

LEONARDO RAMOS NICOLAU DA COSTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO
VOLUNTÁRIO NO DIABETES MELLITUS TIPO 1 EM
CAMUNDONGOS NOD (NON OBESE DIABETIC)**

CAMPINAS

UNICAMP

2007

LEONARDO RAMOS NICOLAU DA COSTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO
VOLUNTÁRIO NO DIABETES MELLITUS TIPO 1 EM
CAMUNDONGOS NOD (NON OBESE DIABETIC)**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração em Ciências Básicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO DE LIMA ZOLLNER

CAMPINAS

Unicamp

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C823a	Costa, Leonardo Ramos Nicolau da Avaliação dos efeitos do exercício físico voluntário no diabetes mellitus tipo 1 em camundongos NOD (non obese diabetic) / Leonardo Ramos Nicolau da Costa. Campinas, SP : [s.n.], 2007. Orientador : Ricardo de Lima Zollner Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. 1. Exercício físico. 2. Diabetes Mellitus tipo 1. 3. Camundongos NOD. 4. Citocinas. 5. Leptina. I. Zollner, Ricardo de Lima. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.
-------	--

Título em inglês : Evaluation of the effects of voluntary physical exercise on diabetes mellitus type 1 in NOD mice

Keywords: • Physical exercise
• Diabetes Mellitus type 1
• Nod mice
• Cytokines
• Leptin

Titulação: Mestre em Clínica Médica
Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
Prof. Dr. Luis Henrique Boechat
Prof. Dra. Denise Engelbrech Zantut Wittmann

Data da defesa: 31- 08 - 2007



Fls. Nº 25
Proc. nº 01P-7211/05
Rub. Paula

ATA Nº. 174/07

Cópia autêntica da Ata da Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado a que se submeteu **LEONARDO RAMOS NICOLAU DA COSTA (RA-036781)**, aluno regularmente matriculado no Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, nível de Mestrado.

Ata da Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado a que se submeteu o aluno **LEONARDO RAMOS NICOLAU DA COSTA (RA-036781)**, aluno regularmente matriculado no Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, nível de Mestrado. Aos **Trigésimo primeiro dia do mês de agosto dois mil e sete**, com início às 9:00hs, no Anfiteatro da Auditorio da Nefrologia da Universidade Estadual de Campinas, reuniu-se a Comissão Examinadora para a prova em epígrafe, formada pelos Professores Doutores: Ricardo de Lima Zollner (matricula-211010), Presidente e Orientador, Denise Engelbrecht Zantut Wittmann e Luiz Henrique Barbosa Boechat, membros. Os trabalhos foram considerados abertos pelo Prof. Dra. Ricardo de Lima Zollner, que agradeceu a presença de todos e passou a palavra ao candidato para que expusesse seu trabalho de Tese, o qual teria a duração de "trinta minutos" e versou sobre o tema "**Avaliação dos efeitos do exercício físico voluntário no diabetes tipo 1 em camundongos NOD (non obese diabetic)**". A seguir deu-se início às arguições na seguinte ordem: Professor Doutor Luiz Henrique Barbosa Boechat, Professora Doutora Denise Engelbrecht Zantut Wittmann, e Professor Doutor Ricardo de Lima Zollner que colocaram suas dúvidas, as quais foram sendo esclarecidas pelo candidato. Logo após foi dado um intervalo de dez minutos para que os examinadores proferissem um parecer final. Considerando ao candidato aprovado por unanimidade e levando em conta a relevância do trabalho apresentado, a Banca Examinadora houve por bem concluir pela aprovação. Portanto, o candidato foi considerado "Aprovado", fazendo jus ao Título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas. Para que o respectivo título possa ser concedido, com as prerrogativas legais dele advindas, é necessário que ocorra a entrega dos volumes definitivos no prazo de máximo de **60 dias**, a constar da data da defesa. Nada mais havendo a constar, eu, **Cristiane Patricia de Freitas**, secretária da Subcomissão de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas, lavrei a presente ata.

Campinas, 31 de agosto de 2007

Professora Doutora Denise Engelbrecht Zantut Wittmann

Professor Doutor Luiz Henrique Barbosa Boechat

Professor Doutor Ricardo de Lima Zollner

	PÁG.
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1- INTRODUÇÃO.....	12
1.1- Diabetes mellitus.....	13
1.2- Camundongo diabético não-obeso (NOD) como modelo experimental de autoimunidade.....	15
1.3- Exercício físico e diabetes.....	17
1.4- Citocinas e diabetes.....	18
1.5- Leptina.....	19
2- OBJETIVOS.....	22
2.1- Objetivo geral.....	23
2.2- Objetivos específicos.....	23
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1- Animais.....	25
3.2- Estratificação dos grupos experimentais.....	25
3.3- Adaptação à gaiola de exercício físico voluntário.....	25
3.4- Diagnóstico do diabetes e sacrifício dos animais.....	26
3.5- Análise morfológica.....	27
3.6- Análise da expressão sérica de citocina por método imunoenzimático (ELISA).....	30
3.6.1- IL-4, IL-12, IFN- γ e IL-1 β	30

3.6.2- TNF- α	31
3.6.3- Leptina.....	31
3.7- Análise estatística.....	32
4- RESULTADOS.....	33
4.1- Expressão do diabetes tipo i na linhagem NOD submetida ao exercício físico aeróbico voluntário.....	34
4.2- Efeito do exercício físico sobre o processo inflamatório das ilhotas pancreáticas e índice de infiltrado nas ilhotas pancreáticas.....	37
4.3- Efeito do exercício físico na expressão da leptina no camundongo NOD.....	41
4.4- Efeito do exercício físico na expressão das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-12, IFN- γ E TNF- α no camundongo NOD.....	43
4.4.1- IL-1 β	43
4.4.2- IL-4.....	45
4.4.3- IL-12.....	47
4.4.4- IFN- γ	49
4.4.5- TNF- α	51
5- DISCUSSÃO.....	53
6- CONCLUSÃO.....	58
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígeno
CEMIB	Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
DC	Células dendríticas
DM-1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM-2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxiribonucleico
GAD	Glutamato descarboxilase
HE	Hematoxilina e eosina
HPA	Hipotálamo-ptuitária-adrenal
ICA	Islet cells antibodies
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
LIAE	Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
NGF	Nerve growth factor
NK	Natural killer
NOD	Non obese diabetic/diabético não-obeso
PBS	Salina fosfatada tamponada
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro

RNAT	Ácido ribonucleico total
SBF	Soro fetal bovino
SPF	Specific pathogen free
Th	T auxiliar/T helper
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa

RESUMO

A linhagem de camundongos NOD (non obese diabetic) é utilizado como modelo experimental por desenvolver diabetes mellitus tipo 1 (DM-1) espontâneo similar ao diabetes mellitus humano resultando na destruição das ilhotas, orquestrada pelos linfócitos T que induzem a liberação de citocinas, promovendo o processo inflamatório. O exercício físico causa alterações fisiológicas no organismo, resultando em resposta sincronizada dos sistemas cardiovascular, respiratório, endócrino e imunológico. Entre estas respostas temos alterações na concentração de citocinas pró e antiinflamatórias e alterações nos níveis séricos do hormônio leptina. Estudos de terapias para o DM-1 baseadas na intervenção sobre o sistema imunológico revelam que estas podem ser estratégias promissoras para impedir a instalação e/ou evolução da doença. Neste contexto, investigamos os efeitos do exercício físico voluntário sobre a incidência do DM-1 e insulite em camundongos NOD, expressão de citocinas (IL-1 β , IL-4, IL-12, IFN- δ e TNF- α) e leptina. Nossos resultados sugerem que, em camundongos NOD fêmeas a partir da 4ª semana de vida, o exercício físico voluntário por 1h/dia e 5 vezes por semana é capaz de diminuir o índice de infiltrado inflamatório e conseqüentemente a expressão do diabetes, modulando negativamente o infiltrado inflamatório. A análise dos níveis séricos de leptina e IL-4 não apresentaram alterações significativas entre o grupo exercício e controle. Por outro lado, no grupo que praticavam o exercício físico as concentrações séricas das citocinas IL-12, IFN- γ (no grupo não diabético), TNF- α (grupo diabético) e IL-1 β (grupo não diabético e diabético) estavam elevadas, quando comparadas com os animais não submetidos ao exercício físico.

ABSTRACT

The strain of NOD mice (non-obese diabetic) is used as a experimental model of spontaneously develop type1 diabetes mellitus (DM1) similar to human disease resulting in the destruction of the islet, orchestrated by lymphocytes that induce a cytokines release, promoting inflammatory process. The physical exercise cause physiological alterations in the organism, resulting in reply synchronized of the systems cardiovascular, respiratory, endocrine and immune. Between these answers we have alterations in the concentration of and pro anti-inflammatory cytokines and alterations in the serum levels of the leptin hormone. The inquiries of therapies for the DM-1 based on the intervention on the immune system disclose that these can be promising strategies to hinder the installation and/or evolution of the disease. In this context, we investigate the effect of voluntary physical exercise on the incidence of DM-1 and insulitis in NOD mice, cytokines (IL-1 β , IL-4, IL-12, IFN- δ e TNF- α) and leptin expression. Our results suggest that voluntary physical exercise one hour per day, five times per week in female NOD mice from 4^a week of life are capable to reduce the index of insulitis and consequently the expression of diabetes, down-modulating the inflammatory cell infiltration. The analysis of the leptin and IL-4 serum levels did not show statistical significance differences between the group exercise and control. In the other way, in the exercise group, the serum levels of IL-12, IFN- γ (in non-diabetic group), TNF- α (diabetic group) and IL-1 β (non-diabetic and diabetic group) are increased, when compared with the animals not submitted to the physical exercise.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Diabetes Mellitus

O diabetes mellitus é uma síndrome hiperglicêmica crônica heterogênea, de múltipla etiologia, afetando o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, resultando na alteração da produção e/ou ação da insulina. A classificação do diabetes mellitus é baseada em sua etiologia e nos mecanismos desencadeantes desta patologia, sendo dividida em tipo 1 (auto-imune, idiopática ou DM-1) e tipo 2 (DM-2)(1).

O início do DM-1 é em geral agudo, acometendo mais freqüentemente crianças e adolescentes, sendo seus fatores desencadeantes e mecanismos envolvidos em sua evolução, ainda não esclarecidos totalmente(2, 3).

A primeira evidência quanto a origem auto-imune do DM-1 foi descrita por BOTTAZZO et al. (1974)(4), que observaram a presença de auto anticorpos circulantes órgão específico, chamados anticorpos anti-células da ilhota (ICA) em pacientes com DM-1. Atualmente, sabe-se que os ICA não exercem efeito patogênico direto, sendo detectados precocemente antes da manifestação clínica do diabetes(5).

Na patologia desta doença, observa-se infiltração mononuclear progressiva nas ilhotas pancreáticas com destruição seletiva das células β produtoras de insulina, resultando na deficiência deste hormônio. Esta destruição é considerada seletiva, pois outras células pancreáticas do sistema endócrino, como células α ou células δ não são afetadas (6).

Enfatizando a característica auto-imune do DM-1, foi observada a presença de clones auto-reativos de linfócitos T na destruição seletiva das células β das ilhotas pancreáticas, como possível consequência da perda da tolerância desta classe de linfócitos a determinados constituintes destas células(7). Estudos nesta área, sugerem o envolvimento de outros mecanismos imunopatogênicos, como a ocorrência de desequilíbrio entre sub-populações de células T efectoras com a liberação de fatores de agressão que incluem citocinas e perforinas

liberadas por linfócitos T, que contribuirão na destruição da célula β pancreática(8, 9).

Estudos experimentais em murinos propõem vários mecanismos para a perda da tolerância imunológica no DM-1, como a existência de anormalidades central tímica e periférica pós-tímica. Existindo falha no bloqueio, anergia e supressão periférica da reatividade anti-células β , ocorrem respostas coordenadas por linfócitos T CD4+ direcionados a constituintes da célula β , que são processados e expostos por células apresentadoras de antígenos (APC), favorecendo a manifestação do DM-1(10).

Alguns auto-antígenos constituintes da célula β , como GAD 65, GAD 67 ("Glutamic acid decarboxylase") e insulina, que estão presentes em grande parte de pacientes com DM-1, foram descritos com auxílio de auto-anticorpos circulantes, sendo denominados como marcadores da destruição imune e identificados quando a hiperglicemia em jejum é detectada (3, 11-14).

