

**Universidade Estadual Paulista
"Julio de Mesquita Filho"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Efeito da suplementação de curcumina e do
exercício físico aeróbico sobre o
desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 1 em
camundongos diabéticos não obesos (NOD)**

Leandro Kansuke Oharomari

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Alimentos e Nutrição
para obtenção do título de Mestre em
Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências
Nutricionais

Orientador: Prof. Dr. Anderson Marliere
Navarro.

Araraquara
2016

Efeito da suplementação de curcumina e do exercício físico aeróbio sobre o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 1 em camundongos diabéticos não obesos (NOD)

Leandro Kansuke Oharomari

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição.

Área de Concentração: Ciências Nutricionais

Orientador: Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro

Araraquara
2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

036e

Oharomari, Leandro Kansuke

Efeito da suplementação de curcumina e do exercício físico aeróbio sobre o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 1 em camundongos diabéticos não obesos (NOD) / Leandro Kansuke Oharomari – Araraquara, 2016.
37 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição, área de concentração: Ciências Nutricionais.

Orientador: Anderson Marliere Navarro.

1. Diabetes mellitus tipo 1. 2. Curcumina. 3. Exercício físico. 4. Camundongo. 5. NOD. 6. Insulites. I. Navarro, Anderson Marliere, orient. II. Título.

CAPES: 40500005

LEANDRO KANSUKE OHAROMARI

"Efeito da suplementação de curcumina e do exercício físico aeróbico sobre o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 1 em camundongos diabéticos não obesos (NOD)"

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição

Araraquara, 17 de outubro de 2016.

BANCA EXAMINADORA


ANDERSON MARLIERE NAVARRO


CAMILA DE MORAES


THABATA KOESTER WEBER

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara pelo aprendizado científico e acadêmico concedido durante todo o período da pós graduação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Anderson Marliere Navarro pela paciência, confiança e aprendizado.

À Profa. Dra. Camila de Moraes por todo ensino desde a graduação até o momento e no auxílio da elaboração do projeto assim como na execução.

À aluna de iniciação científica Sheila Sayuri Shimanuki, pela ajuda no cuidado dos animais.

Ao Maurício, Ronny e Adalberto, pela colaboração no momento do sacrifício dos animais e coleta de amostras.

Aos técnicos Vani e Eduardo que auxiliaram na histologia e na análise das citocinas, respectivamente.

Aos alunos de graduação da Escola de Educação Física e Esportes de Ribeirão Preto, Anderson, Mateus e Macário, por auxiliar no teste incremental de velocidade máxima durante o protocolo experimental.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Ministério da Educação (CAPES – MEC) pela bolsa de estudos.

À Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelo auxílio financeiro na compra de materiais do projeto.

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune caracterizada pela diminuição da produção de insulina pelo pâncreas sendo o principal mecanismo fisiopatológico a infiltração de células inflamatórias, liberação de citocinas pró-inflamatórias e consequente destruição das células beta pancreáticas. **Objetivo:** testar o possível efeito anti-inflamatório da suplementação de curcumina e do exercício físico aeróbio de moderada intensidade sobre o desenvolvimento do DM1 em camundongos *non-obese diabetic* (NOD). **Métodos:** foram selecionados 48 camundongos NOD com cinco semanas de vida e divididos em quatro grupos (n=12): controle (C), suplementados com curcumina (CUR), treinados (T) e por último o grupo treinado e suplementado (TC). O experimento durou 20 semanas, a cada duas semanas era medida a glicemia através de glicosímetro. Animais que apresentaram glicemia >250 mg/dL foram classificados como diabéticos. No final foi analisado distribuição de insulites no pâncreas, citocinas inflamatórias, insulina e glicemia de jejum no soro. **Resultados:** Após 25 semanas de vida a incidência de diabetes foi baixa em todos os grupos (0-16,6%) e não houve diferença entre os grupos nos valores finais de glicemia de jejum. Entretanto, foi possível observar que os animais dos grupos que treinaram apresentaram menos insulites comparados com os grupos sedentários. Não houve efeito da suplementação de curcumina. **Conclusão:** o exercício físico, mas não a suplementação de curcumina, previne insulites de camundongos NOD.

Palavras-chave: Curcumina. Exercício físico. Diabetes mellitus tipo 1. Camundongo. NOD. Insulites.

