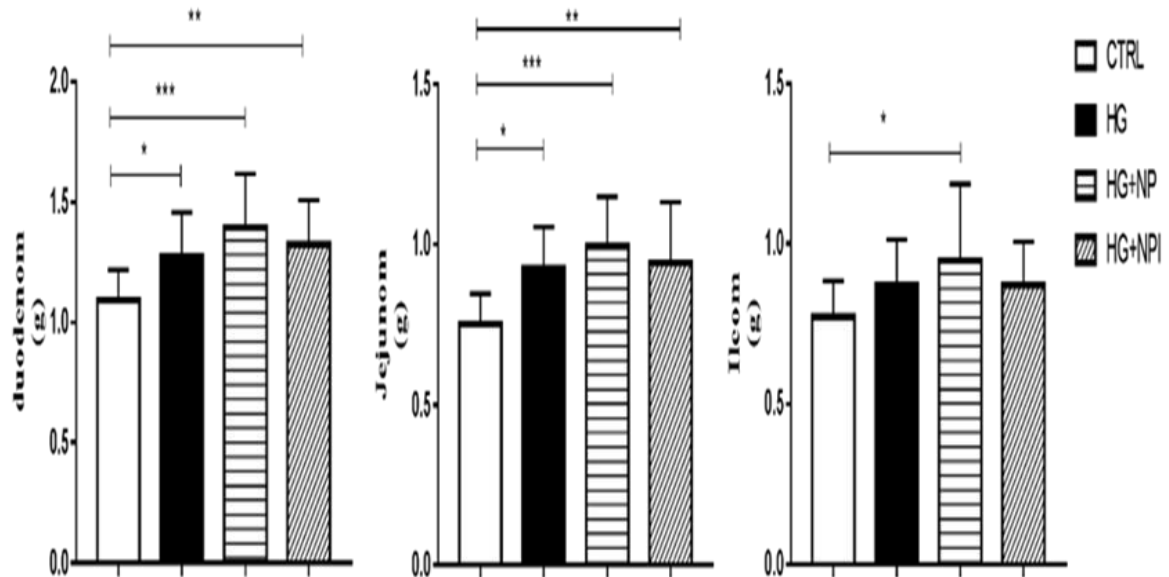
O gráfico 8 apresenta, respectivamente, os resultados obtidos pela comparação do peso da porção do duodeno, jejuno e íleo. Os animais hiperglicêmicos recebendo ou não tratamento tiveram as porções pesados do duodeno e jejuno mais pesados que no controle.

Ainda não existe uma unanimidade entre os pesquisadores quanto ao papel da insulina no epitélio intestinal, nem quanto aos mecanismos que estão relacionados a hiperplasia intestinal. Os animais tratados apenas com as nanocápsulas (HG-NP) tiveram um maior peso do íleo.

Sabe-se que a insulina administrada pela via oral tem um papel de modulação na proliferação celular no intestino diabético, revertendo a hiperplasia intestinal diabética, como resultado de uma inibição da proliferação e do crescimento celular. Macroscopicamente, essas alterações podem ser observadas pela alteração do peso intestinal dos ratos diabéticos tratados em comparação com aqueles não tratados. Microscopicamente, é possível visualizar a redução da altura das vilosidades intestinais dos animais tratados, sugerindo uma redução na superfície de absorção intestinal. (Sukhotnik et al., 2011).



**GRÁFICO 8:** EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM NANOPARTÍCULAS CONTENDO INSULINA NO PESO DO INTESTINO DE RATOS MACHOS HIPERGLICÊMICOS. OS DADOS SÃO A MÉDIA  $\pm$  DPM. OS SÍMBOLOS SOBRE AS BARRAS INDICAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS. A- PESO DUODENO; B- PESO JEJUNO E C- PESO ÍLEO. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  E \*\*\*\* $P < 0.0001$



Fonte: A autora

### 2.2.8 Cripta/Vilos

O gráfico 9, apresenta os resultados obtidos após o tratamento oral com nanopartículas contendo insulina, no epitélio duodenal de ratos hiperglicêmicos. O Gráfico 9 A demonstra o comprimento total da cripta. No gráfico 9 B pode-se observar que ocorreu uma diferença significativa entre o grupo controle e hiperglicêmicos ( $p < 0.05$ ), onde o tratamento com nanocápsulas de insulina reduziu o comprimento da cripta. O gráfico 9 C demonstra os dados de comprimento total.