Além disso, sugere-se que a expressão de peptídios imunogênicos na célula β , induzidos por infecções virais e toxinas, poderia aumentar a suscetibilidade a reações auto-imunes. E, a predisposição genética do indivíduo, junto com fatores ambientais, parece favorecer a ocorrência de mecanismos auto-imunes(8).

O complexo de histocompatibilidade principal (MHC) contribui na predisposição genética do DM-1, por meio da associação entre genes I-A e I-E, pela seleção positiva de clones auto-reativos no timo (presença de alelos de suscetibilidade), pela ausência de seleção negativa no timo (falta de alelos protetores para eliminar clones auto-reativos) e, ausência de anergia periférica de clones auto-reativos (gradiente de afinidade do MHC com o complexo peptídio/TCR e ausência de linfócitos T supressores restritos do MHC) (15, 16).

Evidências provenientes de estudos experimentais, sugerem que as células β pancreáticas são suscetíveis a vários fatores de agressão como, radicais livres e citocinas (17-20). As citocinas que são liberadas por linfócitos, atuam na

destruição seletiva das células β pancreáticas, participando no processo inflamatório local, alterando funções celulares e conseqüente destruição insular. Porém, os mecanismos mediados por citocinas para destruição das ilhotas pancreáticas não estão totalmente estabelecidos. E, entretanto trabalhos prévios mostram os efeitos citotóxicos das citocinas na indução de apoptose das células β (21-23).

Diversos estudos visando subsidiar o entendimento dos mecanismos de participação dos linfócitos T e citocinas na imunopatogênese do DM-1 utilizam modelos experimentais geneticamente predispostos para esta patologia, como o camundongo da linhagem NOD (diabético não obeso)(10, 16, 24, 25).

1.2- Camundongo Diabético Não–Obeso (NOD) como modelo experimental de autoimunidade

O camundongo NOD representa o modelo experimental em que os animais desenvolvem espontaneamente o diabetes Mellitus auto-imune (DM-1), semelhante ao observado em humanos. Essa linhagem foi desenvolvida a partir do cruzamento de uma linhagem CTS (propensa à catarata), com a linhagem não consangüínea ICR(26).

A linhagem NOD isogênica foi estabelecida em 1980 no laboratório Shionogi Aburahi como modelo animal para DM-1(26) com prevalência do diabetes entre 70-90% em fêmeas e 20% em machos. A partir de então, a linhagem foi estabelecida em diversos centros de pesquisa por todo mundo(27).

No Brasil, a colônia foi introduzida e implantada na Universidade Estadual de Campinas (PAVIN & ZOLLNER, 1994)(28) a partir de colônias matrizes provenientes do Laboratório INSERM U-25 Neker, Paris, França.

Atualmente, estes animais mantidos no centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB) em condições livres de patógenos (SPF), apresentam frequência cumulativa do DM-1 de 70-90% das fêmeas e 5-10% dos machos, entre 17^a e a 25^a semana de vida.

A polidipsia, poliúria, glicosúria elevada, hiperglicemia e deficiência de insulina são observadas nestes animais, acompanhados de rápida perda de peso(26).

De forma similar à doença humana, o DM-1 apresentado por estes animais é caracterizado por duas fases; na primeira fase, definida como pré-diabética (insulite), ocorre infiltração progressiva de células mononucleares nas ilhotas pancreáticas (CD4 e CD8, macrófagos) e de células dendríticas (DC). É um evento fundamental na fase inicial da doença, exercendo papel na patogênese de doenças auto-imunes mediadas por células T, como a apresentação de auto-antígenos, seguida de dano tecidual e morte por apoptose(29).

A segunda fase é caracterizada pela destruição das células β pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina e conseqüente manifestação do diabetes(6).

Linfócitos T demonstram ter papel importante no desenvolvimento do DM-1(30), no qual a ineficiência da eliminação de linfócitos auto-reativos contribui para o aparecimento da auto-imunidade(31). No decorrer da doença, células T CD4+ e CD8+ exercem papel sinérgico, uma vez que o desenvolvimento do DM-1 é dependente de ambos os subtipos de células(32).

Além disso, os linfócitos T CD4+ têm papel essencial no início da insulite e na progressão do DM-1, visto que o uso de anticorpos monoclonais anti-CD4+, pode suprimir a insulite e conseqüentemente, o aparecimento do DM-1 no camundongo NOD(33). Este tipo celular é observado principalmente na fase precoce da infiltração (periinsular), onde são necessários para a expansão clonal e ativação de linfócitos T CD8+ através da produção de IL-2(32). A proporção de células T CD8+ aumenta com a evolução da destruição das células produtoras de insulina, explicando o sinergismo entre os dois subtipos favorecendo o aparecimento do DM-1(34).

1.3- Exercício Físico e Diabetes

Exercício físico, como corrida, causa mudanças fisiológicas do organismo, principalmente um aumento da demanda de oxigênio e nutrientes, com resposta sincronizada entre os sistemas cardiovascular, respiratório e endócrino. Indivíduos jovens com diabetes tipo 1 possuem esse tipo de resposta similar aos indivíduos de mesma faixa etária e sem diabetes, porém, com resposta metabólica ao exercício deficiente, principalmente no que diz respeito ao aumento da glicose intramuscular e na utilização de outras fontes de energia(35).

A maioria dos pacientes com diabetes tipo 1 antes da utilização da terapia insulínica não praticavam atividade física vigorosa, devido aos distúrbios metabólicos (cetoacidose, desidratação grave e perda massa muscular) que o exercício físico pode causar. Porém, atualmente muitos pacientes com diabetes tipo 1 praticam exercício físico na sua rotina diária e sendo alguns até atletas profissionais(36).

O exercício físico pode causar desde hipoglicemia, hiperglicemia até cetoacidose diabética. Hipoglicemia pode ocorrer devido ao aumento da utilização de glicose durante o exercício, ainda mais, se houver a aplicação de insulina prévia. Pacientes sem controle glicêmico adequado e deficiência insulínica tem o risco de desenvolver cetoacidose. Pode ocorrer hiperglicemia em pacientes com adequado controle glicêmico e insulínico, onde a atividade física através do aumento de catecolaminas e ativação do sistema nervoso simpático estimulam a produção hepática de glicose(36).

Exercício físico também aumenta o risco do aparecimento de doenças cardíacas e angina em pacientes diabéticos. Assim, recomenda-se avaliação do sistema cardiovascular antes do início de atividades físicas regulares(36).

Atualmente, pacientes com diabetes tipo 1 são encorajados a praticar atividade física regular com adequação individual, devido seus benefícios a saúde, como: melhora dos níveis de colesterol, triglicérides, pressão sanguínea,

frequência cardíaca e trabalho cardíaco, além da melhora da qualidade de vida(36).

MATTHEW et. al. (2003)(37), mostraram que as alterações na concentração sérica de leptina depende do tempo e intensidade do exercício físico. Onde, exercício de curto período e baixa intensidade, não causam alterações na concentração de leptina, já exercícios de alta intensidade reduzem os níveis de leptina sérica.

Trabalhos que pesquisam diabetes e exercício sugerem que o exercício físico modula a resposta imunológica, por meio da interação entre os sistemas neuroendócrino e imunológico(38).

1.4- Citocinas e Diabetes

A análise da expressão de citocinas na insulite em camundongos NOD demonstra grande variedade tanto em nível gênico quanto na produção da proteína(39, 40).

Evidências favorecem o conceito de que as células β são destruídas em decorrência da falha na imunorregulação, levando a resposta auto-imune direta contra constituintes destas células(41, 42).

No camundongo NOD, o desequilíbrio entre a resposta Th1 e Th2, com predomínio do fenótipo Th1(pró-inflamatório), desempenha papel relevante na fisiopatologia das reações auto-imunes nesta linhagem(43).

Há correlações entre insulite destrutiva das células β e expressão de citocinas proinflamatórias do tipo 1 ($\text{TNF}\beta$, $\text{IFN}\gamma$, IL-2 e IL-12) em camundongos NOD e pacientes com DM-1. Desta forma, várias citocinas participam da resposta autoimune que leva a destruição das células β . A ausência de uma destas citocinas patogênicas não é suficiente para evitar o desenvolvimento do diabetes(39, 42, 44).

O óxido nítrico e radical livres, produzido pelas células expostas às citocinas e outras substâncias como a leptina a qual pode estimular a resposta imune adaptativa pró-inflamatória Th1, são elementos adicionais envolvidos na destruição das células β (39). Além disso, as evidências clínico-experimentais mostram envolvimento direto das células linfocitárias (células efectoras) sobre as células β pancreáticas (células alvo), resultando na liberação de mediadores solúveis responsáveis pelo processo inflamatório local, contribuindo para a destruição das ilhotas(45-48).

1.5- Leptina

A leptina é um hormônio, descoberta em 1994 por Zhang et al(49), produto do gene da obesidade (*ob*) de 16 KDa, secretada principalmente pelas células adiposas e pelo tecido muscular esquelético, placenta e estômago(50). A expressão é proporcional à gordura corporal, sendo mais elevada em pessoas obesas. O nível de leptina, também é maior em fêmeas, exibindo portanto, dimorfismo sexual(51, 52). Contudo, mostra-se diminuindo durante jejum(53-54). Possui papel fisiológico importante na saciedade, onde este hormônio integra diferentes funções endócrinas com efeito metabólico direto em tecidos periféricos(55).

O defeito no gene da leptina (*ob*) resulta em aumento tanto na ingestão alimentar quanto na diminuição do gasto energético, levando à obesidade, demonstrando seu papel no balanço energético e no metabolismo(50, 56, 57).

A leptina tem ação na regulação neuroendócrina e na homeostase de energia, assim como em outros processos fisiológicos que demandam energia como a reprodução, hematopoiese, angiogênese e respostas imunológicas(50, 56, 57).

Este hormônio e seus receptores têm estrutura semelhante à citocinas do tipo 1. A leptina atua na sinalização celular através de receptores próprios (*obR*), com seis isoformas de receptores ObRa – ObRf, os quais são proteínas

transmembrana, com domínio extracelular idêntico para todos os tipos de receptores e o domínio intracelular variando, segundo o receptor. As isoformas ObRa, ObRc, ObRd e ObRf, formadas por 32 a 40 aminoácidos apresentam a forma curta do receptor de leptina(51,56,58,59,60).

Por outro lado, o receptor ObRb exibe a forma longa do receptor com 306 aminoácidos e o receptor solúvel ObRe o qual, embora não participe diretamente na sinalização da leptina, é relevante para a detecção dos níveis circulantes, livres ou ligadas ao receptor, para determinar sua ação(59).

O receptor da leptina é expresso em vários tipos celulares, como em células do hipotálamo, onde regula a homeostase de energia e funções neuroendócrinas, em células do sistema imune, como linfócitos T(56), células NK, monócitos/macrófagos e células B (61) e, ainda, em células endoteliais, células β pancreáticas e hematopoiéticas (50).

A expressão do gene da leptina é regulada por vários fatores, incluindo outros hormônios e, pode ter sua produção aumentada pelos hormônios sexuais ovarianos e inibida pela testosterona, influenciando diretamente o eixo hipotálamo–pituitária–adrenal (HPA)(50, 51).

A insulina estimula a secreção de leptina durante alimentação. Da mesma forma, a queda da insulina durante o jejum antecipa a queda da leptina. A integração reguladora entre leptina e insulina, sugere possível participação da leptina na fisiologia do diabetes mellitus tipo 1 e 2(55).

Na deficiência nutricional, com redução da reserva energética, a leptina tem papel crucial em mecanismos adaptativos visando à economia de energia. Como a inflamação e a imunidade mediada por células requerem energia, a queda do nível de leptina promove economia no gasto energético, levando a redução na expansão e ativação das células imunes, para sustentar funções vitais(50).

Desta forma, a leptina associa o estado nutricional às respostas pró-inflamatórias Th1, onde o decréscimo do nível deste hormônio durante o jejum compromete a resposta pró-inflamatória do fenótipo Th1(60).

A deficiência de leptina no organismo aumenta a sensibilidade a estímulos infecciosos e inflamatórios, causando defeito na hematopoiese e resultando na desregulação da produção de citocinas(57).

Em mamíferos, além da ação em linfócitos T, a leptina modula outros componentes do sistema imune incluindo hematopoiese, função de macrófagos, entre outras(57).

Por outro lado, a ação da leptina na proliferação de linfócitos T ainda é motivo de discussão. Enquanto Martin-Romero et. al. (2000) sugerem a necessidade de pré-estimulação de linfócitos para ação proliferativa da leptina, LORD et. al. (1998) aludem que sua ação seja preferencialmente em células virgens e não de memória.

