

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DO DIABETES MELLITUS
FARMACOLÓGICO (ALOXÂNICO) EM TILÁPIAS DO NILO**

Ed Johnny da Rosa Prado

Medico Veterinário

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO DO DIABETES MELLITUS
FARMACOLÓGICO (ALOXÂMICO) EM TILÁPIAS DO NILO**

Ed Johnny da Rosa Prado

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo

Tese apresentada à Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinária – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de doutorado em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

2017

P896c Prado, Ed Johnny da Rosa
Caracterização do diabetes mellitus farmacológico (aloxânico) em tilápias do Nilo / Ed Johnny da Rosa Prado. -- Jaboticabal, 2017 xx, 74 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Marco Antonio de Andrade Belo
Banca examinadora: Antonio Carlos Shimano, Antonio Sergio Ferraudo, Francisco Jose Albuquerque de Paula, Silas Fernandes Eto
Bibliografia

1. *Oreochromis niloticus*. 2. Fisiopatologia. 3. Diabetes. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.379-008.4

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

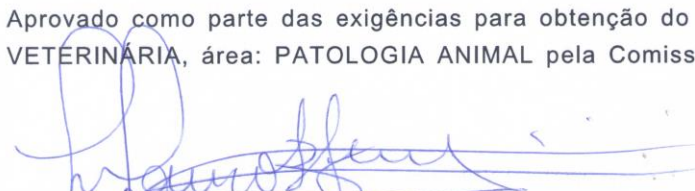
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO DO DIABETES MELLITUS FARMACOLÓGICO (ALOXÂMICO) EM TILÁPIAS DO NILO

AUTOR: ED JOHNNY DA ROSA PRADO

ORIENTADOR: MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: PATOLOGIA ANIMAL pela Comissão Examinadora:



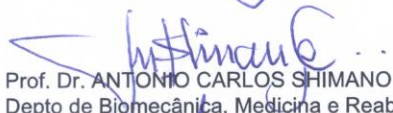
Prof. Dr. MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FRANCISCO JOSÉ ALBUQUERQUE DE PAULA
Departamento de Clínica Médica / USP / Ribeirão Preto/SP



Prof. Dr. ANTONIO SÉRGIO FERRAUDO
Vice-Diretoria / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. ANTONIO CARLOS SHIMANO
Depto de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Aparelho Locomotor / USP / Ribeirão Preto/SP



Pós-doutorando SILAS FERNANDES ETO
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 08 de dezembro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ED JOHNNY DA ROSA PRADO – Natural de Moji das Cruzes – SP, nascido em 10 de janeiro de 1986, Médico Veterinário, mestre em patologia veterinária e Técnico agrícola. Iniciou o curso técnico agrícola juntamente ao ensino médio na instituição Centro Paula Souza, Espírito Santo do Pinhal - SP o ano 2002, tendo concluído o mesmo no ano de 2004. Em 2005, participou do primeiro e segundo módulo em técnico agropecuário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Inconfidentes. Ingressou em 2006 no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Camilo Castelo Branco - UNICASTELO, Campus Descalvado (SP), concluindo a graduação no ano de 2010. No período de graduação exerceu atividades de pesquisa junto ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Animal da UNICASTELO, obtendo por dois anos consecutivos bolsa de pesquisa do Programa Institucional Pró-inicial (2008 e 2009), atuando na área de fisiopatologia da reação inflamatória em peixes teleósteos. Iniciou em 2011 o mestrado pelo Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP junto ao Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, com bolsa pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo FAPESP-Nº 2011/16945-9), concluído 2014. Doutorando entre o período 2014 a 2017 pelo Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Jaboticabal-SP junto ao Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, com bolsa pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo FAPESP-Nº 2014/09437-5). Membro do Group of Animal Pharmacology (GAP), exercendo atividades de pesquisa junto ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Animal da UNICASTELO.

O homem é a mais insana das espécies. Adora um Deus invisível e mata a natureza visível, sem perceber que a natureza que ele mata é esse Deus invisível que ele adora.

(Hubert Reeves)

A

Minha família

DEDICO

À

Ciência

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Em primeiro lugar a *DEUS*, por ter me dado à oportunidade da evolução espiritual.
- As vidas, pois sem elas este estudo não poderia ser realizado e espero que as mesma tenham cumprido sua missão aqui na terra.
- Ao Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo por me acompanhar nesta caminhada com seu espírito inovador, me orientando e incentivando a pesquisa, tendo grandes oportunidades de participação em publicações e eventos que contribuíram ainda mais para o meu crescimento profissional.
- À minha esposa Alessandra Cristina de Moraes, pela dedicação ao longo deste estudo como se o mesmo fosse responsabilidade dela.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa (processo FAPESP-Nº2014/09437-5) de pesquisa.
- À Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp/FCAV-Jaboticabal/SP.
- À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, especialmente ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, por permitir a realização deste Doutorado.
- Ao Prof. Dr. Samir Issa Samara, Prof. Dr. Luiz Augusto do Amaral, Prof. Dr. Francisco Jose Albuquerque de Paula e Prof. Dr. Antonio Carlos Shimano, por oferecer seus laboratórios e orientação para realização deste projeto de pesquisa.
- Aos colegas Silas Fernandes Eto e Dayanne Carla Fernandes, os quais foram uma fonte constante de auxílios.
- À Carolina Zucchermaglio, por contribuir em meu estudo e espero que tenha cumprido sua missão aqui na terra.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
LISTA DE SIMBOLOS.....	XV
LISTA DE TABELAS.....	XVI
LISTA DE FIGURAS.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1 Efeito de diabetes mellitus no organismo.....	02
2.2 Reação inflamatória aguda.....	05
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	08
3.1 Animais utilizados e acondicionamento.....	08
3.1.1 Estudo do efeito diabético crônico.....	08
3.1.2 Estudo do efeito diabético sobre a resposta inflamação aguda.....	08
3.2 Manuseio dos peixes para exames.....	09
3.3 Indução diabética por aloxano.....	09
3.4 Tratamento com insulina.....	10
3.5 Exame hematológico e bioquímico.....	10
3.6 Necropsia, coleta de materiais e preservação	11
3.7 Determinação da densidade mineral óssea.....	12
3.8 Determinação da fragilidade óssea por biomecânica.....	13
3.9 Eletroforese das proteínas do soro (SDS-PAGE)	14
3.10 Digestão de proteína em gel e identificação por espectrometria de massa.....	16
3.11 Análise da atividade de lisozima sérica.....	17
3.12 Imunohistoquímica, análise de TNF- α , IGF-1 e insulina.....	18
3.13 Estatística.....	20
4. RESULTADOS.....	21

4.1 Estudo do efeito diabético crônica.....	21
4.1.1 Efeito da aloxana no tecido pancreático.....	21
4.1.2 Efeito diabético no ganho de peso em tilápias do Nilo.....	23
4.1.3 Efeito diabético na avaliação de lipídeos no soro.....	24
4.1.4 Efeito diabético na deposição lipídica.....	25
4.1.5 Efeito diabético na avaliação da fragilidade óssea.....	26
4.1.6 Efeito diabético na avaliação metabólica óssea.....	28
4.1.7 Efeito diabético na avaliação gástrica e renal.....	29
4.1.8 Efeito diabético no eritograma.....	30
4.1.9 Efeito diabético no leucograma.....	32
4.1.10 Efeito diabético no trombograma.....	34
4.1.11 Efeito diabético na atividade de lisozima no soro.....	35
4.1.12 Avaliações histopatológicas.....	35
4.1.12.1 Avaliação tegumentar e muscular.....	35
4.1.12.2 Avaliação cardiovascular.....	36
4.1.12.3 Avaliação hepática.....	38
4.1.12.4 Avaliação renal.....	38
4.1.12.5 Avaliação gastrointestinal.....	40
4.2 Estudo do efeito diabético na reação inflamação aguda.....	41
4.2.1 Produção de IGF-1 no foco inflamatório.....	41
4.2.2 Produção de TNF-alfa no foco inflamatório.....	42
4.2.3 Atividade de lisozima sérica.....	43
5. DISCUSSÃO.....	44
5.1 Perfil clínico em tilápias do Nilo aloxana-diabéticos.....	44
5.2 Reação inflamatória em tilápias do Nilo aloxana-diabéticos.....	53
6. CONCLUSÃO.....	55
7. REFERÊNCIAS	56
8. APÊNDICE.....	74

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 11493/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Estudo da fisiopatologia da reação inflamatória aguda durante aerocistite infecciosa por *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, aloxano-diabéticas"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marco Antonio de Andrade Belo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de julho de 2014.

Jaboticabal, 07 de julho de 2014.



Prof.^a Dr.^a Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

CARACTERIZAÇÃO DO DIABETES MELLITUS FARMACOLÓGICO (ALOXÂMICO) EM TILÁPIAS DO NILO

RESUMO - O estudo investigou os mecanismos envolvidos na fisiopatologia metabólica e inflamatória aguda em tilápias aloxano-diabéticas. Para avaliação metabólica, foi realizado um ensaio experimental crônico com 30 tilápias aloxano diabéticas para determinação das massas corporais, constituído três grupos (n=10): Não diabético e tratado com salina; Diabético e tratado com insulina; Diabético sem tratamento. Para estes animais foram analisados produção de insulina do pâncreas, densidade mineral óssea (g/cm^2), densidade de massa gorda (%), biomecânica de osso, determinação de apolipoproteína A1 séricas, glicemia, fosfatase alcalina sérica, colesterol sérica, triglicérides sérica, hemograma, atividade de lisozima sérica e avaliações histopatológicos. Para avaliação inflamatória aguda, foram utilizadas amostras de soro e tecidos de tilápias com aerocistite infecciosa aguda por *A. hydrophyla*, constituindo 3 tratamentos analisado 6, 24 e 48 horas após estímulos inflamatório infeccioso, compostos por: Não aloxana-diabéticas e inoculado; aloxana-diabéticas e inoculado; aloxana-diabéticas e tratado com insulina e inoculado. Para estas amostras foram analisadas através de imunohistoquímica a produção de TNF- α , IGF-1 no foco inflamado e determinação de lisozima sérica. O presente estudo revelou resultados muito promissores, demonstrando que tilápias do Nilo submetidas a administração de aloxana endovenosa podem desenvolver o diabetes mellitus tipo 1. A correlação entre os estudos demonstram que tilápias do Nilo aloxano-diabéticos, apresentaram baixo ou inexistência de células beta, deposição ectópica de tecido adiposo, degeneração muscular, dislipidemia, anormalidades cardíacas, doenças gastrointestinais, esteatose hepática, fragilidade óssea, nefropatia, anemia, leucopenia, trombocitose, além de alterações da resposta imunológica em relação à atividade lisozima, TNF- α e IGF-1 no foco inflamado durante estímulo inflamatório infeccioso agudo. Provando a importância do efeito insulínico na resposta orgânica deste peixe teleósteo, demonstrando a importância deste modelo experimental para estudos e avanços em pesquisas envolvendo o diabetes mellitus, pois são alterações fisiopatológicas do diabetes em seres humanos.

Palavras-chave: insulina, tecido adiposo, musculo, osso, Inflamação, peixe teleósteo.

CHARACTERIZATION OF DIABETES MELLITUS PHARMACOLOGICAL (ALLOXAN) IN TILÁPIAS DO NILO

ABSTRACT – The study investigated the mechanisms involved in acute metabolic and inflammatory pathophysiology in alloxan-diabetic tilapia. For metabolic evaluation, a chronic experimental study was performed with 30 diabetic alloxan tilapia for determination of body masses, consisting of three groups (n= 10): Non-diabetic and treated with saline; Diabetic and treated with insulin; Diabetic without treatment. For these animals, pancreas insulin production, bone mineral density (g/cm²), fat mass density (%), bone biomechanics, determination of serum apolipoprotein A1, blood glucose, serum alkaline phosphatase, serum cholesterol, serum triglycerides, blood count, serum lysozyme activity and histopathological evaluations. For acute inflammatory evaluation, serum and tilapia tissues were used with acute infectious aerocystitis by *A. hydrophyla*, constituting 3 treatments analyzed 6, 24 and 48 hours after inflammatory stimuli, composed of: Non-alloxan-diabetic and inoculated; alloxan-diabetic and inoculated; alloxan-diabetic and treated with insulin and inoculated. For these samples the production of TNF- α , IGF-1 in the inflamed focus and determination of serum lysozyme were analyzed by immunohistochemistry. The present study revealed very promising results, demonstrating that Nile tilapia submitted to alloxan endovena may develop diabetes mellitus type 1. The correlation between the studies showed that Nile alloxan-diabetic tilapia showed low or no beta cells, ectopic deposition of adipose tissue, muscle degeneration, dyslipidemia, cardiac abnormalities, gastrointestinal diseases, hepatic steatosis, bone fragility, nephropathy, anemia, leukopenia, thrombocytosis, and changes in the immuneresponse to lysozyme activity, TNF- α and IGF-1 at the inflamed site during acute infectious inflammatory stimulation. Proving the importance of the insulin effect in the organic response of this teleost fish, demonstrating the importance of this experimental model for studies and advances in research involving diabetes mellitus, since they are pathophysiological changes of diabetes in humans.

Keywords: insulin, adipose tissue, muscle, bone, inflammation, teleost fish.

LISTA DE ABREVIATURAS

C.P	– Controle positivo
CEUA	– Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	– Concentração de hemoglobina corpuscular média
COBEA	– Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	– Grama
g.L ⁻¹	– Grama por litro
Glut-2	– Transportador de glicose tipo 2
gm.dL ⁻¹	– Grama por decilitro
GH	– Hormônio do crescimento
H&E	– Hematoxilina eosina
HPI	– Horas após inóculo
HCL	– Ácido clorídrico
HPI	– Horas após inóculo
IGF1	– Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	– Interleucina
ILPs	– Peptídeos semelhante a insulina
KCl	– Cloreto de potássio
L	– Litros
L/min	– Litros por minuto
LPS	– Lipopolissacarídeo
mg.L ⁻¹	– Miligrama por litro
mg.kg ⁻¹	– Miligrama por quilograma
MgSO ₄	– Sulfato de magnésio
mL	– Mililitro
mm	– Milímetro
mM	– Massa molecular
NaCl	– Cloreto de sódio
ng	– Nanograma

ng- μ L ⁻¹	– Nanograma por microlitro
NO	– Óxido nítrico
n°	– Número
O ₂	– Oxigênio
PBS	– Tampão Salina Fosfato
PMM	– Polimorfonucleares
pH	– Potencial hidrogeniônico
ROS	– Espécie reativa de oxigênio
rpm	– Rotação por minuto
SP	– São Paulo
TLR	– Receptores do tipo Toll
TNF- α	– Fator de necrose tumoral alfa
UI.kg ⁻¹	– Unidade internacional por quilograma
UNESP	– Universidade Estadual Paulista
VCM	– Volume corpuscular médio

LISTA DE SIMBOLOS

®	– Marca registrada
°C	– Graus Celsius
%	– Porcentagem
μ	– Micras
±	– Maior ou menor
α	– Alfa
β	– Beta

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Distribuição de animais nos diferentes tratamentos (estudo crônico).....	20
Tabela 2 - Distribuição de animais nos diferentes tratamentos (estudo inflamatório).....	21
Tabela 3 - Associações de variáveis (triglicerídeos, colesterol e apolipoproteína A1) em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais.....	36
Tabela 4 - Associações de variáveis (Massa gorda corporal, Coração, Fígado e Colesterol) em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais.....	37
Tabela 5 - Associações de variáveis (Densidade mineral óssea vertebral, Rigidez do arco aórtico e Força máxima para quebra) em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais.....	39
Tabela 6 - Associações de variáveis (Glicemia, Fosfatase alcalina e Densidade mineral óssea total) em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais.....	40
Tabela 7 - Associações de variáveis (estômago e rim) em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais.....	41
Tabela 8 - Associações de variáveis {nº de eritrócito, volume corpuscular médio (VCM), glicemia e concentração de hemoglobina corpuscular médio (CHCM)} em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais com rotação “ <i>varimax raw</i> ”.....	43
Tabela 9 - Associações de variáveis (neutrófilos, linfócito, monócito) em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais.....	45

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura	1 - Aplicação de aloxano via endovenosa em vaso caudal.....	22
Figura	2 - Órgãos coletados: tegumento e músculo esquelético (A); duodeno (B); coração (C); baço (D); rim (E); fígado (F); estômago (G); pâncreas (H).....	24
Figura	3 - Primeiro arco aórtico esquerdo (ponte a pinça).....	24
Figura	4 - Determinação do índice de massa gorda, magra e óssea em tilápia.....	25
Figura	5 - Análise radiográfica de quatro pontos na coluna vertebral em tilápia.....	25
Figura	6 - Ensaio mecânico por flexão de três pontos do arco aórtico.	26
Figura	7 - Fracionamento eletroforético das proteínas do soro, separação proteína (A) e determinação da densitometria computadorizada (B).....	28
Figura	8 - Identificação da apolipoproteína A1.....	29
Figura	9 - Fotomicrografias das imunohistoquímicas (imagens superiores) e análise computacional (imagens inferiores). Imunomarcagem em castanho: insulina no tecido pancreático (A), IGF-1 na bexiga natatória (B) e TNF-alpha na visícula natatória (C).....	32
Figura	10 - Fotomicrografias dos pâncreas de tilápias do Nilo aloxana-diabéticas (A e C) e normais (B e D). Coloração H&E (imagens superiores) e imunohistoquímica (imagens inferiores). Setas demonstram núcleos em cariólise, cabeças das setas demonstram núcleos em picnose, asteriscos demonstram células adiposas e células com coloração acastanhada demonstram células beta produtora de insulina.....	34
Figura	11 - Percentagem de insulina imunomarcadas no pâncreas em tilápias do Nilo. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo <i>Tukey</i> (Letras maiúsculas). Grupos: tilápias do Nilo normais (C); tilápias do Nilo aloxana-diabético (D). O nível de significância: $p < 0,05$	35
Figura	12 - Resultados do ganho de peso em tilápias do Nilo criadas por 215 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo <i>Tukey</i> (Letras maiúsculas comparações entre grupos e letras minúsculas comparações ao longo do tempo). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Peso transformado segundo Box e Cox (1982).....	35

- Figura 13 - Resposta lipídica de 21 tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras maiúsculas comparações entre grupos e letras minúsculas comparações ao longo do tempo). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escore do fator (processo), extraídos pelo método de análise de fatores por componentes principais... 37
- Figura 14 - Deposição lipídica em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escore do fator (processo), extraídos pelo método de análise de fatores por componentes principais..... 38
- Figura 15 - Resposta da fragilidade óssea de tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escore do fator (processo), extraídos pelo método de análise de fatores por componentes principais..... 39
- Figura 16 - Resposta metabólica Óssea de tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escore do fator (processo), extraídos pelo método de análise de fatores por componentes principais..... 41
- Figura 17 - Anormalidade gástrica e renal em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escore do fator (processo), extraídos pelo método de análise de fatores por componentes principais..... 42
- Figura 18 - Anemia macrocítica em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escore do fator (processo), extraídos pelo método de análise por componentes principais com rotação “*varimax raw*”..... 43

Figura	19 - Normocromia em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo <i>Tukey</i> (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escores do fator (processo) extraídos pelo método de análise por componentes principais com rotação “ <i>varimax raw</i> ”.....	44
Figura	20 - Leucopenia em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo <i>Tukey</i> (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escores do fator (processo), extraídos pelo método de análise por componentes.....	45
Figura	21 - Monócitos em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo <i>Tukey</i> (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escores do fator (processo), extraídos pelo método de análise por componentes.....	46
Figura	22 - Trombócitos em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo <i>Tukey</i> (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$	46
Figura	23 - Atividade de lisozima no soro em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo <i>Tukey</i> (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Método segundo Ellis, 1990; Milla et al., 2010.....	47
Figura	24 - Fotomicrografia do tegumento (T) e músculo esquelético (ME) de tilápia do Nilo. Tilápias normais (A e B) e tilápia aloxano-diabética (C e D). Subcutâneo (S). Coloração H&E.....	48
Figura	25 - Fotomicrografica do bulbo aórtico de tilápia do Nilo. Tilápias normais (A e B) e tilápia aloxano-diabética (C e D). Túnica adventícia (TA). Túnica média (TM). Células adiposas (asterisco). Infiltrado de células mononucleares (seta). Coloração H&E.....	49
Figura	26 - Fotomicrografica cardíaca de tilápia do Nilo. Tilápias normais (A e B) e tilápia aloxano-diabética (C e D). Miocárdio ventricular (MV). Epicárdio (E). Rbdomiócitos cardíacos (R). Células adiposas (asterisco). Infiltrado de células mononucleares (seta). Coloração H&E.....	49
Figura	27 - Fotomicrografia hepática em tilápias do Nilo. Tilápias normais (A) e tilápia aloxano-diabética (B). Veia centrolobular (VC). Acúmulo lipídico (asterisco) Coloração H&E.....	50

Figura	28 - Fotomicrografica tecido renal em tilápias do Nilo. Tilápias normais (A, C e E) e tilápia aloxano-diabética (B, D e F). Glomerulo (g). Capsula (c) e espaço (e) de <i>Bowman</i> . Túbulos (t). Atrofia (a) e necrose (n) tubular. Infiltrado de células mononucleares (im). Célula (seta) e matriz (*) mesangial. Coloração H&E.....	51
Figura	29 - Fotomicrografica do estomago em tilápias do Nilo. Tilápias normais (A, B e C) e tilápia aloxano-diabética (D, E e F). Aumento de 100x (A, D). Aumento de 400x (B, C, E e F). Mucosa (m). submucosa (s), muscular (M) e adventícia (a). Glândulas produtora de muco protetor (gp). Glândulas produtora de ácido gástrico e pepsina (gg). Coloração H&E.....	52
Figura	30 - Fotomicrografia da vilosidade duodenal em tilápias do Nilo. Aumento de 400x. Tilápias normais (A) e tilápia aloxano-diabética (B). Vilosidade ampliada mostrando os enterócitos (V). Lâmina própria (L) Coloração HE.....	53
Figura	31 - Produção de IGF-1 na bexiga natatória após estímulo inflamatório por <i>A. hydrophila</i> em tilápias do Nilo. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo <i>Tukey</i> (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p=<0,05$	54
Figura	32 - Produção de Fator de necrose tumoral (TNF-alfa) na bexiga natatória após estímulo inflamatório por <i>A. hydrophila</i> em tilápias do Nilo. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo <i>Tukey</i> (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p=<0,05$	55
Figura	33 - Atividade de lisozima no soro em tilápias do Nilo, após estímulo inflamatório por <i>A. hydrophila</i> na bexiga natatória. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo <i>Tukey</i> (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p=<0,05$. *Método segundo Ellis, 1990; Milla et al., 2010.....	56

1. INTRODUÇÃO

Dentre as síndromes metabólicas de importância médica, a diabetes mellitus (tipo I e II) se destacam por ser a principal doença endócrina com acometimento crescente a nível mundial. Desta forma, é importante a obtenção de modelos biológicos que sejam representativos para entender os mecanismos fisiopatológicos da diabetes mellitus.

Diante deste fato, muitos estudos sobre diabetes vêm sendo feitos em modelos experimentais com o uso de roedores. Estes podem ser induzidos ao diabetes por manipulação genética (roedor nocauteado) ou por drogas (aloxano e estreptozotocina). Apresentado na diabetologia (ausência ou deficiência na ação da insulina) um dos efeitos mais conhecido na clínica médica que é a hiperglicemia e hiperlipidemia e concomitantemente o desenvolvimento de várias complicações sérias no organismo: envolvendo doenças cardiovasculares, miopatia, hepatopatia, retinopatia, nefropatia, neuropatia e osteopatia.

O uso de peixes pode preencher uma lacuna que existe entre os modelos com roedores para o estudo da diabetes, tendo em vista que o hormônio que controla o estresse em peixes é o mesmo hormônio presente nos seres humanos: o cortisol, onde o efeito endócrino atua no bloqueio da secreção de insulina e causa resistência à insulina, desta forma, promover maior disponibilização de glicose para o organismo. Já os roedores, apresentam como principal hormônio do estresse a corticosterona.

Além do mais, mundialmente, são aceitos testes em peixes teleósteos como alternativa para estudos em neurociência, farmacologia, toxicologia e doenças infectocontagiosas na área da medicina, portanto, tornando-se o peixe um modelo experimental bastante promissor na área da ciência.

Portanto, o estudo objetivou-se caracterizar o efeito aloxana-diabético em tilápias do Nilo, bem como, compreender a participação da insulina na resposta orgânica deste peixe teleósteo. Assim, provar a importância deste modelo experimental com peixes teleósteos para estudos e avanços em pesquisas envolvendo o diabetes mellitus.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Efeito de diabetes mellitus no organismo

A insulina é considerada um hormônio importante no controle metabólico, no entanto, outras características importantes desse peptídeo têm sido elucidadas quanto às células endoteliais, plaquetas e leucócitos (DANDONA et al., 2007). Esse peptídeo regula vários processos celulares, como transporte de glicose (KHAM and PESSIN, 2002), síntese de glicogênio (SRIVASTAVA; PANDLEY, 1998), mitogênese (ISH-SHALOM et al., 1997) e transcrição gênica (MOUNIER; POSNER, 2006).

A insulina regula a transcrição gênica e o crescimento de várias células por modulação da atividade de diversas proteínas envolvidas na sinalização intracelular (KEETON et al., 2002). Nesse contexto, estudos demonstraram que a via da proteína quinase ativada por mitógenos é importante nas ações proliferativas da insulina, tendo em vista sua participação na angiogênese, essa via intercede o crescimento celular, na capacidade migratória das células endoteliais e do músculo liso vascular e dos monócitos, mediando a expressão de um fator pró-trombótico, pró-fibrótico, inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), na resposta a diversos estímulos (CLARKE; DODSON, 2007). A insulina apresenta ação vasodilatadora, com relação à produção endotelial de óxido nítrico (DANDONA, 2000), efeito anti-agregante plaquetário, anti-trombótico e pro-fibrinolítico em humanos (DANDONA et al., 2009). Reforçando assim, a hipótese de que a insulina desempenhe importante papel na resposta imune inata durante reação inflamatória aguda, denota a sua importância como hormônio pró-inflamatório, segundo descrito por Garcia Leme (1982,1989).