Os animais dos grupos que apresentaram hiperglicemia tiveram um aumento do comprimento do vilos ( $p < 0,05$ ) na porção duodenal recebendo ou não tratamento. Os animais hiperglicêmicos (HG) apresentaram significativamente um aumento no comprimento da cripta em relação ao controle e aos animais tratados com nanocápsulas de insulina. Em relação ao comprimento total (vilos + cripta) não foi observado nenhuma diferença.

Diversos estudos mostram que a quantidade de glicose ingerida pode ter relação com o crescimento do epitélio intestinal. Esse crescimento ocorre nos segmentos mais proximais do intestino, onde a maior parte da glicose é absorvida.

Essa maior capacidade absorptiva das porções proximais do intestino delgado, pode estar relacionada com a menor secreção de GLP-1, incretina que é conhecida por estimular a sensação de saciedade. (OKAMOTO, 2014; CAZZO 2016).

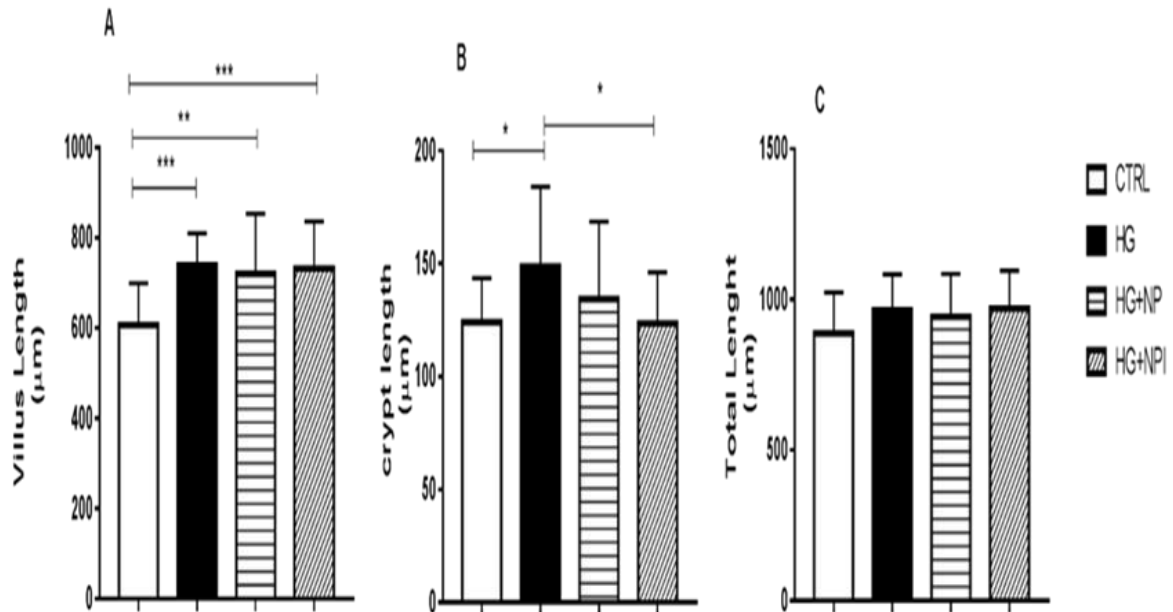
Conseqüentemente, a ausência desse hormônio levaria à hiperfagia e estimularia a proliferação celular. Esse dado, pode explicar o porquê de o segmento duodenal apresentar maior massa e comprimento dos vilos nos animais hiperglicêmicos observados nesse estudo.

Visto que, a hiperfagia é considerada um fator que dispõe à hiperplasia intestinal, e vale salientar que não constitui fato primário e, tão pouco, fator exclusivo na fisiopatologia desse achado. (NODA 2001).

Ainda, o GLP-1 vem sendo bastante estudado quanto a sua participação no desenvolvimento do DM, contudo, o GLP-2, outra incretina que pode estar associada com o processo da hiperplasia intestinal, devido aos efeitos tróficos sobre o epitélio, apresenta um crescimento da capacidade absorptiva do intestino, uma vez que, aumenta sua concentração. (CAZZO 2016).

A relação do GLP-2 com a hiperplasia intestinal é confirmada pelo fato de que o aumento desse hormônio pode preceder as mudanças no peso e nas vilosidades intestinais. (ZHAO, 2017).