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by decreasing of pancreas insulin production. The main pathophysiological mechanism is immune cell infiltration, release of inflammatory cytokines and consequent destruction of beta pancreatic cells. **Objective:** it is to test possible anti-inflammatory effects of curcumin supplementation and moderate-aerobic exercise on development of T1D in non-obese diabetic mouse (NOD). **Methods:** At five weeks old, forty-eight NOD were randomly separated into four groups (n=12): control (C), curcumin (CUR), trained (T), and trained plus curcumin (TC). Experiment lasted 20 weeks; every two week glycemic was measured by glucometer. Animals which had glycemic more than 250 mg/dL were classified as diabetic. In the final of protocol, insulitis, cytokines and insulin were measured. **Results:** After 20 weeks, all groups showed low diabetes incidence (0-16.6%), and there were no difference in fasting blood glucose between groups. However, the two groups of trained animals had less insulitis than other sedentary groups. Curcumin supplementation had any effects. **Conclusion:** exercise, but not curcumin supplementation, prevents insulitis in NOD mice.

Key-words: Curcumin. Exercise. Type 1 diabetes. NOD. Insulitis.

Sumário

Introdução Expandida	7
Capítulo 1	16
Introdução	18
Métodos	18
Resultados	20
Discussão	22
Considerações Finais	27
Referências	28
Anexo	36

INTRODUÇÃO EXPANDIDA

O diabetes mellitus é uma doença caracterizada por distúrbios metabólicos, principalmente dos carboidratos, devido à ausência de insulina ou problemas na sua sinalização. O diabetes é dividido em duas categorias: o diabetes tipo 1 (DM1) e o diabetes tipo 2. O diabetes tipo 2 é o mais comum e está associado com a resistência à insulina nos tecidos periféricos principalmente fígado, músculos e tecido adiposo (1).

O DM1 é caracterizado pela deficiência absoluta na produção de insulina devido à destruição das células β , células responsáveis pela produção desse hormônio, por isso era denominado como diabetes insulino-dependente. Seu diagnóstico é mais frequente em crianças e adolescentes e representa 95% dos casos de diabetes diagnosticados nesta faixa etária (2). Os primeiros sinais clínicos são: glicemia elevada, polifagia, poliúria e polidipsia. Esses sinais aparecem somente quando mais de 80% das células β pancreáticas estiverem destruídas (3).

O DM1 pode ser classificado em dois grandes grupos: o primeiro, diabetes mellitus tipo 1A (T1A) tem caráter autoimune e seu diagnóstico é confirmado pela presença de anticorpos específicos para as ilhotas de Langerhans. O segundo, diabetes mellitus tipo 1B (T1B) não apresenta marcadores autoimunes e sua etiologia é desconhecida, também conhecida como DM1 idiopática (4).

O DM1 mais comum é uma doença autoimune. Dados de 2007 mostram que o número de pessoas com diabetes tipo 1 em todo o mundo

era de aproximadamente 4,9 milhões, com diagnóstico de 70 mil novos casos por ano (5). Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2014), 7,6 a cada 100 mil crianças com menos de 15 anos possuem DM1 no Brasil (6). Forlenza e Rewers (2011) concluíram que a incidência do DM1 cresce 3-5% ao ano principalmente em países desenvolvidos (7). Segundo o *Department of Health and Human Service, Center of Disease Control and Prevention* em *National Diabetes Fact Sheet* (2011) não existe meio de prevenção do DM1 cujos principais fatores de risco são genéticos e ambientais (8). Atualmente o tratamento do DM1 é a insulinoaterapia, entretanto, outros tratamentos estão em aprimoramento como o uso de outros agentes antidiabéticos, como as incretinas e análogos de GLP-1, o transplante de pâncreas e o uso de células tronco. O uso de insulina ainda é a melhor opção para o tratamento visto a necessidade de altas doses de imunossupressores nesses dois últimos casos. Além disso, mais estudos em longo prazo são necessários para esses novos tratamentos (5).

Mecanismos inflamatórios tem importante papel no desenvolvimento do DM1 que depende fundamentalmente de três etapas. A primeira é a detecção de antígenos das células β pelo sistema imune, que pode ocorrer pela morte celular programada ou pela presença de vírus. A segunda é a necessidade de uma resposta pró-inflamatória com magnitude suficiente para destruição das células β . Isso ocorre pela ativação de células T CD4 e CD8, células dendríticas, macrófagos e células Natural Killer que liberam citocinas inflamatórias, por exemplo, interleucina 1- β , interferon- γ e fator de

necrose tumoral- α . Por último, os mecanismos de regulação das respostas imunes devem ser deficiente a ponto de não cessar o processo inflamatório já estabelecido (9). Isso ocorre principalmente pelo desequilíbrio entre células T regulatórias e efectoras (Treg/Teffs) que são controladas por citocinas como IL-2, IL-7 e IL-15 (10).

