

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA SETOR DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS E DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE

ISABELLA MARAVIESKI LIPINSKI

EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA E USO DE INSULINA ORAL NO EPITÉLIO
INTESTINAL E TECIDO ADIPOSEO

PONTA GROSSA
2020

ISABELLA MARAVIESKI LIPINSKI

EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA E USO DE INSULINA ORAL NO EPITÉLIO
INTESTINAL E TECIDO ADIPOSEO

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof.^o Dr. Leandro Cavalcante Lipinski

Coorientador: Prof.^a Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA
2020

L764 Lipinski, Isabella Maravieski
Efeito da dieta hiperlipídica e uso de insulina oral no epitélio intestinal e tecido adiposo / Isabella Maravieski Lipinski. Ponta Grossa, 2020.
41 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.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago.

1. Trato gastrointestinal. 2. Histologia. 3. Diabetes mellitus. 4. Obesidade.
I. Lipinski, Leandro Cavalcante. II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV.T.

CDD: 616.462

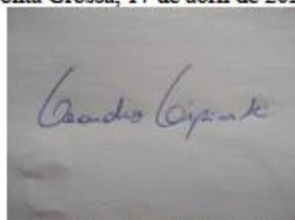
TERMO DE APROVAÇÃO

ISABELLA MARAVIESKI LIPINSKI

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO ADIPOSEO E INTESTINAL EM RATOS WISTAR ALIMENTADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA TRATADOS COM INSULINA ORAL

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, 17 de abril de 2020.




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



Assinatura

Prof. Dr. Rudiger Daniel Ollhoff
Doutor em Microbiologia Clínica
PUC-PR



Profa. Dra. Dionizia Xavier Scomparin
Doutora em Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Ponta Grossa

“Não nos cansemos de fazer o bem, pois se não desanimarmos colheremos no tempo próprio” (Bíblia: Gálatas 6:9).

RESUMO

Introdução: Diabetes e obesidade são doenças correlacionadas que provocam outras comorbidades. Conhecer os mecanismos de ação e interação destas doenças permite desenvolver tecnologias menos dolorosas e mais efetivas quando comparadas ao uso de injeção de insulina subcutânea. O epitélio intestinal possui especial papel em ambas as doenças e sofre hipertrofia em condições de hiperglicemia. O uso de IO (insulina oral) melhora parâmetros séricos e altera morfológicamente o epitélio intestinal e o tecido adiposo, revertendo alterações geradas nas condições de hiperglicemia pela ingesta de DH (dieta hiperlipídica). **Métodos:** Pesquisa pré-clínica interdisciplinar, na qual 48 ratos Wistar machos foram mantidos por 60 dias separados em quatro grupos de 12 animais, sendo: Grupo 1 controle (dieta padrão de laboratório + gavagem de água); Grupo 2 (dieta padrão de laboratório + IO); Grupo 3 (DH + água); Grupo 4 (DH+IO). Foram analisados o peso corporal do rato, o peso de intestinos (duodeno, jejuno íleo e ceco) e gorduras (omental, retroperitoneal, epididimal e mesentérica), a histologia e histomorfometria de intestinos e gorduras, espessura de camada mucosa e epitelial intestinal e glicemia de jejum. **Resultados:** A insulina oral reduz o ganho de tecido adiposo, de peso corporal e de peso intestinal em ratos submetidos a dieta hiperlipídica. O intestino delgado é sensível à insulina oral e muda seu epitélio de acordo com a dieta e em presença de insulina. A suplementação oral de insulina provou ter efeito sobre 10 parâmetros analisados em administração concomitante com DH (peso corporal, índice de adiposidade, redução da hipertrofia e aumento da hiperplasia nos adipócitos, redução da glicemia de jejum, redução do peso intestinal, aumento da largura de vilosidade do duodeno, redução da largura de vilosidade do íleo, redução da área de vilosidades do íleo e redução da espessura do epitélio do íleo), e demonstrou efeito sobre 2 parâmetros analisados em administração concomitante com dieta padrão (aumento da largura de vilosidade de íleo e aumento da área de vilosidade do íleo). A DH também apresentou efeito sobre a amostra, o peso corporal, intestinal e das gorduras dos ratos que receberam DH foi significativamente maior do que o grupo que recebeu ração padrão de laboratório. Notou-se hipertrofia nos adipócitos dos ratos que receberam DH. **Conclusões:** A IO exerce efeito sobre o epitélio intestinal e tecido adiposo que demonstra regredir as alterações advindas da DH. Sugere-se que a IO poderia promover regressão maior ou até mesmo total das alterações causadas pela DH. Sugere-se que a IO exerça efeito citoprotetor ao TGI e tecido adiposo em presença de DH.

Palavras-chave: Trato Gastrointestinal, Histologia, Diabetes mellitus, Obesidade.

ABSTRACT

Introduction: Diabetes and obesity are correlated diseases that cause other comorbidities. Knowing the mechanisms of action and interaction of these diseases allows developing less painful and more effective technologies when compared to the use of subcutaneous injection of insulin. The intestinal epithelium has a special role as diseases and undergoes hypertrophy in conditions of hyperglycemia. The use of OI (oral insulin) improves physical parameters and morphologically changes the intestinal epithelium and adipose tissue, reversing changes generated in the conditions of hyperglycemia by the intake of HFD (high-fat diet). **Methods:** Pre-clinical interdisciplinary research, in which 48 male Wistar rats were kept for 60 days separated into four groups of 12 animals, being: Group 1 control (standard laboratory diet + water gavage); Group 2 (standard laboratory diet + OI); Group 3 (HFD + water); Group 4 (HFD + OI). Rat body weight, intestine weight (duodenum, jejunum and cecum) and fat (omental, retroperitoneal, epididimal and mesenteric), histology and histomorphometry of intestines and fat, mucosal and epithelial thickness and fasting intestinal glucose were analyzed. **Results:** Oral insulin reduces the gain of adipose tissue, body weight and intestinal weight in rats submitted to a high fat diet. The small intestine is sensitive to oral insulin and changes its epithelium according to diet and in the presence of insulin. Oral insulin supplementation proved to have an effect on 10 parameters analyzed in concomitant administration with HFD (body weight, adiposity index, reduced hypertrophy and increased adipocyte hyperplasia, reduced fasting glycemia, reduced intestinal weight, increased villus, reduction of ileum villus width, reduction of ileum villus area and reduction of the epithelium thickness from ileum); and demonstrated an effect on 2 parameters analyzed in concomitant administration with a standard diet (increase of the villus width of the ileum and an increase in the villus area of the ileum). HFD also had an effect on the sample, the body, intestinal and fat weight of the rats that received HFD was significantly higher than the group that received standard laboratory diets. Hypertrophy had noted in the adipocytes of rats that received HFD. **Conclusions:** OI has an effect on the intestinal epithelium and adipose tissue, which has shown to regress the changes resulting from HFD. Suggest that OI could promote a greater or even total regression of the changes caused by HFD. Suggest that OI has a cytoprotective effect on GIT and adipose tissue in the presence of HFD.

Keyword: Gastrointestinal Tract. Histology. Diabetes mellitus. Obesity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Fatores da hiperglicemia segundo Defronzo (2009) reunidos em um “Octeto Sinistro”	12
Figura 02 - Representação esquemática do protocolo experimental.	19
Figura 03 - Microfotografias de tecido adiposo do mesentério demonstrando à esquerda a mensuração da área do adipócito e à direita contagem do número de células (Aumento de 40x).....	21
Figura 04 - Histologia da gordura Mesentérica dos grupos 1-2-3-4 (coloração hematoxilina-eosina; aumento de 40x).....	25
Figura 05 - Histologia intestinal do duodeno dos grupos 1-2-3-4 (coloração hematoxilina-eosina; aumento de 40x).....	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 - Peso corporal de ratos Wistar (N =48)	23
Gráfico 02 - Peso das gorduras de ratos Wistar após tratamento de 60 dias	24
Gráfico 03 - Índice de adiposidade de ratos Wistar após tratamento de 60 dias	25
Gráfico 04 - Efeito do tratamento com insulina oral sobre a morfologia do tecido adiposo mesentérico de ratos alimentados com dieta hiperlipídica	26
Gráfico 05 - Efeito do tratamento com insulina oral sobre a morfologia do tecido adiposo retroperitoneal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica	27
Gráfico 06 - Diâmetro dos adipócitos do omento. Efeito do tratamento com insulina oral na hiperplasia e hipertrofia de adipócitos do tecido adiposo omental de ratos alimentados com dieta hiperlipídica.	28
Gráfico 07 - Efeito da insulina oral e da dieta sob a glicemia de jejum	29
Gráfico 08 - Efeito do tratamento com insulina oral sobre o peso intestinal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica	30
Gráfico 09 - Efeito do tratamento com insulina oral na altura das vilosidades intestinais de ratos alimentados com dieta hiperlipídica.....	31
Gráfico 10 - Efeito do tratamento com insulina oral na largura das vilosidades de ratos alimentados com dieta hiperlipídica	32
Gráfico 11 - Efeito do tratamento com insulina oral na área das vilosidades de ratos alimentados com dieta hiperlipídica.	34
Gráfico 12 - Efeito do tratamento com insulina oral no número de vilosidades de ratos alimentados com dieta hiperlipídica	35
Gráfico 13 - Efeito do tratamento com insulina oral na espessura da mucosa intestinal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica	37
Gráfico 14 - Efeito do tratamento com insulina oral na espessura do epitélio intestinal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica	38

LISTA DE SIGLAS

CEUA - Comissão de ética na utilização de animais

DH - Dieta hiperlipídica

DM - Diabetes *mellitus*

DM1 - Diabete *mellitus* tipo 1

DM2 - Diabetes *mellitus* tipo 2

HE - Hematoxilina Eosina

DH - High fat diet

IO - Insulina oral

GLP - Peptídeo semelhante ao glucagom (*glucagom like peptide*)

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	11
1.1 DIABETES MELLITUS.....	11
1.2 OBESIDADE	15
1.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	16
2 ARTIGO CIENTÍFICO - EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA E USO DE INSULINA ORAL NO EPITÉLIO INTESTINAL E TECIDO ADIPOSEO	17
2.1 INTRODUÇÃO	17
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.2.1 Modelo animal e tratamento.....	18
2.2.2 Colheita das gorduras e intestinos	19
2.2.3 Processamento e confecção das lâminas de gordura.....	20
2.2.4 Análise histomorfométrica das gorduras	20
2.2.5 Processamento e confecção das lâminas do intestino.....	21
2.2.6 Análise histomorfométrica intestinal e bioquímica.....	21
2.2.7 Análise estatística:	22
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
2.3.1 Peso Corporal	22
2.3.2 Peso das Gorduras	23
2.3.3 Índice de Adiposidade	24
2.3.4 Hiperplasia e Hipertrofia de Adipócitos	25
2.3.5 Tecido Adiposo Mesentérico	26
2.3.6 Tecido Adiposo Retroperitoneal	26
2.3.7 Tecido Adiposo Omental	27
2.3.8 Glicemia de Jejum.....	28
2.3.9 Peso Intestinal.....	30
2.3.10 Altura dos Vilosidades.....	30
2.3.11 Largura dos Vilosidades.....	31
2.3.12 Área das Vilosidades.....	33
2.3.13 Número de Vilosidades	34
2.3.14 Espessura da Mucosa Intestinal.....	35
2.3.15 Espessura do Epitélio Intestinal	37
2.4 CONCLUSÃO.....	38