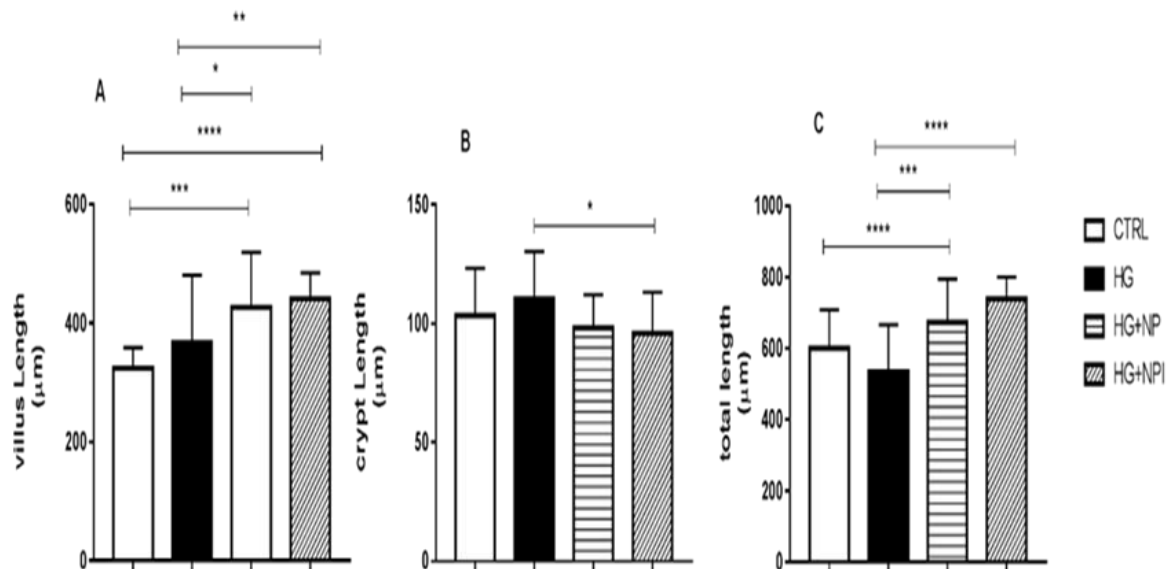
**GRÁFICO 9:** EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM NANOPARTÍCULAS CONTENDO INSULINA NO EPITÉLIO INTESTINAL DE RATOS HIPERGLICÊMICOS. OS DADOS SÃO A MÉDIA  $\pm$  DPM. OS SÍMBOLOS SOBRE AS BARRAS INDICAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS. A- COMPRIMENTO TOTAL DA VILOSIDADE B- COMPRIMENTO DA CRIPTA E C- COMPRIMENTO TOTAL. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  E \*\*\*\* $P < 0.0001$



Fonte: A autora

Na avaliação histológica do íleo (gráfico 10), os animais hiperglicêmicos que receberam tratamento (HG-NP e HG-NPI) apresentaram um maior comprimento de vilo em relação ao controle ( $p < 0,05$ ), (gráfico 10 A). O tratamento com nanocápsulas vazias ou com insulina reduziu o comprimento da cripta ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo HG (gráfico 10 B), contudo no comprimento total os animais que receberam tratamento mantiveram um comprimento maior em relação ao controle e ao grupo HG (gráfico 10 C).

**GRÁFICO 10:** EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM NANOPARTÍCULAS CONTENDO INSULINA NO EPITÉLIO ILEAL DE RATOS HIPERGLICÊMICOS. OS DADOS SÃO A MÉDIA  $\pm$  DPM. OS SÍMBOLOS SOBRE AS BARRAS INDICAM DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS. A- COMPRIMENTO DO VILO B- COMPRIMENTO DA CRIPTA E C- COMPRIMENTO TOTAL. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  E \*\*\*\* $P < 0.0001$



Fonte: A autora

Alguns resultados encontrados nesse trabalho reforçam e ampliam os resultados já encontrados por LIPINSKI et al. (2017), onde a administração de insulina regular por via oral promoveu alterações bioquímicas e teciduais, contudo neste trabalho a administração em forma de nanocápsulas em dose 5 vezes menores promoveram efeitos semelhantes.

## CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a utilização das nanocápsulas gastroresistentes contendo insulina, administrada via oral em ratos hiperglicêmicos, mostrou uma leve estabilização no peso corporal dos animais no decorrer do experimento. Os resultados também sugerem que a formulação das nanopartículas, podem ter influenciado no aumento da reserva de gordura retroperitoneal do grupo que recebeu as nanopartículas vazias. Foi observado que a administração da insulina oral em nanocápsulas, contribuiu para a diminuição dos níveis de glicose nos animais hiperglicêmicos, bem como, redução dos níveis de triglicerídeos nestes animais. Os animais que apresentaram hiperglicemia tiveram um aumento significativo no comprimento do vilo na porção duodenal, ainda, estes animais demonstraram um aumento no comprimento da cripta em relação aos animais controle e os animais tratados com nanocápsulas de insulina, não apresentando diferença significativa no comprimento total. Mais estudos são necessários para elucidar o papel da insulina oral na proliferação celular que ocorre no epitélio intestinal.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H.H., PILLAI, S. Regional immunity: specialized immune responses in epithelial and immune privileged tissues In: Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S, editores. **Cellular and molecular immunology**. 7th ed. Philadelphia: Saunders; p. 295-307, 2011.
- ACHESON, D.W., LUCCIOLI, S. Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol**, v. 18, n. 2, p. 387- 404, 2004.
- ADACHI, T.; MORI, C.; SAKURAI, K.; SHIHARA, N.; TSUDA, K.; YASUDA, K. Morphological changes and increased sucrose and isomaltase activity in small intestines of insulin- deficient and type 2 diabetic rats. **Endocrinology Journal**, v. 50, n. 3, p.271-279, 2003.
- AHMED, A.M. **History of diabetes mellitus**. Saudi Med J, Arabia, v. 23, n. 4, p. 373378, apr. 2002.
- AL-AWAR, A. et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, 2016.
- AL RUBEAN, K.; RAFIULLAH, M.; JAYAVANTH, S. Oral insulin delivery systems using chitosan-based formulation: A review. **Expert opinion on drug. delivery**, v. 13, n. 2, p. 223- 237, 2016.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes care**, v. 37, Suppl. 1, p. S81- S90, 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes care**, v. 42, Suppl. 1, p. S13- S28, 2019.
- ARAÚJO, J. R; MARTEL, F. Regulação da Absorção Intestinal de Glicose, Uma Breve Revisão, Departamento de Bioquímica (U38-FCT). **Arquivos de Medicina**, v. 23, n. 2, p. 35-43, 2009.
- BAYNES, H.W. Classificação, fisiopatologia, diagnóstico e tratamento de diabetes Mellitus. **J Diabetes Metab**, v.6, n. 5, p. 1- 9, 2015.
- BOLLHORST, T., REZWAN, K., MAAS, M. Colloidal capsules: nano- and microcapsules with colloidal particle shells. **Chem. Soc. Rev.**, v. 46, p. 2091-2126, 2017.
- BURANTE, C. Facilitative glucose transport. In: BITTAR, E. **Principles of Medical Biology**. Amsterdam: Elsevier BV, p.67-86, 1996.
- CAZZO, E., GESTIC, M.A., UTRINI, M.P., CHAIM, F.D.M., GELONEZE, B., PAREJA, J.C., CHAIM, E.A., MAGRO, D.O. GLP-2: um mediador pouco compreendido

envolvido em diversos mecanismos fisiopatológicos relacionados à cirurgia bariátrica/metabólica. **Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 29, n. 4, p. 272- 275, 2016.

CHEN, C.C., BAIKOGHLI, M.A., CHENG, R.H. Tissue targeted nanocapsids for oral insulin delivery via drink. **Pharm. Pa.t Anal.**, v. 7, n. 3, p. 121- 127, 2018.

CHOURASIA, M.K., JAIN, S.K., Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. **J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 6, n. 1, p. 33- 66, 2003.

COELHO, J. C. U. **Aparelho digestivo: Clínica e Cirurgia**, 4ª Ed., São Paulo, Editora Atheneu, 2005.

CORREIA-SANTOS, A.M., SUZUKI, A., ANJOS, J.S., RÉGO, T.S., ALMEIDA, K.C.L., BOAVENTURA, G.T. Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratas wistar. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 45, n. 4, p. 436-444, 2012.

CUMMINGS, D.E., OVERDUIN, J., FOSTER-SCHUBERT, K.E. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 89, n. 6, p. 2608-2615, 2004.

DEFRONZO, R.A. From the triumvirate to the „ominous octet”: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 58, p. 773- 795, April, 2009.