Ainda não se sabe exatamente quais são os fatores que desencadeiam esses processos, porém é reconhecido que existe importante papel genético e ambiental. Do ponto de vista genético sabe-se que quando um indivíduo possui DM1 seu irmão tem um risco de 6% de desenvolver a doença, comparado com 0,4% da população. Além disso, é visto a associação entre o aumento na incidência de DM1 com mutações de alguns locos genéticos principalmente associados ao antígeno leucocitário humano ou do inglês *human leukocyte antigen* (HLA) e alguns genes que são expressos nas células do sistema imune. Hoje são conhecidos mais de 40 locos genéticos que estão relacionados com a suscetibilidade de desenvolver essa doença (11). A participação de fatores ambientais no desenvolvimento do DM1 fica clara quando se observa o fato de que apenas 50% dos homozigotos suscetíveis para o DM1 desenvolvem a doença (12). Outro ponto é o aumento da incidência em países desenvolvidos que não pode ser explicado apenas com fatores genéticos (13–17). A presença de infecção, por rota vírus como exemplo, ou ausência delas, como em biotérios livre de patógenos, também podem aumentar o risco de desenvolver DM1 (18,19). Atualmente também é estudado o papel da microbiota intestinal (20) e da exposição solar (21) no desenvolvimento do

DM1. Isso mostra que fatores ambientais podem modular a predisposição genética ao DM1. Portanto, espera-se que no futuro medidas sejam tomadas com o intuito de cessar o aumento da incidência de novos casos de DM1 no mundo.

Nesse sentido, diversas pesquisas buscam por intervenções com o objetivo de reduzir a chance de desenvolvimento do DM1. Atualmente, pouco se sabe como fatores dietéticos poderiam agir para diminuir o risco de desenvolvimento dessa doença. Estudos feitos com vitamina D (22), polifenóis do chá verde, flavonoides do cacau (23,24) e curcumina (25), demonstraram importante redução no desenvolvimento do DM1 em camundongos *non-obese diabetic* (NOD), linhagem especial de animais que desenvolve espontaneamente o DM1. Os autores desses trabalhos apontam mecanismos anti-inflamatórios desses compostos como responsáveis pelos seus achados. A vitamina D e a curcumina apresentaram redução de interferon- γ , já o polifenol do chá verde e os flavonoides do cacau aumentaram a IL-10, uma citocina anti-inflamatória.

A curcumina é um composto bioativo, mais especificamente um polifenol hidrofóbico, encontrado principalmente no rizoma da planta herbácea conhecida popularmente como açafrão da Índia (*Curcuma Longa*). De origem asiática e da mesma família do gengibre, sua raiz possui uma pigmentação amarelada devido à mistura de três curcuminóides: 77% *diferuloylmethane*, 17% *demethoxycurcumin*, e 6% *bisdemethoxycurcumin*. (26). Quando ralada e desidratada, seu pó é utilizado como tempero e corante natural na culinária. Além disso, é utilizado com fins medicinais

devido às atividades farmacológicas já estudadas, por exemplo, atividades anti câncer, hipoglicemiante e cicatrizante (27). Atualmente existem mais de seis mil publicações sobre esse composto visto seu amplo papel em diversas doenças crônicas, como câncer, doenças neurológicas, doenças de caráter inflamatório, cardiovasculares e diabetes. Os principais mecanismos para tais efeitos são suas características anti-inflamatória, antioxidante, anticâncer, hipoglicemiante e antibiótica (26).

Entre os principais efeitos biológicos da curcumina, seu efeito anti-inflamatório chama atenção pelos inúmeros trabalhos que apontam benefícios em doenças como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, edema cerebral, doenças neurodegenerativas, alergias e asma, doença inflamatória intestinal, artrite reumatoide, isquemia renal, psoríase e esclerodermia; doenças essas em que a resposta inflamatória exacerbada tem papel importante na fisiopatologia. Tais benefícios são explicados pela capacidade deste composto em modular a resposta imune via linfócitos T, células dendríticas, Natural Killer, monócitos e macrófagos, células B, neutrófilos, eosinófilos e balanço oxidativo. Isso se deve principalmente ao bloqueio da ação e produção de TNF- α via NF- κ B. (28,29)