1 REVISÃO DA LITERATURA

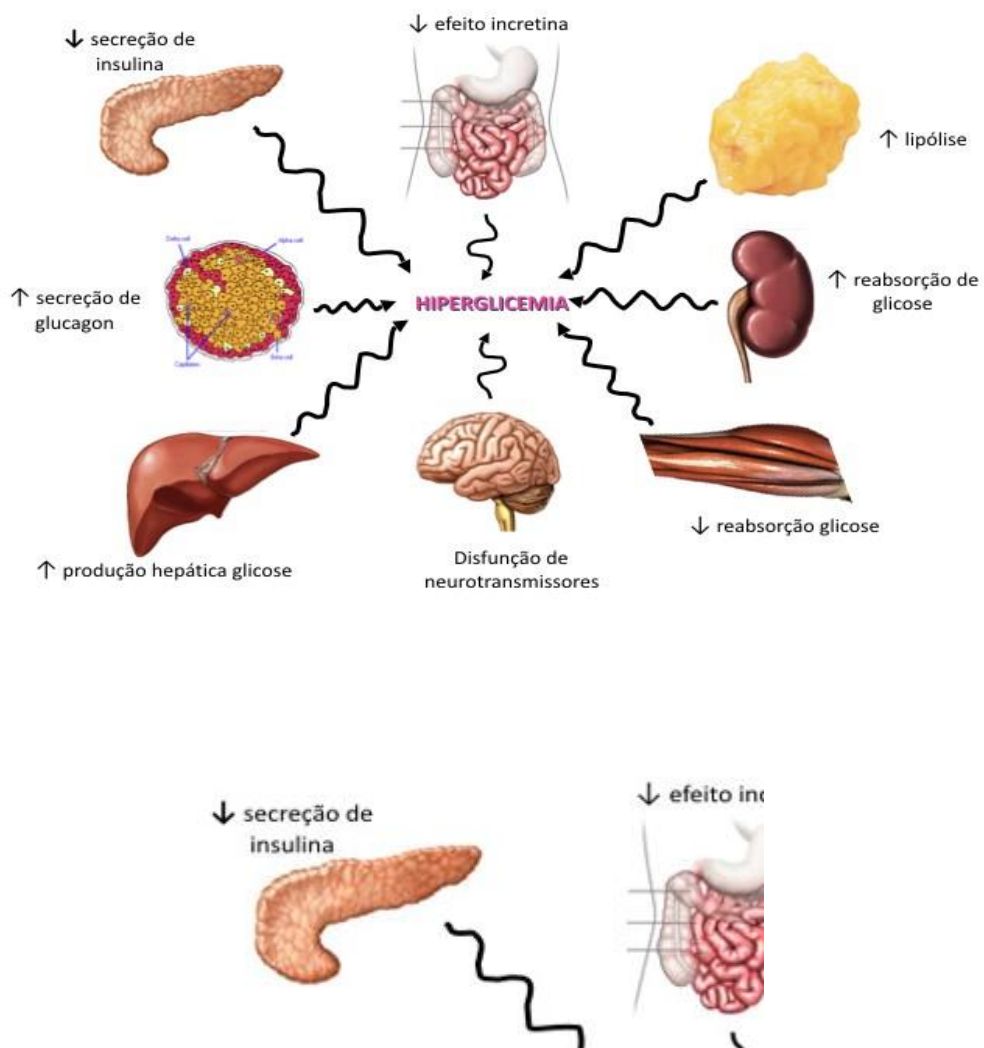
1.1 DIABETES MELLITUS

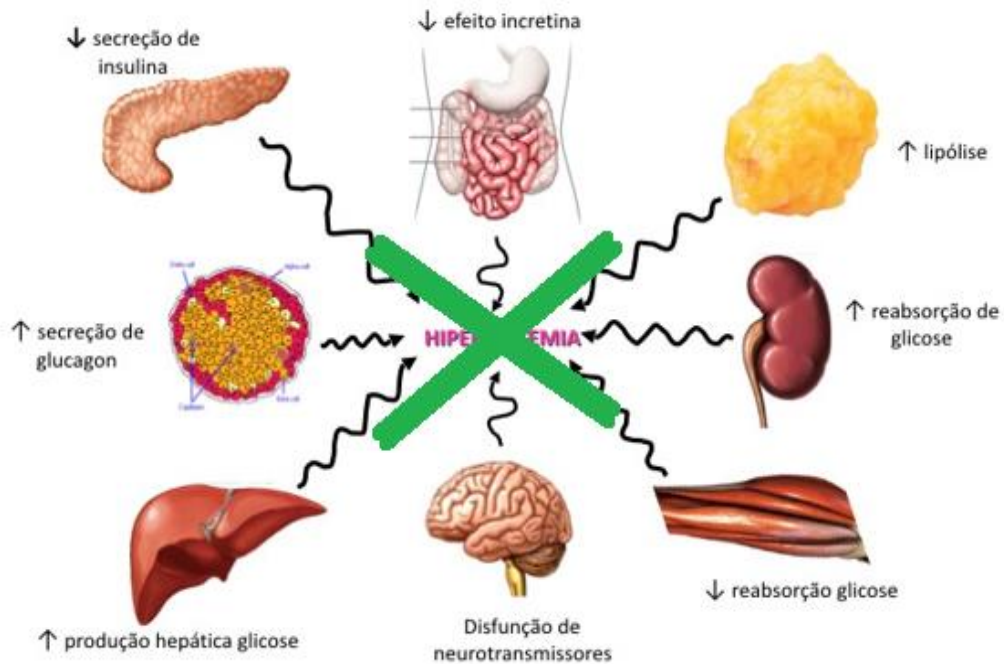
Níveis constantemente aumentados de glicose na corrente sanguínea trazem efeitos deletérios, que ocorrem a longo prazo e de caráter comumente irreversível. A doença ocorre por meio da ineficiência das células beta do pâncreas em produzir ou secretar o hormônio insulina ou pela resistência das células à insulina, eventos que podem ocorrer de forma simultânea ou em conjunto. Categorizado por possuir distinções na etiologia e de causas multifatoriais, o diabetes pode ser tipo 1, de caráter predominantemente hereditário de origem autoimune ou idiopática; tipo 2, proveniente de fatores ambientais e comportamentais. O recentemente proposto tipo 3, ocorre pela junção de resistência à insulina, obesidade, diabetes tipo 2 e distúrbios cognitivos (CERRONE, *et. al.*, 2018); o diabetes advindo de outras patologias e gestacional, que ocorre durante o período da gestação (BOSCARIOL, *et. al.*, 2018). Estas diferentes formas de aparecimento da doença também possuem diferentes manifestações fisiopatológicas, o tipo 1 tem seus sinais percebidos na infância e adolescência e tem por tratamento a insulino-terapia. Neste tipo nota-se maior predisposição genética quando comparada aos outros tipos de Diabetes, porém também influenciam no aparecimento fatores ambientais, e discute-se a influência de infecções virais, contato com toxinas e hábitos alimentares, que, assim como o tipo de parto do neonato, parecem influenciar seu aparecimento. De origem autoimune ocorre o desenvolvimento de anticorpos que atacam os epítomos das células beta pancreáticas, supõe-se que o principal mecanismo pelo qual as células betas pancreáticas são afetadas seja pelas apoptose, a resposta inflamatória é induzida por linfócitos T dentro do microambiente dos ilhéus de Langerhans, e também pelo contato direto de linfócitos T ativados com as células beta. A polifagia, poliúria, polidipsia e perda de peso são os quatro componentes clássicos do quadro de diabetes mellitus tipo 1 (ZHAO; YANG; GREGERSEN, 2003).

O diabetes tipo 2 se manifesta fisio-patologicamente através da resistência à ação da insulina na musculatura e no fígado e secreção de insulina comprometida pelas apoptose de células beta pancreáticas, lipotoxicidade e carbotoxicidade sobre as células remanescentes e resistência ao GLP-1. Defronzo (2009), elenca o “octeto sinistro” para evidenciar os mecanismos de desenvolvimento de intolerância à glicose,

envolvendo lipólise, hiperglucagonemia, recaptação de glicose diminuída, disfunção de neurotransmissores, aumento da produção hepática de glicose, disfunção de neurotransmissores, aumento da reabsorção renal de glicose e alterações gastrointestinais (deficiência/resistência incretínica).

Figura 01 – Fatores da hiperglicemia segundo DeFronzo (2009) reunidos em um “Octeto Sinistro”





Fonte: DeFronzo (2009).

Na DM 2 também se observa níveis aumentados da secreção e da sensibilidade do fígado ao glucagon, aumentando a produção hepática de glicose, contribuindo para o aumento da glicemia. Hipercolesterolemia também pode ser observada, provocando lipotoxicidade sobre a capacidade secretora das células beta. Também possui causa genética, porém o fator de maior influência é o ambiental, como insuficiência das horas de sono, alcoolismo e tabagismo, estresse emocional, e principalmente pela presença e quantia de tecido adiposo proveniente de dieta enriquecida de lipídios e carboidratos e inatividade física, sendo a obesidade importante fator de risco para diabetes tipo 2, tipo 3 e gestacional. Nos portadores de DM 2 dentre os sintomas observados estão a polifagia, polidipsia, poliúria. A polifagia se deve à resistência destes indivíduos à inibição do apetite, que promove aumento de peso corporal, acrescentando a presença de tecido adiposo e conseqüentemente dos mórbidos processos deletérios correlacionados ao aumento da glicose circulante (CERRONE, *et. al.*, 2018).

Inovações terapêuticas são imprescindíveis para o avanço do trabalho em saúde realizado com o indivíduo diabético e acarretam em melhoria na saúde e economia, visto que em torno de 70% destes encontram-se em faixa etária de ativa contribuição e produção econômica, tendo força de trabalho reduzido em prol da

manifestação da doença, dos cuidados que esta exige e, ou, das comorbidades advindas da progressão do diabetes ou do óbito que, segundo dados levantados pela Federação Internacional de Diabetes, chegou à 4 milhões de indivíduos em 2017 por complicações advindas desta comorbidade.

Dentre suas inúmeras complicações conhecidas pode-se elencar a cegueira, amputações de membros, infarto, acidente vascular encefálico e insuficiência renal crônicas como as mais comuns da DM2 (MARIA; SCHMIDT, 2014). Sintomas gástricos são observados em 76% dos indivíduos e são relacionados à absorção e secreção anormal de nutrientes e motilidade gastrointestinal deficiente (RODRIGUES; MOTTA, 2012).

O tratamento da DM é dinâmico e adequado ao indivíduo de forma singular, dependente do índice glicêmico e etiologia da doença. A atividade física reduz índice glicêmico, além de melhorar diversos parâmetros de saúde. Estudos revelam a eficácia de musculação para promover redução da glicemia e atividades aeróbicas em indivíduos com obesidade associada. Além da redução do peso corporal indicado quando há sobrepeso e indicação de atividade física regular, podem ser prescritos hipoglicemiantes orais. Em diabéticos cuja produção de insulina é nula ou ineficiente há a indicação de uso de insulina subcutânea. Geralmente a insulinoterapia está prescrita à portadores do diabetes tipo 1 (OLIVEIRA; VENCIO, 2016).

Embora ingerida por via oral a insulina sofra degradação proteolítica e este seja um claro fator limitante para seu uso, a compreensão dos mecanismos envolvidos na permeabilidade intestinal expande o desenvolvimento de estudos em alternativas de tratamento com uso de insulina oral, pois a permeabilidade intestinal é baixa para esta molécula (principalmente no duodeno) e a permeabilidade é imprescindível para a efetiva absorção e efetivação do fármaco (SILVA, *et. al.*, 2003).

Sabe-se que o uso de insulina oral em ratos melhora parâmetros lipídicos, glicêmicos e colesterol total, e aumenta o peso da mucosa, circunferência e altura de vilosidades no intestino delgado, apoptose diminuída e aumento da proliferação de células intestinais (TOUITOU; RUBINSTEIN, 1986), sendo um reconhecido fator de crescimento intestinal (KUIKEN, *et. al.*, 2017 *apud* SHAMIR, *et. al.*, 2005) e com efeito positivo nas características histológicas intestinais (SUKHOTNIK, *et. al.*, 2011). Inovações nesta temática estão sendo desenvolvidas continuamente, cujas se debruçam em alternativas de administração e no entendimento das consequências orgânicas de seu uso (FONTE, *et. al.*, 2015).

Quando a aplicação endógena de insulina é necessária a administração é realizada por injeção subcutânea. Sendo uma terapia altamente eficaz é prescrita em larga escala, porém causa desconforto (HIRLEKAR, 2017) e dificulta a adesão ao tratamento adequado, levando grande parcela de diabéticos ao descontrole glicêmico gerando complicações e agudização da doença, que fazem com que o diabético procure o serviço de saúde aumentando ainda mais os custos destinados ao tratamento e controle desta comorbidade. O uso de insulina oral demonstra praticidade e facilidade, com distribuição sistêmica similar à insulina endógena. Entretanto a degradação desta molécula no sistema digestório pelo baixo pH gástrico reduz sua efetividade (AL RUBEAN; RAFIULLAH; JAYAVANTH, 2016). Novas terapias alternativas no uso de insulina são necessárias para ampliar o bem estar do diabético (SIQUEIRA, *et. al.*, 2018).

1.2 OBESIDADE

A obesidade está fortemente associada ao diabetes, sendo estimados que 8 em cada 10 indivíduos diabéticos sejam, também, obesos. É uma das comorbidades majoritariamente associadas à resistência periférica à insulina, especialmente o tecido adiposo visceral, como omento e mesentério, sendo não somente um reservatório de massa lipídica, mas também um órgão endócrino, responsável pela secreção de vários hormônios, tais como as adipocinas, leptinas e várias citocinas inflamatórias. Sendo uma patologia crônico-degenerativa cuja principal característica é o acúmulo excessivo de tecido adiposo, originada de causas multifatoriais, é categorizada como doença complexa que, portanto, exige tratamento complexo, por isso importante salientar a efetividade de tratamento interdisciplinar em saúde para tal comorbidade (CERRONE, *et. al.*, 2018; KUMAR, 2013). Se relaciona intimamente com maus hábitos alimentares e sedentarismo. Em pacientes diabéticos e obesos a recomendação terapêutica de primeira instância é a perda de peso, que reduz os níveis glicêmicos consideravelmente através da melhora dos fatores envolvidos na gênese do diabetes (CUMMINGS; RUBINO, 2018).