DIAS, A.S., LLESUY S., MARRONI C.A., MARRONI N. Alterações gastrointestinais no diabetes mellitus: estresse oxidativo e fluxo sanguíneo da artéria mesentérica – estudo experimental. **Arq Gastroenterol**, v. 41, n. 2, p. 108-113, abr./jun. 2004.

DROZDOWSKI, L.A., THOMSON, A.B.R. Intestinal sugar transport. **World J Gastroenterol**, v. 12, n. 11, p. 1657-1670, 2006.

DRUKER, D.J. Incretin-based therapy and the quest for sustained improvements in beta cell health. **Diabetes care**, v.34, p. 2133-2135, 2011.

DUBEY, N., VARSHNEY, R., SHUKLA, J., GANESHPURKAR, A., HAZARI, P.P., BANDOPADHAYA, G.P., MISHRA, A.K., TRIVEDI, P. Synthesis and evaluation of biodegradable PCL/PEG nanoparticles for neuroendocrine tumor targeted delivery of somatostatin analog. **Drug. Deliv.**, v. 19, n. 3, p. 132- 142, 2012.

DUFRANE, D., VAN STEENBERGHE, M., GUIOT, Y., GOEBBELS, R.M., SALIEZ, A., GIANELLO, P. Streptozotocin-induced diabetes in large animals(pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity. **Transplantation**, v. 81, n. 1, p.36- 45, 2006.

ELBERRY, A.A., HARRAZ, F.M., GHAREIB, S.A., GABR, S.A., NAGY, A.A., ABDELSATTAR, E. Methanolic extract of Marrubium vulgare ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Int. J. Diabetes Mellit.**, v. 3, n. 1, p. 37– 44, 2015.

- FANG, Y. Gastrointestinal responsive polymeric nanoparticles for oral delivery of insulin: optimized preparation, characterization and in vivo evaluation. **J. Pharm. Sci.**, v. 108, p. 2994- 3002, 2019.
- FONTE, P., ARAÚJO, F., REIS, S., SARMENTO, B. Oral insulin delivery: how far are we? **J. Diabetes Sci. Technol**, v. 7, n. 2, p. 520-531, 2013.
- FU, A.Z, QIU, Y., RADICAN, L. Impact of fear of insulin or fear of injection on treatment outcomes of patients with diabetes. **Curr. Med. Res. Opin.**, v. 25, n. 6, p. 1413-1420, 2009.
- GOULÃO, I. Insulina - Estrutura, Produção e Secreção. **Actas Bioq. VII Seminário**, v. 8, p. 65–78, 2007.
- HEINEMANN, L., JACQUES, Y. Oral insulin and buccal insulin: a critical reappraisal. **J. Diabetes Sci. Technol**, v. 3, n. 3, p. 568- 584, May. 2009.
- HIRLEKAR, R.S., PATIL, E.J, BHAIKY, S.R. Oral Insulin Delivery: Novel Strategies. **Asian, J. Pharm.**, v. 11, n. 03, p. 434- 443, 2017.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**, 8th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.
- JOURNAL OF NORTH AMERICA, AGRICULTURA E BIOLOGIA, **Animais modelos para o estudo diabetes mellitus**. Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências da Saúde, Usmanu Danfodiyo Universidade, Sokoto, Nigera, v. 1, n. 2, p. 130- 134, 2010.
- JUROWICH, C.F. et al. Duodenal-jejunal bypass improves glycemia and decreases SGLT1-mediated glucose absorption in rats with streptozotocin-induced type 2 diabetes. **Ann Surg**, v. 258, n. 1, p. 89-97, 2013.
- KADIYALA, P., WALTON, S., SATHYAPALAN, T. Insulin induce dlipodystrophy. **Br. J. Diabetes. Vasc. Dis**, v. 14, n. 4, p. 131–133, 2014.
- KAJI, I., KARAKI, S., KUWAHARA, A. Shortchain fatty acid receptor and its contribution to glucagon-like peptide-1 release. **Digestion**, v. 89, v. 1, p. 31- 36, 2014.
- KAUR, R., MAHAJAN, P., GOSWAMI, M. Diabetes Mellitus: An Emerging Risk Factor To Public Health. **World J. Pharm. Res**, v. 7, n. 12, p. 257- 281, 2018.
- KING, A.J.F. The use of animal models ind diabetes research. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 3, p. 877– 894, 2012.
- KOCHAR, **Tratado de Medicina Interna**, 4ª Ed., Rio de Janeiro, Editora Guanabara, cap. 72, p. 348- 355, 2005.
- KUMARI, Y., et al. Modified apple polysaccharide capped gold nanoparticles for oral delivery of insulin. **Int. J. Biol. Macromol**, v. 149, p. 976- 988, 2020.