Com relação à ação anti-inflamatória da curcumina e sua influência sobre o desenvolvimento do DM1, recentemente Castro *et al.* (2014) verificou retardo ou ausência da doença em camundongos NODsci com diminuição da infiltração de leucócitos no pâncreas, modulação da proliferação de linfócitos T e produção de IFN γ através de modificações da transcrição de células T helper tipo 1 (TH1). Além disso, foi observado

redução da ação de NF- κ B, redução de receptores de células T e diminuição dos estímulos a células dendríticas devido à redução de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (NO). Importante salientar que neste estudo os animais foram suplementados com curcumina via intraperitoneal (25 mg/kg), o que poderia ser um fator limitante do uso deste agente na prevenção do DM1 em humanos.

Por outro lado, diferentes estudos têm mostrado adaptações fisiológicas benéficas do exercício físico tanto em humanos (1,30,31) quanto em animais diabéticos (32,33). De fato a falta de exercício físico aumenta a taxa de declínio da capacidade funcional e aumenta a probabilidade de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (34). Os principais mecanismos responsáveis pelas ações benéficas do exercício na saúde são: a melhor regulação do metabolismo lipídico, aumento da biogênese mitocondrial, aumento da sensibilidade à insulina, melhora do aparato antioxidante, liberação de hormônios e miocinas com característica anti-inflamatória (35).

Lemos *et al.* (2012) utilizando ratos *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF/Gmi-*fa/fa*) realizou 1h de natação três vezes na semana por 11 semanas. O programa de treinamento apesar de não diminuir o peso corporal dos animais quando comparado com o grupo sedentário, mostrou diminuição na glicemia, hemoglobina glicada, insulina e HOMA-IR. Os mecanismos encontrados pelos autores para explicar o melhor controle glicêmico dos animais exercitados estão baseados na diminuição da resposta inflamatória (diminuição de TNF- α , proteína C reativa, e aumento de adiponectina) e

menor estresse oxidativo observado por diminuição do marcador de peroxidação lípidica, o malodialdeído (MDA) sérico (36).

Durante as sessões de treinamento há uma resposta neuroendócrina devido ao estresse causado pelo exercício físico e isso é fundamental para manter o controle da homeostase durante o esforço. O sistema neuroendócrino por sua vez tem forte interação com o sistema imune. Durante o esforço físico é observado aumento do hormônio do crescimento (GH), testosterona, cortisol e catecolaminas (epinefrina, noropinefrina e dopamina). A comunicação entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune ocorre basicamente por duas vias, a primeira pelo eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal (ação dos glicocorticóides) e a segunda via sistema nervoso simpático (ação das catecolaminas). Ambas as vias modulam o número, a função, a mobilização e ativação de células imunes (37).

Ji e Zhang (2014) demonstraram também que a produção de espécies reativas de oxigênio aumentada durante o exercício físico estimula adaptações no sistema antioxidante e na biogênese mitocondrial e que tais adaptações regulam o fator nuclear κB (NF κB) diminuindo a expressão de citocinas inflamatórias (38).

Wasinski et al. (2014) sugere um efeito imunomodulador do exercício físico através da alteração do metabolismo de glicose e glutamina dos linfócitos. Isso porque o exercício físico crônico altera enzimas chaves do metabolismo energético dos linfócitos. Em linfócitos T, por exemplo, aumenta a utilização de glutamina e diminui a utilização de glicose, já os linfócitos B aumentam a utilização de ambos nutrientes. Essa mudança no

metabolismo das células imunes altera a produção de citocinas inflamatórias e com isso justificam também o efeito anti-inflamatório do exercício físico. Isso significa, em termos funcionais da ação dos linfócitos por exemplo, um melhor equilíbrio de Th1/Th2 cujo desbalanço é associado com vários problemas imunológicos (39).

Em situações patológicas caracterizadas por processo inflamatório crônico o exercício também apresenta benefícios anti-inflamatórios. Na obesidade ele diminui os ácidos graxos livres, os *toll-like receptors* (TLRs), vias de sinalização chave dos processos inflamatórios como *IκBα kinase/nuclear factor-κB* (IKK/NFκB), estresse do retículo endoplasmático e resistência insulínica. Essas modificações causadas pelo exercício diminuem o estado inflamatório encontrado em indivíduos obesos (40).