1.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A morfometria é o estudo matemático de formas pertencentes a uma mesma população estatística. Nas ciências biomédicas a quantificação tem por meta estabelecer as medidas para se ter objetividade em diagnósticos, e até mesmo em prognósticos. Nesta área a morfometria é a atividade de medir estruturas anatômicas para se obter dados. Para se realizar a histomorfometria (morfometria de tecidos) é utilizada a unidade micrômetro ou micron, cujo símbolo é μm , que equivale à milésima parte do milímetro. Quando se utiliza microscopia óptica de luz e o método de inclusão em parafina, a espessura do corte é de extrema importância. Esta técnica é amplamente utilizada para análise de tecido ósseo (SILVA, 2003). O diâmetro e o perímetro de adipócitos podem ser medidos em micrômetros (μm) e a área em micrômetros quadrados (μm^2) a partir de imagens obtidas de TA corado pelo método da hematoxilina-eosina. O *Image-J*® é um *software* de processamento e análise de imagens digitais, semiautomatizado, de domínio público, em linguagem em JAVA, desenvolvido por Wayne Rasband no *National Institutes of Health*. O cálculo das áreas é feito pela contagem de *pixels* (*picture element*) das regiões selecionadas. Para fazer as medições é preciso calibrar a foto, informando ao programa qual é o tamanho em μm de cada *pixel*. Este *software* é muito útil e prático para medidas de microestruturas na imagem, como o número de microestruturas no campo e a áreas dos microelementos estruturais. No caso do TA para avaliar hiperplasia e hipertrofia.

Tendo em vista os gastos monetários, de serviço, sobrecarga de trabalho de profissionais da saúde pública e privada com o diabetes, obesidade e as inúmeras complicações destes advindas, acrescidos da característica multifatorial que aumenta a complexidade da prevenção e terapêutica, faz-se necessário buscar o entendimento dos mecanismos relacionados bem como o papel do epitélio intestinal e do tecido adiposo na fisiopatologia da doença. Este estudo colabora com a ampliação dos campos de estudos em saúde e reforça a importância da compreensão dos mecanismos relacionados ao binômio saúde doença em endocrinologia.

2 ARTIGO CIENTÍFICO - EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA E USO DE INSULINA ORAL NO EPITÉLIO INTESTINAL E TECIDO ADIPOSEO

Isabella Maravieski Lipinski¹. Bruno Wesley Soltovski².
Bruna Carletto². Adriana Yuriko Koga². Dionízia Xavier Scomparin³.
Ricardo Rodrigues⁴. Marcos Ricardo Rodrigues Da Silva⁵
Leandro Cavalcante Lipinski⁵. Paulo Vítor Farago⁶.

2.1 INTRODUÇÃO

Na pesquisa científica o uso de insulina oral tem sido alvo de diversos estudos desde sua descoberta em 1920, aumentando nas últimas décadas, no entanto seu uso subcutâneo é o mais efetivo atualmente, porém resulta em hiperinsulinemia periférica causando hipertensão e aterosclerose (HVID, *et. al.*, 2019; SUDHAKAR, *et. al.*, 2020). Embora este peptídeo seja reconhecidamente degradado no ambiente estomacal pelo baixo pH gástrico, barreira enzimática, e tenha baixa permeabilidade intestinal enfrentando diversas barreiras para sua ação (XING, *et. al.*, 2017), ele melhora parâmetros séricos e altera morfológicamente o epitélio intestinal, revertendo o quadro de hipertrofia intestinal que ocorre em dieta hiperlipídica e em condições de hiperinsulinemia e hiperglicemia tais como na diabetes (AL RUBEAN; JAYAVANTH; RAFIULLAH, 2016; LIPINSKI *et al.*, 2017). Atua também no tecido adiposo reduzindo sua massa (LIPINSKI, *et al.*, 2017). A insulina está presente no leite humano e de outros mamíferos (SUKHOTNIK, *et. al.*, 2008). Estudos antigos e recentes demonstram tentativas de aumento da biodisponibilidade da droga aliando seu uso a diversos veículos e moléculas, testando também seu uso intrajejunal (TOUITOU; RUBINSTEIN, 1986; FONTE, *et. al.*, 2015) e demonstrando a ação da droga na prevenção do desenvolvimento de Diabetes tipo 1 (GEDAWY, *et. al.*, 2017).

A permeabilidade intestinal é baixa para insulina (principalmente no duodeno) e este fenômeno fisiológico é imprescindível para a efetiva absorção e efetivação do fármaco (SILVA, *et. al.*, 2003). Para compreender melhor o uso da insulina oral,

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) Av. Gal Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (UEPG)

³ Departamento de Biologia Geral (UEPG)

⁴ Curso de Medicina (UEPG)

⁵ Departamento de Medicina (UEPG)

⁶ Departamento de Farmácia (UEPG).

estabeleceu -se como modelo animal o uso do rato Wistar. O uso do peptídeo nesse modelo animal melhora parâmetros lipídicos, glicêmicos e colesterol total, e aumenta o peso da mucosa, circunferência e altura de vilosidades no intestino delgado, apoptose diminuída e aumento da proliferação de células intestinais ((TOUITOU; RUBINSTEIN, 1986), sendo um reconhecido fator trófico de crescimento e citoproteção intestinal (KUIKEN, *et. al.*, 2017; SUKHOTNIK, *et. al.*, 2008).

A diabetes e obesidade estão fortemente associadas, estimando-se que 80% dos diabéticos apresentem excesso de peso, pois o tecido adiposo funciona também como um tecido endócrino, responsável pela secreção de vários hormônios, tais como as adipocinas, leptinas e várias citocinas inflamatórias (ANTONIOLI, *et. al.*, 2020). É possível que, além do aumento da inflamação crônica ligada à obesidade e ao desenvolvimento do diabetes, a microbiota do TGI esteja relacionada ao efeito dos fármacos e que diferentes dietas promovam diferentes microbionas que afetam diretamente o metabolismo humano e animal. Assim faz-se imperativa na pesquisa científica a compreensão da maior amplitude possível dos mecanismos de resposta orgânica à estas doenças e da ação desta molécula, assim como os mecanismos gastrointestinais participantes da interação insulina-tecido, visando o desenvolvimento de alternativas de tratamento menos invasivas, menos dolorosas e de maior eficácia, custo e adesão (HIRLEKAR, 2017). A via oral tem preferência dentre todas as vias alternativas de uso, além da similaridade de distribuição com a endógena (GEDAWY, *et. al.*, 2017). Esse estudo foi desenvolvido objetivando avaliar o comportamento histológico do intestino delgado, e de adipócitos de ratos Wistar, em duas diferentes dietas na presença de IO (insulina oral).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, aprovado em 2017, sob o Processo CEUA 040/2017; Protocolo 12191/2017.

2.2.1 Modelo animal e tratamento

A ração utilizada na dieta dos animais foi confeccionada a partir de 600g da convencional de laboratório Nuvilab®, acrescida de 200g de farelo de soja, 180g de

leite condensado e 200g de gordura bovina; adicionando-se 200ml de água para facilitar a peletização. A secagem ocorreu sob refrigeração por 24 horas.

Foram utilizados 48 ratos Wistar machos, com peso médio 200g, com 10 semanas de idade. Os animais eram mantidos por ciclo claro/escuro de 12 horas, alocados em gaiolas de fundo sólido, água *ad libitum* e temperatura mantida a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Foram separados em quatro grupos de estudo com as seguintes dietas e tratamento: Grupo 1 controle (n=12) submetido à dieta padrão para animais de biotério e gavagem com 0,2 ml de água; Grupo 2 (n=12) submetido à dieta padrão para animais de biotério e gavagem com 20 U.I (Unidades Internacionais) de Insulina do tipo Regular; Grupo 3 (n=12) submetido à dieta hiperlipídica para animais de biotério e gavagem com 0,2 ml de água; Grupo 4 (n=12) submetido à dieta hiperlipídica e gavagem com 20 U.I. de Insulina Regular. Os animais foram pesados semanalmente e o tratamento decorreu por 60 dias ininterruptos. A administração da insulina foi feita por gavagem. As gavagens foram realizadas entre as 18:00h e as 20:00h. Os animais do grupo controle receberam gavagem de água em igual volume ao do grupo tratado.

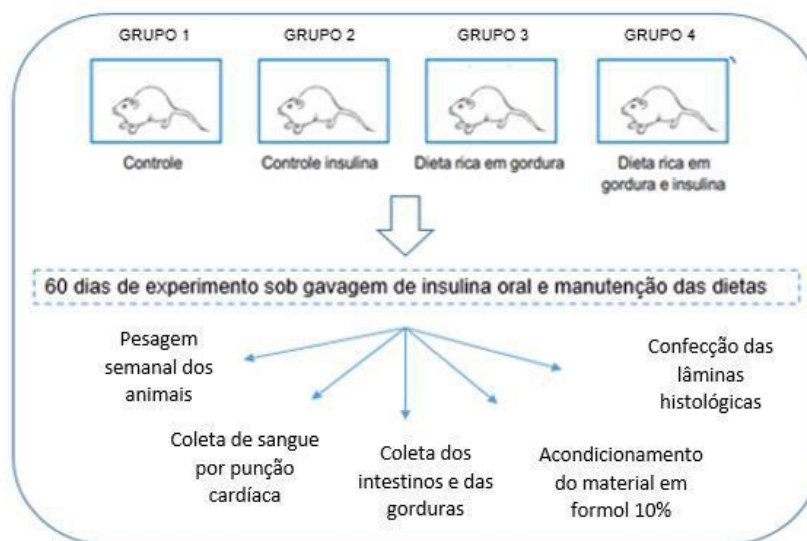


Figura 02 - Representação esquemática do protocolo experimental.
Fonte: A autora (2021)

2.2.2 Colheita das gorduras e intestinos

No 60º dia do experimento os animais ficaram em jejum por 8-12 horas, marcados a fim de identificação e submetidos a eutanásia, coleta de sangue e órgãos.

Para a anestesia usou-se Isoflurano até a total perda da consciência e resposta a estímulos do animal, após foi realizado deslocamento cervical. Em decúbito

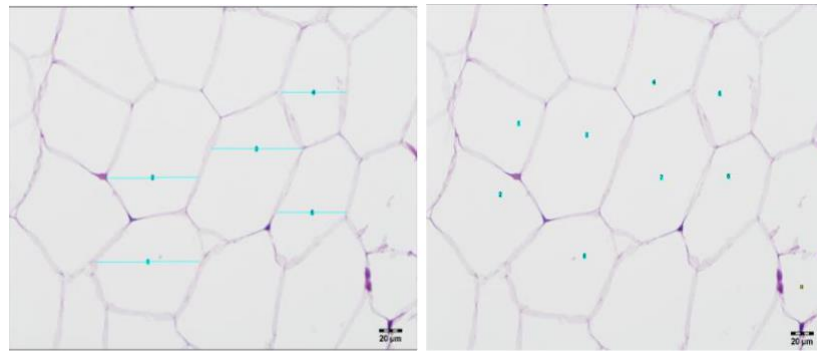
dorsal foi realizada uma incisão mediana, e abertura dos planos, até a completa exposição dos órgãos, para coleta das gorduras omentais, mesentéricas, retroperitoneais, e intestino, que foi removido e dividido em três segmentos: duodeno (10cm do piloro ao ligamento de Treitz), jejuno proximal (10cm do ligamento de Treitz) e íleo distal (10cm da junção íleo-cecal). Em sequência foi realizada pesagem do total de tecidos coletados em balança de precisão e imediato acondicionamento em recipientes individuais com identificação contendo solução salina de formol a 10%, onde foram mantidos por período superior a quatro meses.

2.2.3 Processamento e confecção das lâminas de gordura

Os tecidos coletados foram cortados em peças de 1cmx 1cm e alocados em cassetes plásticos e, em seguida, desidratados e diafanizados para posterior inclusão em blocos de parafina, os mesmos foram submetidos a cortes com 5 µm de espessura, transferidos para lâminas de vidro e corados com Hematoxilina de Harris e Eosina de Lison (HE) e posteriormente avaliados por microscopia de luz.

2.2.4 Análise histomorfométrica das gorduras

A análise morfométrica foi realizada através da fotomicrografia dos tecidos em lâmina com posterior utilização do programa ImageJ (ImageJ 1.50i, Bethesda, MD, Estados Unidos) sobre estas, a fim de visualizar e identificar as estruturas para sua quantificação. Os dados foram alocados em planilha (Windows Excel, Microsoft, Redmond, WA, Estados Unidos) para posterior análise estatística. Foram observados três pontos por lâmina. Na análise do tecido adiposo foram selecionados os adipócitos íntegros, selecionados através da visualização de suas bordas intactas, analisados os diâmetros dos mesmos e a quantidade de adipócitos intactos em cada campo de visualização. Exemplo na figura 03.