LENZEN, S. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 216–226, 2008.

LIPINSK, L.C., et al. Oral insulin improves metabolic parameters in high fat diet fed rats. **An. Acad. Bras. Ciênc**, v. 89, n. 3, p. 1699-1705, 2017.

LIU, C., SHAN, W., LIU, M., ZHU, X., XU, J., XU, Y., HUANG, Y. A novel ligand conjugated nanoparticles for oral insulin delivery. **Drug. Deliv**, v. 23, n. 6, p. 2015-2025, 2016.

MALATHI, S., NANDHAKUMAR, P., PANDIYAN, V., WEBSTER, T.J., BALASUBRAMANIAN, S. Novel PLGA-based nanoparticles for the oral delivery of insulin. **Int., J. Nanomedicine**, v. 10, p. 2207– 2218, 2015.

MALLAKPOUR, S, BEHRANVAND, V. Polymeric nanoparticles: Recent development in synthesis and application. **eXPRESS Polymer Letters**, v. 10, n. 11, p. 895- 913, 2016.

MARTINS, F.S.M. **Mecanismos de ação da insulina**. Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 13 p., 2016.

MOORADIAN, A.D. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. **Nat. Ver. Endocrinol.** v. 5, n. 3, p. 150-159, 2009.

MOREIRA, A.P.B., TEIXEIRA, T.F.S., PELUZIO, M.C.G., ALFENAS, R.C.G. Gut microbiota and the development of obesity. **Nutr. Hosp**, v. 27, n.5, p. 1408- 1414, 2012.

MOWAT, A. M.; AGACE, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 667–685, 2014.

NATIVIDAD, J.M., VERDU, E.F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. **Pharmacol. Res**, v. 69, p. 42-51, 2013.

NODA, T., IWAKIRI, R., FUJIMOTO, K., YOSHIDA, T., UTSUMI, H., SAKATA, H., HISATOMI, A., AW, T.Y. Suppression of apoptosis is responsible for increased thickness of intestinal mucosa in streptozotocin-induced diabetic rats. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 50, n. 3, p. 259- 264, 2001

OKAMOTO, J.M., LOPES, C.B., VEIGA, R.B., LUZ, J.L.R.L, CAMARGO, T.V., RODRIGUES, M. R. S. Alterações Morfofuncionais Intestinais no Diabetes. **Publ. UEPG, Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, v.20, n.2, p. 143-147, jul./dez. 2014.

OLIVEIRA, A.M, HAMMES, T. O. Microbiota e barreira intestinal: implicações para Obesidade. **Clin. Biomed. Res**, v. 36, n. 4, p. 222- 229, 2016, disponível em:< <https://seer.ufrgs.br/hcpa/article/view/67683/pdf>> acesso em: 22 de ago. de 2019.

OLIVEIRA, J.E.P.; VENCIO, S. (Org.). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**, São Paulo, Editora Clannad, 2017, p. 19- 26.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Superintendência de Atenção à Saúde. **Linha guia de diabetes mellitus / SAS.** – 2ª ed. – Curitiba: SESA, 2018. 57p. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/linhaguadiabetes2018.pdf> acesso em: 15 de ago. de 2019.

PSICHAS, A., et al. **The short chain fatty acid propionate stimulates GLP-1 and PYY secretion via free fatty acidreceptor 2 in rodents.** *Int. J. Obes.* v. 39, n. 3, p. 424- 429, 2015.

PURNELL, J.Q. et al. The effect of excesso weight gain with intensive diabete smellitus treatment on cardiovascular disease risk factors and atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus: results from the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study (DCCT/EDIC) study. **National Institutes of Health**, v. 127, n. 2, p. 180-187, 2013.

RAMIRO-PUIG E., PÉREZ-CANO F.J., CASTELLOTE C., FRANCH A., CASTELL M. The bowel: a key component of the immune system. **Rev Esp. Enferm. Dig**, v. 100, n. 1, p. 29-34, 2008.

RANI, R., DAHIYA, S., DHINGRA, D., DILBAGHI, N., KAUSHIK, A., KIM, K-H., KUMAR, S. Antidiabetic activity enhancement in streptozotocin + nicotinamide–induced diabetic rats through combinational polymeric nanoformulation. **Int. J. Nanomedicine**, v. 14, p. 4383- 4395, 2019.