Em macrófagos/monócitos a leptina aumenta a função fagocítica por meio da ativação da fosfolipase, assim como estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias ($TNF\alpha$, IL-6, IL-12, IL-1)(62).

Em neutrófilos, foi demonstrado que a leptina está envolvida em todo o processo de desenvolvimento, diferenciação, proliferação, ativação e citotoxicidade (56). Além disso, a leptina pode direcionar a resposta imunológica para Th1, suprimindo a resposta Th2, atuando, como fator estimulante da produção de citocinas pró-inflamatórias e alterando desta forma, o balanço Th1/Th2 (52, 54, 63).

Em camundongos e humanos deficientes de leptina ou de seu receptor, observa-se prejuízo da função imune mediada por células(58). O camundongo com deficiência de leptina (*ob/ob*) ou de seu receptor (*db/db*), apresenta celularidade reduzida no baço e timo, deficiência na resposta imunológica pró-inflamatória mediada por células e na produção de anticorpos(51).

Em humanos, a deficiência congênita de leptina associa infecções a mortalidade infantil precoce, assim como a supressão de linfócitos e da imunidade Th1, condições estas que podem ser revertidas com a administração de leptina(56).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Avaliar o efeito do exercício físico voluntário na incidência do diabetes tipo I no camundongo NOD.

2.2- Objetivos específicos

1. Verificar a expressão do diabetes tipo I na linhagem camundongo NOD submetida ao exercício físico voluntário e seus respectivos controles;
2. Quantificar o índice de infiltrado inflamatório das ilhotas pancreáticas dos animais submetidos ao exercício físico voluntário e seus respectivos controles;
3. Analisar a expressão da leptina através da detecção sérica por técnica de ELISA nos animais submetidos ao exercício físico voluntário e seus respectivos controles;
4. Analisar a concentração sérica das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-12, IFN- δ e TNF- α nos animais submetidos ao exercício físico voluntário e seus respectivos controles.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Animais

Os camundongos utilizados neste estudo foram obtidos da colônia NOD provenientes do INSERM U-25, Hospital Necker (Paris, França), implantada e mantida pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) a partir de 1994, em condições livres de patógenos específicos (SPF)(28).

A frequência cumulativa do DM-1 clínico espontâneo registrado na colônia NOD/Uni com 25 semanas de idade, se mantém ao redor de 85% entre as fêmeas e de 5 a 20% entre machos, revelando-se similar à da colônia de origem. Os protocolos utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2- Estratificação dos grupos experimentais

Camundongos NOD/Uni fêmeas provenientes do CEMIB/UNICAMP foram mantidos em condições livres de patógenos específicos, com controle de luz, temperatura e umidade em biotério de experimentação no Laboratório de Imunologia e Alergia Experimental (LIAE), recebendo água e ração padrão autoclavadas *ad libitum*.

Os grupos experimentais foram estabelecidos como a seguir:

Grupo Exercício: Composto por 19 animais adaptados ao exercício físico voluntário.

Grupo Controle: Composto por 16 animais, os quais ficaram em gaiolas sem a roda de exercício físico.

3.3- Adaptação à gaiola de exercício físico voluntário

Os animais iniciaram no protocolo na 4ª semana de vida. Passaram por um período de adaptação à gaiola individual de exercício físico voluntário, onde no 1º dia permaneceram por vinte minutos. Nos dias subseqüentes eram diariamente

acrescidos 10 minutos até completar o período de 60 minutos na gaiola de exercício físico voluntário. Após este período de adaptação, os animais eram colocados cinco vezes por semana na gaiola de exercício físico voluntário durante o período de 60 minutos em ambiente SPF. Os animais do Grupo Exercício ficaram em gaiolas com a roda de exercício físico voluntário. Para o Grupo Controle era retirada a roda de exercício físico voluntário.

3.4- Diagnóstico do diabetes e sacrifício dos animais

A ocorrência do diabetes mellitus foi monitorada em todos os animais a partir da 10^a semana de vida. As glicemias eram realizadas semanalmente em jejum através de glicosímetro Prestige LX® (Home Diagnostic, EUA) retirando-se amostra de sangue da veia caudal do animal. Os animais eram considerados diabéticos após confirmação da hiperglicemia por duas semanas consecutivas através de glicosímetro com valores de glicemia > 250 mg/dL (13,8 mM) (estabelecido no LIAE e em concordância com ITOH et al. 1997).

Os animais diagnosticados diabéticos eram anestesiados com tiopental sódico 2,5% (Thiopentax®, Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA), na dose de 15 a 30mg/kg de peso corpóreo. O sangue periférico era coletado através de punção cardíaca e transferido para tubo plástico de 1,5ml (livre de RNase) para centrifugação e posterior separação de soro. Após este procedimento, realizou-se a remoção do pâncreas, o qual era depositado em cápsulas contendo meio de inclusão O.C.T. (Tissue Tek® Miles – EUA) e rapidamente congelado em nitrogênio líquido, sendo conservado em bio-freezer a -80°C até processamento histológico para estudo morfológico e imunohistoquímico, empregando-se cortes obtidos em criostato (Leica, CM 1850 Alemanha).

3.5- Análise morfológica

A avaliação histológica dos pâncreas tinha como objetivo analisar os aspectos morfológicos das ilhotas pancreáticas e de seu eventual grau de insulite.

Os pâncreas eram transferidos e posicionados no suporte do criostato de maneira a se obter a maior área possível de corte. Os cortes eram coletados em série de 10 cortes consecutivos de 5µm de espessura e depositados em lâminas histológicas previamente silanizadas (γ -Methacryl-Oxipropil-Methoxysilane - Sigma St Louis, EUA). Após a obtenção da primeira série de cortes, o pâncreas era desbastado 300µm e, a seguir, outra série de 10 cortes era igualmente processada. Repetia-se este procedimento mais quatro vezes, obtendo-se os conjuntos de lâminas representados no esquema 1.

As lâminas nº: 1, 5, 9 e 13 - obtidas através de criocortes eram corados pela técnica da hematoxilina e eosina, observadas em microscópio óptico (Axioscope, Zeiss, Darmstad-Alemanha), permitindo detectar a presença de infiltrado inflamatório em toda extensão do órgão. Os cortes, nos quais se evidenciava a presença de infiltrado inflamatório, eram submetidos a contagem de ilhotas de Langerhans e classificados segundo o grau de infiltrado celular (insulite) apresentado. As lâminas subseqüentes eram utilizadas para a caracterização linfocitária para CD4⁺ (lâminas 2, 6, 10 e 14), CD8⁺ (lâminas 3, 7, 11 e 15) e CD11⁺ (lâminas 4, 8, 12 e 16).

A classificação utilizada nas ilhotas pancreáticas, segundo o grau de insulite apresentado, era realizada atribuindo-lhes seguinte escore segundo critérios propostos por SIGNORE *et al.* (1989) e adaptado (39).

0 = ilhota normal, na ausência de infiltrado.

1 = peri-insulite, presença < 25% de infiltrado ao redor e no interior da ilhota.

2 = insulite moderada, 25 - 80% da ilhota invadida pelo infiltrado.

3 = insulite invasiva, > 80% da ilhota invadida pelo infiltrado. Ocupação extensiva da ilhota.

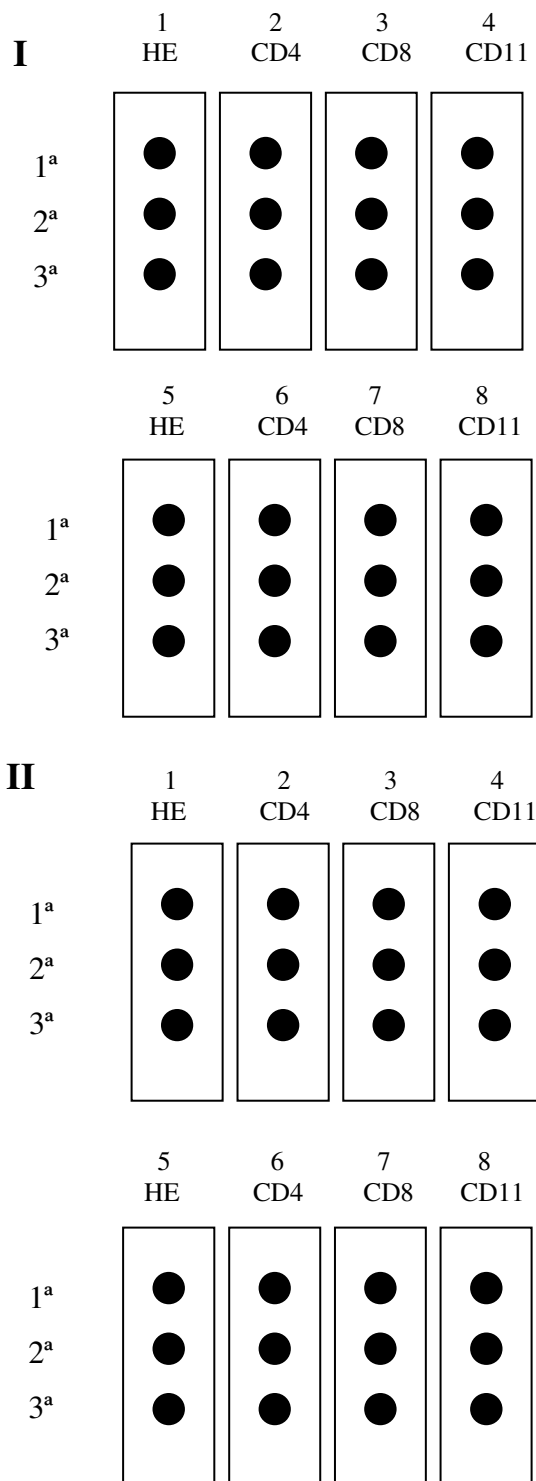
4 = insulite destrutiva, invasão total da ilhota pelo infiltrado.

As ilhotas eram contadas e classificadas por grau, em três planos de cortes diferentes por órgão. Os resultados eram representados pela média e desvio padrão referente relação número de ilhotas de cada grau/total de ilhotas contadas por animal, para cada grupo experimental, e calculava-se o índice de infiltrado celular, segundo a fórmula:

$$I = \frac{(0 \times N_0) + (1 \times N_1) + (2 \times N_2) + (3 \times N_3) + (4 \times N_4)}{4 \times (N_0 + N_1 + N_2 + N_3 + N_4)}$$

Índice = 1 - destruição total da ilhota.

0, 1, 2, 3 e 4 representam os diferentes graus de insulite (como descrito anteriormente) e N_0 , N_1 , N_2 , N_3 e N_4 , o número total de ilhotas com seus respectivos graus de infiltração.



Esquema 1 - Representação do procedimento para a obtenção dos conjuntos de cortes analisados para estudo morfológico, quantitativo e imunohistoquímico das ilhotas pancreáticas.

3.6- Análise da expressão sérica de citocina por método imunoenzimático (ELISA)

3.6.1. IL-4, IL-12, IFN- γ e IL-1 β

As placas eram adsorvidas com anticorpo de captura específico para as citocinas IL-4, IL-12, IFN- γ e IL-1 β (CytoSet™ – Biosource, EUA) na concentração de 1,25 μ g/ml, diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato (p.H. 9,4) e incubadas por 18 horas em temperatura de 4°C. A seguir, as placas eram lavadas por 3 ciclos rápidos com solução salina e 0,1% de Tween 20 (Merck - Alemanha). Para bloqueio dos sítios inespecíficos utilizava-se solução de soro albumina bovina 1% em PBS (p.H. 7,4) (tampão de ensaio), por 2 horas em temperatura ambiente. Novamente as placas eram lavadas por 3 ciclos rápidos e 100 μ l de amostras de soros diluídos 1:2 em tampão de ensaio era adicionado, e eram mantidas em câmara úmida por 90 minutos em temperatura ambiente, com exceção de IL-1 β , incubada a 37°C. Após o processo de lavagem, era adicionado 100 μ l de anticorpo de detecção biotilado diluído 0,125 μ g/ml em tampão de ensaio suplementado com 5% de soro bovino fetal para IL-12 e IFN- γ , e a concentração utilizada era de 0,05 μ g/ml para IL-1 β e IL-4, sendo que as placas permaneciam em câmara úmida por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida as lavagens, era adicionada solução de estreptavidina/peroxidase, na concentração de 0,3 μ g/ml diluído em tampão de ensaio e então, mantidas por 45 minutos em temperatura ambiente protegida de luminosidade. Posterior às lavagens, a reação de cor era produzida pela adição de tetrametilbenzidina (TMB OptEIA™ BD - Biosciences), sendo bloqueada após 30 minutos com H₂SO₄ 1N. Os valores de absorbância eram obtidos após leitura em 450nm utilizando espectrofotômetro Spectra Max 190 (Medical Device, EUA) e os cálculos eram realizados através do software SOFT MAX-PRO 3.0. Para cada experimento, era utilizada curva de referência, para determinação da concentração de citocina.