Por outro lado, a ausência ou deficiência na ação da insulina resulta em perda da homeostasia metabólica concomitantemente associada a danos secundários em múltiplos sistemas e órgãos, apresentando em ambos os tipos de diabetes, complicações sérias em tecido vascular, envolvendo doença macrovascular e microvascular, desta forma ocasionando disfunção em órgão-alvos, tais como: rins e coração (DANEMAN, 2006; STUMVOLL, 2005). A hiperglicemia persistente no meio

extracelular leva a um aumento da glicose intracelular (endotélio) que levará o aumento da suscetibilidade celular à “glicotoxicidade”, adjacientemente desenvolvendo aterosclerose acelerada, retinopatia, nefropatia e neuropatia periférica diabética (HARJA et al., 2008; CLARKE; DODSON, 2007). Além disso, em seres humanos, a hiperglicemia crônica parece ser a principal causa subjacente de neuropatia diabética, denominada de neurotoxicidade à glicose (TOMLINSON; GARDINER, 2008). Outro importante risco em diabéticos é a formação de placas ateroscleróticas, resultante da hiperlipidemia, a qual inclui tanto os níveis elevados de triglicérides, colesterol (LDL) e produção hepática de lipoproteína aterogênicas (BOYLE, 2007). No estudo em tecido ósseo, em casos de deficiência ou resistência de insulina pode ocorrer redução da massa óssea e aumento da fragilidade esquelética (KAWAI et al., 2012).

Em pesquisa de Prado (2014) demonstrou-se comprometimento sistêmico com múltiplas anormalidades patofisiológicas em tilápias diabéticas induzidas na aerocistite aguda, particularmente na resposta imunológica inata. Em relação à quimiotaxia, um estudo demonstrou a redução desse fenômeno em células polimorfonucleares (PMN) em pacientes diabéticos (PELEG et al., 2007). Substâncias microbidas produzidas por PMN estão reduzidas no diabetes, como exemplo, o superóxido (PELEG et al., 2007). No diabetes temos uma disfunção dos PMN concomitante com concentrações alteradas de citocinas, contribuindo para influenciar a resposta imunológica do paciente diabético durante uma infecção local ou sistêmica (STEGENGA et al., 2010). Em modelo experimental para estudo inflamatório em ratos aloxano-diabéticos, foi encontrado que a instilação intra-traqueal de lipopolissacarídeo (LPS) induziu menor migração de neutrófilos e baixas expressões de TNF- α , interleucina IL-1 β , IL-6 e IL-10 no espaço bronco-alveolar quando comparados com animais controle (sadios), 6 horas após a instilação de LPS (MARTINS et al., 2006; MARTINS et al., 2009). Pereira et al. (1987) demonstraram diminuição do infiltrado de neutrófilos na cavidade pleural em ratos diabéticos comparado com animais sadios.

Em seres humanos, o diabetes mellitus provoca disfunção imune, baixa secreção de citocinas pro-inflamatórias e da quimiocina interleucina-8 (IL-8), aumentando a susceptibilidade às infecções (GEERLINGS et al., 2000). Estudos

confirmam que a IL-8 é encontrada em varias células como monócitos, linfócitos, células do endotélio e fibroblastos, podendo ser produzida através de estímulos com LPS, assim mencionado, como um potente quimiotático e ativador de neutrófilos (MONTÓN et al., 1998).

Segundo Anjos-Loureiro et al. (2006), ratos com diabetes induzido por aloxano apresentaram baixa adesão, migração celular e baixa expressão de ICAM-1 ("intercellular adhesion molecule-1") na fásia espermática interna após estímulo com TNF- α , e com o tratamento destes animais com insulina havia restauração de todos estes parâmetros. Estudos descreveram a participação de uma proteína denominada resistina, considerada hormônio, ("Resistin-Like-Molecules") na reação inflamatória, sua fonte em humano são os macrófagos sugerindo um importante papel inflamatório, cujos efeitos no metabolismo da glicose são antagônicos àqueles da insulina (WOLF, 2004). Segundo Kawanami et al. (2004), a resistina aumenta a expressão de moléculas de aderência VCAM- 1 e ICAM-1, faz "up-regulation" da proteína quimiotáxica para monócitos¹ (MCP-1) e promove ativação da célula endotelial via liberação de endotelina 1 (ET-1).

Existem evidências para a regulação da função endotelial pela insulina e adipocinas como adiponectina, leptina, resistina, IL-6 e TNF- α , visto que, por exemplo, a redução da massa de tecido adiposo, através de redução de peso em associação com exercício, reduz TNF- α , IL-6 e PAI-1, aumenta adiponectina, e está associada com melhora na função endotelial (ALDHAHI, 2003). Entre os mediadores inflamatórios, o TNF- α , este produzido por adipócitos e está aumentado no tecido adiposo de roedores obesos, bem como em humanos (WOLF, 2004; KAWANAMI et al., 2004). Estudos sugerem que, enquanto o TNF- α age de forma parácrina no adipócito por outro lado, a IL-6 circula no plasma em concentrações relativamente altas. Apesar das células gordurosas contribuírem com 1/3 da concentração circulante de IL-6, existem outras fontes importantes de produção, como os monócitos. Outro fato importante é que pacientes diabéticos apresentam concentrações plasmáticas elevadas de IL-6 (FERNÁNDEZ-REAL; RICART, 2003).

Contudo, há evidencia que a fisiopatologia envolvida na resistência à insulina em obesos esta intimamente ligada à comunicação entre o sistema nervo (Hipotálamo, nervo vago) e sistema imuno-endócrino (IL-1, TNF- α , IL-6, leptina e

cortisol) (YAMADA; KATAGIRI, 2007). Segundo Milanski et al., (2012), lipídeos pode ativa o “Toll Like Receptor” em células e induzir a produção de TNF- α que consequentemente leva à inflamação do hipotálamo, por esse motivo, pode haver uma interrupção na sinalização de leptina e insulina no sistema nervoso central, assim, inibindo a passagem de sinalização pelo nervo vago, implicando em resistência à insulina e prejuízo no controle da produção hepática de glicose.

2.2 Reação inflamatória aguda

A inflamação é a reação do tecido vivo à agressão local, ocorrendo como resposta inespecífica, caracterizada por alterações que tendem a limitar os efeitos lesivos ao organismo, tornando-se um processo modulado no sentido de que sua amplitude varie em função da intensidade do estímulo. Este fenômeno é parte essencial das defesas naturais (imunidade inata e adaptativa) do indivíduo, além de apresentar participação efetiva na reparação tecidual (ABBAS et al., 2012).

Os peixes, assim como em mamíferos, possuem uma variedade de mecanismos de defesa específicos e não-específicos contra organismos invasores. Este mecanismo de proteção é fundamental para os peixes, e constitui-se processo controlado e coordenado, buscando minimizar os danos teciduais e restabelecer condições fisiológicas normais (KIM et al., 2007). A reação inflamatória em peixes teleósteos, assim como em mamíferos, desenvolve papel importante na defesa do organismo, resultando no recrutamento e acúmulo de leucócitos no sítio lesado (BELO et al., 2005; BELO et al., 2013, CASTRO et al., 2014; PRADO, 2014).

A inflamação aguda inicia imediatamente após a injúria tecidual e apresenta substâncias originárias de metabólitos do ácido aracdônico, tais como, as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos, que por sua vez são responsáveis pelas alterações iniciais da reação inflamatória (BAUMANN; GAULDIE, 1994). As prostaglandinas promovem vasodilatação, agregação de plaquetas e degranulação celular (WHITE, 1999). Os leucotrienos responsáveis pela quimiotaxia de células fagocitárias e contração da musculatura lisa (BAUMANN; GAULDIE, 1994). Mecanismo este, essencial para desencadear um processo de proteção, de modo que os importantes componentes do sistema de defesa atinjam o

local da agressão (WHITE, 1999).

Mudanças sistêmicas e metabólicas na fase aguda promovem uma defesa inicial não-específica contra o agressor, até que uma imunidade específica seja adquirida (GRUYS et al., 2006). Dentre os vários eventos que ocorrem nesta fase, está à liberação de citocinas, tais como as interleucinas (IL), interferons (INF) e fator de necrose tumoral (TNF), secretadas por células de defesa durante a resposta inflamatória e então, lançadas ao redor do foco inflamado adicionalmente na corrente sanguínea para efeitos sistêmicos, com ação em órgãos-alvo (DINARELLO, 2000). Segundo Elluru et al., (2006) algumas citocinas promovem a inflamação e são chamadas de pró-inflamatórias (IL-1 β ; IL-6; IL-8 e TNF- α), enquanto que outras inibem os genes das citocinas pró-inflamatórias e são chamadas de anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13).

Determinadas citocinas, secretadas nos sítios inflamatórios, desempenham múltiplos efeitos moduladores da defesa imune celular local e sistêmico, induzindo primeiramente mudanças nas células endoteliais vasculares no local inflamado, como, por exemplo, IL-1 e TNF- α estimulam a expressão da E-selectina, ICAM-1 e VCAM nas células endoteliais, que são proteínas responsáveis pela adesão e diapedese de leucócitos, outro exemplo é a influência das citocinas sobre o crescimento e diferenciação celular da linhagem mielocítica da medula óssea, visto que a IL-1 em efeito sinérgico com outras citocinas induz a produção de leucócitos, aumento do crescimento de células T auxiliares, o crescimento e proliferação de células B, enquanto que a IL-2 provoca a proliferação de linfócitos T e a ativação dos linfócitos B (SIMS; SMITH, 2010; SCHRODER; TSCHOPP, 2010; WHITE, 1999).

Além do mais, tais citocinas são simultaneamente responsáveis pelo controle da síntese e secreção de proteínas de fase aguda nos hepatócitos (GRUYS et al., 2006). Agindo as citocinas de forma sinérgica, através da mobilização de aminoácidos corporal, oriundos da musculatura esquelética, pela ação proteolítica do TNF- α , o que aumenta a disponibilidade de moléculas no fígado para a produção de novas proteínas. De tal modo, a IL-1 modula a síntese de proteínas no hepatócito, inibindo a síntese de proteínas comuns em animais saudáveis (albumina, apolipoproteína A-1, transtiretina e transferrina) e estimulando a

produção de proteínas de fase aguda (proteína C-reativa, soro amiloide A, haptoglobina, ceruloplasmina, fibrinogênio e alfa-1 glicoproteína ácida). Por fim, a IL-6 é responsável pela liberação dessas proteínas para a circulação sanguínea (CRAY, 2012; GRUYS et al., 2006; GRUYS et al., 2005).

Entretanto, níveis elevados de IL-1 β é um fator de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 e tipo 1, visto que rapidamente contribui para a resistência à insulina por antagonizar a sinalização da insulina e promovendo também em casos crônicos o efeito tóxico para células β pancreáticas, contribuindo a apoptose (SIMS; SMITH, 2010; SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Também é descrito que doenças inflamatórias à medida que secretam TNF- α e IL-1 levam um mecanismo subsequente de remodelação óssea, resultando em aumento na reabsorção mineral óssea, culminando em diminuição da densidade mineral óssea (COLLIER, 2007).

Embora as proteínas de fase aguda apresentem ações individuais diversificadas nas defesas do organismo contra processos patológicos e na restauração na homeostase, algumas proteínas podem ser agrupadas como atividades antiproteases, como a α -1 antitripsina e α -2 macroglobulina, que inibem a ação de proteases liberadas pelos fagócitos, minimizando os danos ao tecido inflamado, outro grupo com ação de remoção, tais como haptoglobina, soro amiloide A e proteína C-reativa, apresentam um papel de limpeza, através da ligação com metabólitos gerados da degradação celular, que poderiam servir como substrato para o crescimento de microrganismos e por fim, um grupo que apresenta ação bactericida e habilidade de influenciar no curso da resposta imune, como por exemplo proteína C-reativa, α -1 glicoproteína ácida e soro amiloide A (CRAY, 2012; GRUYS et al., 2006; GRUYS et al., 2005).

Gabay e Kushner (1999), descrevem que glicocorticóides possuem efeito regulador sobre a produção das proteínas de fase aguda pelas citocinas, enquanto que a insulina, por exemplo, é um hormônio que pode inibir parcialmente a produção das mesmas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais utilizados e acondicionamento

3.1.1 Estudo do efeito diabético crônico

Foram utilizadas para este estudo, 30 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), peso médio $1017,6 \pm 46,7\text{g}$, pertencentes à linhagem “GIFT”, machos. Aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP- Campus de Jaboticabal, sob o protocolo nº 022546/11. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 tanques de 1000 Litros ($n=10$), constituindo 3 tratamentos (tabela1). Para tal, utilizou se infraestrutura do infectória de animais de laboratório, pertencente ao departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UNESP-FCAV, campus Jaboticabal-SP.

Tabela1- Distribuição de animais nos diferentes tratamentos (estudo crônico).

Grupos	Tratamentos	4 meses ¹
C	Padrão fisiológico (solução salina a 0,65%)	N=10
D	Aloxano-diabético sem insulina	N=10
DI	Aloxano-diabético com insulina	N=10

¹Período de tratamento experimental.

O arraçoamento para tilápias foram feitas cuidadosamente, duas vezes ao dia, alimentados pela manhã e tarde com a ração comercial peletizada (32% de proteína bruta) LAGUNA-Socil®, correspondendo a 2% da biomassa dos tanques.

3.1.2 Estudo do efeito diabético sobre a resposta inflamação aguda

Foram utilizadas para este estudo, amostras de soro e vesícula natatória de 72 tilápias do Nilo (*O. niloticus*), peso médio $532 \pm 74\text{g}$, pertencentes à linhagem “GIFT”, oriundas do projeto de mestrado (PRADO, 2014) processo FAPESP Nº 2011/16945-9 e auxílio à pesquisa processo FAPESP Nº 2012/12256-7. Sendo o

delineamento experimental aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP- Campus de Jaboticabal, sob o protocolo nº 022546/11. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 9 tanques de 1000 Litros (n=8), constituindo 3 tratamentos (tabela2).

Tabela2- Distribuição de animais nos diferentes tratamentos (estudo inflamatório).

Grupos	Tratamentos	Horas após inóculo (HPI) ¹		
		6	24	48
C. P	Inoculado + não tratado (controle positivo)	N= 8	N= 8	N= 8
D	Inoculado + aloxano	N= 8	N= 8	N= 8
D + I	Inoculado + aloxano + insulina	N= 8	N= 8	N= 8

¹ Estímulo inflamatório na vesícula natatória por *Aeromonas hydrophila*.

O arraçoamento para tilápias foram feitas cuidadosamente, duas vezes ao dia, alimentados pela manhã e tarde com a ração comercial peletizada (32% de proteína bruta) LAGUNA-Socil®, correspondendo a 3% da biomassa dos tanques.

3.2 Manuseio dos peixes para exames

Os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000 v:v (para aferimento do peso, coleta sanguínea e indução diabética por aloxano) e 1:500 v:v (para eutanásia). Inicialmente, a benzocaína foi diluída em álcool 98° (0,1 g/mL), completando-se o volume para um litro de água (WEDEMEYER, 1970). Após o manuseio experimental, os animais foram novamente colocados nos tanques.

3.3 Indução diabética por aloxano

O uso do aloxano (Sigma®) foi por via endovenosa aplicado em vaso caudal (figura 1), na dose de 100 mg-Kg⁻¹ de peso vivo utilizando como solvente 1ml de solução salina estéril (NaCl 0,65%) segundo Prado (2014). A administração de

aloxano foi feita 102 dias após a chegada dos animais no biotério, apresentando um ano de vida. Animais não pertencentes aos grupos tratados com aloxano foram injetados pela mesma via em igual volume solução salina estéril (NaCl 0,65%). Após a aplicação de aloxano, os animais foram novamente colocados nos tanques onde permaneceram por volta de 24 horas em banho em solução de cloreto de sódio (NaCl 0,65%).



Figura 1. Aplicação de aloxano via endovenosa em vaso caudal.

Desta forma, uma semana após a aplicação de aloxano, tilapias que apresentaram valores glicêmicos acima de 150 mg.dL⁻¹ após 12 horas de jejum foram consideradas diabéticas.

3.4 Tratamento com insulina

A aplicação de insulina (Lantus®) foi feita via subcutânea na região ventral abdominal entre o ânus e o fim da nadadeira pélvica, na dose única de 1 UI·kg⁻¹ diário.

3.5 Exame hematológico e bioquímico

Para avaliação do hemograma foram colhidas amostras de sangue dos peixes por punção de vaso caudal, com auxílio de seringas descartáveis previamente

heparinizadas. A partir das amostras de sangue total foi feita a contagem direta de eritrócitos, leucócitos e trombócitos em câmara de Neubauer, utilizando-se a solução de Natt e Herrick (1952) como diluente na proporção de 1:100 v:v. Os eritrócitos foram quantificados nos cinco quadrantes secundários em diagonal do quadrado central, sendo este valor multiplicado por 5000. Em relação à determinação total de leucócitos e trombócitos foram quantificados todos juntos nos 25 quadrantes secundários do quadrado central, sendo este valor multiplicado por 1000. Para determinação da proporção de trombócitos e leucócitos no sangue foram realizadas extensões sanguíneas em lâmina. Depois de secas, foram coradas com corante “May-Grunwald-Giemsa-Wright” segundo Tavares-dias e Moraes (2003). Assim, estabelecendo o percentual de cada tipo celular de interesse.

Avaliação do bioquímico sérico a glicemia dos animais foi determinada utilizando o aparelho Accu-Chek Performa, e alíquotas de soro foram destinadas a avaliação de colesterol, triglicerídeos, fosfatase alcalina e proteínas totais foram por meio da determinação enzimática e colorimétrica em analisador bioquímico semiautomático (Modelo LabQuest – Bioplus®).

Para tal, utilizou-se a infraestrutura do infectória de animais de laboratório, pertencente ao departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UNESP-FCAV, campus Jaboticabal-SP.

3.6 Necropsia, coleta de materiais e preservação

Após a necropsia alguns órgãos foram coletados para histopatologia: musculatura esquelética, duodeno, coração, baço, rim, fígado, estômago e pâncreas (figura 2). O tecido hepático, coração, estômago, renal (porção cranial e caudal) e esplênico foi coletado para avaliação morfométrica conforme Weibel et al. (1969), por meio da proporção entre peso do órgão (PO) e peso corporal (PC) expressos como índice somático hepático, renal e esplênico, calculado pela fórmula: Índice somático (IS) = $PO \times 100/PC$.

Imediatamente após a coleta, um fragmento de cada órgão foi fixado em paraformaldeído a 4 % preparado em solução tampão fosfato, a uma concentração molar de 0,1M e pH 7,2. Após 24 horas, o mesmo foi transferido para o álcool a

70%. Após os procedimentos de fixação, desidratação, diafanização e inclusão dos tecidos em parafina, foram feitos corte em espessura de 5 μm e as lâminas coradas em hematoxilina e eosina (H&E).

Para o estudo das alterações óssea, no momento da necropsia dissecou-se o segundo arco aórtico esquerdo (figura 3) para avaliação biomecânica e preservou-se a carcaça do peixe em refrigeração até o momento da determinação da densitometria da massa gorda, magra e mineral de corpo.

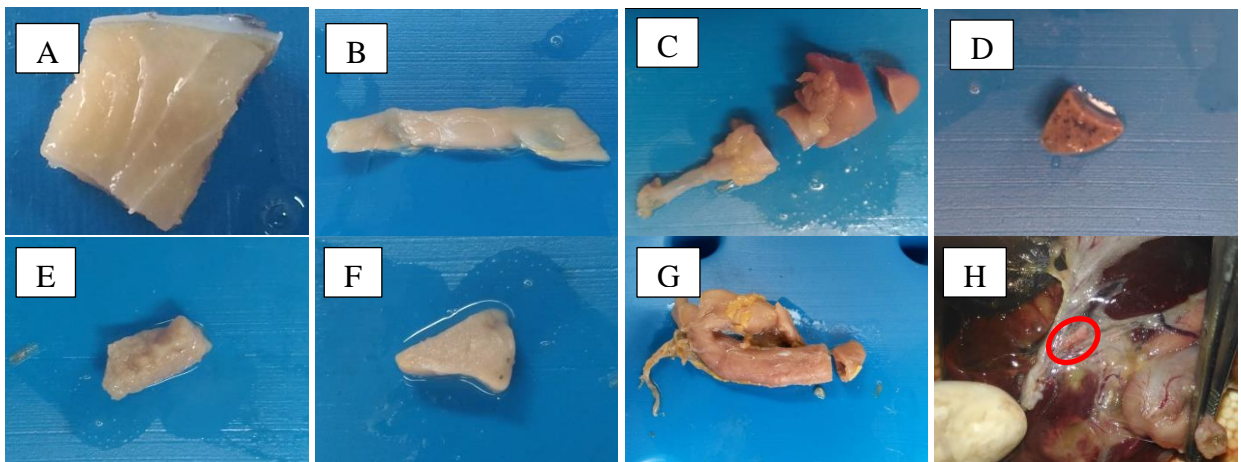


Figura 2. Órgãos coletados: tegumento e músculo esquelético (A); duodeno (B); coração (C); baço (D); rim (E); fígado (F); estômago (G); pâncreas (H).



Figura 3. Primeiro arco aórtico esquerdo (ponte a pinça).

3.7 Determinação da densidade mineral óssea

As análises foram realizadas através da densitometria radiográfica por aparelho Hologic® 4500 W densitometer (Hologic® Inc., Bedford, MA, EUA). Onde se determinou os

índices de massa gorda, massa magra e massa mineral óssea global (figura 4). E também a análise radiográfica da 3, 4, 5 e 6 vertebra, totalizando 4 repetições por animal (figura 5).

Os exames obtidos por densitômetro foram realizados no Centro de Ciência da imagem e Física Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP).

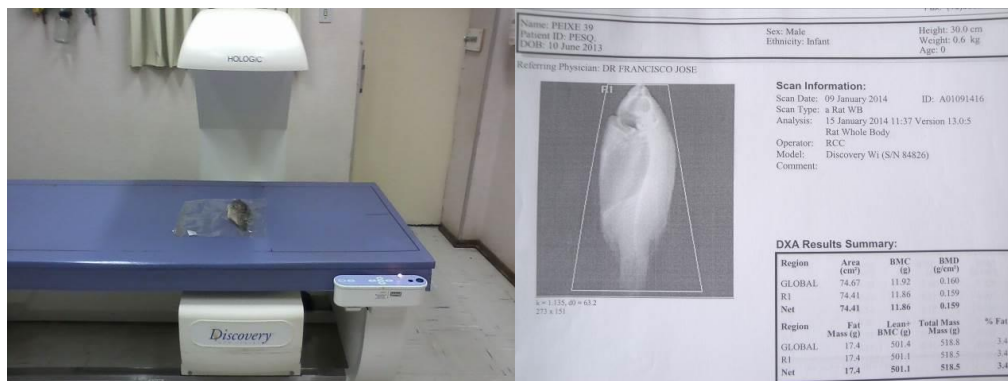


Figura 4. Determinação do índice de massa gorda, magra e óssea em tilápia.

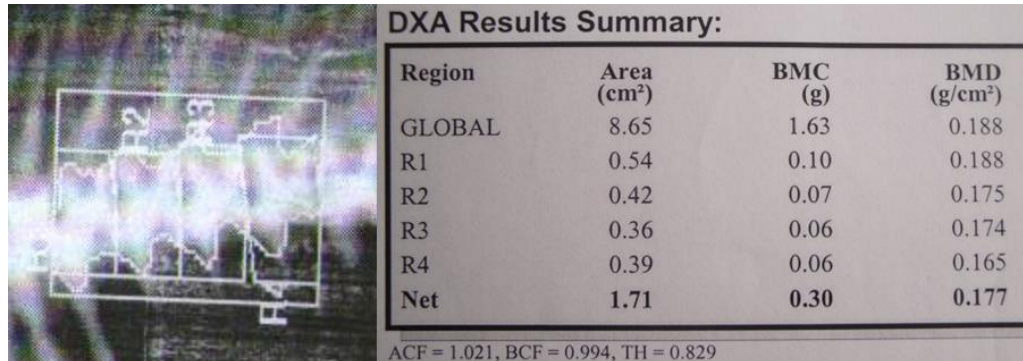


Figura 5. Análise radiográfica de quatro pontos na coluna vertebral em tilápia.

3.8 Determinação da fragilidade óssea por teste mecânico

Determinado por ensaio mecânico de flexão de três pontos, em máquina EMIC[®] (modelo DL-10000). Para isto, o segundo maior arco aórtico direito foram utilizado, dissecado no momento da necropsia e colocados em refrigeração até o momento do ensaio (figura 6). Para o ensaio mecânico, o arco aórtico foi posicionado em uma base de apoio com distância entre 25mm e aplicado carga

transversalmente em sua margem anterior na região central, de cima para baixo, através de um pino de aço. A força foi aplicada a uma velocidade de 5 mm/minuto, com intervalo de medida da deformação de 0,02mm, utilizada uma célula de carga de 50Kgf.