RODRIGUES, M.L.C., MOTTA, M.E.F.A. Mechanisms and factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with diabetes mellitus. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n. 1, p.17-24, 2012.

SAADDINE, J.B., CADWELL, B., GREGG, E.W., ENGELGAU, M.M., VINICOR, F., IMPERATORE, G., NARAYAN, K.M.V. Improvements in diabetes processes of care and intermediate outcomes: United States, 1988-2002. **Ann. Intern. Med**, v. 144, n. 7, p. 465- 474, 2006.

SANTORO, S. Is the Metabolic syndrome a disease of the foregut? Yes, excessive foregut. **Ann. Surg**, v. 247, n. 6, p. 1074-1075, 2008.

SCHAUER, P.R., et al. Effect of laparoscopic Roux-en Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus. **Ann. Surg**, v. 238, n. 4, p. 160-178, 2003.  
SCHAUER, P.R., IKRAMUDDIN, S., GOURASH, W., RAMANATHAN, R., LUKETICH, J. Outcomes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. **Ann. Surg**, v. 232, n. 4, p. 515-529, 2000.

SCHOFIELD, J.D., LIU, Y., RAO-BALAKRISHNA, P., MALIK, R.A., SORAN, H. Diabetes dyslipidemia. **Diabetes Ther**, v. 7, n. 2, p. 203- 219, 2016.

SHESHALA, R., PEH, K.K., DARWIS, Y. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of insulin-loaded PLA-PEG microspheres for controlled parenteral drug delivery. **Drug. Dev. Ind. Pharm**, v. 35, n 11, p. 1364–1374, 2009.

SJÖSTRÖM, L., et al. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. **N. Engl. J. Med**, v. 351, n. 26, p. 2683- 2693, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**, São Paulo, Editora Clannad, p. 27- 32, 2019.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE DIABETOLOGIA. Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes. **Diabetes Factos e Números**, Lisboa, p. 1- 63 2014.

SUKHOTNIK, I.; SHAMIR, R.; BASHENKO, Y.; MOGILNER, J. G.; CHEMODANOV, E.; SHAOUL, R.; CORAN, AG.; SHEHADEH, N. Effect of oral insulin on diabetes-induced intestinal mucosal growth in rats. **Dig Dis Sci**, v. 56, p.2566-2574, 2011.

VAREDA, P.M.P. **A avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato de Myrciabela em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2013.

VERDAN, F.J.; GREVE, J.W.; ROOSTA, S.; VAN EIJK, H.; BOUVY, N.; BUURMAN, WA; RENSEN, S.S. Small intestinal alterations in severely obese hyperglycemic subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 96, n. 2, p. 379-383, 2011.