3.6.2- TNF- α

As placas eram adsorvidas com 100 μ l de anticorpo de captura específico para TNF- α (CytoSet™ – Biosource, EUA) na concentração de 1,25 μ g/ml, diluído em solução tampão carbonato-bicarbonato (p.H. 9,4) e incubadas por 18 horas a 4°C. A seguir, a solução de adsorção era aspirada e, para bloqueio dos sítios inespecíficos adicionava-se 300 μ l de solução de soro albumina bovina 1% em PBS (p.H. 7,4) (tampão de ensaio), por 2 horas em temperatura ambiente. A seguir, as placas eram aspiradas e 100 μ l de amostras de soros diluídos 1:2 em tampão de ensaio eram adicionados, e imediatamente, adicionava-se 50 μ l do anticorpo de detecção biotinilado na concentração de 0,05 μ g/ml em tampão de ensaio, sendo mantidas em câmara úmida por 2 horas em temperatura ambiente. Após 4 ciclos rápidos de lavagem com solução salina e 0,1% de Tween 20 (Merck-Alemanha), eram adicionados 100 μ l de anticorpo solução de estreptavidina/peroxidase, na concentração de 0,15 μ g/ml diluído em tampão de ensaio e então, as placas eram mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente protegida de luminosidade. Posterior às lavagens, a reação de cor era produzida pela adição de tetrametilbenzidina (TMB OptEIA™ BD - Biosciences), sendo bloqueada após 20 minutos com H₂SO₄ 1N. Os valores de absorbância eram obtidos após leitura em 450nm utilizando espectrofotômetro Spectra Max 190 (Medical Device, EUA) e os cálculos eram realizados através do software SOFT MAX-PRO 3.0. Era utilizada curva de referência, para determinação da concentração da citocina em estudo.

3.6.3- Leptina

Para determinação dos níveis séricos de leptina, placas de polietileno eram adsorvidas com 2 μ g/ml de anticorpo anti-leptina de camundongo (R&D Systems, Inc) em 0,05M de tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e incubadas por 18 horas à 4°C em câmara úmida. Após 3 lavagens com solução 0,05% de

Tween 20 (Merck) em PBS, os sítios inespecíficos eram bloqueados com 3% de soro bovino fetal em PBS por 2 horas em temperatura ambiente. A seguir, as placas eram novamente lavadas e 100µl de soros diluídos 1:5 em solução contendo 1% de soro bovino fetal e PBS eram adicionados e mantidos em câmara úmida por 18 horas à 4°C. Após o processo de lavagem, era adicionado 100µl de anticorpo anti-leptina de camundongo (produzido em coelho) (Rockland, EUA) na diluição 1:2400 em PBS e soro bovino fetal 1%. Após incubação de 90 minutos as placas eram lavadas e 100µl de anticorpo conjugado com peroxidase anti-coelho (Rockland, EUA) na diluição 1:80000 eram adicionadas e então mantidas em câmara úmida durante 1 hora em temperatura ambiente. Posterior as lavagens a reação de cor era produzida pela adição de tetrametilbenzidina TMB (BD – Biosciences, EUA), sendo bloqueada após 30 minutos com H₂ SO₄ 1N. Os valores de absorbância eram obtidos após leitura em 450nm utilizando espectrofotômetro Spectra Max 190 (Medical Device, EUA) e os cálculos eram realizados através do software SOFT MAX-PRO 3.0. Era utilizada curva de referência para determinação da concentração da leptina com concentração inicial de 30ng/ml seguida por diluições seriadas (1:2) até a concentração final de 0,05ng/ml.

3.7- Análise estatística

Os resultados eram expressos como média e desvio padrão. Os dados eram submetidos a análise de variância (ANOVA) entre os grupos exercício e grupos controle pelo teste de Mann-Whitney (não paramétrico). Eram considerados estatisticamente significativos $p < 0,05$. O efeito do exercício sobre a expressão do diabetes era analisado pelo cálculo da razão de probabilidade (Odds ratio) assumindo-se $p \leq 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- Expressão do diabetes tipo I na linhagem NOD submetida ao exercício físico aeróbico voluntário

O exercício físico voluntário no camundongo NOD reduziu a manifestação do diabetes tipo I, visto que apenas 42,4% (8/19) dos animais que realizaram exercício físico voluntário apresentaram níveis glicêmicos superiores a 250mg/dl. Por outro lado, nos animais que não realizaram exercício físico (grupo controle) verificou-se a ocorrência de glicemias superiores a 250 mg/dl em 93,75% dos animais (15/16). Foi calculada a razão de chance da condição nos expostos e não expostos para analisar o efeito do exercício físico sobre a expressão do diabetes, levando em consideração o intervalo de confiança. O risco relativo dos animais que realizaram exercício físico voluntário foi de 0,07, com intervalo de confiança de 0,01 a 0,47. Esses valores indicam o favorecimento do efeito do exercício físico voluntário em relação a doença (Figura 1 pág.35).

Observou-se também, diminuição do pico de incidência da doença, que ocorrem entre a 16 a 19 semanas de vida do animal, causando incidência mais homogênea e tardia no grupo exercício, quando comparados com o grupo controle (Figura 2 pág.36).

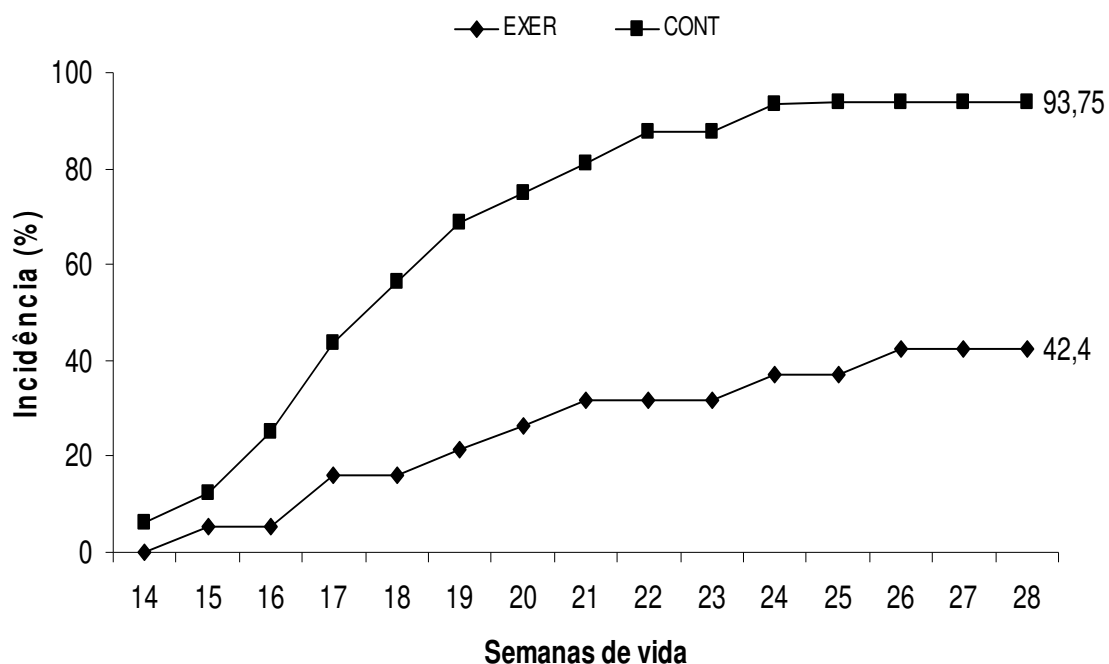


Figura 1- Incidência cumulativa do diabetes no camundongo NOD submetido ao exercício físico. Observa-se que nos animais submetidos ao exercício físico voluntário 42,4% ficaram diabéticos (n=8/19), enquanto que 93,75% dos animais do grupo controle apresentaram a doença (n=15/16). O risco relativo ao exercício físico foi de 0,07, com intervalo de confiança de 0,01 a 0,47, indicando o favorecimento do efeito do exercício físico no controle da manifestação do diabetes.

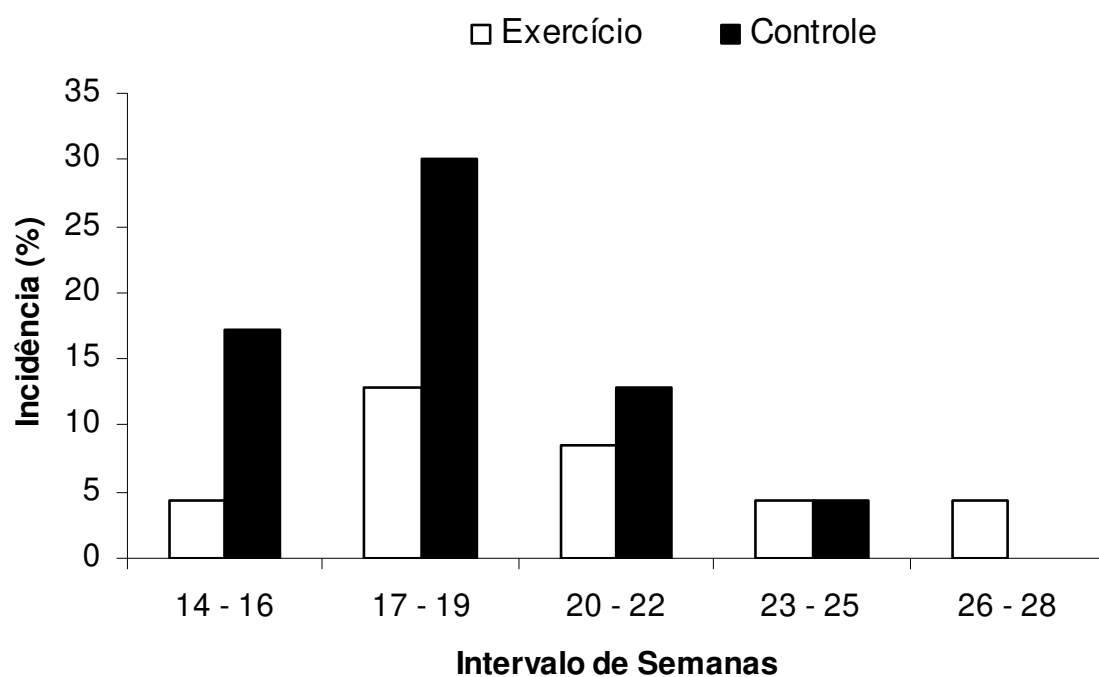


Figura 2- Distribuição da incidência do diabetes em intervalos semanais, mostrando uma distribuição mais homogênea e tardia desta incidência no grupo exercício, quando comparada com o grupo controle.

4.2- Efeito do exercício físico sobre o processo inflamatório das ilhotas pancreáticas e índice de infiltrado nas ilhotas pancreáticas

A verificação do processo inflamatório foi realizada por meio de cortes histológicos de pâncreas de animais dos grupos exercício e controle e foram classificadas segundo grau de insulite por escores (descrito em materiais e métodos).

O escore dos animais do grupo exercício não diabéticos apresentaram maior porcentagem de ilhotas grau 0 (26,1%), ou seja ilhotas íntegras, e ilhotas grau 1 (31,7%), mostrando baixo grau de comprometimento das ilhotas, ainda mais por apresentarem porcentagem 0 de ilhotas grau 4 (Figura 3 pág.38), levando a um índice de infiltrado de 0,31, quando comparado com grupo exercício diabético (0,56), grupo controle não diabético (0,5) e diabético (0,5) (Figura 4 pág.39). Sendo estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre os grupos exercício não diabético e exercício diabético, e exercício não diabético e controle não diabético.

A imunofluorescência do infiltrado insular revelou a presença de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos (CD11⁺), especialmente intensos em animais diabéticos, independente se realizaram exercício físico (Prancha I pág.40).