O exercício físico tem sido considerado como intervenção anti-inflamatória, pois se observa aumento da produção de miocinas, IL-6, IL-8 e IL-15. O aumento de IL-6 induzida pelo exercício estimula citocinas anti-inflamatórias como a IL-1ra e a IL-10, além disso, tem a capacidade de suprimir TNF-α. (41). Somado a essa produção de citocinas, o exercício também diminui a produção de citocinas e receptores *toll-like* de leucócitos, com isso diminui a capacidade inflamatória dessas células. Por fim o exercício físico tem a capacidade de reduzir o tecido adiposo que é o maior produtor de proteínas inflamatórias do nosso organismo (42). Portanto, a prática de exercício físico promove um ambiente anti-inflamatório no organismo humano (38,43).

Vários estudos recentes relatam o papel anti-inflamatório sistêmico do

exercício aeróbio em diferentes modelos de camundongos como: câncer de mama (44,45), inflamação do tecido adiposo induzida via agonista específico beta-3 (46) e em modelo de aterosclerose diabética (47).

Recentemente, Paula *et al.* (2015) demonstrou que o exercício físico (70% VO_{max}) cinco vezes na semana por oito semanas inibiu a morte de células beta pancreáticas em camundongos *wild-type* via sinalização de IL-6 (48). Entretanto, não existem estudos em modelo experimental NOD de DM1 que avaliou o efeito protetor do exercício físico no desenvolvimento da doença.

Por isso, o presente estudo tem como objetivo testar o efeito da suplementação de curcumina e do exercício físico aeróbio de moderada intensidade sobre os mecanismos fisiopatológicos que desencadeiam o diabetes tipo 1 de camundongos diabéticos não obesos (NOD).

Capítulo 1.

Exercise training but not curcumin supplementation decrease immune cell infiltration in pancreatic islet of a genetically susceptible model of type 1 diabetes

Artigo Enviado para a publicação em Outubro de 2016 para a **Sports Medicine**. ISSN: 0112-1642 (Print) 1179-2035 (Online).

Title: Exercise training but not curcumin supplementation decrease immune cell infiltration in pancreatic islet of a genetically susceptible model of type 1 diabetes

Authors: Leandro Kansuke Oharomari^{1*}, Camila De Moraes², Anderson Marliere Navarro¹

Affiliations:

¹ Department of Food and Nutrition, Pharmaceutical Sciences College, São Paulo State University, SP, Brazil.

² School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo, SP, Brazil.

Email addresses: lkansuke@hotmail.com* (55 16 98813-1148), navarro@fmrp.usp.br, camimoraes@usp.br

*corresponding author

Abstract: The main mechanism involved in pathogenesis of autoimmunity is uncontrolled inflammatory response against self-antigens. Therefore, anti-inflammatory factors, such as a high bioactive compounds diet and physical active lifestyle, may inhibit or slow development of autoimmune diseases. Type 1 diabetes (T1D) is an autoimmune disease characterized by pancreatic β cell destruction. Non-obese diabetic (NOD) mouse is a model of spontaneous T1D, and it is the most similar to human disease. To determine if chronic exercise training or diet rich in polyphenol delay islet autoimmunity, 48 NOD mice, with five weeks old, were randomly separated in four groups: control, curcumin supplementation, trained, and trained plus curcumin. All experiment lasted for 20 weeks. Pancreatic histology demonstrated fewer immune cells infiltration in pancreatic islet of trained groups. There was no effect of curcumin supplementation neither alone nor improving exercise effects. These data provide evidence that exercise training can mitigate T1D development in genetically susceptible mice.

Key Points: Exercise training decreased immune cells infiltration *in vivo* of a spontaneous mouse model of type 1 diabetes.

1 Introduction

Autoimmune diseases have as main feature intense inflammatory response. In type 1 diabetes (T1D), this response must be chronic, strong, and with enough magnitude to destroy most of pancreatic β cell [1]. Incidence of some autoimmune diseases has been increased worldwide over the past decades [2,3]; with T1D is not different [4,5]. Currently, environment factors are the most accepted explanation to this rising. For instance, vitamin D status [6] and Hygiene Hypothesis [7] are environment factors being investigated. Physical inactivity and industrialized diet behavior in childhood happened together with the increasing in autoimmune diseases. These behavior are responsible for many kinds of chronic diseases [8–10] and inflammatory disease [11] in early stage of life. Additionally, these changes in lifestyle support the Overload Hypothesis which associates modern lifestyle with overload of beta cells making it more vulnerable to autoimmune response [12].