Fonte: A autora (2021)

Figura 03 - Microfotografias de tecido adiposo do mesentério demonstrando à esquerda a mensuração da área do adipócito e à direita contagem do número de células (Aumento de 40x). Efeito do tratamento com insulina oral sobre o tamanho dos adipócitos em ratos alimentados com dieta hiperlipídica- histomorfometria.

2.2.5 Processamento e confecção das lâminas do intestino

Na análise do tecido intestinal foram analisadas as porções do duodeno, jejuno, íleo e ceco. Os fragmentos foram processados rotineiramente para histologia da mesma forma descrita para os fragmentos de gordura, porém com cortes com 3 µm de espessura, e igualmente corados pelo método de hematoxilina-eosina.

2.2.6 Análise histomorfométrica intestinal e bioquímica

Vilosidades: medidas de altura e largura., cada medição ocorreu em uma vilosidade por campo de 10x e preferencialmente em vilosidades que não apresentassem artefatos. Para a altura era traçada uma reta entre o ponto mais alto da vilosidade e a base da vilosidade. Para a largura foi traçada uma reta próxima a porção média da vilosidade. Mucosa: medida da espessura total da mucosa. As medições da espessura total da mucosa foram realizadas em todas as amostras. Para a medição foi traçada uma reta entre o ápice da vilosidade e a base da mucosa. O aumento utilizado foi o de 10x e foi realizada uma medição por campo. As medições da espessura dos epitélios foram realizadas em 3 campos diferentes com a objetiva de 40x, sendo feita uma medição em cada campo em todas as amostras. Essas medições foram feitas preferencialmente nas extremidades das vilosidades ou da mucosa (no caso do intestino grosso) e as laterais das vilosidades foram evitadas. Para esse tipo de análise foi traçado uma reta entre o ápice do epitélio da vilosidade

ou da mucosa (no caso do intestino grosso) até a membrana basal do epitélio ou até junção com o tecido conjuntivo. Em todas as análises foram analisados três campos por lâmina evitando as extremidades e às cegas. (BANKS, 1992). O programa utilizado para a captura das fotos e para as medições foi o LAS EZ, fornecido pela empresa Leica Microsystems® usado por conveniência

2.2.7 Análise estatística:

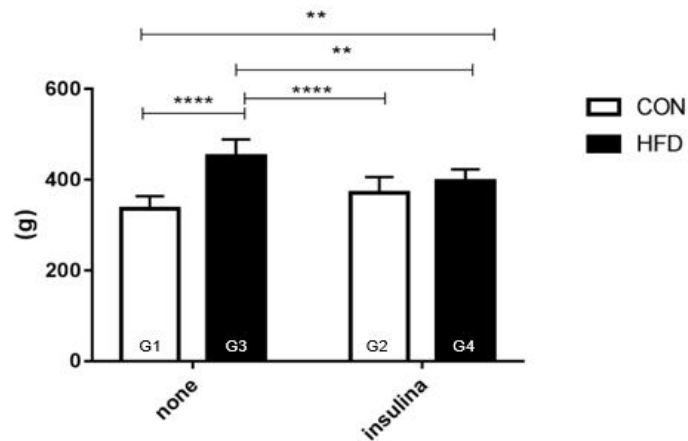
A avaliação estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prisma Versão 7.0 pela análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguido de teste Tukey, com intervalo de variância em 95% ($p \leq 0,05$).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Peso Corporal

Há interação entre as variáveis dieta e tratamento com insulina oral [$F(1, 31) = 16,59$ $P=0,0003$]. DH aumenta o peso corporal do animal, porém o uso de IO reduz o peso corporal quando em dieta obesogênica.

O aumento de peso corporal e adiposidade dos ratos alimentados com DH certamente se deve à sua composição hipercalórica e hiperlipídica (GIL-CARDOSO, *et. al.*, 2017). Outros estudos obtiveram sobrepeso animal na utilização de DH em ratos quando em comparação à ratos que recebiam dieta padrão de laboratório (LEOPOLDO, *et. al.*, 2016). Ambos os grupos que receberam DH tiveram peso maior que o grupo controle, mas os animais G4 apresentaram-se mais magros que G3. Recebendo maior quantidade de gordura na ingesta G3 e G4 parecem ter sofrido modificação da estrutura absorptiva intestinal, concordando com os resultados do estudo de La Serre, *et. al.*, (2010), em que a DH aumenta a permeabilidade intestinal por dano na barreira epitelial.

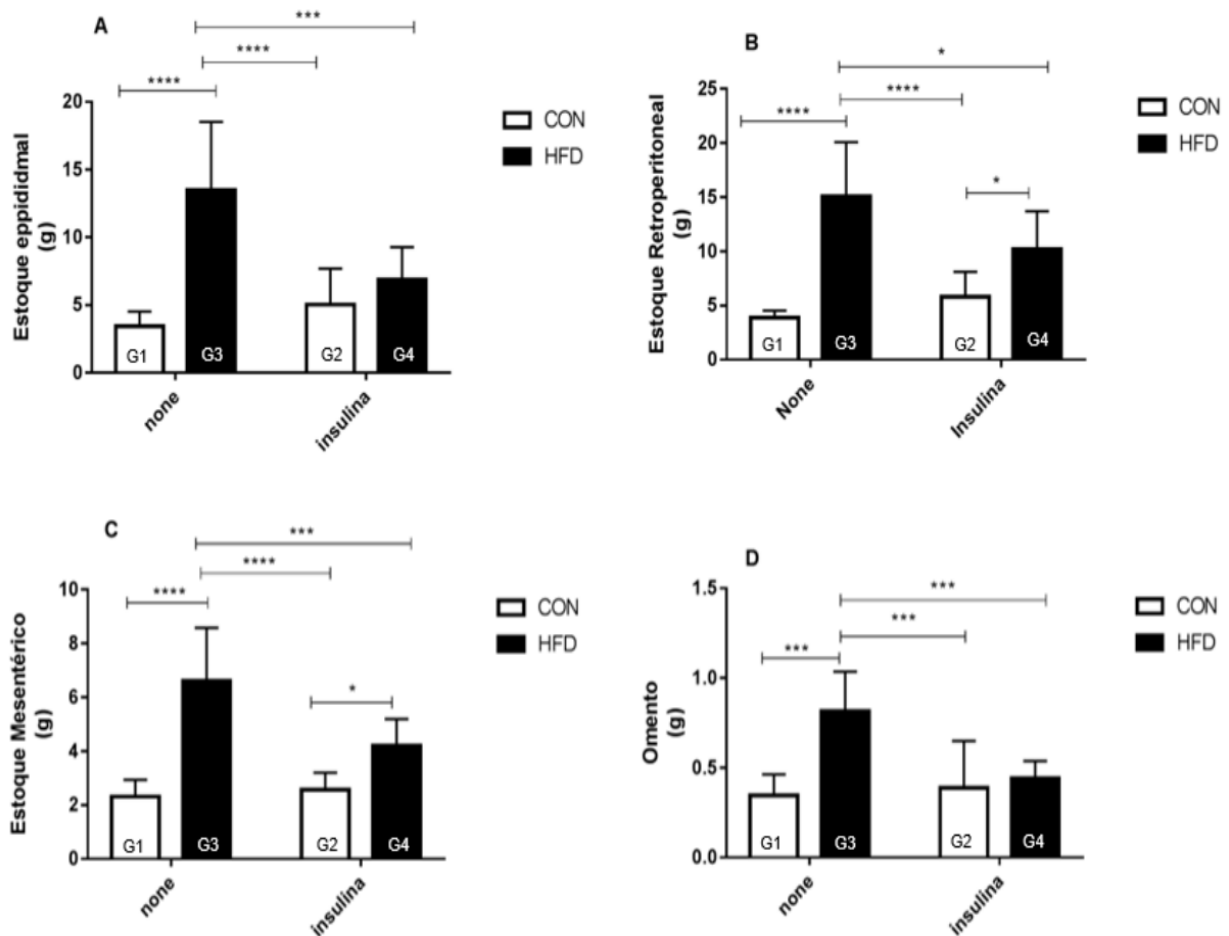


Fonte: A autora (2021)

Gráfico 01 - Peso corporal de ratos Wistar (N =48). Efeito do tratamento com insulina oral sobre o peso de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Após tratamento dietas hiperlipídicas ou convencionais sem (G1, G3) ou com (G2, G4) adição de insulina oral durante 60 dias. Os dados são a média \pm DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças entre os grupos. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey ** $p < 0,011$ e **** $p < 0,0001$.

2.3.2 Peso das Gorduras

O gráfico 02 apresenta os dados de estoques de gordura corporal. Nota-se que DH aumenta o peso do estoque de gordura omental, mesentérica e retroperitoneal e tem esse aumento dificultado pela administração concomitante de insulina oral, tornando menor o peso das gorduras em DH+IO em comparação a DH; nos animais que recebiam DH e insulina oral foi observada notável diminuição no ganho de peso e gordura visceral, sugerindo ação metabólica indireta da insulina, mesmo que sofrendo degradação pré-sistêmica na ingesta (AIR, *et al.* 2002).

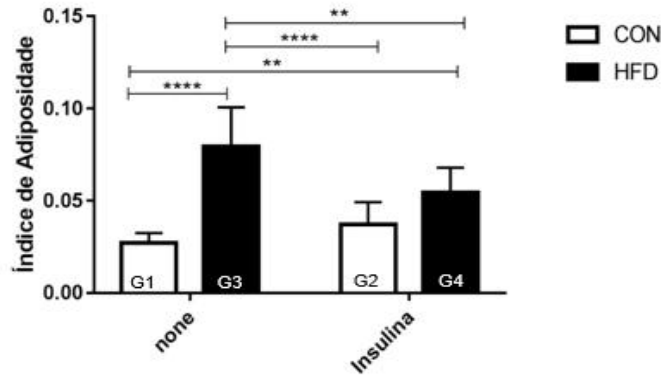


Fonte: A autora (2021)

Gráfico 02 - Peso das gorduras de ratos Wistar após tratamento de 60 dias. Efeito do tratamento com insulina oral sobre o peso das gorduras em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. As medições foram realizadas em balança analítica após 60 dias de experimento. Os dados são a média ± DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças entre os grupos A-Estoque de gordura Omental; B-Estoque de gordura Retroperitoneal; C-Estoque de gordura Mesentérica. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

2.3.3 Índice de Adiposidade

O gráfico 03 apresenta o índice de Adiposidade calculado pela razão da gordura corporal total sobre peso corporal final x100 ($GCT/PCF \times 100$). Há interação entre as variáveis dieta e tratamento com insulina [$F(1, 32) = 12,26$ $P = 0,0014$]. O fator dieta foi responsável por afetar os resultados em 52,68% [$F(1, 32) = 48,36$ $P < 0,0001$]. A dieta provocou aumento significativo nos animais DH quando comparados ao grupo que recebeu apenas ração comercial ($p < 0,05$). Todavia, foi observado também para o grupo que recebeu a insulina oral diminuição do índice de adiposidade ($p < 0,05$). Quando a dieta aumenta os níveis glicêmicos e lipídicos os níveis de insulina aumentando o peso corporal e o índice de adiposidade, através do efeito hipertrófico deste hormônio (GEDAWY, *et. al.*, 2017).

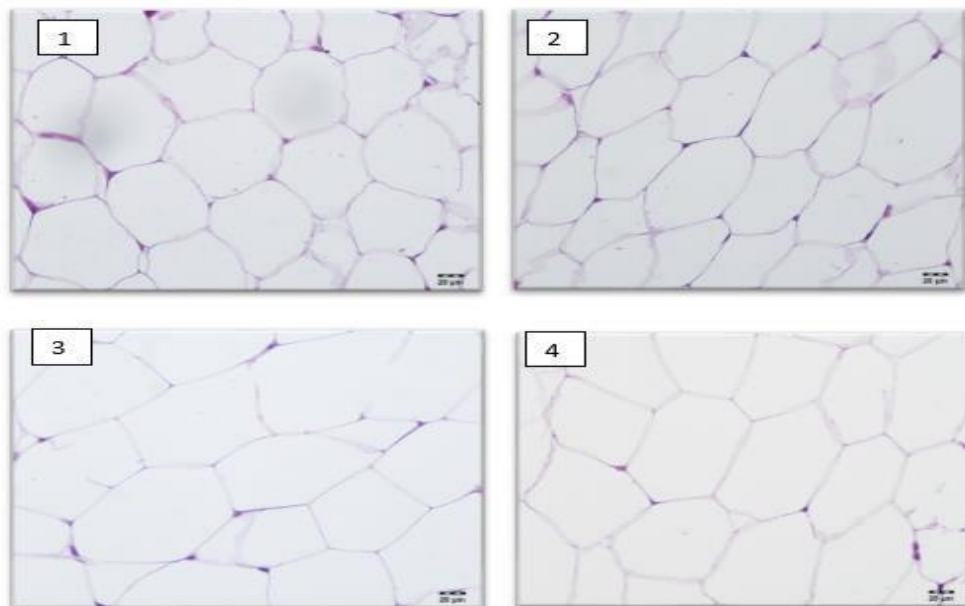


Fonte: A autora (2021)

Gráfico 03 - Índice de adiposidade de ratos Wistar após tratamento de 60 dias. Efeito do tratamento com insulina oral sobre o índice de adiposidade em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os dados são a média \pm DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças significativas entre os grupos. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

2.3.4 Hiperplasia e Hipertrofia de Adipócitos

Na análise histomorfométrica das gorduras dos animais do estudo podemos observar no gráfico 04, que a dieta hiperlipídica ocasionou hipertrofia nos adipócitos, aumentando significativamente a densidade total dos adipócitos, na área seccional média e em seu volume. Há aumento visível do grupo 3, na imagem utilizou-se do mesmo aumento para fotomicrografar as células de gordura do tecido adiposo mesentérico dos 4 diferentes grupos e às cegas.