Nos animais não diabéticos que realizaram exercício físico voluntário, observou-se diminuição da presença de infiltrado na ilhota de Langerhans constituído por linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e macrófagos (Prancha I pág.40).

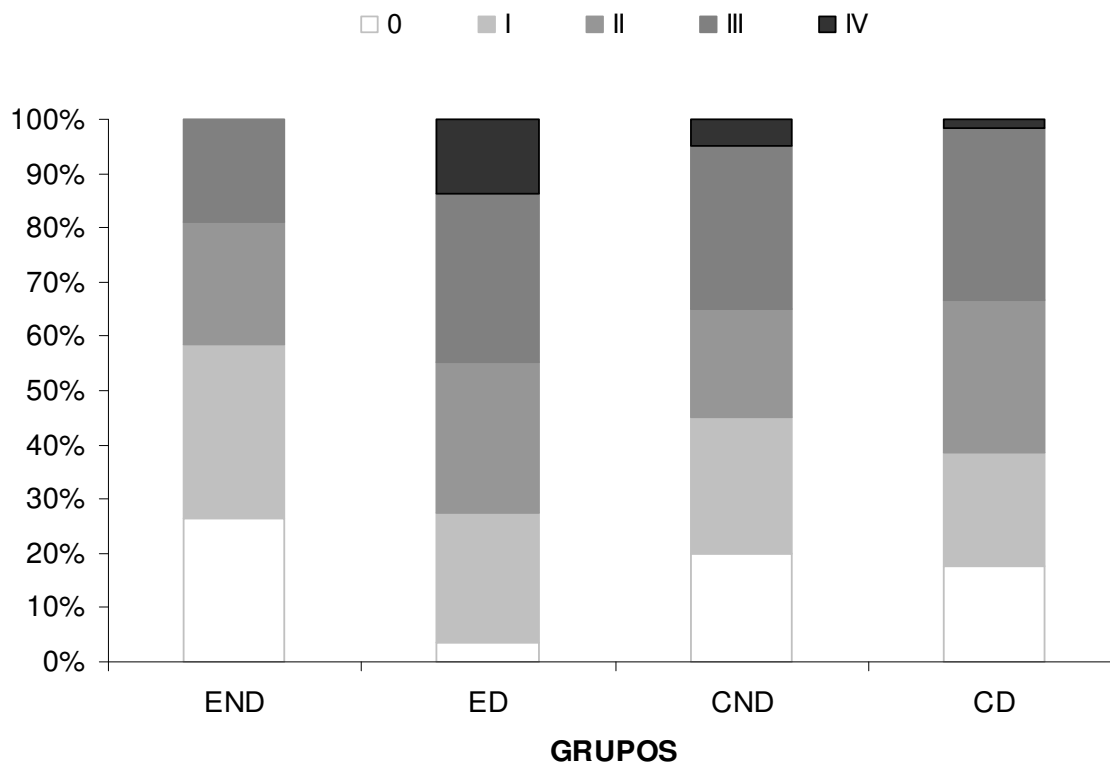


Figura 3- Gráfico representativo da classificação das ilhotas de Langerhans segundo o grau de insulite em camundongos NOD que praticaram exercício físico não diabético (n=8), exercício físico diabético (n =11), controle não diabético (n=1) e controle diabético (n=15). END = Grupo exercício não diabético; ED = Grupo exercício diabético; CND = Grupo controle não diabético; CD = Grupo controle diabético. Grau 0 = ilhota normal; Grau I = menos de 25% de infiltrado; Grau II = entre 25 e 80% de infiltrado; Grau III = acima de 80% de infiltrado celular e Grau IV = infiltração total da ilhota.

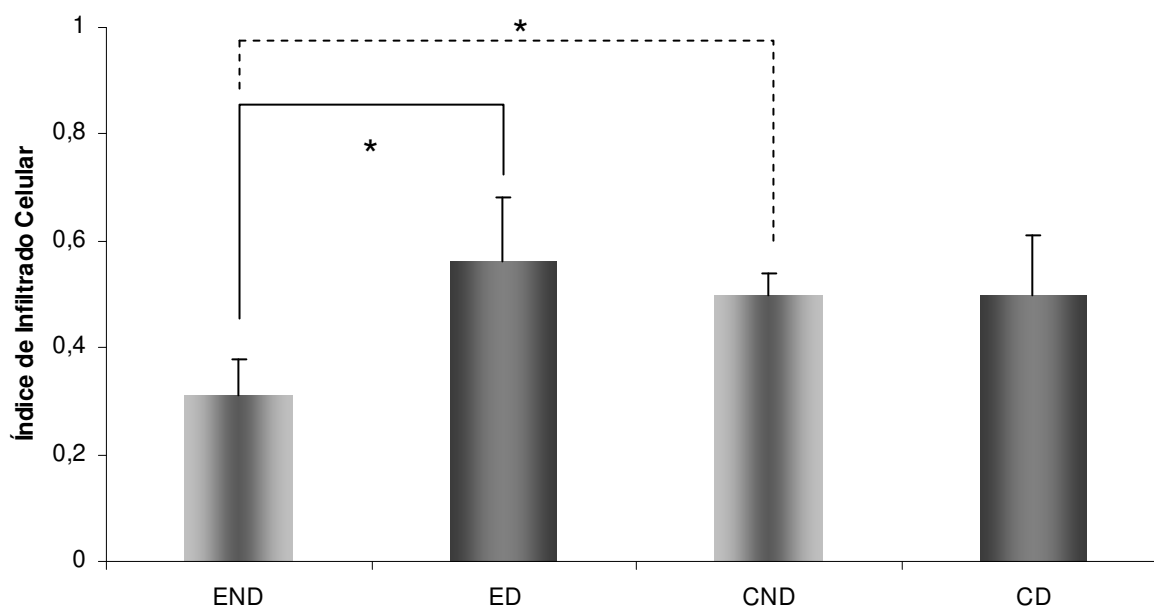


Figura 4- Índice de infiltrado celular em ilhotas de camundongos NOD que realizaram exercício físico voluntário e grupos controle, Os animais que realizaram exercício físico não diabético apresentaram índices significativamente reduzidos ($p < 0,01$) quando comparados com o grupo exercício diabético e grupo controle não diabético (END = 0,31; ED = 0,56; CND = 0,5 e CD = 0,5) . Os resultados estão expressos por média e desvio padrão. END = Grupo exercício não diabético; ED = Grupo exercício diabético; CND = Grupo controle não diabético; CD = Grupo controle diabético.

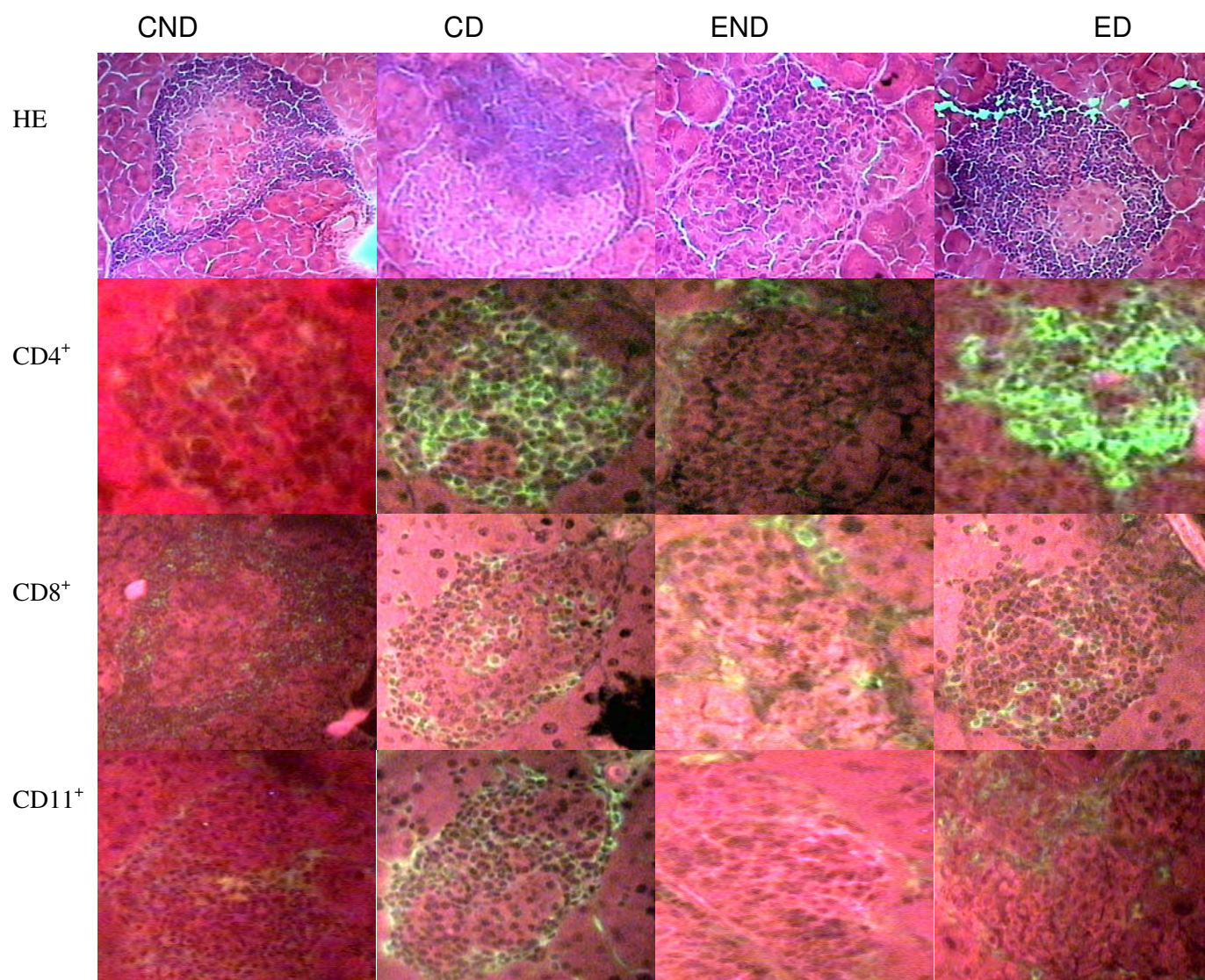


Figura 5- Fotomicrografias representativas da fenotipificação do infiltrado inflamatório no pâncreas dos animais controle não-diabético, controle diabéticos, exercício não-diabético e exercício diabético, por técnica de imunoistoquímica (imunofluorescência) para subpopulações de macrófagos .

4.3- Efeito do exercício físico na expressão da leptina no camundongo NOD

A análise da expressão de leptina através do método de ELISA no soro de camundongos NOD grupo exercício não diabético, exercício diabético, controle não diabético e controle diabético, não mostrou significância estatística. Porém, observamos que nos animais do grupo exercício não diabético a leptina apresenta tendência ao aumento de seus níveis em relação aos demais grupos (END = $2,14 \pm 1,27$; ED = $1,23 \pm 0,25$, CND = $1,49 \pm 0,16$ e CD = $1,16 \pm 0,27$).

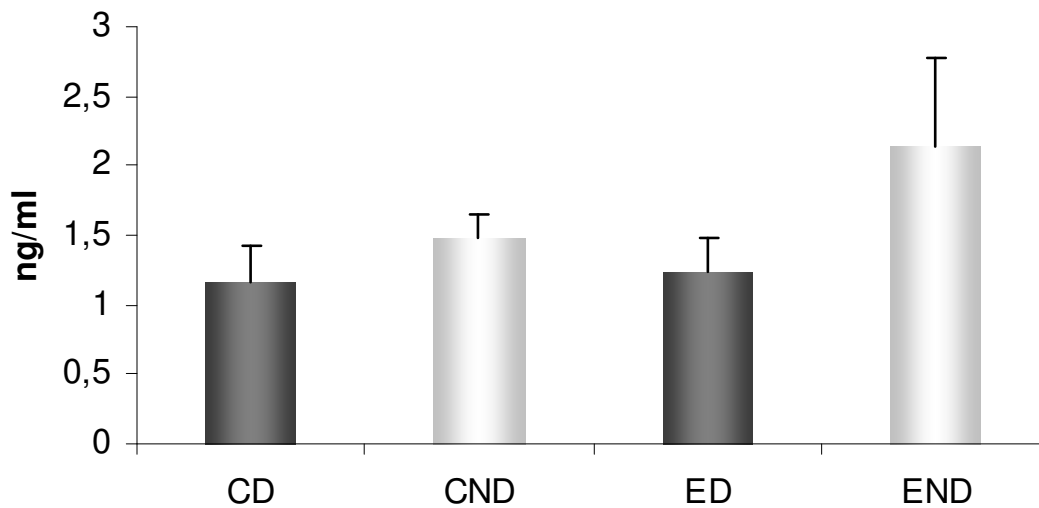


Figura 6- Expressão de leptina avaliada por meio da técnica ELISA no soro de camundongos NOD que realizaram exercício físico não diabéticos e diabéticos, e grupo controle não diabético e diabético. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$. END = Grupo exercício não diabético; ED = Grupo exercício diabético; CND = Grupo controle não diabético; CD = Grupo controle diabético.