O estudo mecânico foi realizado no laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

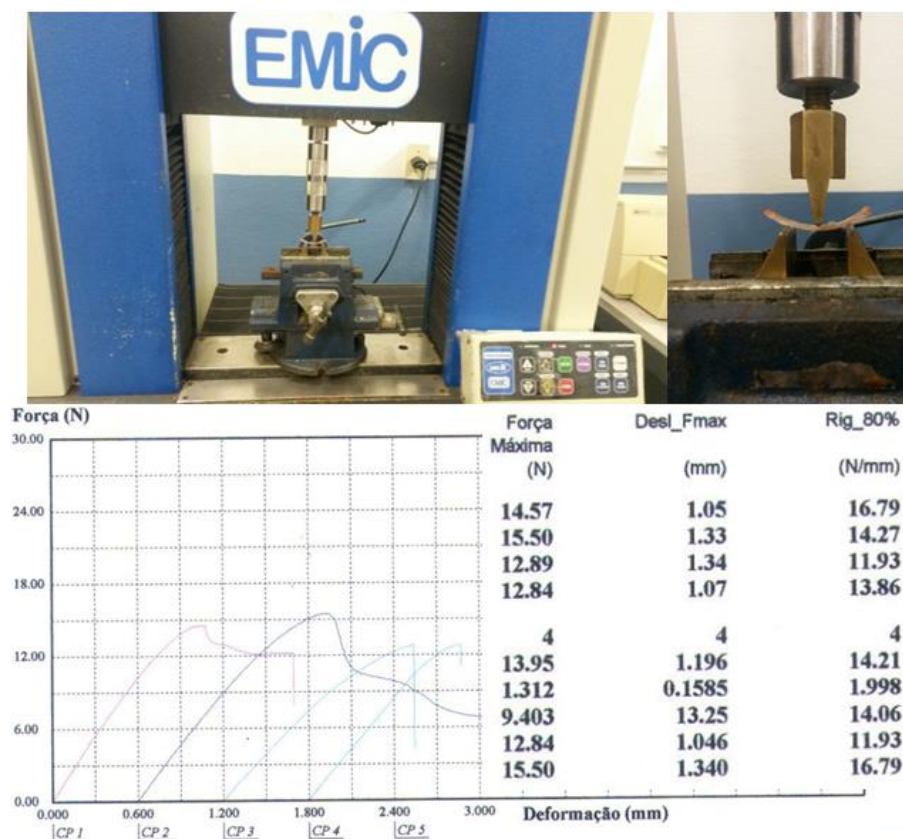


Figura 6. Ensaio mecânico por flexão de três pontos do arco aórtico.

3.9 Eletroforese das proteínas do soro (SDS-PAGE)

O fracionamento eletroforético foi realizado em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (figura 7). Foi realizado por técnica descrita por Laemmli (1970) modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI-VERTICALELECTROPHORESIS CELLS®- BIO-RAD) com amostra

de soro. Para polimerização do gel foi necessário à adição de 15,0 μL de tetrametiletilenodiamina e 0,3 μL de persulfato de amônia a 10%. A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado em contato com uma cuba superior contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 36,30g de tris-base, 112,50g de glicina, 10g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução. A parte superior da placa que contém o gel entrará em contato com uma cuba contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 18,15g de tris-base, 46,25g de glicina, 10g de SDS, em um litro de água destilada estéril. As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%. As amostras para o fracionamento das proteínas foram preparadas utilizando-se 10 μL de soro diluídos em 30 μL de tampão-fosfato (PBS) e 20 μL de gel mix e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5 μL das referidas amostras foi depositada no fosso do gel. A placa foi colocada em suporte apropriado, em contato com solução tampão com pH 8,5 e submetida à corrente elétrica a 20 mA, em fonte adequada. Terminada a separação, o gel foi corado durante duas horas em solução de azul de comassie 0,2%, no agitador horizontal, para uma coloração uniforme e, em seguida, retirado o excesso de corante com solução descorante, até que as frações se apresentem nítidas. Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram determinados por densitometria computadorizada (SHIMADZU CS-930) através do escaneamento das amostras.

O estudo eletroforético foi realizado no laboratório de apoio à pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária (UNESP-FCAV), campus Jaboticabal-SP.

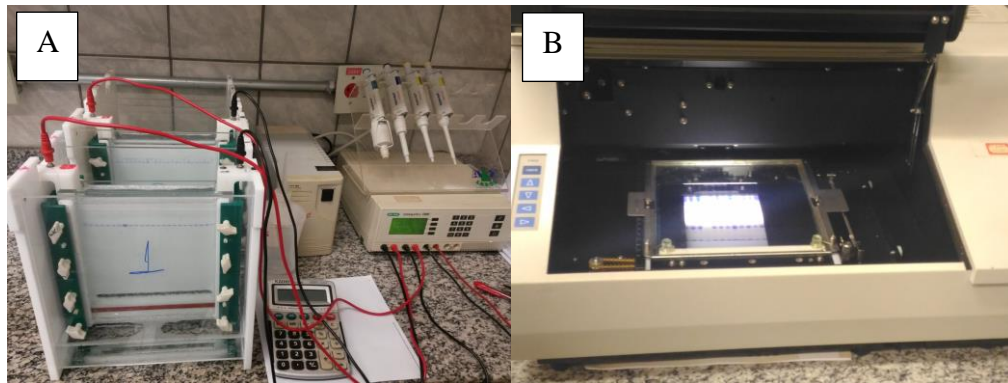


Figura 7. Fracionamento eletroforético das proteínas do soro, separação proteína (A) e determinação da densitometria computadorizada (B).

3.10 Digestão de proteína em gel e identificação por espectrometria de massa

As bandas de proteínas foram excisadas a partir da SDS-poliacrilamida e a digestão com tripsina em gel foi realizada de acordo com Niessen et al. (2006), com modificações. Análise de espectrometria de massa por LC-MS / MS. As amostras de peptídeos (4,5 μ l) foram automaticamente injetadas em uma coluna de armadilha empacotada com C18 (180 μ m id x 20 mm) (Waters, Milford, MA) para dessalinizar com 100% de solvente A (0,1% de ácido fórmico) a 15 μ L / min para 3 min. Os peptídeos foram então eluídos sobre uma coluna C18 analítica (100 μ m id x 100 mm) (Waters, Milford, MA) usando um gradiente de 20 min a uma taxa de fluxo de 600 nL / min, em que o solvente A continha 0,1% de ácido fórmico e o solvente B continha 0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo. O gradiente foi de 0-3% do solvente B em 1 min, 3-60% de B em 14 minutos, 60-80% de B em 2,5 min, 80% de B durante 1 min, depois de volta a 3% de B em 1,5 min. Um espectrômetro de massa ESI Q-TOF Ultima (Waters, Milford, MA) foi usado para adquirir espectros. A tensão e a temperatura do pulverizador foram ajustadas a 3,4 kV e 100 ° C, respectivamente, e o instrumento foi operado em modo dependente de dados, no qual uma varredura MS completa foi adquirida na faixa m / z de 200-2000 seguida de aquisição MS / MS usando a dissociação induzida por colisão dos três íons mais intensos da verificação MS. A exclusão de pico dinâmico foi aplicada para evitar o mesmo m / z a ser selecionado para as próximas 45 s. Os arquivos de dados brutos dos espectros de fragmentos foram processados pelo ProteinLynx 2.2 (Waters, Milford, MA) e convertidos para o formato * pkl. Os espectros de fragmentos

resultantes foram pesquisados usando o mecanismo de busca Mascot (versão 2.4.1) (Matrix Science, Reino Unido) contra a base de dados UniProt e NCBI nr restrita à Classe Actinopterygii com uma tolerância de 1.5 Da e tolerância ao fragmento de 1.0 Da. O derivado de iodoacetamida da cisteína e a oxidação da metionina foram especificados em Mascot como modificações fixas e variáveis, respectivamente. As identificações de mascote exigiram escores de íons maiores do que as pontuações de identidade associadas e 20, 30, 40 e 40 para peptídeos isolados, duplamente, triplos e quadruplicamente carregados, respectivamente. A espectrometria de massa foi utilizada para identificar o banda proteica que diferiu-se visualmente no estudo de eletroforese das proteínas do soro, onde correspondeu por uma proteína nomeada apolipoproteína A1 (figura 8).

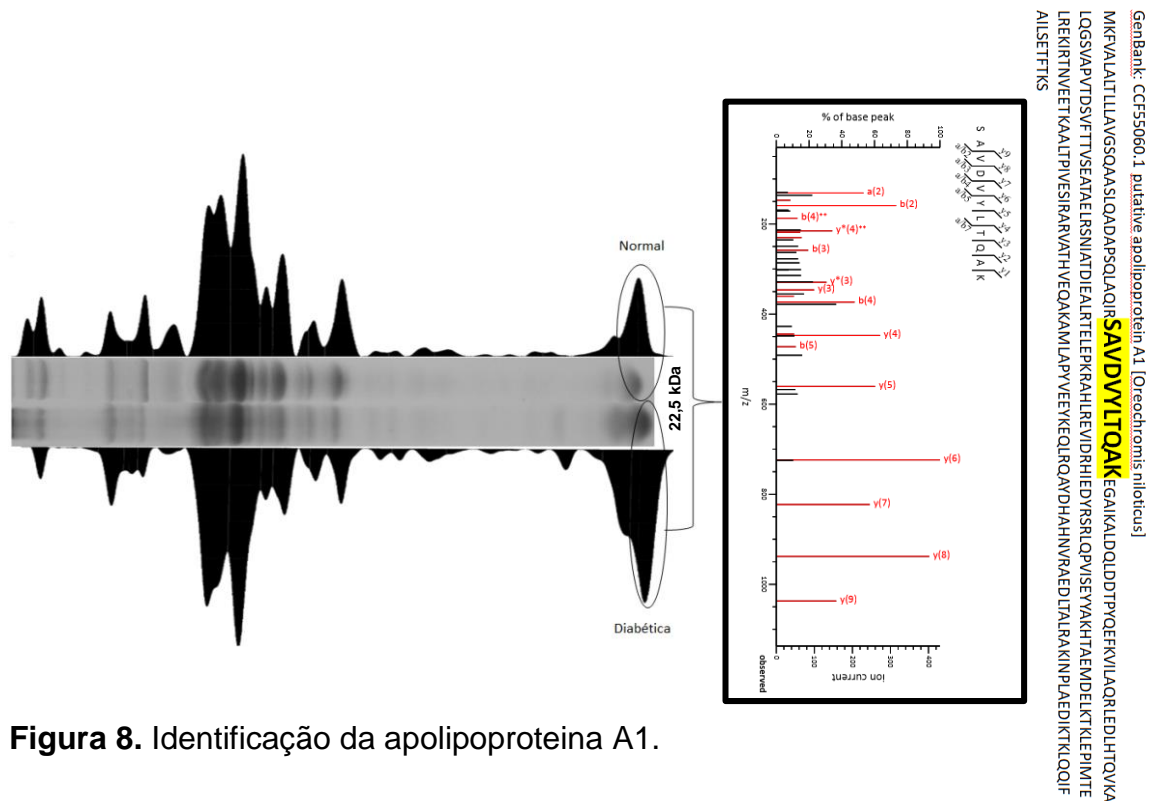


Figura 8. Identificação da apolipoproteína A1.

3.11 Análise da atividade de lisozima sérica

Para análise foram utilizada soro de tilapias oriundo do estudo de mestrado (PRADO, 2014) e do estudo crônico. A atividade de lisozima sérica foi determinada com base no método de Ellis, 1990 e modificado por Milla et al., 2010, no qual uma

suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* é usada como substrato para a lise, que é medida pela redução da densidade óptica por meio de espectrofotometria.

3.12 Imuno-histoquímica, análise de TNF- α , IGF-1 e insulina

Para determinação de TNF- α e IGF-1 no local inflamado foram utilizados cortes histopatológicos de visícula natatória mantida em bloco de parafina oriundo do projeto de mestrado (PRADO, 2014), descrito anteriormente. Por outro lado, as determinações de insulina foram realizadas em cortes histopatológicos de tecido pancreático oriundo do estudo crônico.

Todo o método para detecção foi por os seguintes procedimentos: a obtenção de cortes de tecido (5 μ m), na sequência, desparafinização em estufa a 60°C por 4 hora e em seguida banhos em soluções de xilol (I, II e III) por 5 , 5 e 10 minutos respectivamente, seguido da bateria corrida de álcool (álcool absoluto I, II, III, 95%, 80% e 70%) para hidratação dos cortes.

Após a etapa anterior, os cortes foram lavados por um minuto em água corrente, mais um minuto em água deionizada e três vezes em solução tamponada com citrato de sódio (TRIS HCl) 10mM em pH 7,2 por cinco minutos cada.

Na sequência, foram realizada recuperação antigênica em micro-ondas por imersão em tampão citrato de sódio (10mM), EDTA (1mM), Tween20 (0,1%) em pH 8,0 por 10 minutos na temperatura 89°C, em seguida deixar esfriar por 20 minutos. Após essa etapa, os cortes foram novamente lavados por um minuto em água corrente, mais um minuto em água deionizada e três vezes em solução tamponada com citrato de sódio (TRIS HCl) 10mM em pH 7,2 por cinco minutos cada.

Incubado em imersão em metanol a 5% de peróxido de hidrogênio (v/v), para bloqueio da peroxidase endógena, durante 20 minutos à temperatura ambiente (37°C) protegida de luz, em seguida os cortes foram novamente lavados em solução tampão TRIS HCl. Seguida de bloqueio de possíveis ligações inespecíficas com kits “*protein block*” (EXPOSE [AB80436] – ABCAM[®], Corp.) e “*blok*” (MERCK[®], Corp.), por 10 minutos cada em câmara úmida protegida de luz.

A próxima etapa foi secar a lâmina em volta do corte do tecido e contornar o mesmo com caneta hidrofóbica para posteriormente acrescentar o anti-corpo primário {Anti-TNF alpha [AB1793]; Anti-IGF-1 [AB106836] e Anti-Insulin [AB210560], todos da marca ABCAM[®], permanecendo incubado por 2h à temperatura ambiente (37°C). Depois o corte foi novamente lavado em solução tampão TRS HCl, como já descrito.

Para posteriormente incubar com complemento (kit EXPOSE [AB80436] – ABCAM[®], Corp.) por 10 minutos, após lavado em solução tampão TRS HCl e depois incubar com anticorpos secundários ligados à peroxidase (kit EXPOSE [AB80436] – ABCAM[®], Corp.), conforme protocolo do fabricante. Para a revelação foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina (kit EXPOSE [AB80436] – ABCAM[®], Corp.), por cerca de 3 minutos. Em seguida, a reação foi interrompida com a lavagem das preparações em água destilada, e feita a contra-coloração com hematoxilina de Harris pura por 1 segundo, com posterior lavagem em água corrente e em seguida desidratação.

Nesta última etapa, realizara passagens em álcool etílico (70% 85%, 95%), álcool absoluto (I, II e III), álcool-xilol (50%- “v/v”) e xilol (I e II), por um minuto cada. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck[®]) e observadas em óptico Olympus[®]. O controle positivo seguiu o protocolo do fabricante. O controle negativo foi realizado ao substituir o anticorpo primário por anticorpo do mesmo espécime em que foi produzido o anticorpo primário.

A determinação da densidade das células imunomarcadas para cada anticorpo foi determinada por contagem nas áreas que apresentaram maior imunomarcação (figura 9), onde calculou a média de três fotomicrografias, para insulina área=0,48 mm² e para os de mais anticorpos área=0,032 mm² em microscópio de luz a partir da captura de imagens feitas com câmera de vídeo acoplada em um microscópio óptico modelo (SWIFT M10L SERIES[®]). As fotomicrografias foram analisadas pelo programa ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, USA-2016) através do aplicativo “*IHC-toolbox*”.

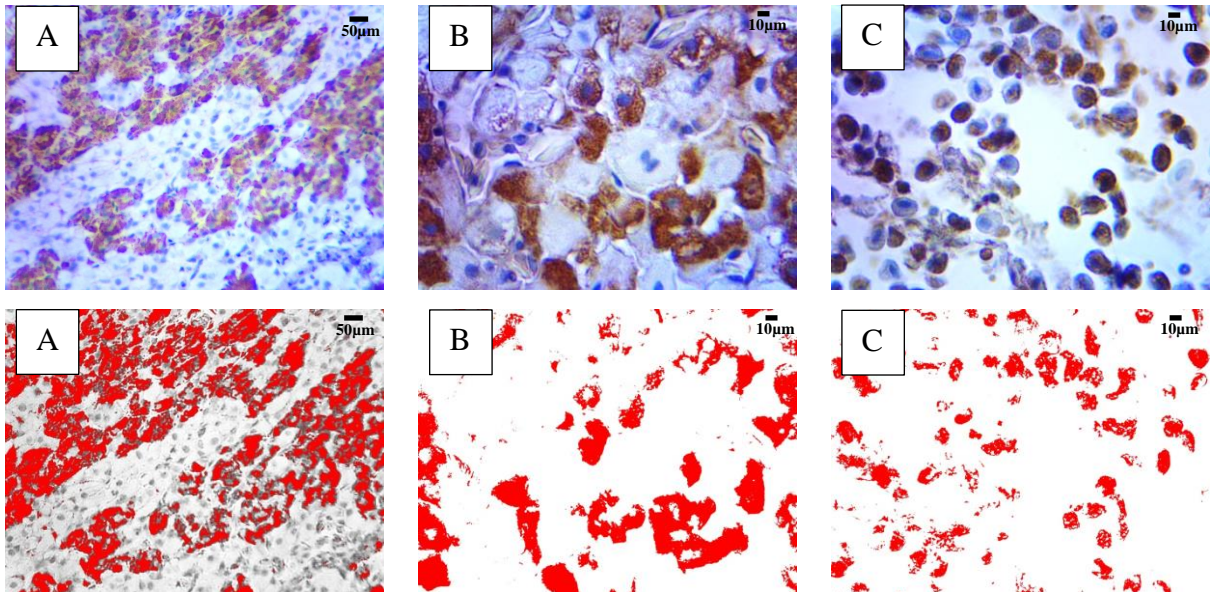


Figura 9. Fotomicrografias das imunohistoquímicas (imagens superiores) e análise computacional (imagens inferiores). Imunomarcção em castanho: insulina no tecido pancreático (A), IGF-1 na bexiga natatória (B) e TNF-alpha na visícula natatória (C).

3.13 Estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada por análise multivariada exploratória, a fim de buscar padrões nas inter-relações contidas nas estruturas das variáveis estudadas, utilizando o método análise de fatores por componentes principais, onde é necessário calcular a matriz de covariância, encontrar os autovalores e os autovetores e, finalmente, escrever as combinações lineares, que serviram para construção de variáveis latentes (processos biológicos), com o propósito em resumir adequadamente a informação contida nas variáveis originais (JOLIFFE; MORGAN, 1992; HAIR et al., 2009). Para tanto, o conjunto de dados foi padronizado de modo que cada variável fosse mantida com média nula e variância unitária, aplicada a função:

$$Z_{ij} = \frac{X_{ij} - \bar{X}_j}{S_j}$$

Sendo $j=1,2,\dots,p$ atributos e $i=1,2,\dots,n$ objetos, Z_{ij} o valor padronizado de X_{ij} e \bar{X}_j e S_j a média e o desvio padrão da coluna j .

Utilizou-se o critério de Kaiser (1958) para identificar novas variáveis latentes. Os valores das correlações aceitas foram adotados de acordo com Streiner, D. L. (2003).

Análises estatísticas univariadas foram processadas pelo programa “*proc mixed*”, onde os escores dos fatores (processos biológicos) extraídos da análise de componentes principais foram testados aplicando o delineamento experimental inteiramente casualizado para teste da hipótese nula entre grupos (tratamentos). Para estabelecer a hipótese de homocedasticidade e normalidade utilizou-se a análise dos resíduos padronizados internamente segundo o teste Box e Cox ($\lambda=1$) e teste Shapiro–Wilk ($p > 0,05$) respectivamente. Empregou-se o teste Tukey ($p < 0,05$) para multicomparações. As análises univariadas foram processadas no software SAS[®] versão 9.3 (Statistical Analysis System, 2012), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), UNESP/Jaboticabal-São Paulo. A análise multivariada foi realizada através do software STATISTICA[®] versão 7.0 (StatSoft, 2004).

4. RESULTADOS

Os valores das variáveis analisadas no estudo estão no apêndice, onde é apresentado à média e desvio padrão de cada grupo experimental.

4.1 Estudo do efeito diabético crônica

4.1.1 Efeito da aloxana no tecido pancreático

No estudo histopatológico pancreático, coloração de rotina “*H&E*” (figura 10), tilápias do Nilo aloxana-diabéticas apresentaram deposições de tecidos adiposos e grande número de células tumefeitas com alterações nucleares (cariólise e picnose).

A marcação positiva para a insulina pela técnica de imunohistoquímica no pâncreas (células com coloração acastanhada) possibilitou a identificação de área das ilhotas pancreáticas constituída por células beta produtora de insulina. Desta

forma, avaliando o pâncreas de tilápias do Nilo aloxana-diabéticas, notou-se claramente que células imunomarcadas para insulina apresentaram tumefação celular e alterações patológicas nucleares, confirmando os achados histopatológicos.

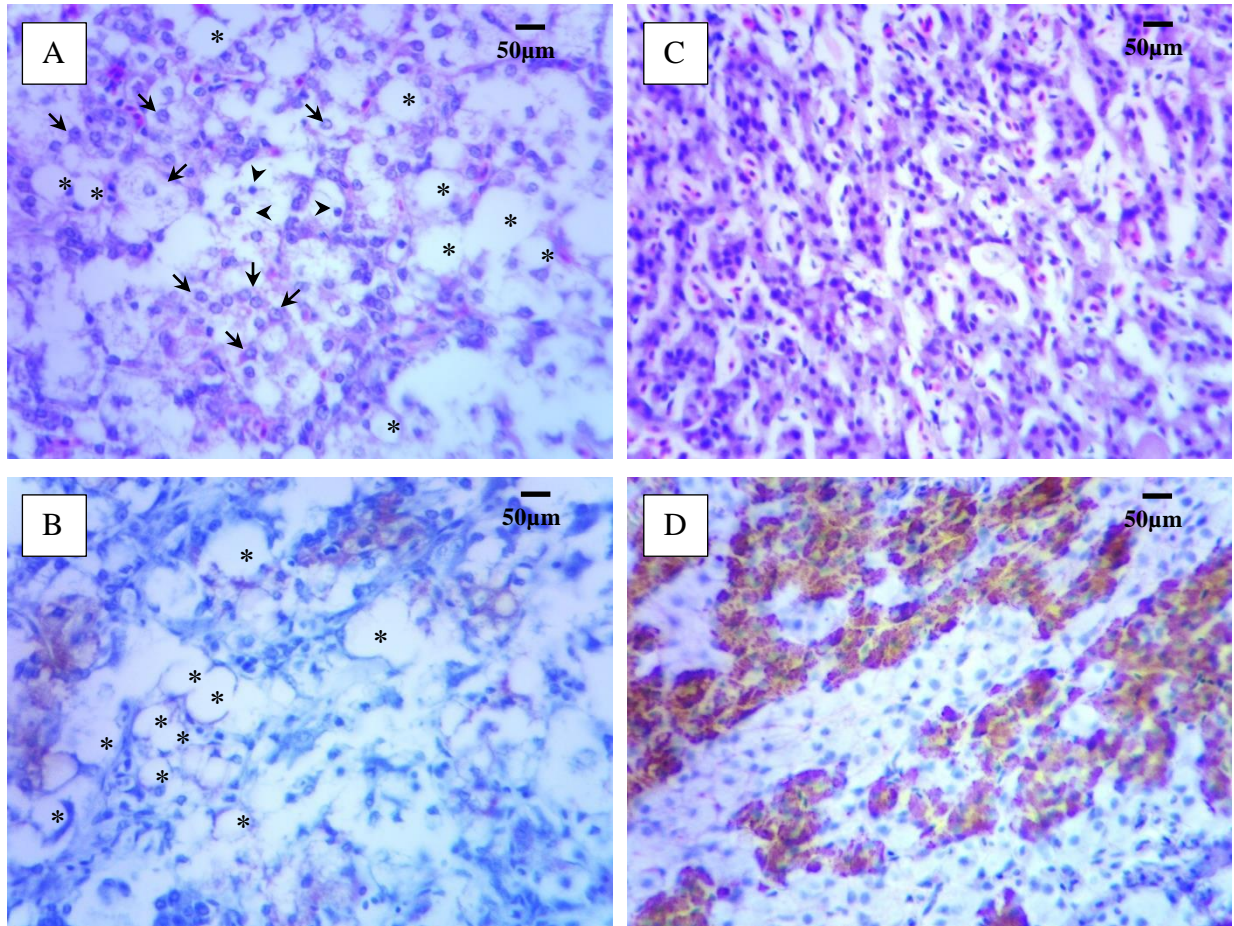


Figura 10. Fotomicrografias dos pâncreas de tilápias do Nilo aloxana-diabéticas (A e C) e normais (B e D). Coloração H&E (imagens superiores) e imunohistoquímica (imagens inferiores). Setas demonstram núcleos em cariólise, cabeças das setas demonstram núcleos em picnose, asteriscos demonstram células adiposas e células com coloração acastanhada demonstram células beta produtora de insulina.

Na análise do percentual de insulina no pâncreas, tilápias do Nilo aloxana-diabéticas apresentaram menor área de imunomarcção em relação às tilápias normais (figura 11).