Intervention with anti-inflammatory property, if able to stop autoimmune responses, could prevent or delay T1D development. Dietary patterns rich in food sources of bioactive compounds, such as Mediterranean diet, favors anti-inflammatory environment in human organism [13]. Curcumin is a polyphenol found in rhizome of *Curcuma longa*; it is one of bioactive compounds most studied due its anti-inflammatory properties [14–16]. Furthermore, a physical active lifestyle also promote anti-inflammatory response by several mechanism, such as antioxidant activity [17], releasing myokines and hormones [18], immune cells metabolism modulation [19], and decreasing inflammation signaling [20].

Currently, non-obese diabetic mouse (NOD), a model of spontaneous T1D, is the most similar to human T1D compared to other animal models [21]. As in humans, T1D occurs in NOD due immune cell infiltration into pancreatic islet (insulitis), and consequent destruction of β cells. Over 30 years, it has been used in research improving science of autoimmunity [22].

Some studies have tested bioactive compounds in NOD mice. Cocoa flavonols and green tea catechin supplementation reduced diabetes incidence in NOD mice [23,24]. There were no studies that tested exercise training to prevent T1D in NOD. To help understand the role of lifestyle changes in prevention of autoimmune disease, the aim of this study is to test exercise training and curcumin supplementation on T1D progression of NOD mice.

2 Materials and Methods

2.1 Animals

Forty eight female NOD mice, with five weeks old, were randomized in four groups (n=12): control (C), curcumin supplementation (CUR), trained (T), and trained plus curcumin (TC). The protocol took 20 weeks. Animals were maintained in conventional condition (22-24 °C and 12h light-dark cycle), and housed four animals per cage. Food and water provided *ad libitum*. Mice were fed with pelletized AIN-93G [25] diet. Food intake was monitored three times a week. Body weight was measured weekly. Blood glucose was checked every 14 days by glucometer (FreeStyle Lite – Abbot). Animals was considered diabetic when glycemic >250mg/dL. Diabetic animals that lose >25% body weight were killed before 20 week. This study was approved by local Animal Ethical Committee from Ribeirão

Preto Medical School of the University of São Paulo (n° 190/2014) which is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) following the Guide for the care and use of laboratory animals 2011[26].

2.2 Sample size

Sample size was calculated based in primary outcome in this study which is immune cell infiltration in pancreatic islet (insulitis). Because insulitis is a nominal qualitative variable sample size was determined using:

$$\frac{(p1.q1 + p2.q2)(Z\alpha/2 + Z\beta)^2}{(p1 - p2)^2}$$

It was considered that each section of pancreas has mean of ~10 islets and control group have ~60% of some level of insulitis even in absence of T1D [27]. Sample size was established to reach statistical significance level when intervention reduces at least by half (30%) the islet with some level of insulitis.

2.3 Curcumin supplementation

AIN-93 diet was made twice a week, kept freeze, and protected from light. In CUR and TC groups, 500 mg curcumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added in 1 kg diet. This results in ~65 mg/kg body weight curcumin intake per day.

2.4 Exercise Training Intensity

All mice of T and TC groups were submitted to maximal speed incremental test with five weeks old. Incremental test consists in two minutes acclimatization to treadmill. After, animals started the test running at 0.6 km/h, each 2min 0.1 km/h was increased until 1.2 km/h that increased 0.2 km/k each 2min. Test over when mouse was exhausted. Test was remade every four weeks to adjust load. However, there was no different in maximal speed among weeks. Due to animals performance they were divided in three groups: the bests ones, the middle ones and the less conditioned. This setting intended to respect the different performance without a “lazy” animal disturb training intensity of the “good runners”.

2.5 Training Protocol

Training was performed five days per week, 60min per session, with five minutes warm up and two minutes cool down. Three days, speedy was 60% of the maximal speed reached in incremental test; it was separated for two days that speedy was 30% of the maximal speed. One animal of T group injured paw and had to be removed from the protocol.

2.6 Serum

With 25 week-old, animals were killed by decapitation, two days from last training session and fasting from food but not water. Serum was obtained for immediate analysis of fasting glucose by colorimetric method and the remainder stored at -70 °C for future analysis.

2.7 Cytokines and Insulin

Insulin, TNF- α , and IL-6 were measured using Luminex xMAP® technology with kit Milliplex® (Millipore Corporation) analyzed on MAGPIX®. Standard curve of all analytes had $R^2 = 1$.