4.4- Efeito do exercício físico na expressão das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-12, IFN-gama e TNF-alfa no camundongo NOD:

4.4.1- IL-4

A análise da expressão da citocina IL-4 através do método de ELISA no soro de camundongos NOD grupo exercício não diabético, exercício diabético, controle não diabético e controle diabético, não mostrou significância estatística. Porém, observamos que nos animais do grupo exercício não diabético a citocina IL-4 apresenta tendência a diminuição de seus níveis em relação aos demais grupos. (END = $3,4 \pm 0,5$; ED = $4,6 \pm 0,6$, CND = $4 \pm 0,9$ e CD = $3,6 \pm 0,9$).

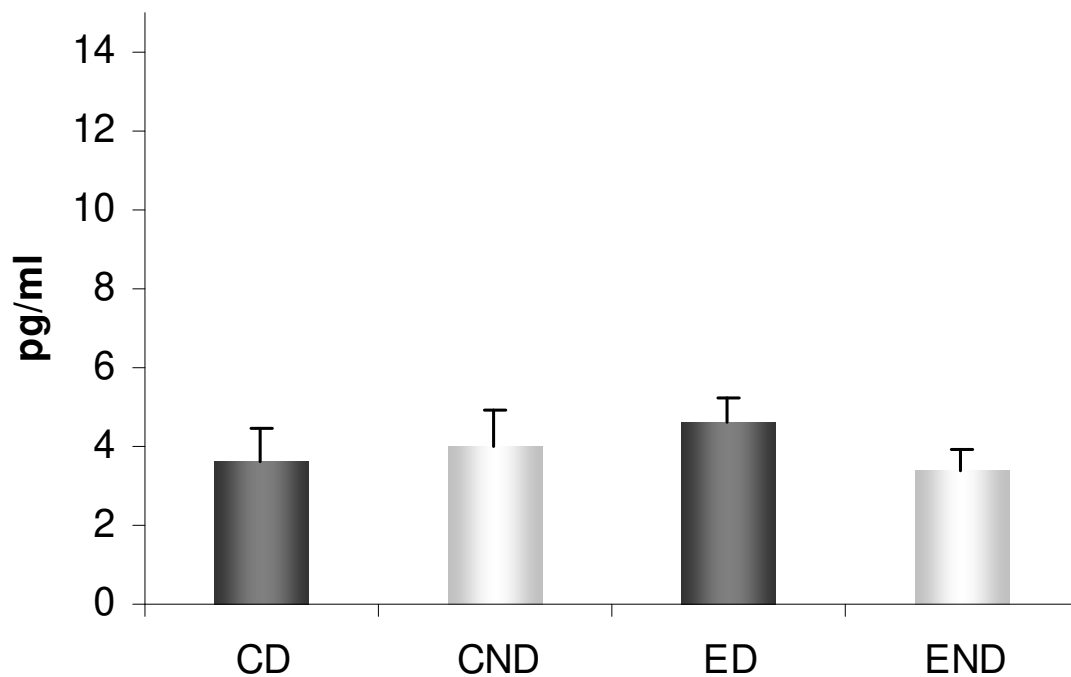


Figura 7- Expressão da citocina IL-4 avaliada por meio da técnica ELISA no soro de camundongos NOD que realizaram exercício físico não diabéticos e diabéticos, e grupo controle não diabético e diabético. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney, considerando $p < 0,05$. END = Grupo exercício não diabético; ED = Grupo exercício diabético; CND = Grupo controle não diabético; CD = Grupo controle diabético.

4.4.2- IL-1 β

A análise dos níveis séricos de IL-1 β através do método de ELISA no soro de camundongos NOD grupo exercício não diabético, exercício diabético, controle não diabético e controle diabético, mostrou aumento significativo dos grupos exercício não diabético e exercício diabético. Tendo significância estatística entre os grupos controle diabético e exercício diabético ($p < 0,05$). (END = $6,9 \pm 5,4$; ED = $6,5 \pm 2,2$; CND = $3,7 \pm 1,1$ e CD = $4,7 \pm 0,8$).

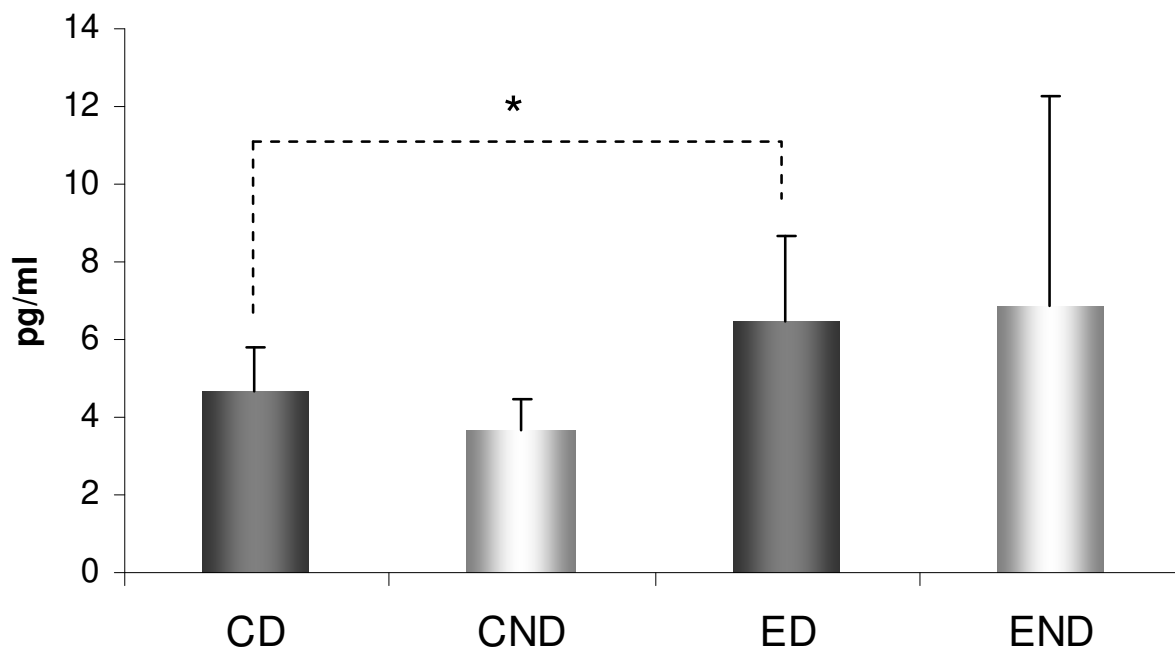


Figura 8- Expressão da citocina IL-1 β avaliada por meio da técnica ELISA no soro de camundongos NOD que realizaram exercício físico não diabéticos e diabéticos, e grupo controle não diabético e diabético. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney, considerando * $p < 0,05$. END = Grupo exercício não diabético; ED = Grupo exercício diabético; CND = Grupo controle não diabético; CD = Grupo controle diabético.

4.4.3- IL-12

A análise dos níveis séricos da citocina IL-12 através do método de ELISA no soro de camundongos NOD grupo exercício não diabético, exercício diabético, controle não diabético e controle diabético, mostrou aumento significativo do grupo exercício não diabético em relação aos demais. Tendo significância estatística entre os grupos exercício não diabético e exercício diabético ($p < 0,01$) e nos grupos exercício não diabético e controle não diabético ($p < 0,01$). (END = $356,3 \pm 75,3$; ED = $109 \pm 56,4$; CND = $140,3 \pm 63,6$ e CD = $94,8 \pm 15,4$).

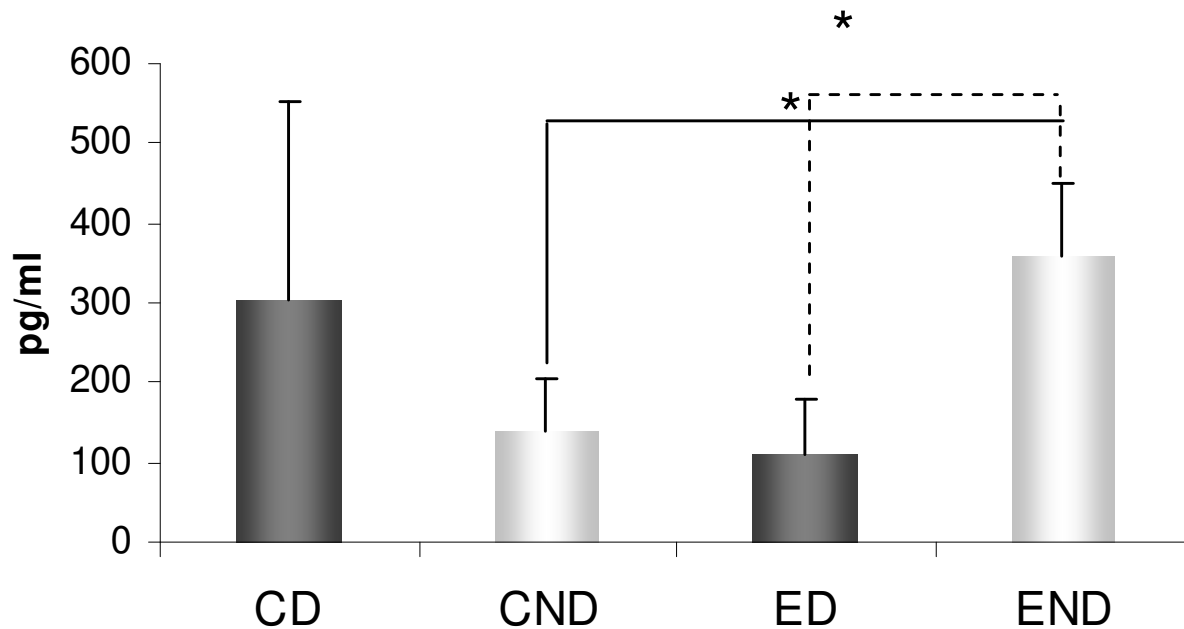


Figura 9- Expressão da citocina IL-12 avaliada por meio da técnica ELISA no soro de camundongos NOD que realizaram exercício físico não diabéticos e diabéticos, e grupo controle não diabético e diabético. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney, considerando $*p < 0,05$. END = Grupo exercício não diabético; ED = Grupo exercício diabético; CND = Grupo controle não diabético; CD = Grupo controle diabético.

4.4.4- IFN- γ

A análise dos níveis séricos de IFN- γ através do método de ELISA no soro de camundongos NOD grupo exercício não diabético, exercício diabético, controle não diabético e controle diabético, mostrou aumento significativo nos grupos exercício não diabético e controle não diabético. Tendo significância estatística entre os grupos controle não diabético e controle diabético ($p < 0,05$), e nos grupos exercício não diabético e exercício diabético ($p < 0,01$) (END = $26,5 \pm 3$; ED = $15,2 \pm 2,7$; CND = $27,1 \pm 3,6$ e CD = $14,6 \pm 2,4$).