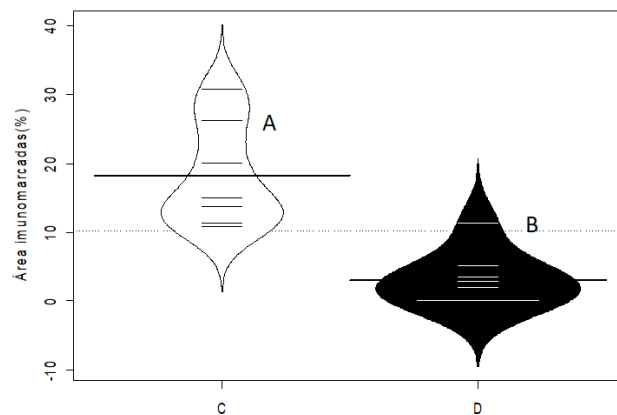


Figura 11. Percentagem de insulina imunomarcadas no pâncreas em tilápias do Nilo. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras maiúsculas). Grupos: tilápias do Nilo normais (C); tilápias do Nilo aloxana-diabético (D). O nível de significância: $p < 0,05$.

4.1.2 Efeito diabético no ganho de peso em tilápias do Nilo

Tilápias do Nilo normais e diabéticas tratadas com insulina apresentaram ganho de peso corporal ao longo do período experimental (figura12). Entretanto, não observando este efeito em peixes do grupo diabético sem tratamento com insulina. Evidenciando desta forma, apresentando a participação da insulina no desenvolvimento corporal em tilápias do Nilo.

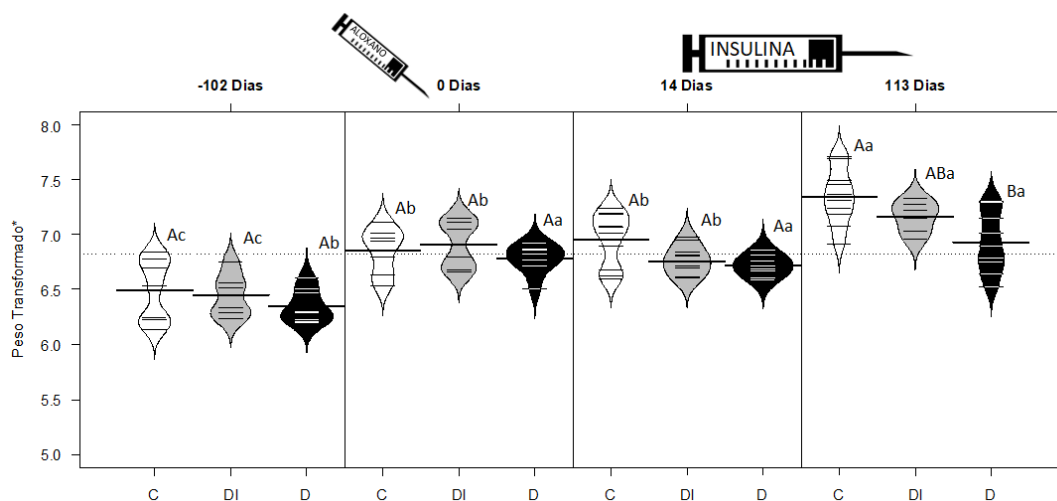


Figura 12. Resultados do ganho de peso em tilápias do Nilo criadas por 215 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras maiúsculas comparações entre grupos e letras minúsculas comparações ao longo do tempo). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Peso transformado segundo Box e Cox (1982).

4.1.3 Efeito diabético na avaliação de lipídeos no soro

É possível observar associações das variáveis: triglicerídeos, colesterol e apolipoproteína A1 na análise de fatores por componentes principais, onde asseguram 77% da variabilidade total dos dados originais (tabela 3), as quais apresentaram uma diminuição concomitante, resultados relacionados a processos normolipidêmicos.

TABELA 3. Associações de variáveis (triglicerídeos, colesterol e apolipoproteína A1) em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais.

Variáveis \ Processo	"Normolipidêmia"
Triglicerídeos	-0,883641
Colesterol	-0,939905
Apolipoproteína A1	-0,807266
Autovalor	2,315923
Variância (%)	77,2

Autovalor ≥ 1 , segundo Kaiser, H.F. (1958);
Carga marcada ≥ 70 , segundo Streiner, D. L. (2003);

Nota-se na avaliação da resposta lipídica (figura13), a influência do efeito diabético na perda do equilíbrio normolipidêmico em tilápias do Nilo. Apresentando aumento da concentração de triglicerídeos, colesterol e apolipoproteína A1 no soro em tilápias do Nilo aloxana-diabéticas. No entanto, tilápias pertencentes ao grupo tratado com insulina tende a melhorar o quadro dislipidêmico, em vista, que não houve diferença quando comparado aos animais do grupo controle.

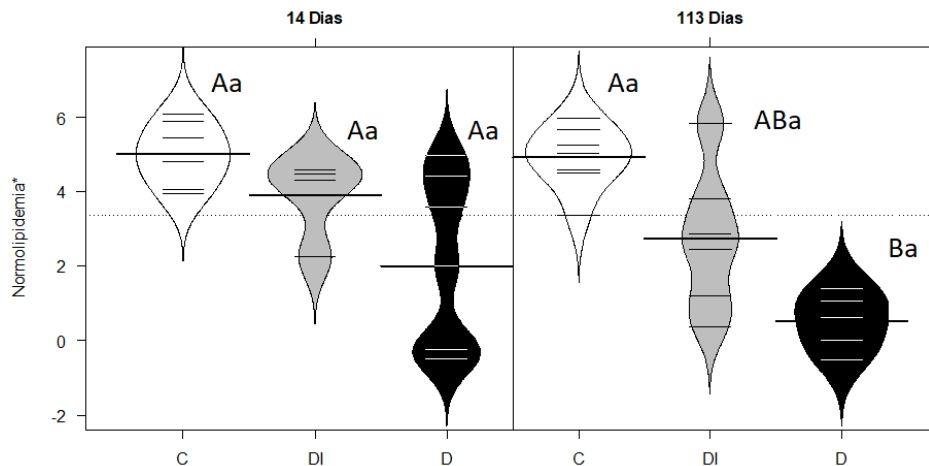


Figura 13. Resposta lipídica de 21 tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras maiúsculas comparações entre grupos e letras minúsculas comparações ao longo do tempo). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escores do fator (processo), extraídos pelo método de análise de fatores por componentes principais.

4.1.4 Efeito diabético na deposição lipídica

Observa associações das variáveis: massa gorda corporal, coração, fígado e níveis de colesterol no soro na análise de fatores por componentes principais, onde asseguram 66% da variabilidade total dos dados originais (tabela 4), as quais apresentaram uma diminuição concomitante, resultado este relacionado ao processo de diminuição da deposição lipídica, segundo a avaliação histopatológica do coração e do fígado.

TABELA 4. Associações de variáveis (Massa gorda corporal, Coração, Fígado e Colesterol) em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais.

Variáveis \ Processo	Deposição lipídica
Massa gorda corporal (%)	-0,704340
Coração	-0,879311
Fígado	-0,839942
Colesterol	-0,823338
Autovalor	2,652672
Variância (%)	66,3

Autovalor ≥ 1 , segundo Kaiser, H.F. (1958);

Carga marcada ≥ 70 , segundo Streiner, D. L. (2003);

Na análise do processo de deposição lipídica (figura 14), observou-se influência do efeito diabético no aumento da deposição lipídica em tilápias do Nilo. Apresentando aumento da massa gorda corporal, coração, fígado e níveis de colesterol no soro em tilápias do Nilo aloxana-diabéticas. Entretanto, tilápias aloxana-diabéticas tratadas com insulina apresentaram tendência de melhora, tendo em vista, que não se observou diferença em relação aos animais do grupo controle.

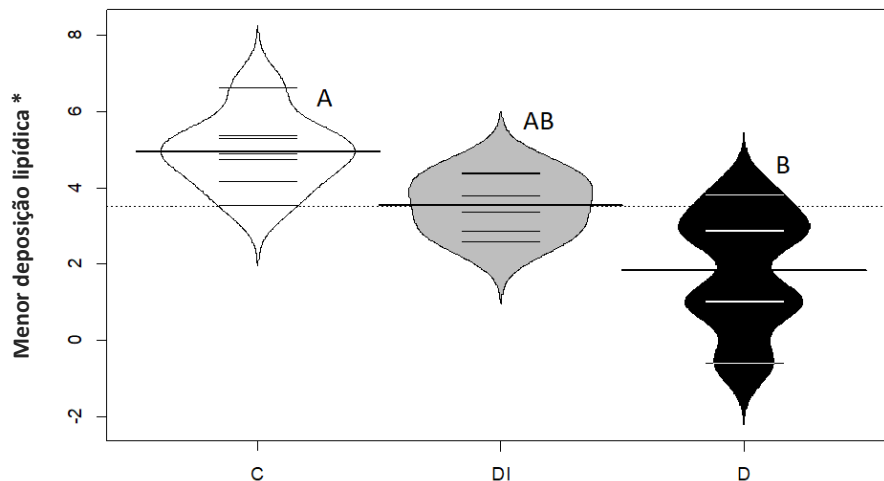


Figura 14. Deposição lipídica em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. * Escores do fator (processo), extraídos pelo método de análise de fatores por componentes principais.

4.1.5 Efeito diabético na avaliação da fragilidade óssea

É possível observar associações das variáveis: densidade mineral óssea vertebral, rigidez do arco aórtico e força máxima para deformação do arco aórtico na análise de fatores por componentes principais, onde asseguram 79% da variabilidade total dos dados originais (tabela 5), as quais apresentaram uma diminuição concomitante, resultados estes relacionados aos processos de fragilidade óssea.

TABELA 5. Associações de variáveis (Densidade mineral óssea vertebral, Rigidez do arco aórtico e Força máxima para quebra) em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais.

Variáveis \ Processo	FRAGILIDADE ÓSSEA
Densidade mineral óssea vertebral	-0,771967
Rigidez do arco aórtico	-0,959726
Força máxima para quebra (arco aórtico)	-0,926484
Autovalor	2,375380
Variância (%)	79,2

Autovalor ≥ 1 , segundo Kaiser, H.F. (1958);
Carga marcada ≥ 70 , segundo Streiner, D. L. (2003);

Na avaliação do processo de fragilidade óssea (figura 15), observa-se influência do efeito diabético no aumento da fragilidade óssea em tilápias do Nilo, as quais apresentaram diminuição da densidade mineral óssea vertebral, rigidez do arco aórtico e força máxima para quebra do arco aórtico. Entretanto, tilápias aloxana-diabéticas pertencentes ao grupo tratado com insulina apresentaram tendência de melhora, tendo em vista, que não se observou diferença quando comparados aos valores determinados em animais do grupo controle.

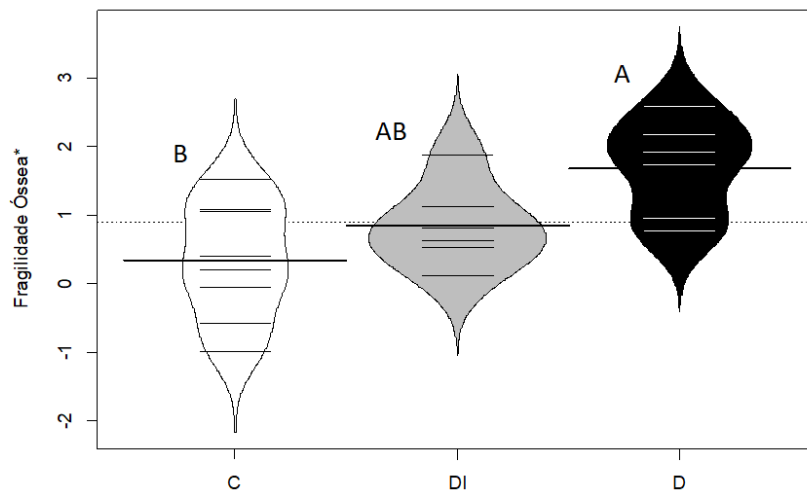


Figura 15. Resposta da fragilidade óssea de tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo Tukey (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. * Escores do fator (processo), extraídos pelo método de análise de fatores por componentes principais.

4.1.6 Efeito diabético na avaliação metabólica óssea

Nota-se associações das variáveis: glicemia, fosfatase alcalina e densidade mineral óssea global na análise de fatores por componentes principais, onde asseguram 60% da variabilidade total dos dados originais (tabela 6), cujo a diminuição dos valores de glicemia, fosfatase alcalina estão associados com o aumento da densidade mineral óssea global. Estes resultados podem estar relacionados ao processo de metabolismo ósseo.

TABELA 6. Associações de variáveis (Glicemia, Fosfatase alcalina e Densidade mineral óssea total) em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais.

Variáveis \ Processo	Normalidade metabólica Óssea
Glicemia	-0,868731
Fosfatase alcalina	-0,758279
Densidade mineral óssea global	0,704527
Autovalor	1,826039
Variância (%)	60,9

Autovalor ≥ 1 , segundo Kaiser, H.F. (1958);
Carga marcada ≥ 70 , segundo Streiner, D. L. (2003);

Na avaliação da resposta metabólica óssea (figura 16), observa-se influência do efeito diabético na perda do equilíbrio metabólico ósseo em tilápias do Nilo, pois os peixes apresentaram aumento da glicemia e atividade da fosfatase alcalina no soro, além de diminuição da densidade mineral óssea global. Entretanto, tilápias aloxana-diabéticas pertencentes ao grupo tratado com insulina apresentou amenização destas alterações e tendência de melhora, tendo em vista, que não houve se observou diferença quando comparadas aos valores observados nos animais controles.

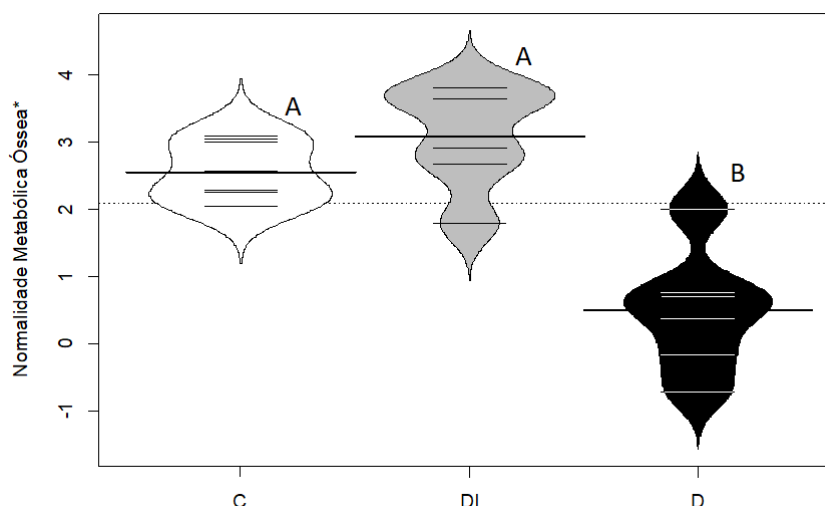


Figura 16. Resposta metabólica Óssea de tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. * Escores do fator (processo), extraídos pelo método de análise de fatores por componentes principais.

4.1.7 Efeito diabético na avaliação gástrica e renal

Observar associações das variáveis: peso do estômago e peso renal na análise de fatores por componentes principais, onde asseguram 53% da variabilidade total dos dados originais (tabela 7), as quais apresentam aumento concomitante, resultado este podendo estar associado à anormalidade fisiopatológicas.

TABELA 7. Associações de variáveis (estômago e rim) em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais.

Variáveis \ Processo	Anormalidade gástrica e renal
Estômago	0,729467
Rim	0,729467
Autovalor	1,064243
Variância (%)	53,2

Autovalor ≥ 1 , segundo Kaiser, H.F. (1958);
Carga marcada $\geq 0,70$, segundo Streiner, D. L. (2003);

Na análise do processo da anormalidade gástrica e renal (figura 17), observou-se influência do efeito diabético no aparecimento da anormalidade em questão. Entretanto, tilápias aloxana-diabéticas tratadas com insulina apresentaram tendência de melhora, tendo em vista, que não houve diferença em relação aos resultados observados nos animais controles.

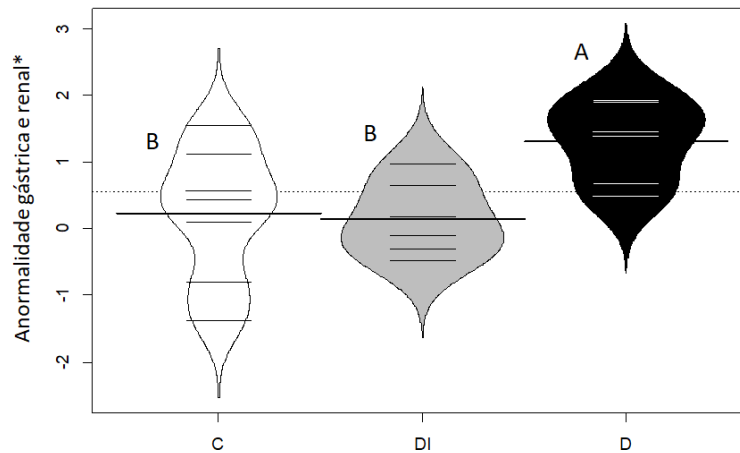


Figura 17. Anormalidade gástrica e renal em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. * Escores do fator (processo), extraídos pelo método de análise de fatores por componentes principais.

4.1.8 Efeito diabético no eritrograma

Observou-se a formação de dois processos independentes (tabela 8), no qual o primeiro envolve a diminuição do número de eritrócitos no sangue e aumento volume corpuscular médio (VCM), relacionados este efeito com desenvolvimento de uma anemia macrocítica. O segundo processo esta envolvido com a diminuição da concentração de glicose no sangue e aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), relacionados este efeito com normocromia.

Contudo, os processos asseguram 83,9% da variabilidade total dos dados originais na análise de fatores por componentes principais.

TABELA 8. Associações de variáveis {nº de eritrócito, volume corpuscular médio (VCM), glicemia e concentração de hemoglobina corpuscular médio (CHCM)} em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais com rotação “*varimax raw*”.

Variáveis \ Processo	Anemia macrocítica	Normocromia
ERITRÓCITO	-0,946089	-0,137722
VCM	0,958743	-0,061303
GLICEMIA	0,140443	-0,882514
CHCM	0,375451	0,751335
Autovalor	1,974961	1,366061
Variância (%)	49,4	34,5

Autovalor ≥ 1 , segundo Kaiser, H.F. (1958);

Carga marcada $\geq 0,70$, segundo Streiner, D. L. (2003);

Na análise eritrocitária (figura 18), observou-se influência do efeito diabético no desenvolvimento de processo anêmico com característica macrocítica em tilápias do Nilo quando comparados com tilápias do grupo controle.

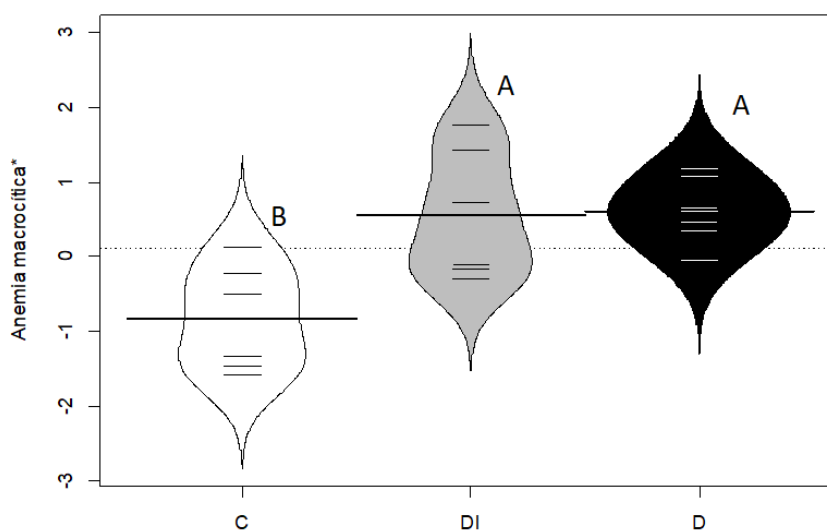


Figura 18. Anemia macrocítica em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escores do fator (processo), extraídos pelo método de análise por componentes principais com rotação “*varimax raw*”.

Na análise de hemoglobina presente nos eritrócitos (figura 19), observou-se influência do efeito diabético na diminuição da concentração de hemoglobina corpuscular médio em tilápias do Nilo. Entretanto, tilápias aloxana-diabéticas

tratadas com insulina apresentaram tendência de melhora, tendo em vista, que não houve diferença quando comparado aso animais controles.

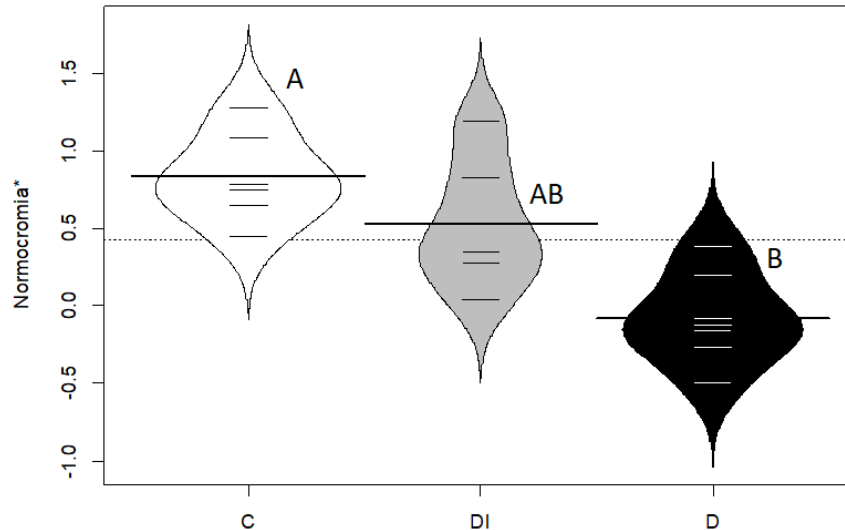


Figura 19. Normocromia em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escores do fator (processo) extraídos pelo método de análise por componentes principais com rotação “*varimax raw*”.

4.1.9 Efeito diabético no leucograma

A formação de dois processos independentes (tabela 9), no qual o primeiro envolve a diminuição do número de neutrófilos e linfócitos no sangue, relacionados este efeito com desenvolvimento de leucopenia. Enquanto, o segundo processo está envolvido unicamente com o número de monócitos no sangue.

Contudo, os processos asseguram 77% da variabilidade total dos dados originais na análise de fatores por componentes principais.

TABELA 9. Associações de variáveis (neutrófilos, linfócito, monócito) em 21 tilápias do Nilo. Método: análise de fatores por componentes principais.

Variáveis \ Processo	Leucopenia	Monócito
Neutrófilo	-0,817018	-0,006050
Linfócito	-0,773249	0,322467
Monócito	-0,257979	-0,947379
Autovalor	1,331987	1,001549
Variância (%)	44,4	33,4

Autovalor ≥ 1 , segundo Kaiser, H.F. (1958);
Carga marcada ≥ 70 , segundo Streiner, D. L. (2003);

Na análise da leucopenia (figura 20), observou-se influência do efeito diabético na diminuição do número de linfócitos e neutrófilos no sangue. Entretanto, tilápias aloxana-diabéticas tratadas com insulina apresentaram tendência a normalizar o número de linfócitos e neutrófilos no sangue, tendo em vista, que não houve diferença entre as contagens observadas em animais controles.

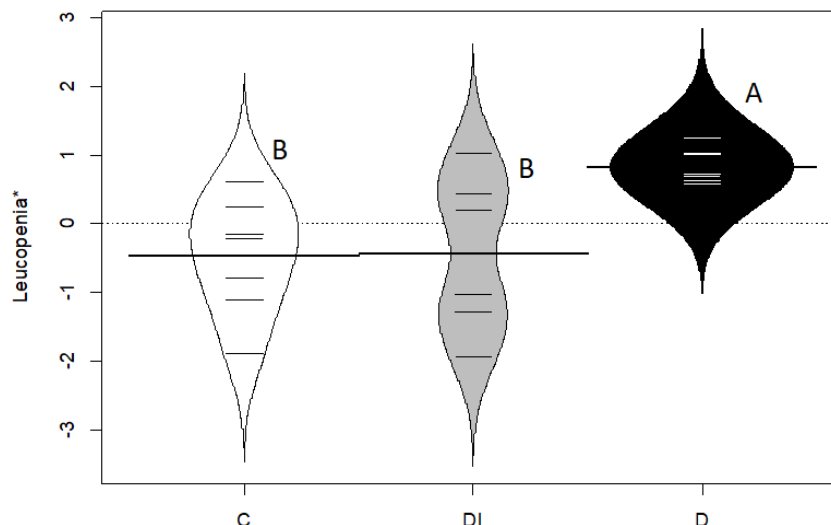


Figura 20. Leucopenia em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escores do fator (processo), extraídos pelo método de análise por componentes.

Na análise do número de monócitos no sangue (figura 21), não foi observado qualquer influência do efeito diabético em tilápias do Nilo, tendo em vista, que não houve diferença entre os diferentes tratamentos.

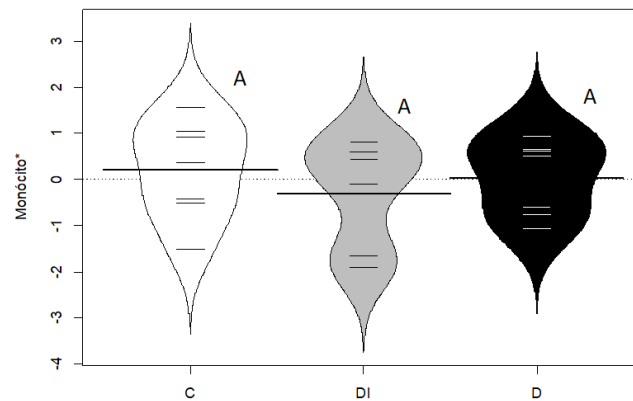


Figura 21. Monócitos em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Escores do fator (processo), extraídos pelo método de análise por componentes.