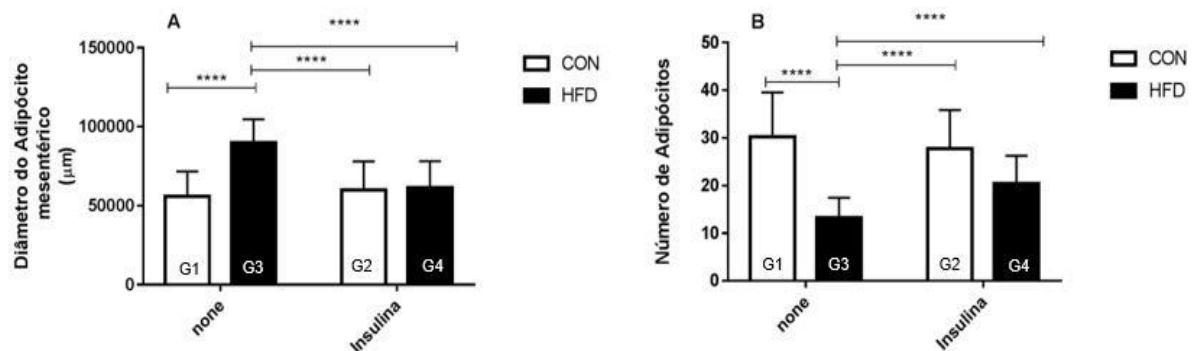


Fonte: A autora (2021)

Figura 04 - Histologia da gordura Mesentérica dos grupos 1-2-3-4 (coloração hematoxilina-eosina; aumento de 40x). Efeito do tratamento com insulina oral sobre o tamanho dos adipócitos em ratos alimentados com dieta hiperlipídica

2.3.5 Tecido Adiposo Mesentérico

O gráfico 05 apresenta os dados do tecido adiposo mesentérico. Em A observa-se o diâmetro da célula adiposa. O tratamento com insulina oral foi eficaz em provocar redução do diâmetro do adipócito no grupo DH+ insulina oral quando comparado ao grupo DH que não recebeu o tratamento com insulina, resultado de alta relevância estatística ($p < 0,0001$). Não foram observadas alterações no grupo controle. Em B mostra o número de adipócitos por campo observado e para este parâmetro não se obteve diferença significativa. Os animais que foram alimentados com DH apresentam número menor de adipócitos por campo quando comparado ao grupo controle ($p = 0,0003$). Para este parâmetro não foi observada influência da insulina comparativamente entre grupos 3 e 1 que recebiam ração convencional, apenas e entre o grupo de recebeu DH, que tinha menor número de adipócitos, e o grupo que recebeu ração convencional e insulina oral em que o número de células adiposas quase duplicou ($p < 0,0001$).



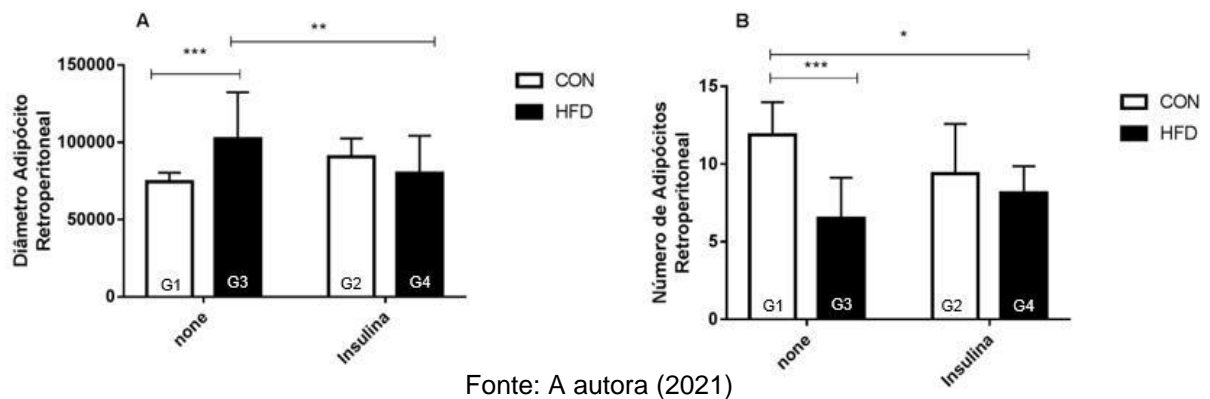
Fonte: A autora (2021)

Gráfico 04 - Efeito do tratamento com insulina oral sobre a morfologia do tecido adiposo mesentérico de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Efeito do tratamento com insulina oral sobre a morfologia do tecido adiposo mesentérico de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os dados são a média \pm DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças entre os grupos. A- Diâmetro das células adiposas do tecido adiposo mesentérico; B- Número de células adiposas no tecido mesentérico. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

2.3.6 Tecido Adiposo Retroperitoneal

O Gráfico 05 apresenta os dados de gordura Retroperitoneal. Em A o diâmetro das células adiposas. É possível notar que há hipertrofia do adipócito nos animais que recebiam DH, e que esta hipertrofia foi reduzida pelo uso de insulina oral [F (1, 84) = 19,27 $P < 0,0001$]. A Figura 08 B mostra o número de células adiposas observada por

campo. [F (1, 28) = 5,552 P=0,0257] Observa-se que a dieta hiperlipídica provoca diminuição do número de células observadas, enquanto o uso de insulina oral não demonstrou significância com relação ao grupo que recebia dieta DH e gavagem de água. Essa diminuição pode ser devido ao aumento do tamanho celular ocupando maior espaço no campo de visualização.



Fonte: A autora (2021)

Gráfico 05 - Efeito do tratamento com insulina oral sobre a morfologia do tecido adiposo retroperitoneal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Efeito do tratamento com insulina oral na hiperplasia e hipertrofia de adipócitos do tecido adiposo retroperitoneal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os dados são a média \pm DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças entre os grupos. A- Diâmetro das células adiposas do tecido adiposo retroperitoneal; B- Número de células adiposas do tecido adiposo retroperitoneal. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,001$.

2.3.7 Tecido Adiposo Omental

O gráfico 06 apresenta os dados de morfologia do tecido adiposo omental. Vê-se que não houve interação entre as variáveis dieta e tratamento com insulina oral [F (1, 72) = 3,8 P=0,0551]. Mas houve influência do fator dieta [F (1, 72) = 8,675 P=0,0043]. Os animais do grupo DH apresentaram aumento do diâmetro do adipócito. Não observamos mudanças com o tratamento oral com insulina neste parâmetro. A figura 10B apresenta os dados sobre números de adipócitos por campo. Neste caso também não houve interação entre as variáveis [F (1, 22) = 0,0004945 P=0,9825], e mais uma vez observamos o efeito da dieta sobre este parâmetro [F (1, 72) = 42,45 P<0,0001]. Nota-se que a dieta hiperlipídica provoca diminuição do número de adipócitos por campo quando comparado ao grupo controle, essa diminuição se mostrou presente quando os animais receberam tratamento com insulina oral, assim o tratamento com insulina oral não provou mudanças na contagem de células.

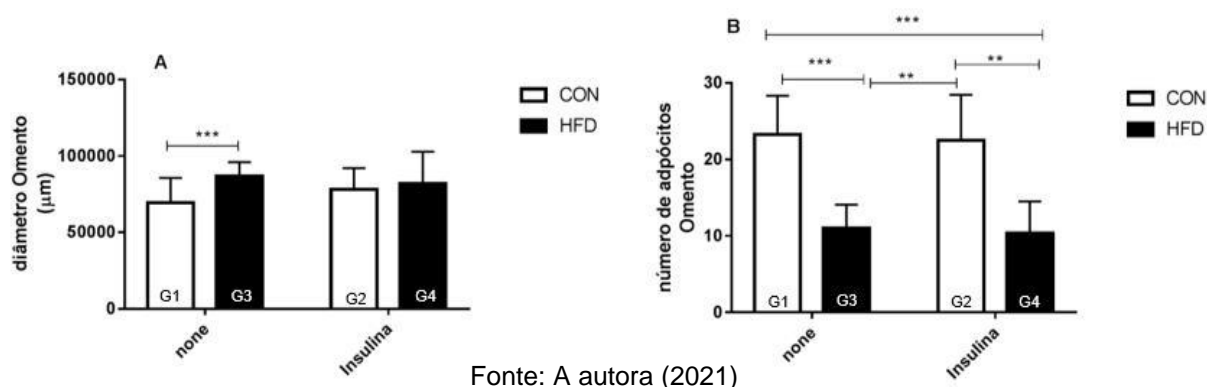


Gráfico 06 - Diâmetro dos adipócitos do omento. Efeito do tratamento com insulina oral na hiperplasia e hipertrofia de adipócitos do tecido adiposo omental de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os dados são a média \pm DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças entre os grupos. A- Diâmetro das células adiposas do tecido adiposo omental; B- Número de células adiposas do tecido adiposo omental. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,001$.

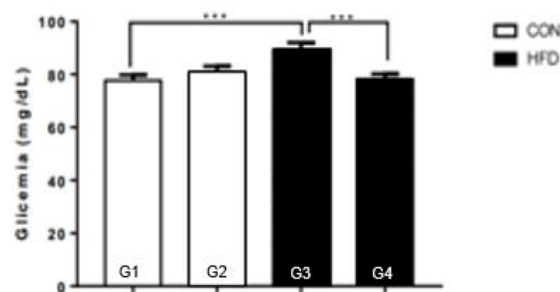
Foi observada nos três tecidos analisados hipertrofia de adipócitos nos animais que recebiam dieta hiperlipídica e diâmetro de adipócitos significativamente menor nos animais que recebiam DH com adição de insulina oral comparado ao grupo sem insulina, ou seja, ao passo em que a DH aumenta o tamanho dos adipócitos a insulina oral inibe a hipertrofia. Achado de grande valia quando consideramos que o tamanho do adipócito possui maior significância do que o número de adipócitos presentes no tecido, pois indivíduos obesos com poucos adipócitos de grande diâmetro possuem menor tolerância à glicose e maior hiperinsulinemia do que aqueles com o mesmo grau de obesidade e adipócitos de menor diâmetro, porém em maior número; este mesmo estudo relata que adipócitos hipertrofiados são observados em pré-diabéticos e diabéticos tipo 2, correlacionando o aumento celular do tecido gorduroso ao aumento da glicemia. Essas células aumentadas também podem gerar aumento da resposta inflamatória através de macrófagos atraídos pela morte precoce de células adiposas grandes (LUNDGREN, *et. al.*, 2007). Acompanhando a redução do peso corporal que ocorreu no grupo 4, que recebeu DH e IO, também houve redução na hipertrofia celular em gordura retroperitoneal e mesentérica.

2.3.8 Glicemia de Jejum

O Grupo 3 (DH) apresentou aumento da glicemia de jejum em comparação com os outros grupos. Por outro lado, o Grupo 4 (DH + insulina) teve menor glicemia de jejum média quando comparado com o Grupo 3 ($p < 0,01$) e sem diferença estatística quando comparado aos Grupos 1 e 2. Demonstrando que DH aumenta a glicemia

capilar e a IO diminui. Esse efeito hipoglicemiante da insulina oral, mesmo proteolisada no TGI, concorda com outros estudos que revelaram efeito hipoglicemiante da IO (WOITISKI, *et. al.*, 2010; HVID, *et. al.*, 2019). Existem receptores específicos de insulina na membrana luminal e basolateral de enterócitos, sugere-se que seja também por esta rota que a ação hipoglicemiante da insulina quando administrada por via oral se dê (SUKHOTNIK, *et. al.*, 2008). Em ambos os grupos de animais que receberam IO (G2 e G4) esta foi administrada do 1º ao 60º dia do estudo.