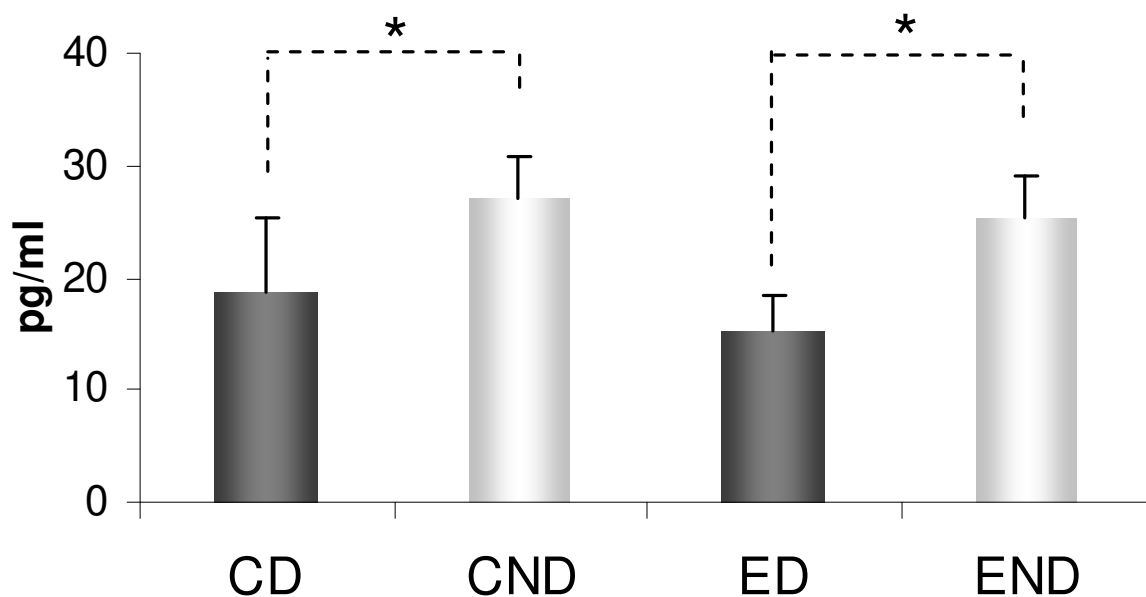


Figura 10- Expressão da citocina IFN- γ avaliada por meio da técnica ELISA no soro de camundongos NOD que realizaram exercício físico não diabéticos e diabéticos, e grupo controle não diabético e diabético. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney, considerando $*p < 0,05$. END = Grupo exercício não diabético; ED = Grupo exercício diabético; CND = Grupo controle não diabético; CD = Grupo controle diabético.

4.4.5- TNF- α

A análise dos níveis séricos da citocina TNF- α através do método de ELISA no soro de camundongos NOD grupo exercício não diabético, exercício diabético, controle não diabético e controle diabético, mostrou aumento significativo nos grupos exercício não diabético e exercício diabético. Tendo significância estatística entre os grupos exercício diabético e controle diabético ($p < 0,05$). (END = $3,8 \pm 2,8$; ED = $4,3 \pm 1,6$; CND = $2,2 \pm 0,6$ e CD = $2,5 \pm 1$).

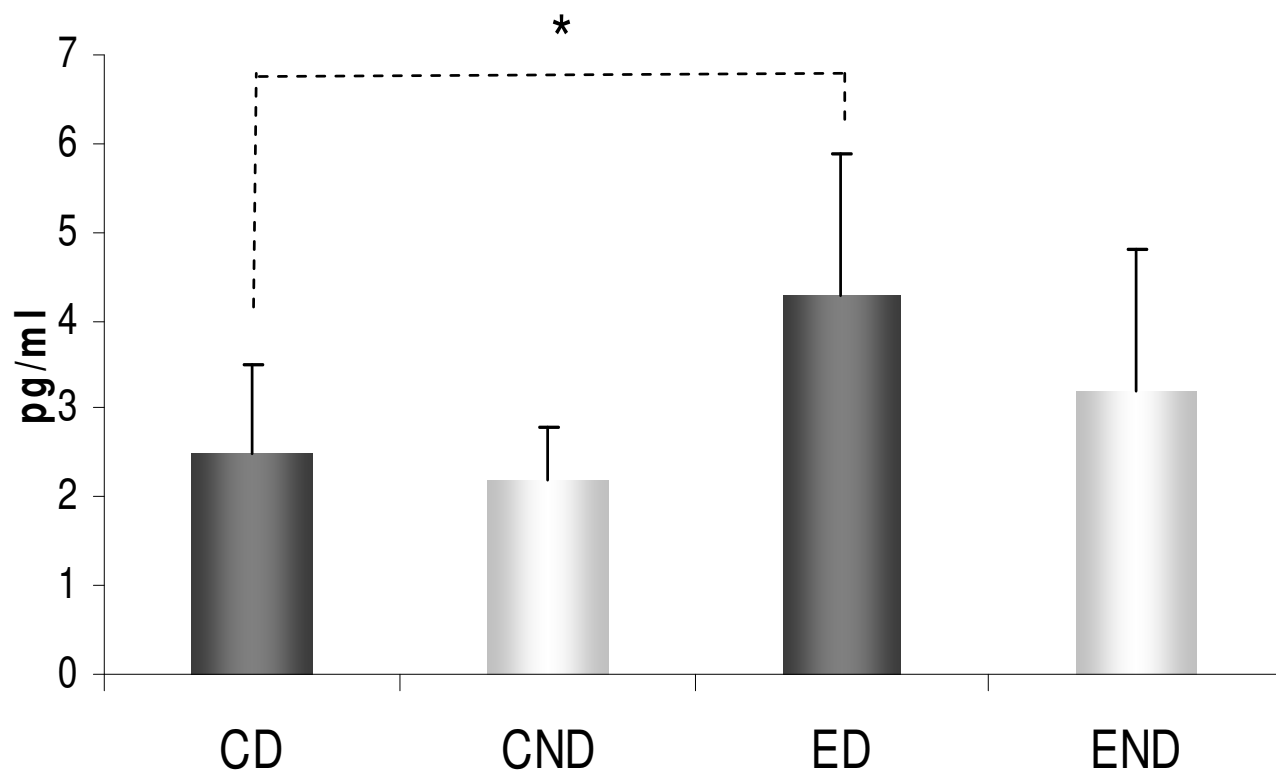


Figura 11- Expressão da citocina TNF- α avaliada por meio da técnica ELISA no soro de camundongos NOD que realizaram exercício físico não diabéticos e diabéticos, e grupo controle não diabético e diabético. Os resultados estão expressos pela média e desvio padrão. Para a análise estatística foi utilizado o teste Mann-Whitney, considerando $*p < 0,05$. END = Grupo exercício não diabético; ED = Grupo exercício diabético; CND = Grupo controle não diabético; CD = Grupo controle diabético.

5- DISCUSSÃO

O diabetes tipo 1 resulta da destruição das células β nas ilhotas pancreáticas devido processo inflamatório crônico autoimune(64). Grande parte dos conhecimentos da fisiopatologia desta doença está fundamentada em estudos realizados com camundongos da linhagem NOD. Nestes animais, hiperglicemia e início do diabetes são atribuídos à infiltração de leucócitos auto-reativos nas ilhotas de Langerhans que induzem a destruição das células β (65). Devido à grande similaridade ao DM-1 em humanos, o camundongo NOD é usado amplamente como ferramenta para estudos pré-clínicos visando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas(66).

O exercício físico vem sendo muito utilizado como fonte de estudo objetivando o controle da manifestação do diabetes, já que sua prática regular oferece proteção contra várias causas de mortalidade, principalmente contra doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2(67).

O mecanismo que associa o exercício com mudanças imunológicas inclui fatores neuroendócrinos como a adrenalina, noradrenalina, hormônio do crescimento e cortisol, onde esses hormônios aumentam as suas concentrações durante o exercício, estimulando células do sistema imunológico, como células NK, células T e neutrófilos(68).

KELLER et al. (1993) (69), após utilizarem camundongos NOD para investigar o efeito exercício físico (corrida) sobre o diabetes tipo 1 e nos níveis de glicose no sangue, concluem que o camundongo NOD é um excelente modelo experimental para o estudo do exercício no diabetes 1.

Baseados nestas considerações, estudamos o efeito do exercício físico na incidência do diabetes tipo 1 do camundongo NOD disponibilizando a atividade física diária por 60 minutos/dia 5 vezes na semana, iniciando na 4ª semana até a 28ª semana de vida (total de 24 semanas, salvo os animais que tornaram-se diabéticos e foram sacrificados) de treinamento e com seus respectivos controles, obtendo como resultado a diminuição na incidência do diabetes no grupo exercício comparado com grupo controle.

Além disso, pode-se observar distribuição mais homogênea da incidência do diabetes no grupo exercício, em intervalos semanais, quando comparada com o grupo controle. O pico de incidência do diabetes tipo 1 nos animais controle variam entre a 16 e 18 semana de vida do animal.

Outro resultado relevante é quanto ao processo inflamatório das ilhotas do pâncreas dos animais, onde o escore dos animais do grupo exercício não diabéticos apresentaram maior porcentagem de ilhotas grau 0 e 1, e nenhuma ilhota grau 4, mostrando baixo grau de comprometimento das ilhotas, quando comparado com grupo exercício diabético, grupo controle não diabético e diabético.

Citocinas podem estar envolvidas nos efeitos benéficos a saúde causados pelo exercício, realizando proteção contra a inflamação sistêmica(67).

O primeiro estudo sugerindo que o exercício físico induz resposta das citocinas em murinos foi realizado em 1983. Neste estudo injetava-se intraperitonealmente, em ratos, plasma humano obtido após a realização de exercício físico, levando ao aumento da temperatura retal. Sendo que, o plasma obtido antes do exercício físico não produzia este efeito(68).

O exercício físico aumenta a quantidade sérica de IL-6, neste caso, caracterizada com citocina antiinflamatória, já que estimula o aparecimento de outras citocinas anti-inflamatórias na circulação, como IL-1ra e IL-10, e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-1 β (67).

Os níveis plasmáticos de várias citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-6, em resposta ao exercício estão aumentados. Sendo esta ação equilibrada pela liberação de citocinas inibitórias (IL-1ra e TNF- α r) e citocinas anti-inflamatórias (IL-10). Sugerindo que citocinas inibitórias e anti-inflamatórias restringem a resposta inflamatória do exercício(68).

PEAKE & cols. (2005) (70), estudaram o efeito de diferentes intensidades de exercício nas concentrações de citocinas, tendo como resultado o aumento significativo nas concentrações de citocinas anti-inflamatórias IL-12 e

IL-1ra em todas as intensidades de exercício físico. Nosso estudo demonstrou resultados semelhantes na análise da expressão da citocina IL-12, obtendo um aumento significativo desta citocina no grupo de exercício não diabético.

Donovan et al. (2007) (74), estudando o efeito do exercício físico de alta intensidade em cavalos na expressão de citocinas pró-inflamatórias antes e após o exercício físico, verificaram o aumento das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. Pedersen e Hoffman (2000), relataram em seu estudo o aumento de TNF- α e IL-1 β em atletas humanos após exercício exaustivo (71, 72). Entretanto, Suzuki et al. (2000)(72), não observaram nenhuma alteração nos níveis de citocinas pro-inflamatórias em seu estudo. No presente estudo, os níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , estavam elevados nos grupos exercício diabético e exercício não diabético, com resultados semelhantes ao encontrado por Pedersen e Hoffman(2000), e Donovan et. al. (2007).

OGAWA et. al. (2003) (72), estudou o efeito do exercício físico, no caso caminhada, em mulheres de diferentes faixas etárias, concluindo que o exercício físico habitual não causa alterações no balanço entre as citocinas do tipo Th1 e Th2. De acordo com o achado nesta pesquisa, em nosso estudo a citocina IL-4 não apresentou diferenças estatísticas entre os diferentes grupos. Contudo os grupos de animais que realizaram exercício mostram tendência a níveis mais baixos que os que não realizaram exercício.

Fitzgerald et. al. (1988) (75), relata que o exercício físico realizado em seus diversos níveis causam diferentes efeitos na função do sistema imune. Exercício físico de moderada intensidade aumentam a resistência contra infecções em humanos, mas treinamento físico de alta intensidade predispõem atletas a infecções do trato respiratório.

MATTHEW et al (2003) (37), mostraram que o exercício físico pode alterar os níveis de leptina na circulação em humanos (mulheres), mas este efeito depende do tipo de exercício que é realizado. Então, sugerem que exercício físico de curta duração e baixa intensidade não altera os níveis de leptina sérica. Porém,

exercícios de alta intensidade, podendo ser de longa ou curta duração alteram os níveis de leptina circulante, levando a uma diminuição desses níveis. Concluem que, essas alterações causadas pelo exercício devem ser devido a alterações no balanço energético do organismo.

Em nosso estudo, os níveis séricos de leptina em camundongos NOD grupo controle e grupo exercício, não mostrou diferença significativa, mas sugere que a leptina nos animais do grupo exercício não diabético tendência ao aumento de seus níveis.

O interesse pelos resultados do efeito da atividade física no sistema imune não é apenas da fisiologia do exercício e sim é válido para medicina clínica e como suporte para atletas e não atletas na recomendação do exercício físico(68).