4.1.10 Efeito diabético no trombograma

Na avaliação dos números de trombócitos do sangue (figura 22), observou-se influência do efeito diabético no aumento do número de trombócitos em tilápias do Nilo. Entretanto, tilápias aloxana-diabéticas tratadas com insulina apresentaram tendência a normalizar o número de trombócito circulante, tendo em vista, que não houve diferença quando comparado às contagens de animais controles.

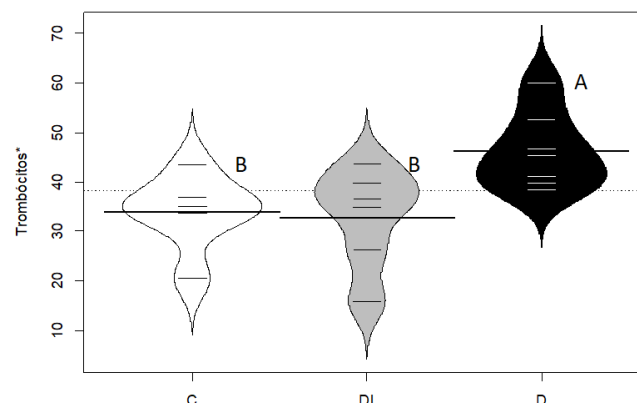


Figura 22. Trombócitos em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$.

4.1.11 Efeito diabético na atividade de lisozima no soro

Na análise da atividade de lisozima no soro (figura 23), observou-se influência do efeito diabético na diminuição da lisozima em tilápias do Nilo. Entretanto, tilápias aloxana-diabéticas tratadas com insulina apresentaram tendência de normalizar os níveis da atividade sérica de lisozima, tendo em vista, que não houve diferença quando comparado aos níveis séricos desta enzima em animais controles.

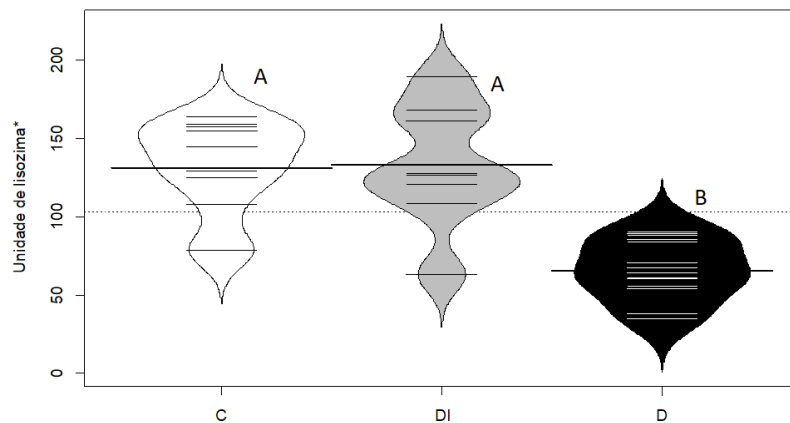


Figura 23. Atividade de lisozima no soro em tilápias do Nilo criadas por 133 dias. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Método segundo Ellis, 1990; Milla et al., 2010.

4.1.12 Avaliações histopatológicas

4.1.12.1 Avaliação tegumentar e muscular

Na avaliação histopatológica tegumentar (figura 24), tilápias aloxana-diabéticas apresentaram diminuição da espessura da epiderme e aumento nos números de adipócitos no subcutâneo em comparação com tilápias normais.

A análise da musculatura esquelética de tilápias aloxana-diabéticas revelaram uma atrofia da célula muscular e aumento nos espaço entre as células musculares comparadas com tilápias normais.

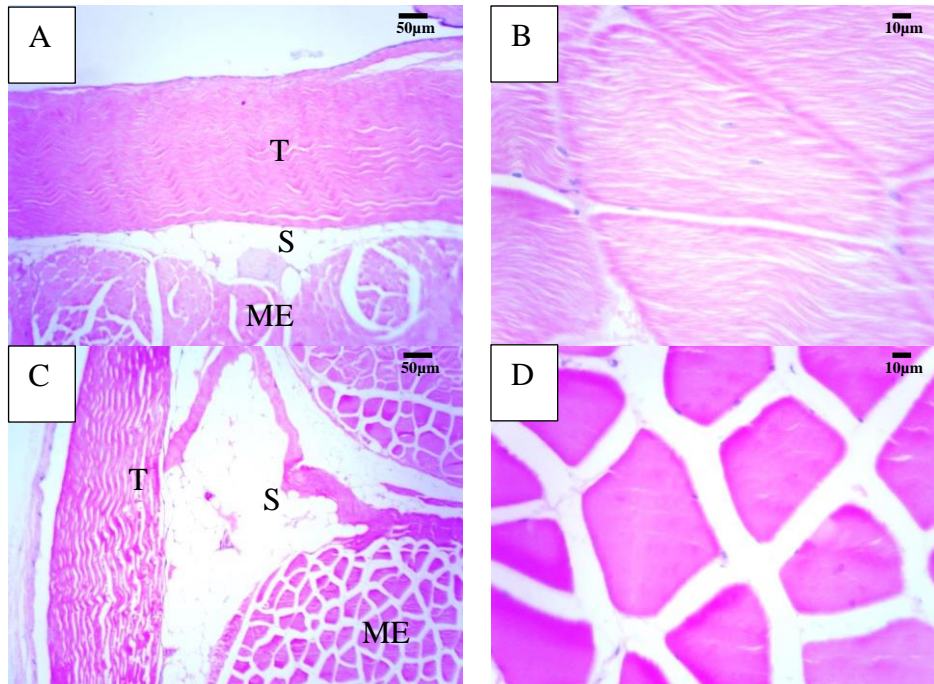


Figura 24. Fotomicrografia do tegumento (T) e músculo esquelético (ME) de tilápia do Nilo. Tilápias normais (A e B) e tilápia aloxano-diabética (C e D). Subcutâneo (S). Coloração H&E.

4.1.12.2 Avaliação cardiovascular

Foram confirmadas em tilápias aloxano-diabéticas alterações patológicas cardiovasculares, apresentado infiltração de células mononucleares na túnica média e acúmulo de tecido adiposo com infiltrado de células mononucleares na túnica adventícia do bulbo aórtico (figura 25).

Na avaliação cardíaca, mostrou-se grande espessamento do epicárdio ventricular com acúmulo de tecido adiposo e recrutamento de células mononucleares (figura 26). Visto a diminuição severa de miofibrilas cardíacas, além do aumento de deposição lipofuscina no citoplasma de rbdomiócitos cardíacos.

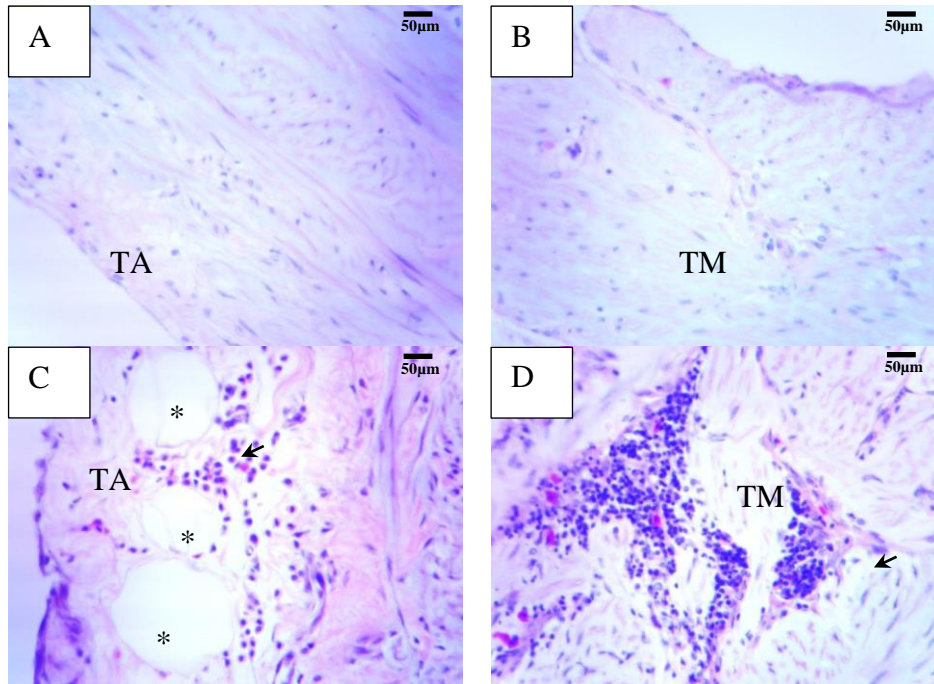


Figura 25. Fotomicrografica do bulbo aórtico de tilápia do Nilo. Tilápias normais (A e B) e tilápia aloxano-diabética (C e D). Túnica adventícia (TA). Túnica média (TM). Células adiposas (asterisco). Infiltrado de células mononucleares (seta). Coloração H&E.

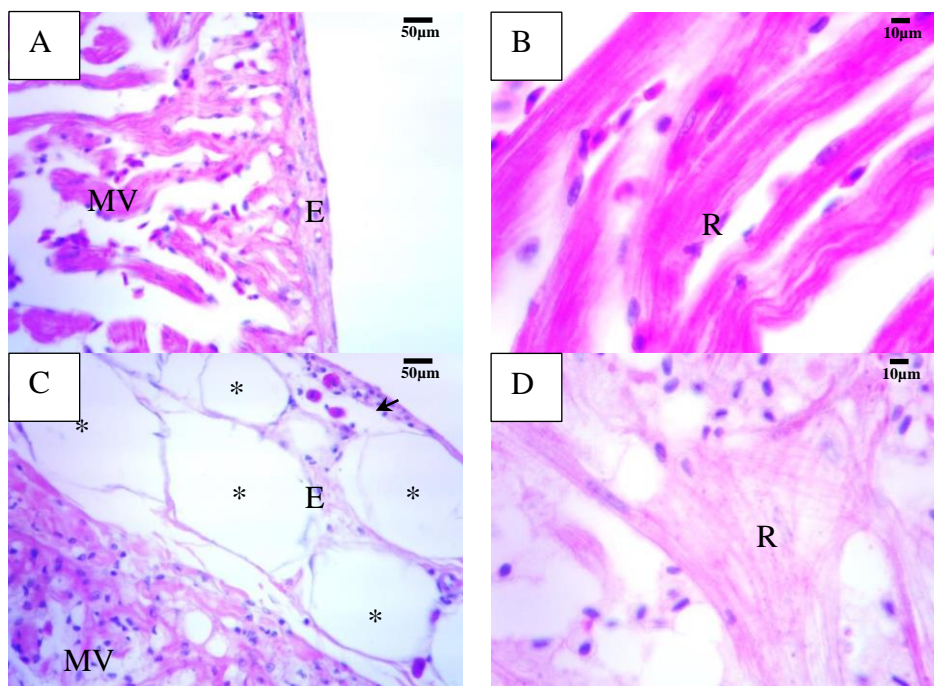


Figura 26. Fotomicrografica cardíaca de tilápia do Nilo. Tilápias normais (A e B) e tilápia aloxano-diabética (C e D). Miocárdio ventricular (MV). Epicárdio (E). Rabdomiócitos cardíacos (R). Células adiposas (asterisco). Infiltrado de células mononucleares (seta). Coloração H&E.

4.1.12.3 Avaliação hepática

A histopatologia do tecido hepático foi observada em tilápias aloxano-diabéticas grande quantidade acúmulo citoplasmático difuso de lipídios (vacuolização redondo) nos hepatócitos, próximo a veia centrolobular, zona três (figura 27).

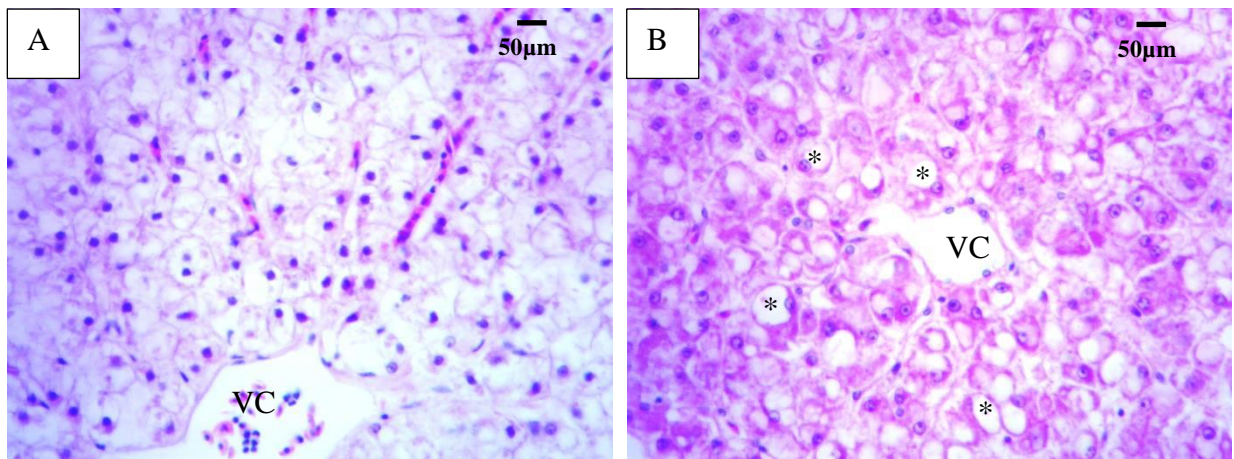


Figura 27. Fotomicrografia hepática em tilápias do Nilo. Tilápias normais (A) e tilápia aloxano-diabética (B). Veia centrolobular (VC). Acúmulo lipídico (asterisco) Coloração H&E.

4.1.12.4 Avaliação renal

Tilápias aloxano-diabéticas apresentaram alterações histopatológicas de tecido renal, com glomerulonefrite membranoproliferativa, fibrose intersticial e degeneração tubular (figura 28). Visto que os glomérulos destes peixes apresentavam leve expansão de matriz mesangial, aumento proliferativo de células mesangiais e espessamento da cápsula de Bowman, resultando em diminuição de espaço de Bowman, evoluindo em alguns casos para glomerulopatia colapsante. Também é evidente a atrofia e necrose tubular com infiltrado de células mononucleares intersticial em tilápias aloxano-diabéticas.

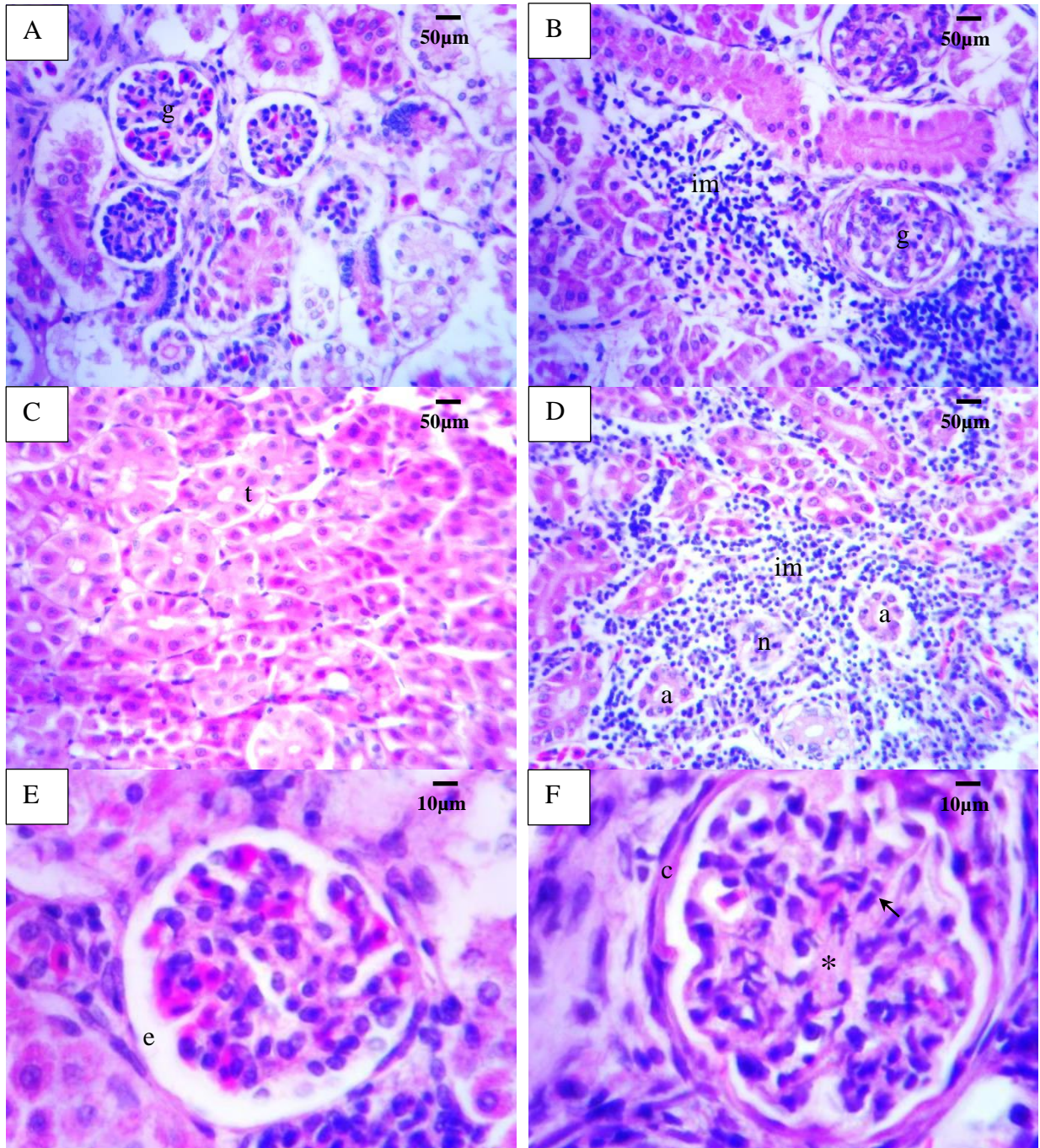


Figura 28. Fotomicrografica tecido renal em tilápias do Nilo. Tilápias normais (A, C e E) e tilápia aloxano-diabética (B, D e F). Glomerulo (g). Capsula (c) e espaço (e) de *Bowman*. Túbulos (t). Atrofia (a) e necrose (n) tubular. Infiltrado de células mononucleares (im). Célula (seta) e matriz (*) mesangial. Coloração H&E.

4.1.12.5 Avaliação gastrointestinal

Tilápias aloxana-diabéticas apresentaram grande perda de glândulas produtora de suco gástrico (ácido gástrico e pepsina), severo aumento da túnica submucosa e diminuição da musculatura na região da túnica muscular com aumento de tecido conectivo (figura 29).

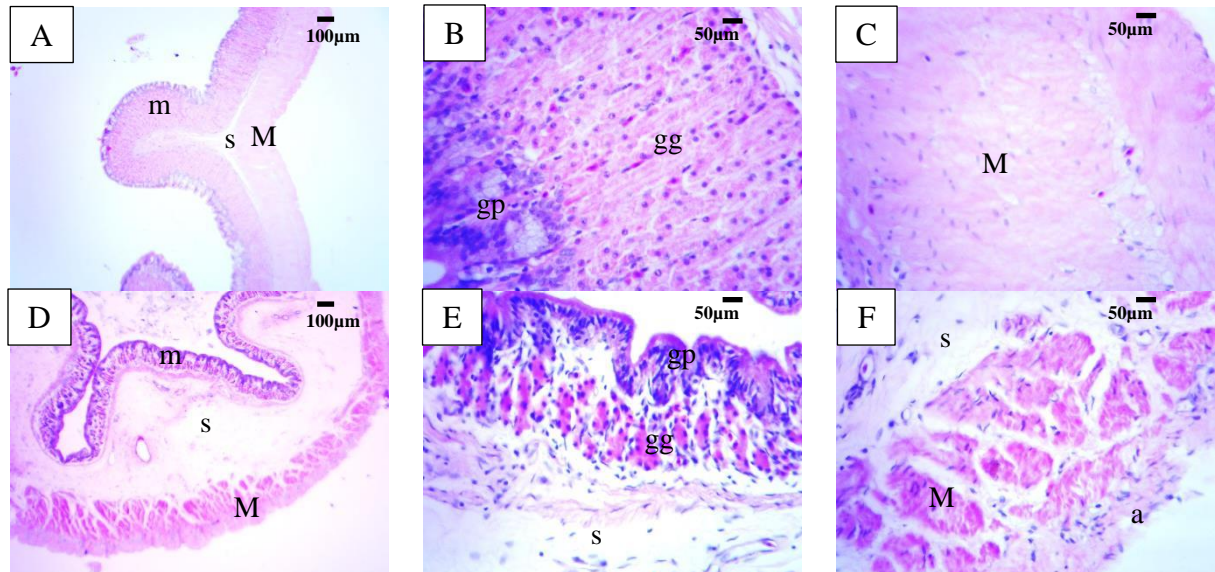


Figura 29. Fotomicrografica do estômago em tilápias do Nilo. Tilápias normais (A, B e C) e tilápia aloxano-diabética (D, E e F). Aumento de 100x (A, D). Aumento de 400x (B, C, E e F). Mucosa (m). submucosa (s), muscular (M) e adventícia (a). Glândulas produtora de muco protetor (gp). Glândulas produtora de ácido gástrico e pepsina (gg). Coloração H&E.

Na avaliação histopatológica duodenal, tilápias aloxana-diabéticas apresentaram duodenite com atrofia de enterócios e hiperplásica da lâmina própria (figura 30).

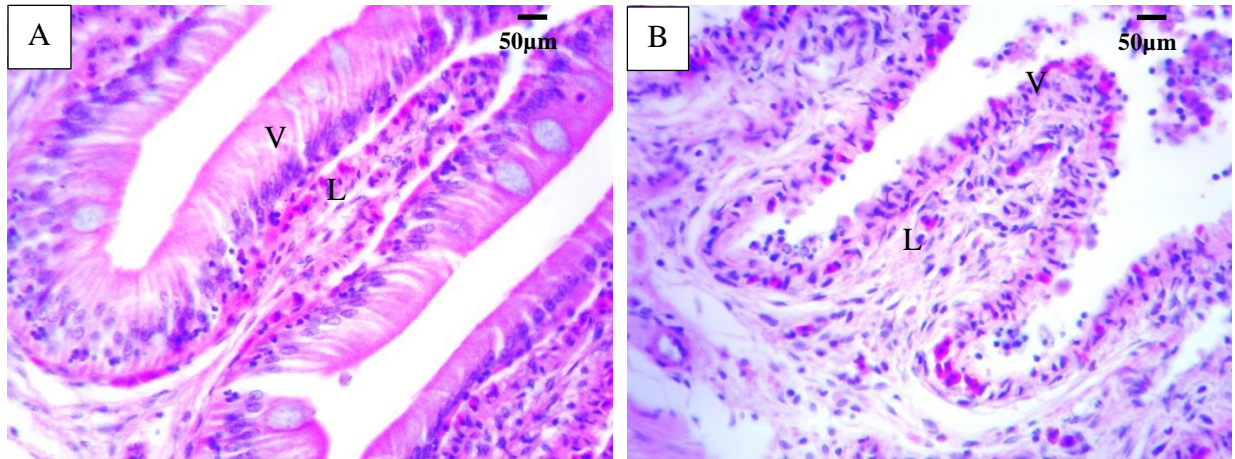


Figura 30. Fotomicrografia da vilosidade duodenal em tilápias do Nilo. Aumento de 400x. Tilápias normais (A) e tilápia aloxano-diabética (B). Vilosidade ampliada mostrando os enterócitos (V). Lâmina própria (L) Coloração HE.

4.2 Estudo do efeito diabético na reação inflamação aguda

4.2.1 Produção de IGF-1 no foco inflamatório

Na avaliação da produção de IGF-1 na bexiga natatória durante a inflamação aguda (figura 31), observou-se, de forma geral, a influência do efeito diabético na diminuição de IGF-1 em tilápias do Nilo. Observando esta diminuição 6 e 24 horas em comparação com controle. Notoriamente, tilápias aloxano-diabéticas sem tratamento com insulina apresentaram menor produção de IGF-1 em 6 horas em comparação aos peixes tratados com insulina.

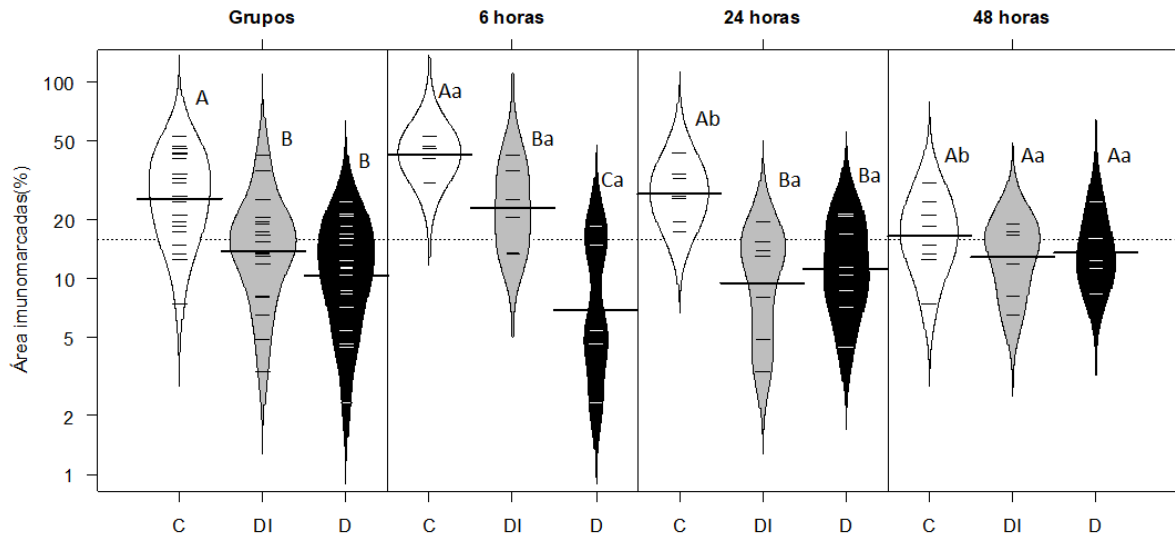


Figura 31. Produção de IGF-1 na bexiga natatória após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* em tilápias do Nilo. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo Tukey (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$.