2.8 Insulitis

Pancreas was fixed in 10% formalin, included in paraffin, and colored with hematoxylin and eosin to histological analysis. Images were taken by optical microscope (Olympus BX61VS). It was utilized three sections of each pancreas. Islets was classified as: No Insulitis (absence of immune cells), Pre-Insulitis (fewer immune cells around the islet), and Insulitis (>25% of cells infiltration and destruction of islet architecture). And then counted as previously described [28]

2.8.1 Insulitis extension

Insulitis extension was calculated as previously described [29]:

$$\frac{(N^{\circ} \text{ No Insulitis}) + (N^{\circ} \text{ Pre Insulitis} \times 2) + (N^{\circ} \text{ Insulitis} \times 3)}{N^{\circ} \text{ Total Islets}}$$

2.9 Statistics

HOMA-IR and IL-6 are continuous variable that did not have normal distribution. So, Kruskal-Wallis test was used. Other continuous variable were used one-way analysis of variance (ANOVA) or analysis of variance to repeated measures according to data distribution. There was not difference between groups variance. Tukey post-hoc test was used to compare group differences. Log rank test was used to compare diabetes incidence. Qui-square test was used to compare insulitis distribution. All analysis was adopted 0.05 of significance levels.

3 Results

Although the trained (T) group had intake ~10% more diet per day than control (C), exercise decreased ~41% weight gain in 20 weeks of experiment (Table 1). Two animals of each group C and curcumin (CUR) developed T1D. This was not enough to alter HOMA IR (Table 1).

Table 1. Food intake, weight gain, T1D incidence and HOMA IR.

Group	Food Intake (g/d)	Weight Gain (g)	T1D Incidence (%)	HOMA IR
C	3.05±0.23	12.40±5.02	16.66	4.97±4.79
CUR	3.13±0.20	9.30±3.30	16.66	2.32±1.95
T	3.39±0.26*	6.73±1.68*	0.00	1.80±2.95
TC	3.31±0.21	7.25±1.48*	0.00	1.71±1.17
P value	0.0006	0.0006	0.5078	0.1172

Values represented by mean ± standard deviation. * Different from Control (C); Curcumin (CUR); Trained (T); Trained plus curcumin (TC).

Three animals had glycemic >250 mg/dL with nineteen week old, and one with twenty three (Fig. 1). Although there was low incidence of T1D, all groups had animals with some insulitis levels. Trained and trained plus curcumin groups had 50% less pancreatic islet with immune cell infiltration than sedentary groups (Fig. 2A). Besides, insulitis extension was also reduced with exercise training (Fig. 2B).

Trained group increase IL-6 level compared to control. TNF- α did not change between groups (Fig. 3).

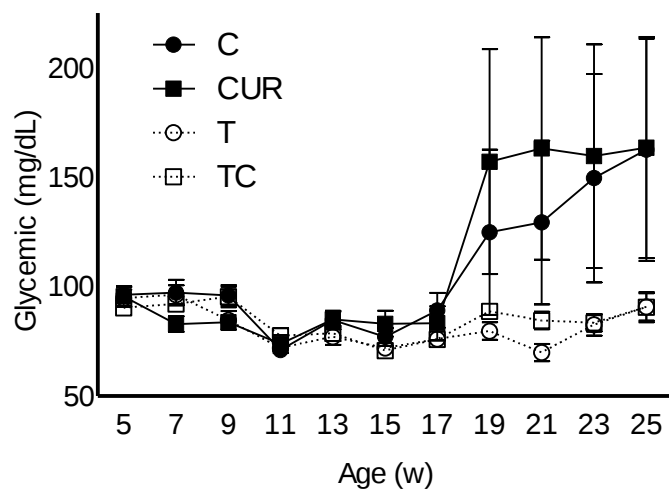


Fig. 1 Blood glucose curve. Values represented by mean and standard error. Control (C); Curcumin (CUR); Trained (T); Trained plus curcumin (TC).