As diferenças entre os resultados na expressão das citocinas antes e após o exercício podem ocorrer devido ao tipo, intensidade e tempo de treinamento físico. Além do momento da coleta da amostra para verificação da expressão das citocinas e leptina.

Baseado em nosso estudo e na revisão bibliográfica sobre o tema em questão, podemos observar que o exercício físico voluntário realizado regularmente pode auxiliar no combate ao diabetes, como já é discutido na comunidade médica mundial, porém se faz necessário a realização de outros estudos para esclarecer de que forma o exercício físico causa este efeito e de que maneira este mecanismo de combate a determinadas doenças deve ser realizado.

6- CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que o exercício físico voluntário:

1. 1h/dia, 5 vezes/semana em camundongo NOD fêmeas a partir da 4^a semana de vida foi capaz de diminuir a expressão do diabetes mellitus tipo 1 em relação ao grupo controle em camundongos NOD.
2. Diminuiu o índice de infiltrado inflamatório nas ilhotas pancreáticas.
3. Não resulta em alterações significativas nos níveis séricos de leptina E IL-4
4. Promove o aumento significativo nos níveis séricos das citocinas IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL-1 β em relação ao grupo não submetido ao exercício físico.
5. As citocinas IL-12 e IFN- γ apresentaram seus maiores valores no grupo exercício não diabético, e a citocina TNF- α no grupo exercício diabético.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberti KG, Zimmet PZ. New diagnostic criteria and classification of diabetes--again? *Diabet Med* 1998;15(7):535-6.
2. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 1986;314(21):1360-8.
3. Atkinson MA, Kaufman DL, Campbell L, Gibbs KA, Shah SC, Bu DF, et al. Response of peripheral-blood mononuclear cells to glutamate decarboxylase in insulin-dependent diabetes. *Lancet* 1992;339(8791):458-9.
4. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Doniach D. Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet* 1974;2(7892):1279-83.
5. Palmer JP, Cooney MK, Crossley JR, Hollander PH, Asplin CM. Antibodies to viruses and to pancreatic islets in nondiabetic and insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* 1981;4(5):525-8.
6. Kikutani H, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol* 1992;51:285-322.
7. Schwartz SL, Hanson C, Lucas C, Rosenblatt S, Rosenstock J, Whittier F, et al. Double-blind, placebo-controlled study of ramipril in diabetics with mild to moderate hypertension. *Clin Ther* 1993;15(1):79-87.
8. Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 1994;15(4):516-42.
9. Bach JF, Mathis D. The NOD mouse. *Res Immunol* 1997;148(5):285-6.
10. Lafferty KJ. Immunobiology of autoimmune diabetes. *Res Immunol* 1997;148(5):313-9.
11. Keller RJ. Cellular immunity to human insulin in individuals at high risk for the development of type I diabetes mellitus. *J Autoimmun* 1990;3(3):321-7.

12. Harrison LC, Chu SX, DeAizpurua HJ, Graham M, Honeyman MC, Colman PG. Islet-reactive T cells are a marker of preclinical insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1992;89(4):1161-5.
13. Honeyman MC, Harrison LC. The immunologic insult in type 1 diabetes. *Springer Semin Immunopathol* 1993;14(3):253-74.
14. Durinovic-Bello I, Hummel M, Ziegler AG. Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. *Diabetes* 1996;45(6):795-800.
15. Nepom GT, Erlich H. MHC class-II molecules and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 1991;9:493-525.
16. Atkinson MA. Mechanisms underlying the loss of self tolerance in NOD mice. *Res Immunol* 1997;148(5):301-6.
17. Corbett JA, Mikhael A, Shimizu J, Frederick K, Misko TP, McDaniel ML, et al. Nitric oxide production in islets from nonobese diabetic mice: aminoguanidine-sensitive and -resistant stages in the immunological diabetic process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(19):8992-5.
18. Eizirik DL. Nitric oxide synthase and antimicrobial armature of human macrophages. *J Infect Dis* 1994;170(3):744-6.
19. Pociot F, Ronningen KS, Bergholdt R, Lorenzen T, Johannesen J, Ye K, et al. Genetic susceptibility markers in Danish patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes--evidence for polygenicity in man. Danish Study Group of Diabetes in Childhood. *Autoimmunity* 1994;19(3):169-78.
20. Eizirik DL, Flodstrom M, Karlens AE, Welsh N. The harmony of the spheres: inducible nitric oxide synthase and related genes in pancreatic beta cells. *Diabetologia* 1996;39(8):875-90.

21. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Shi Y, Morgan AR, Bleackley RC. DNA fragmentation is an early event in cytokine-induced islet beta-cell destruction. *Diabetologia* 1994;37(8):733-8.
22. Thomas HE, Darwiche R, Corbett JA, Kay TW. Evidence that beta cell death in the nonobese diabetic mouse is Fas independent. *J Immunol* 1999;163(3):1562-9.
23. Iwahashi H, Hanafusa T, Eguchi Y, Nakajima H, Miyagawa J, Itoh N, et al. Cytokine-induced apoptotic cell death in a mouse pancreatic beta-cell line: inhibition by Bcl-2. *Diabetologia* 1996;39(5):530-6.
24. Kay TW, Chaplin HL, Parker JL, Stephens LA, Thomas HE. CD4+ and CD8+ T lymphocytes: clarification of their pathogenic roles in diabetes in the NOD mouse. *Res Immunol* 1997;148(5):320-7.
25. Bergerot I, Arreaza G, Cameron M, Chou H, Delovitch TL. Role of T-cell anergy and suppression in susceptibility to IDDM. *Res Immunol* 1997;148(5):348-58.
26. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 1980;29(1):1-13.
27. Pozzilli P, Signore A, Williams AJ, Beales PE. NOD mouse colonies around the world--recent facts and figures. *Immunol Today* 1993;14(5):193-6.
28. Pavin EJ, Zollner RL. Implantação da linhagem NOD mice (camundongos diabéticos não-obesos) no Brasil: contribuição deste modelo animal ao estudo do diabetes mellitus insulino-dependente e outras doenças autoimunes. *Arq Bras Endo Metabol.* 1994;38:105-8.
29. Falcone M, Sarvetnick N. The effect of local production of cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin Immunol* 1999;90(1):2-9.
30. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996;85(3):291-7.

31. Cohen IR. Immunologically specific treatment of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus of NOD mice. *J Autoimmun* 1992;5 Suppl A:227-30.
32. Wong FS, Janeway CA, Jr. The role of CD4 and CD8 T cells in type I diabetes in the NOD mouse. *Res Immunol* 1997;148(5):327-32.
33. Shizuru JA, Taylor-Edwards C, Banks BA, Gregory AK, Fathman CG. Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. *Science* 1988;240(4852):659-62.
34. Bedossa P, Bendelac A, Bach JF, Carnaud C. Syngeneic T cell transfer of diabetes into NOD newborn mice: in situ studies of the autoimmune steps leading to insulin-producing cell destruction. *Eur J Immunol* 1989;19(10):1947-51.
35. Gallen I. Exercise in type 1 diabetes. *Diabet Med* 2003;20 Suppl 1:2-5.
36. Steppel JH, Horton ES. Exercise in the management of type 1 diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 2003;4(4):355-60.
37. Hulver MW, Houmard JA. Plasma leptin and exercise: recent findings. *Sports Med* 2003;33(7):473-82.
38. Itoh CE, Kizaki T, Hitomi Y, Hanawa T, Kamiya S, Ookawara T, et al. Down-regulation of beta2-adrenergic receptor expression by exercise training increases IL-12 production by macrophages following LPS stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322(3):979-84.
39. Suarez-Pinzon WL, Mabley JG, Power R, Szabo C, Rabinovitch A. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice by inducing apoptosis of islet-infiltrating leukocytes. *Diabetes* 2003;52(7):1683-8.
40. Ventura-Oliveira D, Vilella CA, Zanin ME, Castro GM, Moreira Filho DC, Zollner RL. Kinetics of TNF-alpha and IFN-gamma mRNA expression in islets and spleen of NOD mice. *Braz J Med Biol Res* 2002;35(11):1347-55.

41. Rabinovitch A. Animal models of type 1 diabetes are relevant to human IDDM--use caution. *Diabetes Metab Rev* 1998;14(2):189-90.
42. Suarez-Pinzon WL, Korbitt GS, Rayat G, Sorensen O, Power RF, Rajotte RV, et al. Neonatal porcine islet xenografts in nonobese diabetic mice: effects on blood glucose and analysis of cytokines expressed in the islet grafts. *Transplant Proc* 1998;30(2):654-5.
43. Falcone M, Yeung B, Tucker L, Rodriguez E, Sarvetnick N. A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med* 1999;190(7):963-72.
44. Hartemann-Heurtier A, Richard MF, Boitard C. Absence of significant Th2 response in diabetes-prone non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin Exp Immunol* 1999;116(2):225-30.
45. Campbell IL, Iscaro A, Harrison LC. IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Cytotoxicity to murine islets of Langerhans. *J Immunol* 1988;141(7):2325-9.
46. Gurlo T, Kawamura K, von Grafenstein H. Role of inflammatory infiltrate in activation and effector function of cloned islet reactive nonobese diabetic CD8+ T cells: involvement of a nitric oxide-dependent pathway. *J Immunol* 1999;163(11):5770-80.
47. Bradley LM, Asensio VC, Schioetz LK, Harbertson J, Krah T, Patstone G, et al. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol* 1999;162(5):2511-20.
48. Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A. Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin 1. *Diabetes* 1988;37(1):133-6.

49. Zhang XZ, Li S, Wu XZ. [Effects of Tripterygiitotorum in the treatment of insulin dependent diabetes mellitus with islet transplantation]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1994;14(8):451-3.
50. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4(5):371-9.
51. La Cava A, Alviggi C, Matarese G. Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. *J Mol Med* 2004;82(1):4-11.
52. Juge-Aubry CE, Meier CA. Immunomodulatory actions of leptin. *Mol Cell Endocrinol* 2002;194(1-2):1-7.
53. Fruhbeck G, Salvador J. Relation between leptin and the regulation of glucose metabolism. *Diabetologia* 2000;43(1):3-12.
54. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998;394(6696):897-901.
55. Sandoval DA, Davis SN. Leptin: metabolic control and regulation. *J Diabetes Complications* 2003;17(2):108-13.
56. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology. *J Immunol* 2005;174(6):3137-42.
57. Lohmus M, Olin M, Sundstrom LF, Troedsson MH, Molitor TW, El Halawani M. Leptin increases T-cell immune response in birds. *Gen Comp Endocrinol* 2004;139(3):245-50.
58. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Bloom SR, Lechler RI. Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol* 2002;72(2):330-8.
59. Sweeney G. Leptin signalling. *Cell Signal* 2002;14(8):655-63.

60. Lord G. Role of leptin in immunology. *Nutr Rev* 2002;60(10 Pt 2):S35-8; discussion S68-84, 85-7.
61. Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol* 2005;174(11):6820-8.
62. Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 1999;194(1):6-11.
63. Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sanchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell Immunol* 2000;199(1):15-24.
64. Yoon JW, Jun HS. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 2001;928:200-11.
65. Thomas HE, Kay TW. Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes Metab Res Rev* 2000;16(4):251-61.
66. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 2005;23:447-85.
67. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005;98(4):1154-62.
68. Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br J Sports Med* 2000;34(4):246-51.
69. Keller JB, Bevier WC, Jovanovic-Peterson L, Formby B, Durak EP, Peterson CM. Voluntary exercise improves glycemia in non-obese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Res Clin Pract* 1993;22(1):29-35.

70. Peake JM, Suzuki K, Hordern M, Wilson G, Nosaka K, Coombes JS. Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage. *Eur J Appl Physiol* 2005;95(5-6):514-21.
71. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 2000;80(3):1055-81.
72. Ogawa K, Oka J, Yamakawa J, Higuchi M. Habitual exercise did not affect the balance of type 1 and type 2 cytokines in elderly people. *Mech Ageing Dev* 2003;124(8-9):951-6.
73. Suzuki K, Yamada M, Kurakake S, Okamura N, Yamaya K, Liu Q, et al. Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 2000;81(4):281-7.
74. Donovan DC, Jackson CA, Colahan PT, Norton N, Hurley DJ. Exercise-induced alterations in pro-inflammatory cytokines and prostaglandin F2alpha in horses. *Vet Immunol Immunopathol* 2007;118(3-4):263-9.
75. Nieman DC. Current perspective on exercise immunology. *Curr Sports Med Rep* 2003;2(5):239-42.