4.2.2 Produção de TNF-alfa no foco inflamatório

Na avaliação da produção de TNF- α na bexiga natatória durante a inflamação aguda (figura 32), observou-se, de forma geral, a influência do efeito diabético na diminuição de TNF- α em tilápias do Nilo, observando esta diminuição 6 e 24 horas em comparação animais controles.

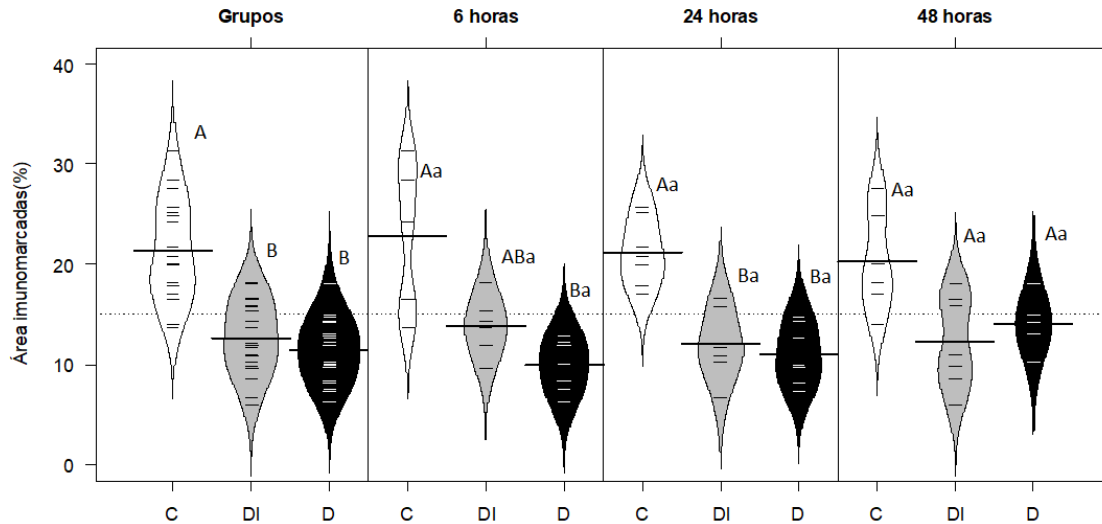


Figura 32. Produção de Fator de necrose tumoral (TNF-alfa) na bexiga natatória após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* em tilápias do Nilo. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo *Tukey* (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$.

4.2.3 Atividade de lisozima sérica

Na avaliação da atividade de lisozima no soro (figura 33), observou-se, de forma geral, a influência do efeito diabético na diminuição na atividade sérica desta enzima em tilápias do Nilo com estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória, sendo notória a diminuição somente no período das 24 horas após estímulo inflamatório. Entretanto, tilápias aloxana-diabéticas pertencentes ao grupo tratado com insulina apresentaram tendência de melhora, tendo em vista, que não houve diferença quando comparado aos animais do grupo controle.

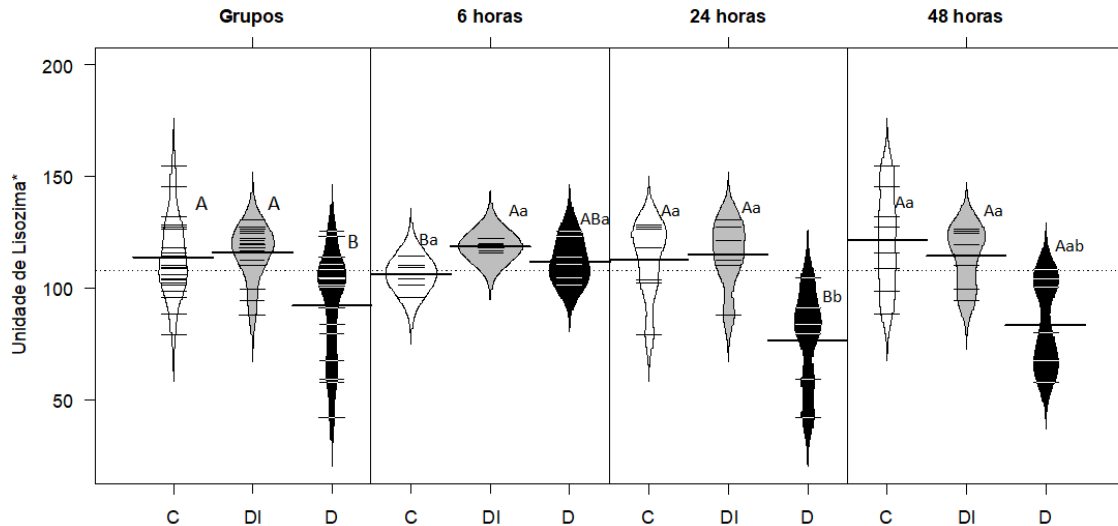


Figura 33. Atividade de lisozima no soro em tilápias do Nilo, após estímulo inflamatório por *A. hydrophila* na bexiga natatória. Aplicado teste de comparações múltiplas segundo Tukey (Letras). Grupos: controle (C); diabético tratado com insulina (DI); diabético sem tratamento (D). O nível de significância: $p < 0,05$. *Método segundo Ellis, 1990; Milla et al., 2010.

5. DISCUSSÃO

5.1 Perfil clínico em tilápias do Nilo aloxana-diabéticas

Pâncreas de tilápias do Nilo aloxana-diabéticas criadas por 113 dias após a indução diabética, apresentam menor área imunomarcada para **insulina**, deposições de tecidos adiposos e grande número de células com alterações degenerativas. Segundo Xu et al., (2004), aloxana via endovenosa em tilápias aumentou a glicemia e reduziu o número de células beta, encontrando alterações degenerativas celulares no citoplasma e nucleares. De modo, que a aloxana destrói seletivamente as células betas, sendo captadas rapidamente pelos transportadores de glicose (GLUT2) causando formação de radicais livres após uma série de reações bioquímicas intracelulares que culminam com a lesão celular (JÖRNS et al., 1997; SZKUDELSKI, 2001; LENZEN, 2008). Neste sentido, em nosso estudo a administração de aloxano via endoflébica causou lesões irreversíveis em célula beta, causando a diabetes em tilápias.

A deficiência do efeito insulínico no quadro de diabetes, por ausência ou resistência à insulina, causa alterações metabólicas severas, como a perda do transporte de glicose para dentro da célula e taxas aumentadas de gliconeogênese no fígado, estimulando a lipólise no fígado e nos adipócitos, favorecendo a liberação de ácidos graxos livres no sangue, ocorrendo hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (DIMITRIADIS et al., 2011; BHATT; SMITH; 2015). Em resposta a hiperlipidemia o organismo promove a produção de apolipoproteínas para regular o metabolismo lipídico através do controle da troca de lipídios celulares (SCHOFIELD et al., 2016; VERGÈS, 2015; BOLANOS-GARCIA; MIGUEL, 2003). Segundo estudo de Otis et al., (2015), as alterações lipídicas em *Danio rerio*, zebrafish, também foram associadas a aumento de apolipoproteínas. Neste contexto, nosso estudo vem reforçar ainda mais a participação da apolipoproteínas no controle lipêmico em peixes. Igualmente, apresentando o desenvolvimento hiperlipidêmico em tilápias do Nilo aloxana-diabéticas sem insulino terapia, envolvendo as associações de triglicerídeos, colesterol e apolipoproteína. Tais achados corroboram alterações descritas seres humanos diabéticos, os quais apresentaram as mesmas alterações bioquímicas com aumento concomitante nos níveis plasmáticos de triglicerídeos, colesterol e apolipoproteína L (DUCHATEAU et al., 2000).

O perfil metabólico energético das tilápias aloxana-diabéticas parece responder a modulação reguladora do hormônio insulina semelhantemente ao observado em humano (CARUSO; SHERIDAN, 2011), pois tilápias diabéticas sem insulino terapia apresentam elevado percentual da massa gorda no corpo com aumento do coração e fígado, associados a níveis aumento de colesterol sérico. Deste sentido, revelado na avaliação histopatológica a deposição ectópica de tecido adiposo, onde foi encontrado esteatose hepática e deposição de tecido adiposo na região do subepicárdio e no bulbo aórtico.

Ainda que não se saiba exatamente o motivo da predisposição genética humana em desenvolver obesidade (GENNÉ-BACON, 2014), historicamente existe uma correlação ao desenvolvimento da Diabetes Mellitus (NEEL, 1962). Neel (1999) revisou o tema e inclui componentes relacionados à síndrome metabólica. Atualmente atribui se à síndrome metabólica ao consumo excessivo de energia, predispondo ao desenvolvimento de sobrepeso e obesidade, condição caracterizada

em apresentar a resistência à insulina (YE, 2013; KAUR, 2014; HAN; LEAN, 2016). Usada para classificar diabetes tipo 2, a resistência à insulina pode vir a se desenvolver em indivíduos com diabetes tipo 1, atualmente classificado como “diabetes duplo” (BJORNSTAD et al., 2015; CLELAND et al., 2013).

Considerado a interconexões entre síndrome metabólica-obesidade-diabetes, as mudanças da massa gorda e magra corporal no diabetes ainda é objeto de muito estudo. No entanto, os efeitos da diabetes no metabolismo das proteínas parecem ser claros, uma vez que a privação de insulina causa um aumento grave no catabolismo proteico, especialmente na musculatura esquelética, resultando em declínio da massa muscular (ROBINSON et al., 2016; D'SOUZA et al., 2013; HEBERT; NAIR, 2010 ; MØLLER; NAIR, 2008; DIMITRIADIS et al., 2011; ABU-LEBDEH; NAIR, 1999). Tilápias aloxana-diabéticas apresentaram alterações degenerativas na musculatura esquelética e menor ganho de peso corporal sem a insulino terapia, corroborando os achados de estudos metabólicos em peixes que revelaram a participação da insulina na incorporação de aminoácidos no tecido muscular esquelético (TASHIMA; CAHILL, 1968; INUI; ISHIKA; 1983^a, 1983^b).

Neste contexto, o desenvolvimento edematoso intersticial do tecido muscular em tilápias do Nilo aloxana-diabéticas sem insulino terapia, observado em nosso estudo pode estar ligado a disfunção vascular. Tendo vista, que estudos associam o infarto muscular, com complicações vasculares oriundas da diabetes (HORTON et al., 2015; HUANG et al., 2010). Grave mionecrose com abundante formação de edema nos septos intersticiais musculares tem sido relatado em diabetes (BHASIN; GHOBRIAL, 2013; MATHEW et al., 2009).

O aumento percentual da massa gorda no corpo em tilápias do Nilo aloxana-diabéticas sem insulino terapia, pode estar entrelaçado com a perda muscular e a influência do aumento glicêmico no desenvolvimento do tecido adiposo. No contexto da diabetogênese, há possível transdiferenciação de células progenitoras musculares em linhagem adipogênica, que em condições inibitórias da resposta insulínica endógena e associada com estímulos hiperglicêmicos, podem resultar em formação de tecido adiposo através de miofibras (AGUIARI et al., 2008; MEUGNIER et al., 2007).

Os elevados níveis de colesterol associado com esteatose hepática e ao aumento de deposição de tecido adiposo e presença de degeneração muscular, observado em tilápias do Nilo aloxana-diabéticas sem insulino terapia, pode estar envolvido diretamente na deficiência insulínica em sinalizar o armazenamento de glicose no tecido muscular e hepático. Considerando-se, que a diabetes, apresentam deficiências na participação do hormônio insulina (ausência/resistência), em que o resultado final é um estado hiperglicêmico tóxico (PUGLIESE; MICELI, 2002; IZE-LUDLOW; SPERLING, 2005; CERNEA; DOBREANU, 2013). O estado hiperglicêmico esta substancialmente ligado à disfunção da sinalização da insulina no tecido muscular e hepático (ABDUL-GHANL et al. 2007). O tecido hepático é o principal órgão responsável pela biossíntese endógena de glicose (FÉRY, 1994). Enquanto, o tecido muscular esquelético absorve aproximadamente 80% do total de glicose no sangue pós-prandial, mecanismo dependente de insulina (BONADONNA et al., 1993). Em resposta ao excesso de glicose nos hepatócitos, o excedente deste carboidrato absorvido nos hepatócitos é direcionado à biossíntese de ácidos graxos, que são exportados do fígado como lipoproteínas para armazenamento nos adipócitos (FLATT, 1995). Nesse contexto, estudos apontam o tecido hepático e adipócitos no envolvimento no excesso de colesterol no corpo em disfunção de adipócitos na obesidade e deficiência na sinalização de insulina, apresentando o tecido adiposo como maior fonte de depósito de colesterol do corpo (KRAUSE; HARTMAN, 1984; LE LAY et al., 2004; YU et al., 2009; WANG; PENG, 2011).

Novos alvos de estudos sobre diabetes e obesidade apontam também o envolvimento da alteração da microbiota intestinal na modulação metabólica lipídica hepática, sugerindo importantes alterações patológicas com aumento na absorção e armazenamento de energia no corpo (PONZIANI et al., 2015; BÄCKHED et al., 2004; LASSENIUS et al., 2016). Alterações anatômicas e endócrinas entre o fígado e intestino alteram o ciclo entero-hepático, influenciando a absorção e transporte de lipídios na forma de quilomícrons pelas células do intestino delgado (RUI, 2014). Tilápias aloxana-diabéticas sem insulino terapia desenvolveram alteração degenerativas nas vilosidades no duodeno, apresentando duodenite atrófica crônica, associada às alterações metabólicas energéticas descritas anteriormente. Tais achados sugerem a hipótese de que as alterações patológicas observadas no

intestino delgado das tilápias diabéticas podem resultar em mudanças na microbiota, agravando o quadro da diabetes por comprometer o metabolismo lipídico, assim como descrito na fisiopatologia da diabetes em humanos.

Outra alteração patológica envolvendo o metabolismo hepático de lipídios observado nas tilápias aloxana-diabéticas sem insulino-terapia refere-se à ocorrência de esteatose hepática. De acordo com Rangel e Lernmark (2011), a acumulação de gordura hepática em pacientes com diabetes tipo 1 pode ser mais comum do que se pensava e pode servir como um marcador de risco para algumas complicações diabéticas crônicas. No entanto, a prevalência, a etiologia e as consequências da esteatose hepática no diabetes tipo 1 não estão claramente compreendidas.

Estima-se que a prevalência de esteatose hepática em indivíduos diabéticos tipo 1 está grandemente associada a prevalência de doenças cardiovasculares (TARGHER et al., 2010). Neste contexto, o acúmulo de gordura no epicárdio foi associado com a obesidade e síndrome metabólica em diabéticos tipo 1 (MOMESSO et al., 2011). Várias linhas de pesquisa evidenciam os eventos pró-inflamatórios ligados a obesidade e síndrome metabólica integrada da patologia diabética (ODEGAARD; CHAWLA, 2012; EMANUELA et al., 2012). O desenvolvimento e progressão de complicações micro e macrovasculares está bem documentada em adolescentes e adultos com diabetes (HAN; LEAN, 2016; BJORNSTAD et al., 2015). Complicações cardiovasculares foram observadas em tilápias aloxana-diabéticas sem insulino-terapia, as quais apresentaram deposição de gordura na região do subepicárdio e no bulbo aórtico, ambos com infiltrados de células mononucleares.

Na avaliação óssea, observou em tilápias aloxana-diabéticas sem insulino-terapia menor força de resistência, com diminuição da densidade mineral óssea vertebral e menor rigidez do arco aórtico. Estudos em humanos revelaram o desenvolvimento de osteopenia ou osteoporose no diabetes mellitus tipo 1 (KEMINK et al., 2000), aumentando o risco de fragilidade óssea (JANGHORBANI et al., 2006; NICODEMUS; FOLSOM, 2001). Neste contexto, estudos de diabetes mellitus tipo 1 com modelos animais revelaram perda óssea dos ratos, por redução na sua formação (VERHAEGHE et al., 1990; VERHAEGHE et al., 1992). O hormônio insulina participa como uma ligação molecular chave entre remodelação óssea e

metabolismo energético (GANDHI et al., 2005; FERRON et al., 2010; FULZELE et al., 2010).

Tilápias aloxana-diabéticas sem insulinoaterapia apresentaram fragilidade óssea, associado à elevação na glicemia, aumento da atividade da fosfatase alcalina sérica e perda da densidade mineral óssea global. Alterações semelhantes ao diabetes em humanos já foram descritas há muito tempo em estudo clínico (STEPAN et al., 1980). Larsen et al. (2002) concluíram que o aumento da glicose esta diretamente ligado ao mecanismo que estimula a reabsorção óssea, vista que, níveis elevados de glicose aumentada expressão da H⁺-ATPase vacuolar assim aumento da atividade de reabsorção óssea por osteoclastos por um mecanismo que parece envolver p38 MAP-quinase. Segundo Saraç e Saygılı (2007), o aumento da atividade de fosfatase alcalina no soro pode estar correlacionado com a extensão da doença esquelética e com níveis de reabsorção óssea. Neste contexto, estudo em humanos revelou que pacientes diabéticos de tipo 1 apresentaram maior perda mineral óssea em comparação com pacientes diabéticos de tipo 2 (TUOMINEN et al., 1999).

Tilápias aloxana-diabéticas sem insulinoaterapia apresentaram atrofia da mucosa gastrointestinais, associadas a gastroparesia e concomitante a duodenite crônica. Complicações gastrointestinais diabéticas tornaram-se cada vez mais prevalentes, especialmente em pacientes com diabetes de longa data, dentro destas manifestações incluem gastroparesia e enteropatia, e seus sintomas são classicamente causados por motilidade anormal, que é uma consequência da neuropatia diabética (LEE; HASLER, 2017; MAISEY, 2016; KRISHNAN et al., 2013).

Estudos do envolvimento diabético com disfunção neurológica, em virtude que, pesquisadores apresentaram a importante participação hipotalâmica no controle metabólico energético através da integração entre o sistema nervoso central e endócrino, mediada por múltiplos caminhos de sinalização (KALSBECK et al., 2010ab; UYAMA et al., 2004). Na neuropatia diabética, existe um fenômeno referido como neurotoxicidade da glicose, em que os neurônios apresentam uma demanda de glicose constante e, ao contrário das células musculares, não podem controlar a absorção de glicose sob a influência da insulina, assim a absorção neuronal por glicose depende da concentração extracelular de glicose, e o dano celular pode

ocorrer após episódios persistentes de hiperglicemia (TOMLINSON; GARDINER, 2008; ZOCHODNE, 2016). Pesquisas fornecem evidências que uma série de alterações hipotalâmicas oriundas da inflamação podem estar associadas à evolução de várias complicações encontradas em indivíduos diabéticos, bem com, hiperglicemia, hiperlipidemia, ganho e perda de peso (BURGOS-RAMOS et al., 2012; CAI, 2012). A inervação vagal esta diretamente relacionada à disfunção no metabolismo energético hepático como resultado de processos inflamatórios no hipotálamo (MILANSKI et al., 2012).

O estímulo do nervo vago é primordial no gatilho inicial para liberação de gastrina no trato gastrointestinal, principalmente para digestão no estômago em situações normais (DEBAS; CARVAJAL, 1994; DOCKRAY, 1999; DIMALINE; VARRO, 2014). A gastrina estimula a diferenciação e a proliferação de células epiteliais de trato gastrointestinal, e foi reconhecido como o hormônio trófico mais importante do estômago (DOCKRAY, 1999; THOMAS et al., 2003; WANG et al., 2000; JAIN; SAMUELSON, 2006; SUNDARESAN et al., 2017). Além de seus efeitos proliferativos no epitélio gastrointestinal bem documentados, a gastrina demonstrou controlar uma série de moléculas que exercem efeitos importantes na remodelação da matriz extracelular (BODGER et al., 2007; YIN et al., 2010; O'HARA et al., 2013). Outros mecanismos candidatos no envolvimento na patogênese da enteropatia em diabetes é a diminuição da contração da vesícula biliar, atribuído à neuropatia vagal (GELLER et al., 1991; GAUR et al., 2000; PAZZI et al., 2000).

Uma série de linhas convergentes de evidências apoia a proposta de que a neuromodulação vagal influencia a motilidade gastrointestinal (FRØKJAER et al., 2016). Desta forma, disfunção do nervo vago foi identificada como característica fisiopatológica de uma série de distúrbios, incluindo dispepsia funcional, síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal, gastroparesia e neuropatia autonômica diabética (FRØKJAER et al., 2007; CAMILLERI, 2007; PELLISSIER et al., 2010; CAMILLERI, 2011). Embora relativamente comuns, as complicações gastrointestinais do diabetes mellitus, a compreensão fisiopatológica são subentendidas na medicina (KRISHNAN et al., 2013).

Por outro lado, Inoue et al., (2016) relataram a importante participação do nervo vago na atividade neuro-imunomoduladora renal, contribuindo no controle pro

e anti-inflamatório a estímulos nocivos no órgão. Estudos apresentaram a alta taxa de mortalidade por doença renal terminal em pacientes diabéticos com neuropatia autonômica (EWING et al., 1980; SAMPSON et al., 1990; O'BRIEN et al., 1991). Portanto, existe grande evidência que a neuropatia vagal pode estar por trás do desenvolvimento de complicações renais diabéticas (MEINHOLD et al., 2001; VINIK et al., 2003). Glomerulonefrite membranoproliferativa, fibrose intersticial e degeneração tubular foram observadas no tecido renal de tilápias aloxano-diabéticas sem insulino-terapia. Estas alterações histopatológicas são observadas em complicações renais diabéticas em humanos (FIORETTO; MAUER, 2007; TONOLO; CHERCHI, 2014; LIM, 2014; POURGHASEM et al., 2015). Contudo, a associação da anormalidade gástrica e renal em tilápias aloxano-diabético sem insulino-terapias sugere a hipótese da ocorrência de neuropatia autonômica diabética nos peixes.

A doença renal crônica diabética esta diretamente associada ao desenvolvimento de anemia, apresentando um complexo mecanismo fisiopatológico entre a anemia e doença renal, em que a principal causa patogênica esta ligada a produção prejudicada de eritropoietina e deficiência de ferro (MEHDI; TOTO, 2009; LOUTRADIS et al., 2016). Fortemente associado à autoregulação de citocinas inflamatórias e à diminuição da resposta de eritropoietina, o que pode prejudicar a produção de eritrócitos e inibir o transporte de ferro armazenado nos macrófagos para a corrente sanguínea (WEISS et al., 2003; WEISS; GOODNOUGH, 2005; PUTTEN et al., 2007; FERRARI et al., 2010). Indivíduos diabéticos de tipo 1 com nefropatia e neuropatia autonômica na doença possuem níveis baixos de eritropoietina associado a gravidade anêmica (BOSMAN et al., 2002). Da mesma forma, o estímulo simpático reduzido pode causar ineficiência na eritropoiese seguido de um quadro anêmico (ROBERTSON et al., 1994). Nosso estudo também observou a influência do efeito diabético no desenvolvimento de anemia macrocítica hipocrômica em tilápias do Nilo.

Em relação ao estudo imunológico, tilápias aloxano-diabéticas sem insulino-terapia apresentam leucopenia associada a diminuição do numero de neutrófilos e linfócitos no sangue, corroboram os achados de Bollyky et al. (2015) que observaram leucopenia por linfopenia e neutropenia em 883 pacientes com

diabetes tipo 1. Em roedores, a indução diabética aguda leva à imunossupressão provocando linfopenia (GUBERSKI et al., 1989; LUO et al., 2006). Valle et al. (2013) observaram neutropenia em humanos com diabetes tipo 1. Neste contexto sobre imuno-poliendocrinopatia diabética, efeitos supressores em células T reguladoras podem ser a causa de citopenia imunomediada em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (BRUSKO; ATKINSON, 2007)

Simultaneamente a alteração leucocitária de neutrófilos e linfócitos, observou-se a diminuição da atividade de lisozima sérica em tilápias aloxana-diabética sem insulino-terapia. A lisozima atua como uma importante enzima antibacteriana encontrada em diversos vertebrados (CALLEWAERT; MICHIELS, 2010; IRWIN et al., 2011). Estudo *in vitro* com populações de células (linfócitos, granulócitos e monócitos/macrófagos) humanas e de camundongos demonstrou que monócitos/macrófagos sintetizam lisozima, e que os granulócitos armazenam lisozima, mas não a sintetizam, enquanto os linfócitos não armazenam e nem sintetizam (MCCLELLAND; FURTH, 1975). De acordo com HANSEN et al. (1976) e KARLE et al. (1974), em condições não infecciosas a presença de atividade da lisozima plasmática pode prover da atividade de neutrófilos. Em estudo anterior, Hansen e Andersen (1973) avaliaram o importante envolvimento da atividade da lisozima em neutrófilos humanos contra microrganismos, demonstrando uma correlação negativa entre a atividade da lisozima com os níveis séricos de creatininas.