Portanto a IO pode ter contribuído para o sobrepeso dos animais no início do tratamento, antes de a DH ter provocado possível dano na barreira epitelial e no micro bioma intestinal, que pode levar a afrouxamento das cadeias agregantes das células intestinais; fenômeno que pode ter favorecido a entrada da grande molécula do hormônio no metabolismo adentrando o lúmen intestinal, ação explicada por Silva (2003), provocando a redução da glicemia, do peso corporal e da hipertrofia do adipócito. Portanto o tempo de 60 dias pode ter sido um fator limitante para esclarecer esta hipótese, concordando com Wu, *et. al.*, (2011), que demonstra em seu estudo mudanças mais severas na microbiota em dietas de longo prazo. Também é possível que a ação da insulina tenha sofrido mudanças farmacológicas de acordo com o micro bioma do animal, diferenciado pelas dietas tal como ocorre com o hipoglicemiante metformina no estudo de De La Cuesta-Zuluaga, *et. al.*, (2016), provocando assim efeitos diferentes nas diferentes dietas, concordando com a afirmação de Silva (2003), de que diferentes dietas mudam composição e função da microbiota intestinal, alterando assim os fenômenos metabólicos decorrentes desta.

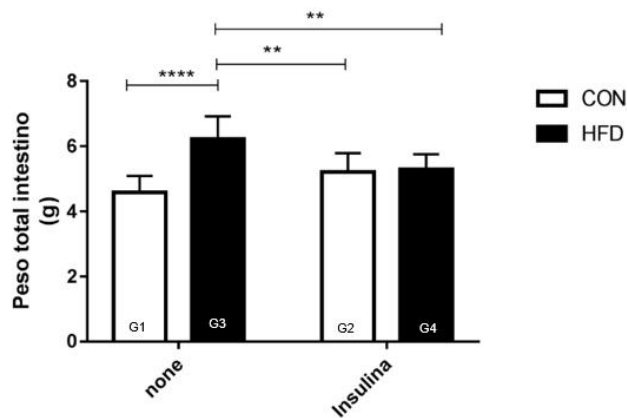


Fonte: A autora (2021)

Gráfico 07 - Efeito da insulina oral e da dieta sob a glicemia de jejum. Efeito do tratamento com insulina oral na glicemia de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. As medidas representam as glicemias analisadas após jejum de 12 horas ($n = 10$). Entre o grupo 1-2, 1-4 e 2-4 não houve diferença estatística. As barras representam a média dos grupos \pm erro padrão da média. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

2.3.9 Peso Intestinal

O gráfico 08 apresenta o peso total do intestino demonstrando interação entre as variáveis dieta e tratamento com insulina oral [$F(1,30) = 15.53$ $p=0.0004$]. Também pode-se observar efeito do fator dieta sobre a variância dos dados [$F(1,30) = 18,68$ $p=0.0002$]. O peso intestinal dos animais tratados com ração hiperlipídica mostrou-se maior em relação ao grupo de animais tratados com dieta padrão de laboratório e a IO concomitante à DH reduz esse aumento. Osborne, *et. al.*, (2000), traz resultados semelhantes em que peso de duodeno de ratos hiperglicêmicos aumentou quase 50% a mais comparado a ratos normoglicêmicos, e peso intestinal de animais tratados com insulina menor do que animais tratados com placebo, estudo no qual também notou-se menor peso de jejuno e ceco de ratos tratados com insulino terapia quando comparados à animais não tratados, assim como neste estudo no grupo 4 cujo menor peso intestinal demonstra a capacidade da insulina em impedir o aumento do peso intestinal que ocorre pela dieta hiperlipídica. A insulina promove também reversão da hiperplasia intestinal diabética, ocasionando diminuição da altura de vilosidades e estacionamento da proliferação celular (SUKHOTNIK, *et. al.*, 2008).



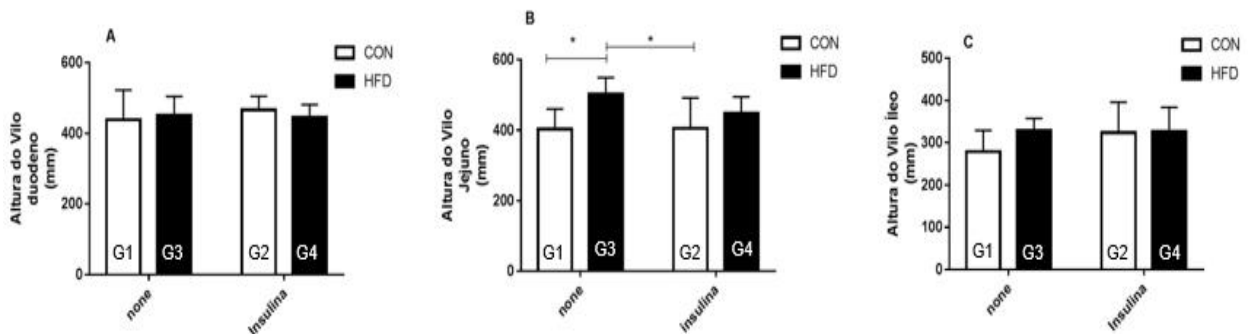
Fonte: A autora (2021)

Gráfico 08 - Efeito do tratamento com insulina oral sobre o peso intestinal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Efeito do tratamento com insulina oral sobre o peso intestinal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. As medições foram realizadas em balança analítica após 60 dias de experimento. Os dados são a média \pm DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças entre os grupos. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,01$; **** $p<0,0001$.

2.3.10 Altura dos Vilosidades

O gráfico 09 apresenta dados de altura das vilosidades das diferentes partes do intestino como em A nas vilosidades do duodeno; em B nas vilosidades do jejuno

e C nas vilosidades do íleo. Para o duodeno não foram observadas mudanças na altura das vilosidades. Para o jejuno não houve interação entre as variáveis, apenas efeito do fator dieta. O grupo 3 apresentou aumento na altura da vilosidade jejunal quando comparado ao grupo controle. Para os animais que receberam IO a altura da vilosidade do jejuno foi igual à dos animais que receberam dieta padrão de laboratório. Para o íleo também não se obteve diferença na altura da vilosidade. DH promoveu aumento da altura da vilosidade apenas em jejuno. A insulina oral não demonstrou alterar a altura das vilosidades dos tecidos analisados, porém, outros estudos demonstram aumento da altura da vilosidade em suplementação com IO (SHAMIR, *et. al.*, 2005). Podemos notar aumento da altura conforme o gráfico 13, porém este não foi estatisticamente significativo.



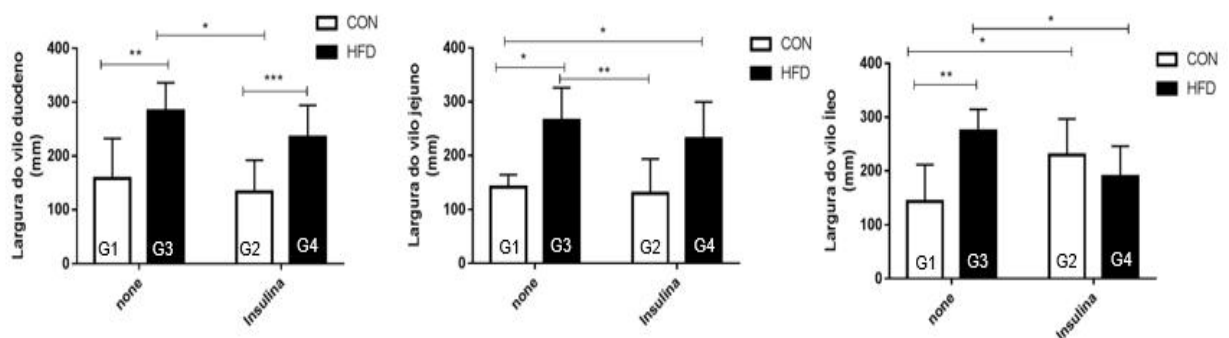
Fonte: A autora (2021)

Gráfico 09 - Efeito do tratamento com insulina oral na altura das vilosidades intestinais de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Efeito do tratamento com IO na altura das vilosidades intestinais de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os dados são a média \pm DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças entre os grupos. A- Altura da vilosidade do Duodeno; B- Altura da vilosidade do Jejuno e C- Altura da vilosidade do Íleo. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,001$.

2.3.11 Largura das Vilosidades

O gráfico 09 apresenta os dados de largura da vilosidade. Pode se observar na figura A, a média da largura das vilosidades do duodeno, em B a média da largura da vilosidade do jejuno e em C a média da largura da vilosidade do íleo. Para o duodeno não houve interação entre as variáveis dieta e tratamento com insulina oral [$F(1, 27) = 0,2768$ $P = 0,6031$]. Podemos observar que houve interferência da variável dieta e o grupo 3 apresentou aumento significativo da largura das vilosidades quando comparado ao grupo controle [$F(1, 27) = 26,18$ $P < 0,0001$]. Para o jejuno observou-se também que não houve interação entre as variáveis [$F(1, 23) = 0,2178$ $P = 0,6451$]

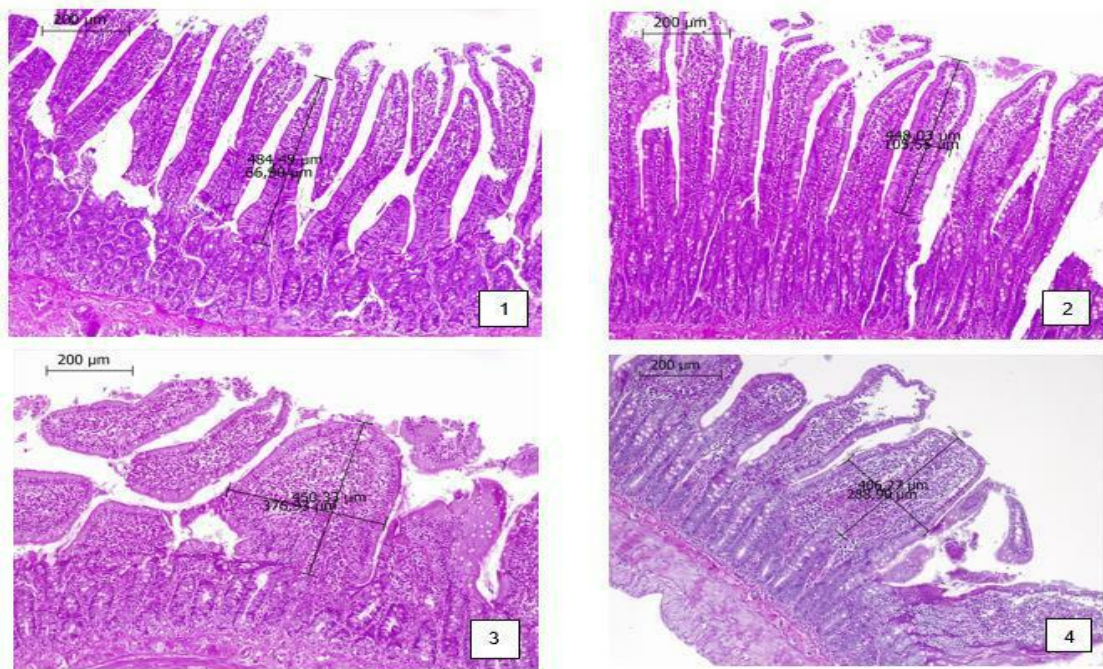
mas observamos efeito da variável dieta [F (1, 23) = 20,82 P=0,0001] influenciando na variância dos dados. Dessa forma o grupo 3 apresentou aumento significativo na largura da vilosidade quando comparado ao seu grupo controle. Para o Íleo o ANOVA de duas vias mostrou interação entre as variáveis dieta e tratamento com insulina oral [F (1, 28) = 16,21 P=0,0004]. Também pode ser observada influência da variável dieta na variância dos dados [F (1, 28) = 4,538 P=0,0421]. Assim, no íleo a IO reduz largura da vilosidade quando concomitante a DH e aumenta largura de vilosidade em dieta padrão de laboratório. Apesar de na dieta padrão de laboratório não ter havido efeito sobre o peso de intestino, a insulina aumenta área e largura de vilosidades no íleo. Esse fenômeno pode estar relacionado com o efeito anabólico da insulina e ainda se sugere ação local intestinal que ainda não se sabe de que forma pode ocorrer (HVID, *et. al.*, 2019).



Fonte: A autora (2021)

Gráfico 10 - Efeito do tratamento com insulina oral na largura das vilosidades de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Efeito do tratamento com insulina oral na largura das vilosidades de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os dados são a média \pm DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças entre os grupos. A- Largura da vilosidade do Duodeno; B- Largura da vilosidade do Jejuno e C- Largura da vilosidade do Íleo. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,001$.

A figura 05 demonstra no duodeno exemplares fotomicrografados das diferenças de altura e largura dentre os diferentes grupos, que, apesar de no geral não apresentarem diferença estatística entre si, demonstram correlação com alguns dos resultados significativos e estudos anteriores (HVID, *et. al.*, 2019; SHAMIR, *et. al.*, 2005).