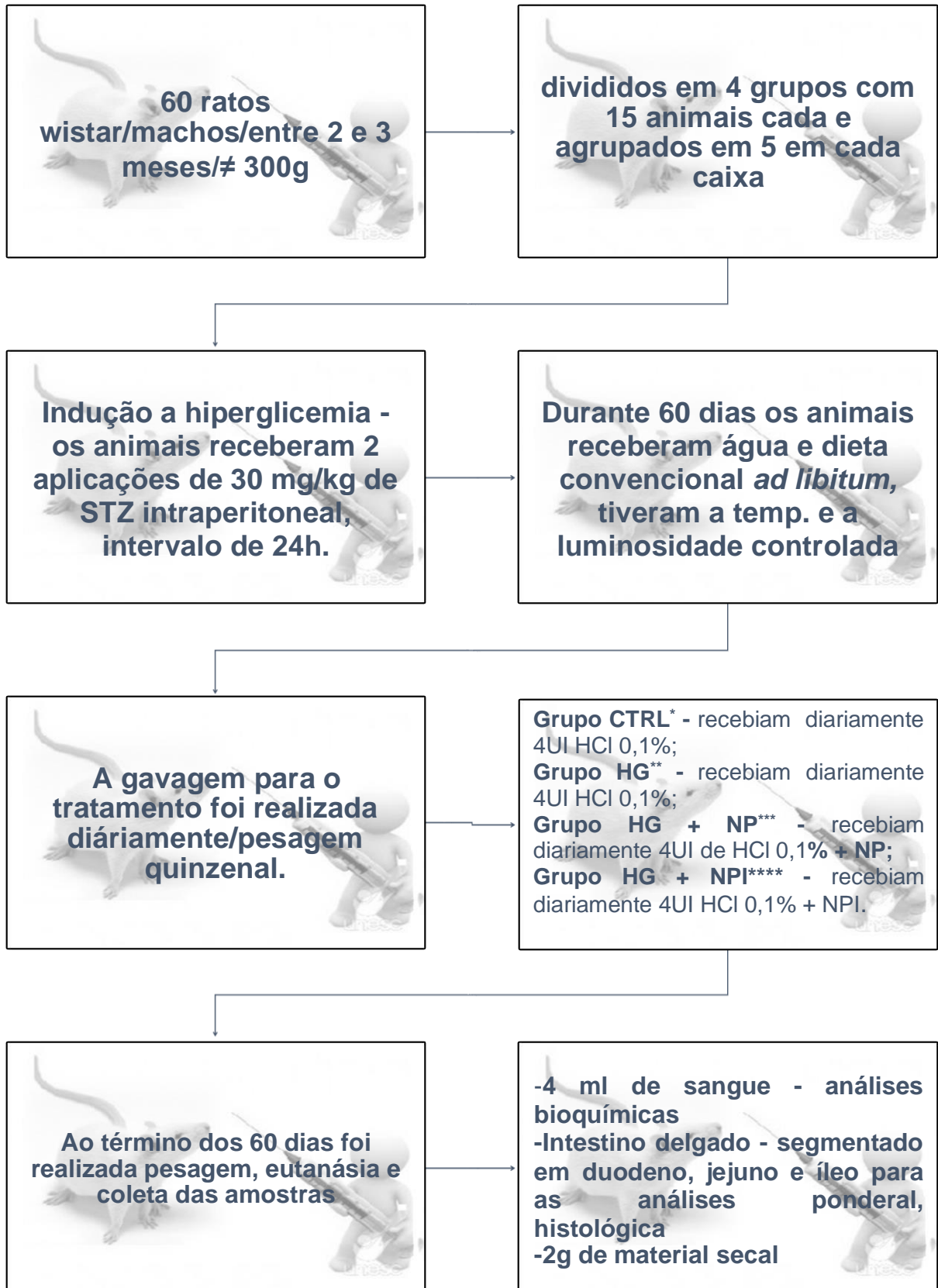
VILSBOLL, T., KRARUP, T., MADSBAD, S., HOLST, J. J. Non reactive hypoglycaemia in Type 2 diabetic patients after subcutaneous administration of GLP-1 and intravenous glucose. **Diabet. Med**, v. 18, p. 144-149, 2001.

WRIGHT, E.M., MARTIN, M.G., TURK, E. Intestinal absorption in health and disease —sugar. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**. v. 17, n.6, p. 943-956, 2003.

WU, Z.M., ZHOUB, L., GUOA, X.D., JIANGA, W., LINGA, L., QIANA, Y., LUOC, K.Q., ZHANG, L.J. HP55-coated capsule containing PLGA/RS nanoparticles for oral delivery of insulin. **Int. J. Pharm**, v. 425, p. 1- 8, 2012.

ZHAO, M., LIAO, D., ZHAO, J. Diabetes-induced mechanophysiological changes in the small intestine and colon. **World J. Diabetes**, v. 8, n. 6, p. 249- 269, 2017.

## APÊNDICE A – DESENHO EXPERIMENTAL



\*CTRL- controle normoglicêmico; \*\*HG- controle hiperglicêmico; \*\*\*HG+NP- hiperglicêmico+ nanocápsulas poliméricas; \*\*\*\*HG+NPI- hiperglicêmicos+ nanocápsulas poliméricas com insulina.

## ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

**UEPG**  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Processo CEUA – 044/2018**

**Protocolo UEPG – 15924/2018**

**Título –** Projeto aula “Desenvolvimento, caracterização e avaliação do efeito de micropartículas contendo insulina na prevenção do Diabetes Mellitus tipo II”

**Interessados:**  
- Leandro Cavalcante Lipinski ([leandrolipinski@yahoo.com.br](mailto:leandrolipinski@yahoo.com.br))

**Data de Entrada – 11/10/2018**

Prezado Professor Leandro:

A comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecidas pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 220 (duzentos e vinte) ratos de dois meses de idade, aproximadamente 300 g – para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 14 de dezembro de 2018.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA**  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais  
*Dr. Dioneia Xavier Scoparim*  
Coordenadora