Na avaliação dos números de trombócitos circulantes, tilápias aloxana-diabéticas sem insulino-terapia apresentaram trombocitose. As plaquetas nos mamíferos correspondem aos trombócitos em peixes, desempenhando a mesma função na hemostasia e na resposta imune (FERDOUS; SCOTT, 2015). Neste sentido, estudo aponta que o aumento dos índices plaquetários é encontrado clinicamente em diabéticos e este fortemente correlacionado com complicações microvasculares (JINDAL et al., 2011), corroborando o achado em tilápias aloxana-diabéticas, as quais apresentaram aumento do número de trombócitos, associado ao desenvolvimento de complicações inflamatórias no subepicárdio e no bulbo aórtico. Várias investigações mostraram que os indivíduos diabéticos são caracterizados por status pro-trombótico que é atribuído a numerosos fatores, incluindo um estado pró-

coagulante, comprometimento da fibrinólise, disfunção endotelial e aumento da reatividade plaquetária, desta forma, podendo acelerar o aumento do risco de vários distúrbios cardiovasculares (COLWELL; NESTO, 2003; VAZZANA et al., 2012; ROLLINI et al., 2013; SANTILLI et al., 2015).

5.2 Reação inflamatória em tilápias do Nilo aloxana-diabéticos

Tilápias aloxana-diabéticas frente ao estímulo inflamatório agudo infeccioso apresentaram baixa produção de IGF-1 no local inflamado até o período de 24 horas após infecção. Partindo-se da premissa, que tais resultados observados são oriundos de materiais obtidos da dissertação de mestrado intitulado “Insulina e dexametasona na aerocistite aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, aloxano-diabéticas”, minha autoria defendida em 2014. Neste estudo inflamatório, tilápias aloxana-diabéticas apresentaram baixo número de células na avaliação do exsudato, diminuição do infiltrado inflamatório tecidual, baixa proliferação de vasos sanguíneos e diminuição de tecido fibroso no foco inflamado (PRADO, 2014).

Os níveis séricos de fatores de crescimento semelhantes à insulina do tipo 1 (IGF-1) são encontrados baixos em diabéticos (TEPPALA; SHANKAR, 2010). Anormalidades do eixo envolvido com o hormônio de crescimento (GH) e fatores de crescimento semelhantes à insulina ocorrem em pacientes diabéticos tipo 1, induzindo as anormalidades que incluem a diminuição dos níveis circulantes de IGF-1 (CARROLL et al., 2000), que atua como principal mediador dos efeitos do GH, resultando no controle da proliferação, diferenciação, crescimento e apoptose celular (SIMPSON et al., 1998; XI et al., 2012). Há evidências claras que o IGF-1 está diretamente ligada às funções pró-inflamatórias em células endoteliais e de células epiteliais pulmonares, onde estimula a expressão de moléculas de adesão e de mediadores pró-inflamatórios, como por exemplo TNF- α (CHE et al., 2002; CHAND et al., 2012).

Tilápias aloxana-diabéticas com ou sem insulino-terapia após o estímulo inflamatório agudo infeccioso, produz níveis baixos de TNF-alfa no local inflamado

até o período de 24 horas após infecção. Um hipótese que justifica tais achados seria a influência do IGF-1 na participação e sinalização pró-inflamatória, tendo uns dos estímulo associados à produção de TNF- α , como descrito anteriormente, podemos propor que a diminuição do TNF- α muito provavelmente esta influenciada pela deficiência na sinalização por IGF-1. Os mesmos achados, em relação à TNF- α , também foram reproduzidos em estudo inflamatório em ratos aloxano-diabéticos, nos quais a deposição intra-traqueal de lipopolissacarídeo (LPS) induziu menor migração de neutrófilos e baixas expressões de TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias dentro do espaço bronco-alveolar quando comparados com animais controles (sadios), 6 horas após a instilação de LPS (MARTINS et al., 2006; MARTINS et al., 2009). Segundo Anjos-Loureiro et al. (2006), ratos com diabetes induzidos por aloxano apresentaram baixa produção de molécula de adesão, menor migração celular e baixa expressão de ICAM-1 ("intercellular adhesion molecule-1") após estímulo com TNF- α .

O efeito supressivo observado na resposta de TNF- α e IGF-1 em tilápias aloxana-diabéticas durante estímulo inflamatório infeccioso agudo apresentou correlação com a diminuição da atividade de lisozima no soro, no entanto, restabelecendo a normalidade quando tratados com insulina. Contudo, a diminuição da atividade de lisozima ocorreu 24 horas após infecção em tilápias aloxana-diabéticas sem insulino-terapia. Por outro lado, tilápias tratadas com insulina apresentaram aumento do número de células presentes no exsudato e alto infiltrado inflamatório tecidual e grande proliferação de vasos sanguíneos no foco inflamado no período 6 horas após infecção (PRADO, 2014).

Neste contexto, atribui-se a participação da insulina no reestabelecimento da imunidade, por favorecer a rápida resposta migratória de células inflamatórias no foco inflamado, principalmente de neutrófilos. Corroborando com estudos que demonstraram o efeito vasodilatador da insulina, aumentando o fluxo sanguíneo arterial, venoso e na microcirculação (STEINBERG et al., 1994; GROVER et al., 1995; TROVATI et al., 1997). Em contraste, animais diabéticos raramente são observados estas fenestrações, no entanto com administração da insulina exógena há correção desta condição permitindo o extravasamento de partículas como carvão coloidal (GARCIA LEME et al, 1973). As células endoteliais atuam como estruturas

alvo para ação da insulina, promovendo aumento da permeabilidade vascular na fase inicial da inflamação como observado por Moraes (1982), que por indução de inflamação por carreginina em pé de rato observou maior taxa de extravasamento de exsudato na fase inicial da indução inflamatória em animais tratados com insulina.

Atribuída aos fagócitos à principal fonte de lisozima no foco inflamatório, conferida a importante atividade antibacteriana, podendo estar associada à atividade de neutrófilos e monócitos os níveis de atividade da lisozima plasmática (KARLE et al., 1974; MCCLELLAND; FURTH, 1975; HANSEN et al., 1976). A deficiência da resposta da atividade da lisozima em tilápias aloxana-diabéticas apresentada em nosso estudo de resposta inflamatória pode estar principalmente associada com a diminuição da atividade de macrófagos e neutrófilos em resposta a uma reação inflamatória, concomitantemente a disfunção endotelial diabética, descrita anteriormente.

Peleg et al. (2007) demonstraram a redução do fenômeno quimiotático de células polimorfonucleares (PMN) e diminuição de substâncias microbidas produzido por estas células em pacientes diabéticos, sendo observado também diminuições da infiltração de neutrófilos na cavidade pleural em ratos diabéticos comparados com animais sadios (PEREIRA et al., 1987). Pacientes diabéticos apresentaram alterações de citocinas e disfunções dos PMN durante uma infecção local ou sistêmica (STEGENGA et al., 2010).

6. CONCLUSÃO

Tilápias do Nilo desenvolvem o diabetes mellitus por indução farmacológica (aloxâmico), apresentando baixo ou inexistência de células beta, acúmulo somático de tecido adiposo, degeneração muscular, dislipidemia, anormalidades cardíacas, esteatose hepática, doenças gastrointestinais, fragilidade óssea, anemia, leucopenia, trombocitose, além de alterações da resposta imunológica bem como diminuição da atividade lisozima, TNF- α e IGF-1 no foco inflamado durante estímulo

inflamatório infeccioso agudo. Comprovando a importância do efeito insulínico na resposta orgânica deste peixe teleósteo e demonstrando a importância deste modelo experimental para estudos e avanços em pesquisas envolvendo o diabetes mellitus, pois são alterações fisiopatológicas do diabetes em seres humanos.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 7th ed. Elsevier: Philadelphia, 2012. 545 p.

ABDUL-GHANI, M. A.; MATSUDA, M.; BALAS, B.; DEFRONZO, R. A. Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test. **Diabetes Care**, v. 30, n. 1, p. 89-94, 2007.

ABREU, J. S. et al. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 4, p. 31-47, 2009.

ABU-LEBDEH, HAITHAM S.; NAIR, K. Sreekumaran. Protein metabolism in diabetes mellitus. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 10, n. 4, p. 589-601, 1996.

AGUIARI, P.; LEO, S.; ZAVAN, B.; VINDIGNI, V.; RIMESSI, A.; BIANCHI, K.; FRANZIN, C.; CORTIVO, R.; ROSSATO, M.; VETTOR, R.; ABATANGELO, G.; POZZAN, T.; PINTON, P.; RIZZUTO, R. High glucose induces adipogenic differentiation of muscle-derived stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 4, p. 1226-1231, 2008.

ALDHAHI, W.; HAMDY, O. Adipokines, inflammation, and endothelium in diabetes. **Currents Diabetes Reports**, v. 3, n. 4, p. 293-298, 2003.

ALBA-LOUREIRO, T. C.; HIRABARA, S. M.; MENDONÇA, J. R.; CURI, R.; PITHON-CURI, T. C. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. **Journal of Endocrinology**, v. 188, n. 2, p. 295-303, 2006.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C. F.; GORDON, J. I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718-15723, 2004.

BARTON, B.; IWAMA, G. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids.

Annual Review of Fish Diseases, Amsterdam, v. 1, p. 3-26, 1991.

BAUMANN, H; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v. 15, p. 74-80, 1994.

BELO, M. A. A.; PRADO, E. J. da R.; MORAES, F. R. de; MORAES, J. R. E. Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacus, during chronic inflammatory reaction. **Aquaculture**, v. 422, p. 124-128, 2013.

BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M.; MORAES, J. E. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 146-54, 2005.

BELO, M. A. A.; MORAES, J. R. E. de; SOARES, V. E.; MARTINS, M. L.; BRUM, C. D.; MORAES F. R. de. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 47, p. 1015-1021, 2012.

BHASIN, R.; GHOBRIAL, I. Diabetic myonecrosis: a diagnostic challenge in patients with long-standing diabetes. **Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives**, v. 3, n. 1, p. 20494, 2013.

BHATT, H. B.; SMITH, R. J. Fatty liver disease in diabetes mellitus. **Hepatobiliary Surgery and Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 101, 2015.

BJORNSTAD, P.; SNELL-BERGEON, J. K.; NADEAU, K. J.; MAAHS, D. M. PETTER. Insulin sensitivity and complications in type 1 diabetes: New insights. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 1, p. 8, 2015.

BODGER, K.; AHMED, S.; MICHAEL, A.; KHAN, A. L.; PAZMANY, L.; PRITCHARD, D. M.; MICHEAL, A.; KHAN, A. L.; DIMALINE, R.; DOCKRAY, G. J.; VARRO, A. Altered gastric corpus expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human and murine Helicobacter infection. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 1, 72-78, 2007.

BOLANOS-GARCIA, V. M.; MIGUEL, R. N. On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 83, n. 1, p. 47-68, 2003.

BOLLYKY, J. B.; XU, P.; BUTTE, A. J.; WILSON, D. M.; BEAM, C. A.; GREENBAUM, C. J. Heterogeneity in recent-onset type 1 diabetes—a clinical trial perspective. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 31, n. 6, p. 588-594, 2015.

BONADONNA, R. C.; DEL PRATO, S.; SACCOMANI, M. P.; BONORA, E.; GULLI, G.; FERRANNINI, E.; BIER D.; COBELLI, C.; DEFRONZO, R. A. Transmembrane glucose transport in skeletal muscle of patients with non-insulin-dependent diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 1, p. 486-494, 1993.

BOSMAN, D. R.; OSBORNE, C. A.; MARSDEN, J. T.; MACDOUGALL, I. C.; GARDNER, W. N.; WATKINS, P. J. Erythropoietin response to hypoxia in patients with diabetic autonomic neuropathy and non-diabetic chronic renal failure. **Diabetic Medicine**, v. 19, n. 1, p. 65-69, 2002.

BOYLE, P. J. Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators. **American Journal of Medicine**, v. 120, p. 12-17, 2007. Supplement 2.
BRUSKO, T.; ATKINSON, M. Treg in type 1 diabetes. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 48, n. 2-3, p. 165-175, 2007.

BURGOS-RAMOS, E.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, Á.; CANELLES, S.; BAQUEDANO, E.; FRAGO, L. M.; REVUELTA-CERVANTES, J.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; FRÜHBECK, G.; CHOWEN, J. A.; VALVERDE, J. A. A. M.; BARRIOS, V. Differential insulin receptor substrate-1 (IRS1)-related modulation of neuropeptide Y and proopiomelanocortin expression in nondiabetic and diabetic IRS2^{-/-} mice. **Endocrinology**, v. 153, n. 3, p. 1129-1140, 2012.

CAI, D. One step from prediabetes to diabetes: hypothalamic inflammation **Endocrinology**, v. 153, n. 3, p. 1010–1013 march, 2012.

CALLEWAERT, L.; MICHIELS, C. W. Lysozymes in the animal kingdom. **Journal of Biosciences**, v. 35, n. 1, p. 127-160, 2010.

CAMILLERI, M. Diabetic gastroparesis. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 8, p. 820-829, 2007.

CAMILLERI, M.; BHARUCHA, A. E.; FARRUGIA, G Epidemiology, mechanisms, and management of diabetic gastroparesis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, n. 1, p. 5-12, 2011.

CARROLL, P. V.; CHRIST, E. R.; UMPLEBY, A. M.; GOWRIE, I.; JACKSON, N.; BOWES, S. B.; HOVORKA, R.; CROOS, P.; SÖNKSEN, P. H.; RUSSELL-JONES, D. L. IGF-I treatment in adults with type 1 diabetes: effects on glucose and protein metabolism in the fasting state and during a hyperinsulinemic-euglycemic amino acid clamp. **Diabetes**, v. 49, n. 5, p. 789-796, 2000.

CARUSO, M. A.; SHERIDAN, M. A. New insights into the signaling system and function of insulin in fish. **General and Comparative Endocrinology**, Maryland Heights, v. 173, n. 3, p. 227–247, 2011.

CASTRO, M. P.; CLAUDIANO, G. S.; PETRILLO, T. R.; SHIMADA, M. T.; BELO, M. A.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; MORAES, J. R.; MANRIQUE, G. W.; MORAES, F. R. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae*. **Fish Shellfish Immunology**, v. 31, p. 284-290, 2014.

CERNEA, S.; DOBREANU, M. Diabetes and beta cell function: from mechanisms to evaluation and clinical implications. **Biochemia Medica**, v. 23, n. 3, p. 266-280, 2013.

CHAND, H. S.; WOLDEGIORGIS, Z.; SCHWALM, K.; MCDONALD, J.; TESFAIGZI, Y. Acute inflammation induces insulin-like growth factor-1 to mediate Bcl-2 and Muc5ac expression in airway epithelial cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 47, n. 6, p. 784-791, 2012.

CHE, W.; LERNER-MARMAROSH, N.; HUANG, Q.; OSAWA, M.; OHTA, S.; YOSHIZUMI, M.; GLASSMAN, M.; LEE, J. D.; YAN, C.; BERK, B. C.; ABE, J. I. Insulin-like growth factor-1 enhances inflammatory responses in endothelial cells. **Circulation Research**, v. 90, n. 11, p. 1222-1230, 2002.

CLARKE, M.; DODSON, P. M. PKC inhibition and diabetic microvascular complications. **Best Practice Research: Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 573–586, 2007.

CLELAND, S. J.; FISHER, B. M.; COLHOUN, H. M.; SATTAR, N.; PETRIE, J. R. Insulin resistance in type 1 diabetes: what is 'double diabetes' and what are the risks. **Diabetologia**, v. 56, n. 7, p. 1462-1470, 2013.

COLLIER, J. Bone disorders in chronic liver disease. **Hepatology**, v. 46, p. 1271-1278, 2007.

COLWELL, J. A.; NESTO, R. W. The platelet in diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 7, p. 2181-2188, 2003.

CRAY, C. Acute phase proteins in animals. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 105, p. 113-150, 2012.

DANDONA, A. A. P. Effect of insulin on human aortic endothelial nitric oxide synthase. **Metabolism**, Maryland Heights, v. 49, n. 2, p. 147-150, 2000.

DANDONA, P.; CHAUDHURI, A.; GHANIM, H.; MOHANTY, P. Insulin as an anti-inflammatory and antiatherogenic modulator. **Journal of American College and Cardiology**, v. 53, p. S14 - S20, 2009. Supplement 5.

DANDONA, P. CHAUDHURI, A.; GHANIM, H.; MOHANTY, P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease. **American Journal of Cardiology**, v. 99, n. 4A, p. 16B-26B, 2007.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 367, p. 847–58, 2006.

DEBAS, H. T.; CARVAJAL, S. H. Vagal regulation of acid secretion and gastrin release. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 67, n. 3-4, p. 145, 1994.

DIMALINE, R.; VARRO, A. Novel roles of gastrin. **The Journal of Physiology**, v. 592, n. 14, p. 2951-2958, 2014.

DIMITRIADIS, G.; MITROU, P.; LAMBADIARI, V.; MARATOU, E.; RAPTIS, S. A. Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 93, p. S52-S59, 2011.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **Chest**, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

DOCKRAY, G. J. Topical review: "Gastrin and gastric epithelial physiology". **The Journal of Physiology**, v. 518, n. 2, p. 315-324, 1999.

D'SOUZA, D. M.; AL-SAJEE, D.; HAWKE, T. J. Diabetic myopathy: impact of diabetes mellitus on skeletal muscle progenitor cells. **Frontiers in Physiology**, v. 4, p. 379, 2013.

DUCHATEAU, P. N.; MOVSESYAN, I.; YAMASHITA, S.; SAKAI, N.; HIRANO, K. I.; SCHOENHAUS, S. A.; O'CONNOR-KEARNS, P. M.; SPENCER, S. J.; JAFFE, R. B.; REDBERG, R. F.; ISHIDA, B. Y.; MATSUZAWA, Y.; KANE, J. P.; MALLOY, M. J. Plasma apolipoprotein L concentrations correlate with plasma triglycerides and cholesterol levels in normolipidemic, hyperlipidemic, and diabetic subjects. **Journal of Lipid Research**, v. 41, n. 8, p. 1231-1236, 2000.

ELLIS, A. E. Lysozyme activity. In: STOLEN, T.C.; FLETCHER, P. D.; ANDERSON, B. S.; ROBERSON, B. S.; MUISWINKEL, W.B. (Ed.). **Technique in fish immunology**. New Jersey: SOS Publications, 1990. p. 101–103.

KÜLTZ, D. Plasticity and stressor specificity of osmotic and heat shock responses of *Gillichthys mirabilis* gill cells. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. C1181-C1193, 1996.

ELLURU, S.; DUONG VAN HUYEN, J. P.; PROST, F.; DELIGNAT, S.; BAYRY, J.; EPHREM, A.; SIBERIL, S.; MISRA, N.; LACROIX-DESMZES, S.; KAZATCHKINE, M. D.; KAVERI, S. V. Comparative study of the anti-inflammatory effect of two intravenous immunoglobulin preparations manufactured by different processes. **Immunology Letters**, v. 107, p. 58-62, 2006.

EMANUELA, F.; GRAZIA, M.; MARCO, D. R.; MARIA PAOLA, L.; GIORGIO, F.; MARCO, B. Inflammation as a link between obesity and metabolic syndrome. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2012, 2012.

EWING, D. J.; CAMPBELL, I. W.; CLARKE, B. F. The natural history of diabetic autonomic neuropathy. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 49, n. 1, p. 95-108, 1980.

FERDOUS, F.; SCOTT, T. R. A comparative examination of thrombocyte/platelet immunity. **Immunology Letters**, v. 163, n. 1, p. 32-39, 2015.

FERNÁNDEZ-REAL, J. M.; RICART, W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. **Endocrinology Review**, Baltimore, v. 24, n. 3, p. 278-301, 2003.

FERRARI, P.; MALLON, D.; TRINDER, D.; OLYNYK, J. K. Pentoxifylline improves haemoglobin and interleukin-6 levels in chronic kidney disease. **Nephrology**, v. 15, n. 3, p. 344-349, 2010.

FERRON, M.; WEI, J.; YOSHIZAWA, T.; DEL FATTORE, A.; DEPINHO, R. A.; TETI, A.; DUCI, P.; KARSENTY, G. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 296-308, 2010.

FERY, F. Role of hepatic glucose production and glucose uptake in the pathogenesis of fasting hyperglycemia in type 2 diabetes: normalization of glucose kinetics by short-term fasting. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 78, n. 3, p. 536-542, 1994.

FIORETTO, P.; MAUER, M. Histopathology of diabetic nephropathy. In: **Seminars in nephrology**. [S.l.]: WB Saunders, 2007. p. 195-207.

FLATT, J.-P. Use and storage of carbohydrate and fat. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 61, n. 4, p. 952S-959S, 1995.

FRØKJAER, J. B.; BERGMANN, S.; BROCK, C.; MADZAK, A.; FARMER, A. D.; ELLRICH, J.; DREWES, A. M. Modulation of vagal tone enhances gastroduodenal motility and reduces somatic pain sensitivity. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 28, n. 4, p. 592-598, 2016.

FULZELE, K.; RIDDLE, R. C.; DIGIROLAMO, D. J.; CAO, X.; WAN, C.; CHEN, D.; FAUGERE, M. C.; AJA, S.; HUSSAIN, M. A.; BRÜNING, J. C.; CLEMENS, T. L. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 309-319, 2010.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 448-454, 1999.

GANDHI, A.; BEAM, H. A.; O'CONNOR, J. P.; PARSONS, J. R.; LIN, S. S. The effects of local insulin delivery on diabetic fracture healing. **Bone**, v. 37, n. 4, p. 482-490, 2005.

GARCIA LEME, J. **Hormones and inflammation**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 238 p.

GARCIA LEME, J. Regulatory mechanisms in inflammation: new aspects of autopharmacology. **General Pharmacology**, Oxford, v. 12, p. 15-20, 1982.

GAUR, C.; MATHUR, A.; AGARWAL, A.; VERMA, K.; JAIN, R.; SWAROOP, A. Diabetic autonomic neuropathy causing gall bladder dysfunction. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 48, n. 6, p. 603-605, 2000.

GEERLINGS, S. E.; BROUWER, E. C.; VAN KESSEL, K. C.; GAASTRA, W.; STOLK, R. P.; HOEPELMAN, A. I. Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, n. 11, p. 995-1001, 2000.

GELLER, L. I.; GRIAZNOVA, M. V.; RYBALKA, E. D. Significance of duodenitis and disorders of gall bladder motility in patients with diabetes mellitus. **Problemy Endokrinologii**, v. 37, n. 3, p. 8-10, 1991.

GENNÉ-BACON, E. Thinking evolutionarily about obesity. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 87, n. 2, p. 99, 2014.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 6, n. 11, p. 1045- 1056, 2005.

GRUYS, E. TOUSSAINT, M. J.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J.; VAN DIJK, E.; MELOEN, R. H. Monitoring health by values of acute phase proteins. **Acta Histochemica**, v. 108, p. 229-232, 2006.

GUBERSKI, D. L.; BUTLER, L.; KASTERN, W.; LIKE, A. A. Genetic studies in inbred BB/Wor rats: analysis of progeny produced by crossing lymphopenic diabetes-prone rats with nonlymphopenic diabetic rats. **Diabetes**, v. 38, n. 7, p. 887-893, 1989.

HAIR, J. F.; BLACK, W. C.; BABIN, B. J.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L. **Análise multivariada de dados**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

HAN, T. S.; LEAN, M. E. J. A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **JRSM Cardiovascular Disease**, v. 5, p. 2048004016633371, 2016.

HANSEN, N. E.; KARLE, H.; ANDERSEN, V.; MALMQUIST, J.; HOFF, G. E. Neutrophilic granulocytes in acute bacterial infection. Sequential studies on lysozyme, myeloperoxidase and lactoferrin. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 26, n. 3, p. 463, 1976.

HANSEN, N. E.; ANDERSEN, V. Lysozyme activity in human neutrophilic granulocytes. **British journal of Haematology**, v. 24, n. 5, p. 613-623, 1973.
 HARJA, E.; BU, D. X.; HUDSON, B. I.; CHANG, J. S.; SHEN, X.; HALLAM, K.; KALEA, A. Z.; LU, Y.; ROSARIO, R. H.; ORUGANTI, S.; NIKOLLA, Z.; BELOV, D.; LALLA, E.; RAMASAMY, R.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in *apoE*^{-/-} mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 1, p.183–194 2008.

HEBERT, S. L.; NAIR, K. S. SREEKUMARAN. Protein and energy metabolism in type 1 diabetes. **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 13-17, 2010.

HORTON, W. B.; TAYLOR, J. S.; RAGLAND, T. J.; SUBAUSTE, A. R. Diabetic muscle infarction: a systematic review. **BMJ Open Diabetes Research and Care**, v. 3, n. 1, p. e000082, 2015.

HUANG, B. K.; MONU, J. UV; DOUMANIAN, J.. Diabetic myopathy: MRI patterns and current trends. **American Journal of Roentgenology**, v. 195, n. 1, p. 198-204, 2010.

INOUE, T., A., C., SUN-SANG, J. S., MOSCALU, S., JANKOWSKI, J., HUANG, L., ... & OKUSA, M. D. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through $\alpha 7nAChR+$ splenocytes. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 5, p. 1939, 2016.

INOUE, T.; OKUSA, M. D. Neuroimmune Control of Acute Kidney Injury and Inflammation. **Nephron**, v. 131, n. 2, p. 97-101, 2015.

INUI, Y.; ISHIOKA, H.. Effects of insulin and glucagon on amino acid transport into the liver and opercular muscle of the eel *in vitro*. **General and comparative endocrinology**, v. 51, n. 2, p. 213-218, 1983.

INUI, Y., ISHIOKA, H.. In vivo and in vitro effects of growth hormone on the incorporation of [¹⁴C] leucine into protein of liver and muscle of the eel. **General and comparative endocrinology**, v. 59, n. 2, p. 295-300, 1985.

IRWIN, D. M.; BIEGEL, J. M.; STEWART, C-B. Evolution of the mammalian lysozyme gene family. **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 166, 2011.