Fonte: A autora (2021)

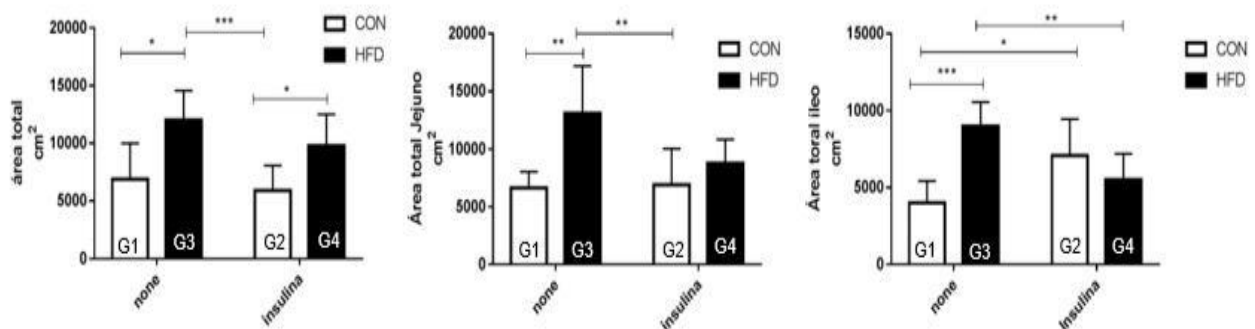
Figura 05 - Histologia intestinal do duodeno dos grupos 1-2-3-4 (coloração hematoxilina-eosina; aumento de 40x). Comparação de largura e altura de vilosidades de duodeno após tratamento com insulina oral em ratos alimentados com dieta hiperlipídica.

2.3.12 Área das Vilosidades

O gráfico 11 apresenta os dados de área total das vilosidades. Para o duodeno notou-se interação entre as variáveis dieta e tratamento oral com insulina [F (1, 23) = 0,4131 P=0,5268]. Foi observado interferência da dieta na variância dos dados [F (1, 23) = 19,99 P=0,0002]. Para o jejuno não foi observado interação entre as variáveis [F (1, 21) = 3,778 P=0,0654], mas novamente observou-se influência da variável dieta [F (1, 21) = 12,7 P=0,0018]. Para o íleo existe interação entre as variáveis dieta e tratamento com insulina oral [F (1, 26) = 23,65 P<0,0001]. Também existe influência da variável dieta onde o grupo DH apresentou aumento significativo na área total das vilosidades [F (1, 26) = 6,41 P=0,0177]. No estudo de Sukhotnik, *et. al.*, (2008), foi observado efeito reversor da diminuição intestinal, causada por maltotrexato, através do uso de IO provocando aumento da área da vilosidade (altura de vilosidade e profundidade de cripta); neste estudo a IO provoca reversão do aumento da área das vilosidades do Íleo causada pela DH. A DH aumentou também a área das vilosidades de duodeno e jejuno e diminuiu a área das vilosidades somente no íleo quando em dieta padrão de laboratório. Sugere-se que a insulina oral aja como um protetor do epitélio intestinal revertendo os danos causados recuperando a estrutura local a fim

de aproximar o tecido da anatomia original. A área das vilosidades aumentadas aumenta a absorção intestinal de nutrientes corroborando com o aumento do índice de adiposidade observado. A diminuição da área das vilosidades e logo da area de absorção em DH subtrai a absorção de nutrientes, gerando redução no tamanho do adipócito e menor índice de obesidade. A diminuição da área das vilosidades também pode contribuir para diminuis as chances de desenvolvimento de Diabetes mellitus tipo1, através da diminuição da introdução aprimorada de antígenos no sistema imunológico intestinal (SHAMIR, *et. al.*, 2005).

A largura e a area do íleo foram maiores em ratos que recebiam dieta padrão de laboratório e IO, assim como no estudo de Oh, Lee e Cho (2015), que demonstra aumento da altura de vilosidade em íleo em transposição ileal, que pode sugerir alguma similaridade do efeito da IO com os fenômenos metabólicos ocorridos na TI.



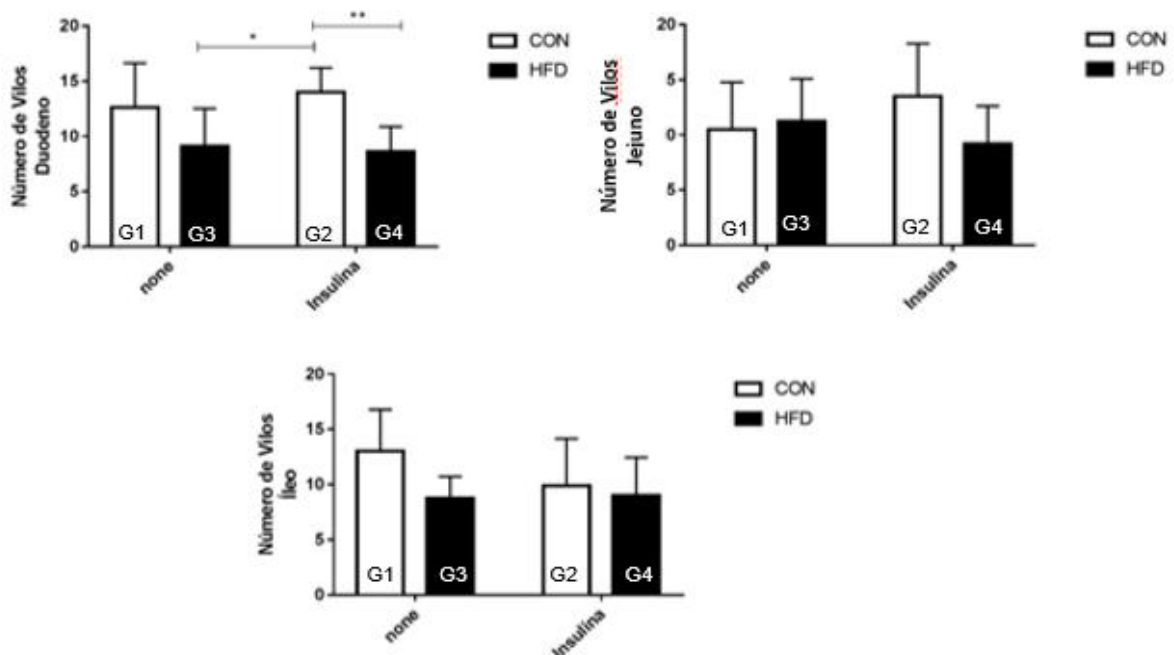
Fonte: A autora (2021)

Gráfico 11 - Efeito do tratamento com insulina oral na área das vilosidades de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Efeito do tratamento com insulina oral na area das vilosidades de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os dados são a média \pm DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças entre os grupos. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,001$.

2.3.13 Número de Vilosidades

O gráfico 12 apresenta o número de vilosidades nas diferentes partes do intestino. Em A- número de vilosidades do duodeno, em B- número de vilosidades do Jejuno e em C- número de vilosidades do íleo. Não houve interação entre a variável dieta e tratamento com insulina oral em nenhum dos três tecidos analisados [F (1, 27) = 0,8032 P=0,3780], [F (1, 29) 3,052 P=0,0912] e [F (1, 28) = 1,835 P=0,1864] respectivamente. Para duodeno e íleo observamos interferência do fator dieta, sendo maior o número de vilosidades no grupo 2 em comparação com o grupo 4 [F (1, 27) = 17,07 P=0,0003] e [F (1, 28) =4,232 P=0,0491].

A IO parece aumentar a proliferação celular em duodeno e mais acentuadamente em jejuno quando em dieta padrão de laboratório e também nota-se aumento em duodeno, jejuno e íleo em DH, Sukhotnik, *et. al.*, (2008) demonstraram resultados semelhantes, no entanto essa tendência não alcançou relevância estatística. Foi estatisticamente relevante a diminuição do número de vilosidades em G4 comparado a G2 em duodeno. Outro fator que pode ter afetado a contagem do número de vilosidades é que por ter aumentado significativamente, em largura e área, menor número de vilosidades é encontrado em cada campo de visualização pois estes têm maior tamanho espacial, sendo visualizados na lâmina em menor quantia que os que possuem menor largura, e logo, que ocupam menor espaço no campo de visualização.



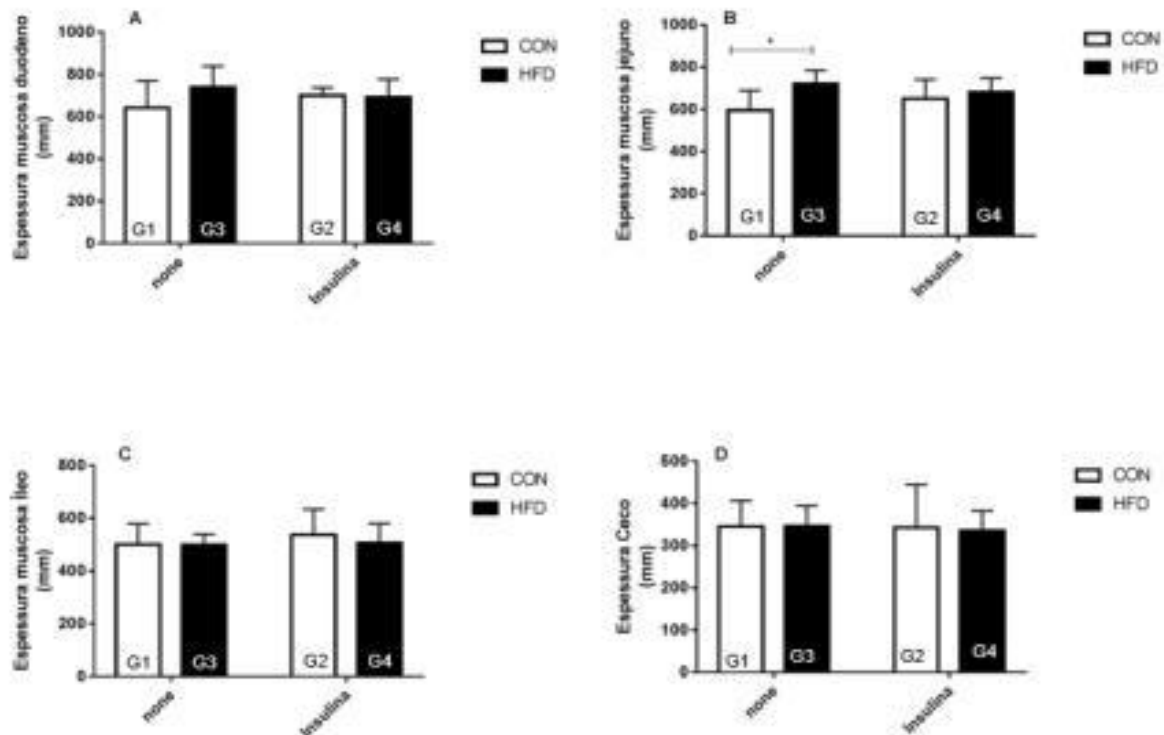
Fonte: A autora (2021)

Gráfico 12 - Efeito do tratamento com insulina oral no número de vilosidades de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Efeito do tratamento com insulina oral no número de vilosidades de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os dados são a média \pm DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças entre os grupos. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,001$.

2.3.14 Espessura da Mucosa Intestinal

O gráfico 13 apresenta os dados de espessura da mucosa intestinal. Em A- mucosa do duodeno, em B- mucosa do jejuno; em C- espessura da mucosa do íleo e em D- espessura da mucosa do ceco. Para todos os segmentos avaliados não houve

diferença significativa. [F (1, 25) = 2,384 P=0,1351], [F (1, 29) = 3,037 P=0,0920], [F (1, 26) = 0,2307 P=0,6350] e [F (1, 27) = 0,02002 P=0,8885] respectivamente. Apenas para jejuno observamos influência da variável dieta [F (1, 29) = 8,077 P=0,0081]. No jejuno nota-se um aumento da espessura da mucosa quando o animal recebe DH, tal como o peso intestinal total aumenta. Esse resultado sugere que a hiperplasia da mucosa, em vez do aumento do intestino, é responsável pelo aumento do peso da mucosa, conforme cita Sukhotnik, *et. al.*, (2008). Em duodeno, jejuno e íleo é possível observar aumento do tamanho da mucosa em G2, no entanto essa tendência não alcançou relevância estatística. Uma dieta rica em gordura é capaz de aumentar o tamanho da mucosa intestinal semelhante ao aumento ocasionado pelo Diabetes, e sua diminuição pode estar relacionada ao uso de IO, corroborando com o achado de Sukhotnik, *et. al.*, (2011), Lim, Tey e Chan, (2014), citam o encapsulamento de insulina envolta por lipídeos para facilitar sua permeação na mucosa intestinal; pode-se indagar alguma interação possível entre a presença de dieta hiperlipídica e aumento de permeabilidade da mucosa à molécula de insulina no intestino, porém os mecanismos pelos quais se dá este processo ainda não são completamente conhecidos. Foi visto em outros estudos espessuras de muco sobre o epitélio intestinal de 120 a 200 μm no duodeno e jejuno, até cerca de 500 μm no íleo e quase 1000 μm no cólon. O muco diminui potencialmente a absorção da insulina nestes locais. É suposto que a DH diminui o muco sobre os enterócitos facilitando a ligação da IO com seus receptores nas membranas luminiais e basolaterais, ou auxiliando a passagem da insulina de alguma maneira. Silva (2003), cita algumas mudanças conhecidas que ocorrem na histologia intestinal advinda da ação da microbiota, como alteração na produção de muco e na espessura da mucosa, assim a diferença de espessuras encontradas neste estudo pode também estar relacionada com a microbiota dos ratos, influenciada pela dieta de acordo com sua composição.