ISH-SHALOM, D. et al. Mitogenic properties of insulin analogues mediated by the insulin receptor. **Diabetologia**. v. 40, p. S25-S31, 1997.

IZE-LUDLOW, D.; SPERLING, M. A. The classification of diabetes mellitus: a conceptual framework. **Pediatric Clinics of North America**, v. 52, n. 6, p. 1533-1552, 2005.

JAIN, R. N.; SAMUELSON, L. C. Transcriptional profiling of gastrin-regulated genes in mouse stomach. **Physiological genomics**, v. 29, n. 1, p. 1-12, 2007.

JANGHORBANI, M., FESKANICH, D., WILLETT, W. C., & HU, F. Prospective study of diabetes and risk of hip fracture. **Diabetes care**, v. 29, n. 7, p. 1573-1578, 2006.

JINDAL, S., GUPTA, S., GUPTA, R., KAKKAR, A., SINGH, H. V., GUPTA, K., & SINGH, S. Platelet indices in diabetes mellitus: indicators of diabetic microvascular complications. **Hematology**, v. 16, n. 2, p. 86-89, 2011.

JOLIFFE, I. T., MORGAN, B. J. T. Principal component analysis and exploratory factor analysis. **Statistical methods in medical research**, v. 1, n. 1, p. 69-95, 1992.

JÖRNS, A.; MUNDAY, R.; TIEDGE, M.; LENZEN, S. Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated pancreatic islets *in vitro*. **J. Endocrinol.**, Bristol, v. 155, n. 2, p. 283–293, 1997.

KAISER, H.F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**, 23:187-200, 1958.

KALSBECK, A., BRUINSTROOP, E., YI, C. X., KLIEVERIK, L. P., LA FLEUR, S. E., & FLIERS, E. Hypothalamic control of energy metabolism via the autonomic nervous system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1212, n. 1, p. 114-129, 2010.

KALSBECK, A., YI, C. X., LA FLEUR, S. E., & FLIERS, E. The hypothalamic clock and its control of glucose homeostasis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 7, p. 402-410, 2010.

KARLE, H.; HANSEN, N. E.; KILLMANN, S.. Intracellular lysozyme in mature neutrophils and blast cells in acute leukemia. **Blood**, v. 44, n. 2, p. 247-255, 1974.

KAUR, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology research and practice**, v. 2014, 2014.

KAWAI, M. et al. New insights into osteoporosis: the bone-fat connection. **J. Int. Med.** v. 272, p. 317-329, 2012.

KAWANAMI, D., MAEMURA, K., TAKEDA, N., HARADA, T., NOJIRI, T., IMAI, Y., ... & NAGAI, R. Direct reciprocal effects of resitin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 314, n. 2, p. 415-419, 2004.

KEETON, A. B., AMSLER, M. O., VENABLE, D. Y., & MESSINA, J. L. Insulin signal transduction pathways and insulin-induced gene expression. **J. Biol. Chem.** v. 227, n. 50, p. 48565-48573, 2002.

KEMINK, S. A. G., HERMUS, A. R. M. M., SWINKELS, L. M. J. W., LUTTERMAN, J. A., & SMALS, A. G. H. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. **Journal of endocrinological investigation**, v. 23, n. 5, p. 295-303, 2000.

KHAM, A. H; PESSIN, J. E. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. **Diabetologia**. v. 45, p. 1475 - 1483. 2002.

KIM, H. J., YASUIKE, M., KONDO, H., HIRONO, I., & AOKI, T. Molecular characterization and gene expression of a CXC chemokine gene from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Fish Shellfish Immunol.**, London, v. 23, n. 6, p. 1275-1284, 2007.

KRAUSE, B. R.; HARTMAN, A. D. Adipose tissue and cholesterol metabolism. **Journal of lipid research**, v. 25, n. 2, p. 97-110, 1984.

KRISHNAN, B., BABU, S., WALKER, J., WALKER, A. B., & PAPPACHAN, J. M. Gastrointestinal complications of diabetes mellitus. **World journal of diabetes**, v. 4, n. 3, p. 51, 2013.

KRISHNAN, B., BABU, S., WALKER, J., WALKER, A. B., & PAPPACHAN, J. M. BABU et al. Gastrointestinal complications of diabetes mellitus. **World journal of diabetes**, v. 4, n. 3, p. 51, 2013.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.

LARSEN, K. I., FALANY, M. L., PONOMAREVA, L. V., WANG, W., & WILLIAMS, J. P. Glucose-dependent regulation of osteoclast H⁺-ATPase expression: Potential role of p38 MAP-kinase. *Journal of cellular biochemistry*, v. 87, n. 1, p. 75-84, 2002.

LASSENIUS, M. I., AHOLA, A. J., HARJUTSALO, V., FORSBLOM, C., GROOP, P. H., & LEHTO, M. Endotoxins are associated with visceral fat mass in type 1 diabetes. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

LE LAY, S.; FERRÉ, P.; DUGAIL, I. Adipocyte cholesterol balance in obesity. *Biochemical Society Transactions* (2004) V. 32, part 1, p. 103-106, 2004

LEE, A. A.; HASLER, W. L. Diabetes and the Stomach. **Current Treatment Options in Gastroenterology**, p. 1-19, 2017.

LIM, A. KH. Diabetic nephropathy—complications and treatment. **International journal of nephrology and renovascular disease**, v. 7, p. 361, 2014.

LOUTRADIS, C., SKODRA, A., GEORGIANOS, P., TOLIKA, P., ALEXANDROU, D., AVDELIDOU, A., & SARAFIDIS, P. A. Diabetes mellitus increases the prevalence of anemia in patients with chronic kidney disease: A nested case-control study. **World journal of nephrology**, v. 5, n. 4, p. 358, 2016.

LUO, B., CHAN, W. F. N., LORD, S. J., NANJI, S. A., RAJOTTE, R. V., SHAPIRO, A. M. J., & ANDERSON, C. C. Diabetes induces rapid suppression of adaptive immunity followed by homeostatic T-cell proliferation. *Scandinavian journal of immunology*, v. 65, n. 1, p. 22-31, 2007.

MAISEY, A.. A practical approach to gastrointestinal complications of diabetes. **Diabetes Therapy**, v. 7, n. 3, p. 379-386, 2016.

MARTINS, J. O., ZANONI, F. L., MARTINS, D. O., COIMBRA, R., KRIEGER, J. E., JANCAR, S., & SANNOMIYA, P. Insulin regulates cytokines and intercellular adhesion molecule-1 gene expression through Nuclear Factor-kB activation in LPS-induced acute lung injury in rats. **Shock**. v. 31, n. 4, p. 404-409, 2009.

MARTINS, J. O. **Papel da insulina na produção e liberação de citocinas na vigência da inflamação induzida por lipopolissacarídeo e na inflamação alérgica pulmonar em ratos**. São Paulo. Universidade de São Paulo, 2006.

MATHEW, A.; REDDY, S.; ARCHIBALD, C. Diabetic muscle infarction. **BMJ case reports**, v. 2009, p. bcr0920081009, 2009.

MCCLELLAND, D. B.; VAN FURTH, R. In vitro synthesis of lysozyme by human and mouse tissues and leucocytes. **Immunology**, v. 28, n. 6, p. 1099, 1975.

MEHDI, U.; TOTO, R. D. Anemia, diabetes, and chronic kidney disease. **Diabetes care**, v. 32, n. 7, p. 1320-1326, 2009.

MEINHOLD, J. A., MASLOWSKA-WESSEL, E., BENDER, R., & SAWICKI, P. T. Low prevalence of cardiac autonomic neuropathy in Type 1 diabetic patients without nephropathy. **Diabetic Medicine**, v. 18, n. 8, p. 607-613, 2001.

MEUGNIER, E., FARAJ, M., ROME, S., BEAUREGARD, G., MICHAUT, A., PELLOUX, V., ... & RABASA-LHORET, R. Acute hyperglycemia induces a global downregulation of gene expression in adipose tissue and skeletal muscle of healthy subjects. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 992-999, 2007.

MILANSKI, M., ARRUDA, A. P., COOPE, A., IGNACIO-SOUZA, L. M., NUNEZ, C. E., ROMAN, E. A., ... & PRADA, P. O. Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. **Diabetes**, v. 61, n. 6, p. 1455-1462, 2012.

MILLA. S., MATHIEU C., WANG N., LAMBERT S., NADZIALEK S., MASSART S., HENROTTE E., DOUXFILS J., MÉLARD C., MANDIKI S.N., KESTEMONT P. Spleen immune status is affected after acute handling stress but not regulated by cortisol in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. **Fish Shellfish Immunol.** 2010 May-Jun;28(5-6):931-41.

MØLLER, N.; NAIR, K. SREEKUMARAN. Diabetes and protein metabolism. **Diabetes**, v. 57, n. 1, p. 3-4, 2008.

MOMESSO, D. P., BUSSADE, I., EPIFANIO, M. A., SCHETTINO, C. D. S., RUSSO, L. A. T., & KUPFER, R. Increased epicardial adipose tissue in type 1 diabetes is associated with central obesity and metabolic syndrome. **diabetes research and clinical practice**, v. 91, n. 1, p. 47-53, 2011.

MONTÓN, C.; TORRES, A. Lung inflammatory response in pneumonia. **Monaldi Arch. Chest Dis.** v.53, p. 56-63, 1998.

MORAES, F. R.; GARCIA LEME, J. Endogenous corticosteroids and insulin in acute inflammation. **Microvasc. Res.**, Maryland Heights, v. 23, p. 281-283, 1982

MOUNIER, C; POSNER, B. I. Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v.84, p. 713 - 724, 2006.

NATT, M. P.; HERRICK, C. A. A new blood diluents for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult.Sci.*, Savoy, v. 31, n. 4, p. 735-738, 1952.

NEEL, J. V. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress". **American journal of human genetics**, v. 14, n. 4, p. 353, 1962.

NEEL, JAMES V. Diabetes mellitus: a " thrifty" genotype rendered detrimental by" progress" 1962. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 8, p. 694, 1999.

NICODEMUS, K. K.; FOLSOM, A. R. Type 1 and type 2 diabetes and incident hip fractures in postmenopausal women. **Diabetes care**, v. 24, n. 7, p. 1192-1197, 2001.

NIESSE, S.; MCLEOD, I., YATES, J. R. Silver staining, digestion, and extraction of peptides from na acrylamide gel for MS analysis. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, n. 7, p. pdb. prot 4661, 2006

O'HARA, A., HOWARTH, A., VARRO, A., & DIMALINE, R. The role of proteasome beta subunits in gastrin-mediated transcription of plasminogen activator inhibitor-2 and regenerating protein1. **Plos one**, v. 8, n. 3, p. e59913, 2013.

O'BRIEN, I. A.; MCFADDEN, J. P.; CORRALL, R. J. M. The influence of autonomic neuropathy on mortality in insulin-dependent diabetes. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 79, n. 3, p. 495-502, 1991.

ODEGAARD, J. I.; CHAWLA, A. Connecting type 1 and type 2 diabetes through innate immunity. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 3, p. a007724, 2012.

OTIS, J. P., ZEITUNI, E. M., THIERER, J. H., ANDERSON, J. L., BROWN, A. C., BOEHM, E. D., ... & YANIV, K. JESSICA P. et al. Zebrafish as a model for apolipoprotein biology: comprehensive expression analysis and a role for ApoA-IV in regulating food intake. **Disease models & mechanisms**, v. 8, n. 3, p. 295-309, 2015.

PAZZI, P., SCAGLIARINI, R., GAMBERINI, S., & PEZZOLI, A. Gall-bladder motor function in diabetes mellitus. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 14, n. s2, p. 62-65, 2000.

PELEG, A. Y. et al. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. **Diab Metab Res Rev**. v. 23, p. 3 - 13, 2007.

PEREIRA, M. A. A., SANNOMIYA, P., & LEME, J. G. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic rat plasma. **Diabetes**, v. 36, p. 1307-1314, 1987.

PONZIANI, F. R., PECERE, S., GASBARRINI, A., & OJETTI, V. Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism. **Expert review of gastroenterology & hepatology**, v. 9, n. 8, p. 1055-1067, 2015.

POURGHASEM, M.N; SHAFI, H.; BABAZADEH, Z. Histological changes of kidney in diabetic nephropathy. **Caspian journal of internal medicine**, v. 6, n. 3, p. 120, 2015.

PRADO, E. J. R. **Insulina e dexametasona na aerocistite aguda induzida por *Aeromonas hydrophila* em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, aloxano-diabéticas**. 2014. Dissertação (Mestrado) – UNESP, Jaboticabal, 2014.

PUGLIESE, A.; MICELI, D. The insulin gene in diabetes. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 18, n. 1, p. 13-25, 2002.

REGNELL, S. E.; LERNMARK, A. Hepatic steatosis in type 1 diabetes. **The review of diabetic studies: RDS**, v. 8, n. 4, p. 454, 2011.

ROBERTSON, D.; KRANTZ, S. B.; BIAGGIONI, I. The anemia of microgravity and recumbency: role of sympathetic neural control of erythropoietin production. **Acta Astronautica**, v. 33, p. 137-141, 1994.

ROLLINI, F., FRANCHI, F., MUÑIZ-LOZANO, A., & ANGIOLILLO, D. J. Platelet function profiles in patients with diabetes mellitus. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 6, n. 3, p. 329-345, 2013.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Comprehensive physiology**, 4(1): p. 177–197, 2014.

SAMPSON, M. J., WILSON, S., KARAGIANNIS, P., EDMONDS, M., & WATKINS, P. J. Progression of diabetic autonomic neuropathy over a decade in insulin-dependent diabetics. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 75, n. 3, p. 635-646, 1990.

SANTILLI, F., SIMEONE, P., LIANI, R., & DAVÌ, G. Platelets and diabetes mellitus. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 120, p. 28-39, 2015.

SARAC, F.; SAYGILI, F. Causes of high bone alkaline phosphatase. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 21, n. 2, p. 194-197, 2007.

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

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasomes. **Cell**, v. 140, p. 821-832, 2010

SIMPSON, H. L.; UMPLEBY, A. M.; RUSSELL-JONES, D. L. Insulin-like growth factor-I and diabetes. A review. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 8, n. 2, p. 83-95, 1998.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Rev. Immunol.*, v. 10, p. 89-102, 2010.

SMOLELIS, A.N.; HARTSELL, S.E. The determination of lysozyme. **J. Bacteriol.**, v.58, p.731-736, 1949.

SRIVASTAVA, A. K; PANDLEY, S. K. Potential mechanism (s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. **Mol. Cell. Biochem.** v. 182, p. 135 - 141, 1998.

STATSOFT, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. Disponível em: <www.statsoft.com>.

STEGENGA, M. E., VINCENT, J. L., VAIL, G. M., XIE, J., HANEY, D. J., WILLIAMS, M. D., ... & VAN DER POLL, T. Diabetes does not alter mortality or hemostatic and inflammatory responses in patients with severe sepsis. **Crit. Care Med.** v. 38, n. 2, p.539 - 545, 2010.

ŠTĚPÁN, J., HAVRANEK, T., FORMANKOVA, J., ŠKRHA, J., ŠKRHA, F., & PACOVSKÝ, V. Bone isoenzyme of serum alkaline phosphatase in diabetes mellitus. **Clinica Chimica Acta**, v. 105, n. 1, p. 75-81, 1980.

STREINER, D. L. Starting at the beginning: an introduction to coefficient alpha and internal consistency. **J Pers Assess.**;80(1):99-103, 2003.

STUMVOLL, M., GOLDSTEIN, B. J., & VAN HAEFTEN, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet.** v.365, p.1333-46, 2005.

SUNDARESAN, S.; KANG, A. J.; MERCHANT, J. L. Pathophysiology of Gastric NETs: Role of Gastrin and Menin. **Current Gastroenterology Reports**, v. 19, n. 7, p. 32, 2017.

SZKUDELSKI, T. The mechanisms of alloxan and streptozotocin action in B cell of the rat pancreas. **Physiol. Res.**, Prague, v. 50, n. 6, p. 536–546, 2001.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 21, p. 335-376, 2003.

TARGHER, G., BERTOLINI, L., PADOVANI, R., RODELLA, S., ZOPPINI, G., PICHIRI, I., ... & BONORA, E. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **Journal of Hepatology**, v. 53, n. 4, p. 713-718, 2010.

TASHIMA, L.; CAHILL, G. F. Effects of insulin in the toadfish, *Opsanus tau*. **General and comparative endocrinology**, v. 11, n. 2, p. 262-271, 1968.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Características hematológicas da *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: cichlidae) capturada em "pesque-pague" de Franca, São Paulo, Brasil. **Biosci. J.**, Uberlandia, v. 19, n. 1, p. 103-110, 2003.

TEPPALA, S.; SHANKAR, A. Association between serum IGF-1 and diabetes among US adults. **Diabetes care**, v. 33, n. 10, p. 2257-2259, 2010.

THOMAS, M. C., MACISAAC, R. J., TSALAMANDRIS, C., & JERUMS, G. Elevated iron indices in patients with diabetes. **Diabetic medicine**, v. 21, n. 7, p. 798-802, 2004.

THOMAS, M. C. Anemia in diabetes: marker or mediator of microvascular disease. **Nature clinical practice Nephrology**, v. 3, n. 1, p. 20-30, 2007.

THOMAS, R. P., HELLMICH, M. R., TOWNSEND JR, C. M., & EVERS, B. M. Role of gastrointestinal hormones in the proliferation of normal and neoplastic tissues. **Endocrine Reviews**, v. 24, n. 5, p. 571-599, 2003.

TOMLINSON, D. R.; GARDINER, N. J. Glucose neurotoxicity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 36-45, 2008.

TONOLO, G.; CHERCHI, S. Tubulointerstitial disease in diabetic nephropathy. **International journal of nephrology and renovascular disease**, v. 7, p. 107, 2014.

TUOMINEN, J. T., IMPIVAARA, O., PUUKKA, P., & RÖNNEMAA, T. A. P. A. N. I. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes care**, v. 22, n. 7, p. 1196-1200, 1999.

UYAMA, N.; GEERTS, A.; REYNAERT, H. Neural connections between the hypothalamus and the liver. **The anatomical record**, v. 280, n. 1, p. 808-820, 2004.

VALLE, A., GIAMPORCARO, G. M., SCAVINI, M., STABILINI, A., GROGAN, P., BIANCONI, E., ... & BONFANTI, R. Reduction of circulating neutrophils precedes and accompanies type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 2072-2077, 2013.

VAN DER PUTTEN, K., BRAAM, B., JIE, K. E., & GAILLARD, C. A. Mechanisms of disease: erythropoietin resistance in patients with both heart and kidney failure. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v. 4, n. 1, p. 47-57, 2008.

VAZZANA, N., RANALLI, P., CUCCURULLO, C., & DAVÌ, G. Diabetes mellitus and thrombosis. **Thrombosis research**, v. 129, n. 3, p. 371-377, 2012.

VERGÈS, BRUNO. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we. **Diabetologia**, v. 58, n. 5, p. 886-899, 2015.

VERHAEGHE, J., SUIKER, A. M. H., VISSER, W. J., VAN HERCK, E., VAN BREE, R., & BOUILLON, R. The effects of systemic insulin, insulin-like growth factor-I and growth hormone on bone growth and turnover in spontaneously diabetic BB rats. **Journal of endocrinology**, v. 134, n. 3, p. 485-492, 1992.

VERHAEGHE, J., VAN HERCK, E., VISSER, W. J., SUIKER, A. M., THOMASSET, M., EINHORN, T. A., ... & BOUILLON, R. Bone and mineral metabolism in BB rats with long-term diabetes: decreased bone turnover and osteoporosis. **Diabetes**, v. 39, n. 4, p. 477-482, 1990.

VINIK, A. I., MASER, R. E., MITCHELL, B. D., & FREEMAN, R. Diabetic autonomic neuropathy. **Diabetes care**, v. 26, n. 5, p. 1553-1579, 2003.

WANG, H.; PENG, D.Q. New insights into the mechanism of low high-density lipoprotein cholesterol in obesity. **Lipids in health and disease**, v. 10, n. 1, p. 176, 2011.

WANG, T. C., DANGLER, C. A., CHEN, D., GOLDENRING, J. R., KOH, T., RAYCHOWDHURY, R., ... & FOX, J. G. Synergistic interaction between hypergastrinemia and Helicobacter infection in a mouse model of gastric cancer. **Gastroenterology**, v. 118, n. 1, p. 36-47, 2000.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fisher. Res. Board Can., Ottawa*, v. 27, n. 5, 1970.

WEIBEL, E. R.; STAUBLI, W.; GNAGI, H. R.; HESS, F. A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. *J. Cell Biol., New York*, v. 42, n. 1, p. 68-91, 1969.

WEISS, G., MEUSBURGER, E., RADACHER, G., GARIMORTH, K., NEYER, U., & MAYER, G. Effect of iron treatment on circulating cytokine levels in ESRD patients receiving recombinant human erythropoietin. **Kidney international**, v. 64, n. 2, p. 572-578, 2003.

WEISS, G.; GOODNOUGH, L. T. Anemia of chronic disease. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 10, p. 1011-1023, 2005.

WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, n. 3, p. 378-381, 1999.

WOLF, G. Insulin resistance and obesity: resistin, a hormone secreted by adipose tissue. **Nutr Rev.**, v. 62, n. 10, p. 389-394, 2004.

WON, G. M., KIM, S. M., & PARK, S. I. The effects of β -1, 3/1,6-linked glucan in the diet on immune responses of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* by oral administration. **J Fish Pathol**, v.17, p.29-38, 2004.

XI, G., SHEN, X., MAILE, L. A., WAI, C., GOLLAHON, K., & CLEMMONS, D. R. Hyperglycemia Enhances IGF-I–Stimulated Src Activation via Increasing Nox4-Derived Reactive Oxygen Species in a PKC ζ -Dependent Manner in Vascular Smooth Muscle Cells. **Diabetes**, v. 61, n. 1, p. 104-113, 2012.

XU, B.; MORRISON, C. M.; YANG, H.; WRIGHT JR, J. R. Tilapia islet grafts are highly alloxan-resistant. **Gen. Comp. Endocrinol.**, Maryland Heights, v. 137, n. 2, p. 132–140, 2004.

YAMADA, T.; KATAGIRI, H. Avenues of communication between the brain and tissues/organs involved in energy homeostasis. **Endocr J.** v. 54, p. 497-505, 2007.

YE, JIANPING. Mechanisms of insulin resistance in obesity. **Frontiers of medicine**, v. 7, n. 1, p. 14-24, 2013.

YIN, Y., GRABOWSKA, A. M., CLARKE, P. A., WHEL BAND, E., ROBINSON, K., ARGENT, R. H., ... & WATSON, S. A. Helicobacter pylori potentiates epithelial: mesenchymal transition in gastric cancer: links to soluble HB-EGF, gastrin and matrix metalloproteinase-7. **Gut**, p. gut. 2009.199794, 2010.

YU, B.-L.; ZHAO, S.-P.; HU, J.-R. Cholesterol imbalance in adipocytes: a possible mechanism of adipocytes dysfunction in obesity. **Obesity Reviews**, v. 11, n. 8, p. 560-567, 2010.

ZOCHODNE, D. W. Chapter Nine-Sensory Neurodegeneration in Diabetes: Beyond Glucotoxicity. **International review of neurobiology**, v. 127, p. 151-180, 2016.

8. APÊNDICE

Tabela dos valores médios (n=7) e desvio padrão médio (DP) das variáveis processadas por método análise de fatores por componentes principais. Grupos: tilápias do Nilo normais (Controle); tilápias do Nilo aloxana-diabético com insulino terapia (DI) e tilápias do Nilo aloxana-diabético sem insulino terapia (D).

Variáveis	\Grupos	Controle		DI		D	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP
Gordura	Índice %	2,3 ± 1,1		3,0 ± 1,5		5,1 ± 3,6	
Coração		0,093 ± 0,02		0,106 ± 0,02		0,136 ± 0,03	
Fígado		2,346 ± 0,63		2,812 ± 0,33		3,298 ± 0,74	
Estômago		0,169 ± 0,03		0,168 ± 0,02		0,197 ± 0,02	
Rim		0,105 ± 0,03		0,127 ± 0,04		0,202 ± 0,06	
Densidade Mineral Óssea	g/cm ²	0,275 ± 0,03		0,283 ± 0,02		0,223 ± 0,03	
Densidade Mineral Vertebral		0,285 ± 0,03		0,300 ± 0,03		0,241 ± 0,05	
Força	N	11,81 ± 3,3		8,56 ± 1,8		7,43 ± 2,2	
Rigidez (80%)	N/mm	16,56 ± 4,9		13,49 ± 4,1		8,88 ± 2,5	
Fosfatase Alcalina	U/L	19,8 ± 3,8		22,7 ± 5,5		32,3 ± 4,5	
Glicose	mg/dL	79,8 ± 10,1		67,0 ± 8,4		137,8 ± 48,7	
Triglicerídeos		349,3 ± 93,0		534,7 ± 240,1		582,2 ± 390,9	
Colesterol		219,6 ± 37,4		349,8 ± 116,8		546,8 ± 320,0	
Apolipoproteína A1		386,5 ± 74,7		517,7 ± 130,9		527,3 ± 145,4	
Neutrófilo	n°/μL	15249 ± 7115		16883 ± 7099		7844 ± 1638	
Linfócito		24082 ± 7890		21665 ± 10954		15150 ± 3077	
Macrófago		3326 ± 2215		5279 ± 2390		1973 ± 1212	
Eritrócito	μL/10 ⁶	2,568 ± 0,194		1,978 ± 0,335		2,012 ± 0,308	
VCM	fL	148,2 ± 13,0		192,2 ± 52,4		185,6 ± 28,2	
CHCM	%	22,8 ± 1,8		15,8 ± 5,1		11,7 ± 4,9	