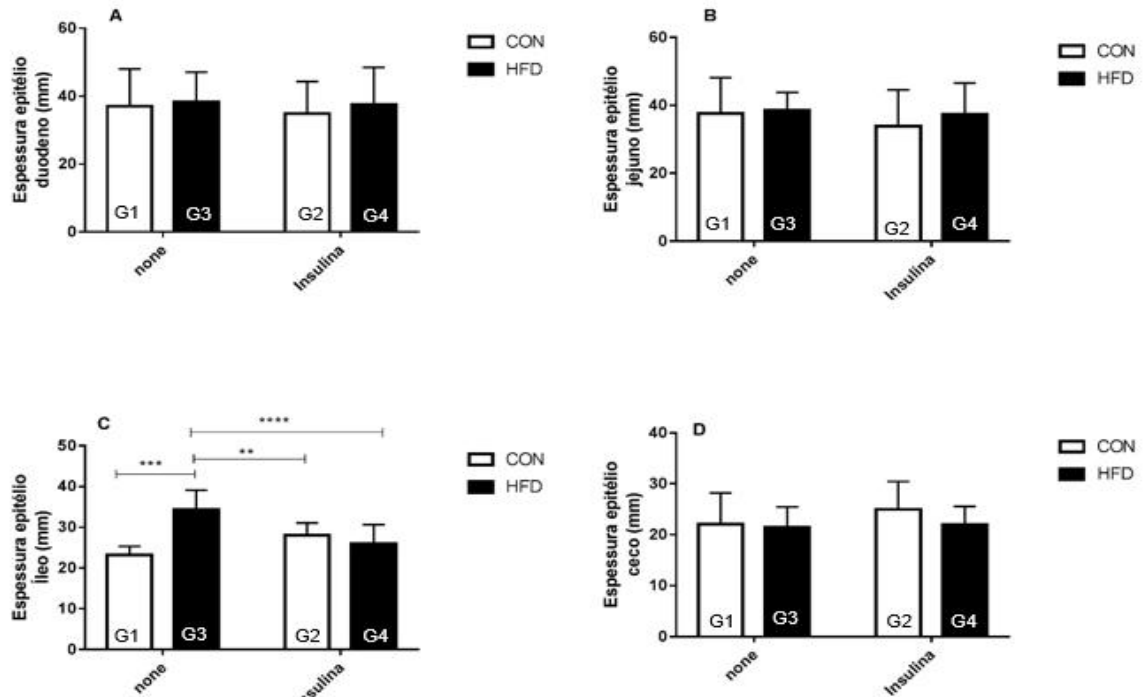
Fonte: A autora (2021)

Gráfico 13 - Efeito do tratamento com insulina oral na espessura da mucosa intestinal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Efeito do tratamento com insulina oral na espessura da mucosa intestinal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os dados são a média ± DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças entre os grupos. ANOVA seguido de *post-hoc* Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,001$.

2.3.15 Espessura do Epitélio Intestinal

O gráfico 14 apresenta os dados de espessura do epitélio intestinal. Nota-se no íleo aumento da espessura do epitélio nos animais que recebiam DH e gavagem de água em comparação com o grupo que recebia ração convencional [F (1, 27) = 9,348 P=0,0050], enquanto que o grupo que recebia DH e gavagem de insulina obteve diminuição da espessura do epitélio intestinal [F (1, 27) = 20,21 P=0,0001]. Das porções intestinais o íleo sofreu mais reversões causadas pela IO em DH, sendo na largura e área de vilosidade e espessura de epitélio intestinal, onde a DH provoca aumento de espessura e a IO diminui, tendo o íleo alterações celulares mais significativas que os outros tecidos, concordando com achados de Sukhotnik, *et. al.*, (2008), em que o íleo era o mais afetado por alterações no apoptose. Shamir, *et. al.*, (2005), traz que o íleo possui o dobro de receptores para insulina comparado ao jejuno, este pode ser um dado relacionado ao aumento da espessura do epitélio intestinal em DH e sua diminuição em presença de IO, visto que a IO possui ação

maior em tecido com maior capacidade de ligação à esta molécula; tem-se também maior aumento de expressão de enzimas digestivas.



Fonte: A autora (2021)

Gráfico 14 - Efeito do tratamento com insulina oral na espessura do epitélio intestinal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Efeito do tratamento com insulina oral na espessura do epitélio intestinal de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Os dados são a média \pm DPM. Os símbolos sobre as barras indicam diferenças entre os grupos. Anova seguido de *post-hoc* Tukey * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,001$.

2.4 CONCLUSÃO

A IO possui ação nos tecidos intestinal e adiposo dos animais e demonstra relevância estatística quando administrada concomitantemente a DH. Sugere-se que a IO poderia promover regressão maior ou até mesmo total das alterações causadas pela DH se em período de tempo maior e/ou com um maior de amostra, o tempo de estudo pode ter sido curto quando comparado ao tempo de desenvolvimento das doenças que desenvolvem condições semelhantes no organismo humano; sugere-se que a IO exerça efeito citoprotetor ao TGI e tecido adiposo em presença de DH. Mais estudos e de maior duração são necessários para avaliar o efeito da insulina oral nestes tecidos.

REFERÊNCIAS

- ANTONIOLI, L. *et al.* Differential Impact of Weight Loss and Glycemic Control on Inflammation Signaling. **Obesity**. 2020.
- AIR, E. L. *et al.* Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. **Nature Medicine**, v. 8, n. 2, p. 179-183. 2002.
- 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.
- BANKS, W. J. **Sistema digestivo I - Canal Alimentar. Histologia veterinária aplicada**. 2 ed. São Paulo: Manole, p.454-459.1992.
- BOSCARIOL, R. *et al.* Diabetes mellitus tipo 2: educação, prática de exercícios e dieta no controle glicêmico. **Rev. Saúde em Foco**. 2018, n. 10, p. 138-150.
- CERRONE, L. A. *et al.* Diabetes mellitus tipo 3 e exercício físico: relações entre obesidade, resistência insulínica e distúrbios cognitivos. **Rev. Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, São Paulo. v.12, n.71, p.336-345, maio/jun. 2018
- CUMMINGS, D. E.; RUBINO, F. Metabolic surgery for the treatment of type 2 diabetes in obese individuals. **Diabetologia**, v. 61, p. 257-264, 2018.
- 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, 2009.
- DE LA CUESTA-ZULUAGA, J.; MUELLER, N. T.; CORRALES-AGUDELO, V.; VELÁSQUEZ-MEJÍA, E. P.; CARMONA, J. A.; ABAD, J. M.; ESCOBAR, J. S. Metformin Is Associated With Higher Relative Abundance of Mucin-Degrading Akkermansia muciniphila and Several Short-Chain Fatty Acid-Producing Microbiota in the Gut. **Diabetes Care**, v. 40, p. 54–62. 2016.
- FONTE, P. *et al.* Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 1342-1354. 2015.
- GEDAWY, A. *et al.* Oral insulin delivery: existing barriers and current counter-strategies. **J. of Pharmacy and Pharmacology**, v. 70, n. 2, p. 197–213. 2017.
- GIL-CARDOSO, K. *et al.* A cafeteria diet triggers intestinal inflammation and oxidative stress in obese rats. **British Journal of Nutrition**, v. 117, n. 2, p. 218–229. 2017.
- HIRLEKAR, R.S. Oral Insulin Delivery: Novel Strategies. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 11, n. 03, out. 2017.
- HVID, H. *et al.* Intraintestinal and Parenteral Administration of an Insulin Analogue Leads to Comparable Activation of Signaling Downstream of the Insulin Receptor

in the Small Intestine. **J. of Diabetes Science and Technology**. jun. 2019, v. 14, n. 1, p. 112–119.

KUIKEN, N. S. *et al.* Effect of Oral Insulin on the Severity and Recovery of Methotrexate-Induced Gastrointestinal Mucositis in the Rat. **J. of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**. Fev. 2017.

LA SERRE, C. B. *et al.* Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. **American Journal of Physiology**, v. 299, p. 440-448. 2010.

LEOPOLDO, A. S. *et al.* Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 4, p. 1-9, fev. 2016.

LIM, H.P.; TEY, B.T.; CHAN, E.S. Particle designs for the stabilization and controlled-delivery of protein drugs by biopolymers: A case study on insulin. **Journal of Controlled Release**, v. 186, p.11–21. 2014.

LIPINSKI, L. C. *et al.* Oral insulin improves metabolic parameters in high fat diet fed rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 1699-1705. 2017.

LUNDGREN, M, *et. al.* Fat cell enlargement is an independent marker of insulin resistance and hyperleptinaemia. **Diabetologia**, v. 50, p. 625–633. 2007.

MARIA, K. C; SCHMIDT, J. C. Avaliação do controle glicêmico de pacientes diabéticos participantes de Associação de Apoio à Doença em São Lourenço do Oeste – SC. **R. Bras. Qual. Vida**, Ponta Grossa, v. 6, n. 2, p. 139-146, 2014.

OH, T. J.; LEE, H.-J.; CHO, Y. M. Ileal Transposition Decreases Plasma Lipopolysaccharide Levels in Association with Increased L Cell Secretion in Non-obese Non-diabetic Rats. **Obesity Surgery**, 26(6), 1287–1295. 2015.

OLIVEIRA, J.E.P.; VENCIO, S. (org.). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2019, p. 236-242.

OSBORNE, D. L. *et. al.* Comparison of therapeutic regimens in the amelioration of alterations in rat gastrointestinal mucosal dna, rna and protein induced by streptozotocin diabetes mellitus. **Life Sciences**, v. 66, n. 24, p. 2405-2417. 2000.

RODRIGUES, M. L. C.; MOTTA, M. E. F. A. Mechanisms and factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with diabetes mellitus. **J. Pediatr.** (Rio J.), Porto Alegre, v. 88, n. 1, p. 17-24, feb. 2012.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n.1. 2003. **Digestive Diseases and Sciences**. V. 50, n. 7, p. 1239–1244. 2003.

SIQUEIRA, E.; *et. al.* Insulina: formas alternativas de administração. **Rev. Uniandrade**. 2018, v.19, n.1, p. 1-12.

SHAMIR, R., *et al.* Intestinal and systemic effects of oral insulin supplementation in rats after weaning. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 50, n. 7, p. 1239–1244, 2005.

SUDHAKAR, S. *et al.* Biodistribution and pharmacokinetics of thiolated chitosan nanoparticles for oral delivery of insulin in vivo. **International Journal of Biological Macromolecules**. fev. 2020.

SUKHOTNIK, I. *et al.* Oral insulin enhances cell proliferation and decreases enterocyte apoptosis during methotrexate-induced mucositis in the rat. **Journal of pediatric gastroenterology and nutrition**, v. 47, n. 2, p. 115-122, 2008.

SUKHOTNIK, I. *et al.* Effect of Oral Insulin on Diabetes-Induced Intestinal Mucosal Growth in Rats. **Digestive Diseases and Sciences** v. 56, p. 2566–2574, mar. 2011.

TOUITOU, E.; RUBINSTEIN, A. Targeted enteral delivery of insulin to rats. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 30. 1986.

WOITISKI, *et al.* Pharmacological effect of orally delivered insulin facilitated by multilayered stable nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v 41. 2010.

WU, G. D.; CHEN, J.; HOFFMANN, C.; BITTINGER, K.; CHEN, Y.-Y., KEILBAUGH, S. A.; LEWIS, J. D. Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. **Science**, v. 334, p.105–108. 2011.

XING, X. *et al.* Enteric-coated insulin microparticles delivered by lipopeptides of iturin and surfactin. **Drug Delivery**, v. 25, p. 23–34. 2017.

ZHAO, J.; YANG, J.; GREGERSEN, H. Biomechanical and morphometric intestinal remodelling during experimental diabetes in rats. **Diabetologia**, v. 46, n. 12, p. 1688-1697, dez. 2003.