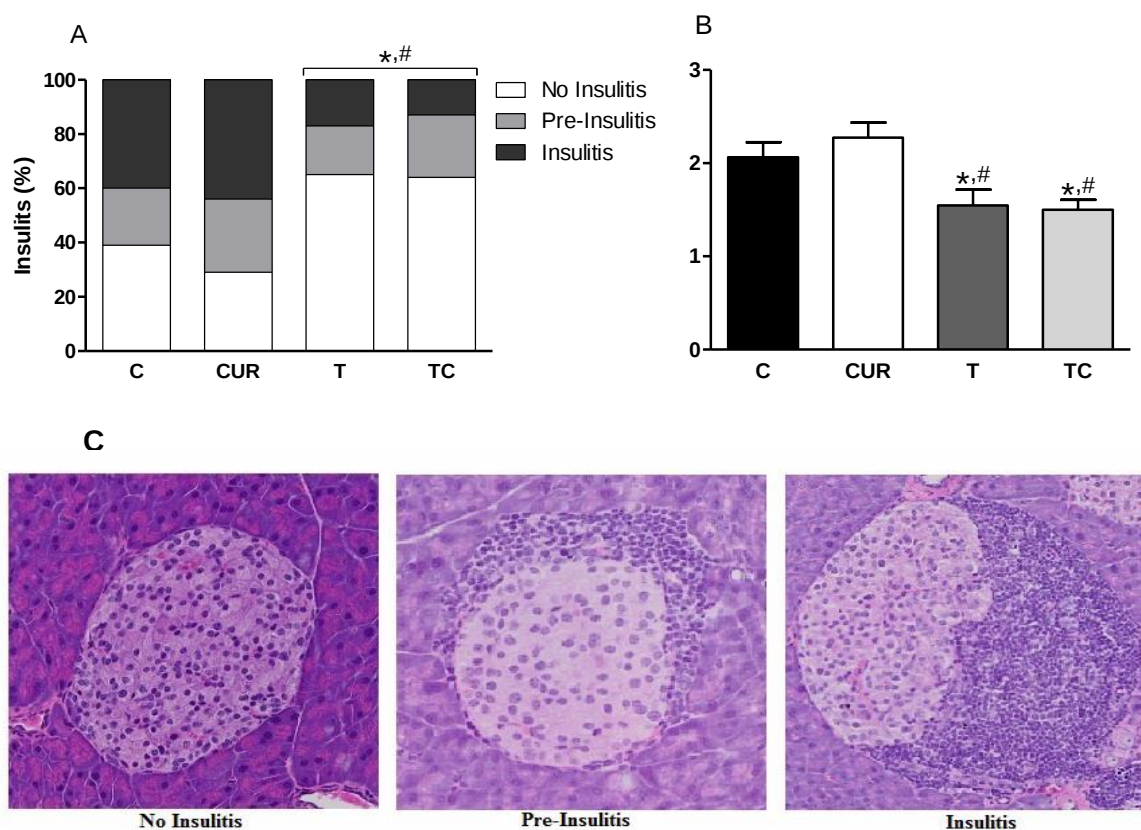


Fig. 2 Insulinitis. Insulinitis distributions (A). Insulinitis extension (B). Representative images of each level of Insulinitis (C). * Different from Control (C); # Different from Curcumin (CUR); Trained (T); Trained plus curcumin (TC). $P < 0.0001$.

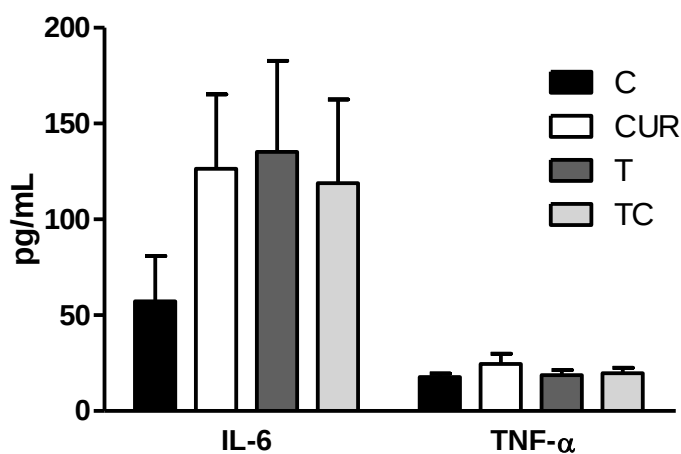


Fig. 3 Cytokines. Control (C); Curcumin (CUR); Trained (T); Trained plus curcumin (TC).

4 Discussion

To our knowledge, is the first time that exercise protect pancreatic β cell against immune response *in vivo*. No effects were observed with curcumin supplementation.

Although chronic oral curcumin (500 ppm in diet) reach detectable concentration in plasma and even brain tissue [30], there was no results in T1D. However, curcumin (25 mg/kg body weight) intraperitoneal inhibited leucocyte infiltration in accelerated murine models of T1D [31]. These suggest that increasing dose or using strategies that heightened curcumin bioavailability maybe find better results.

Low incidence of T1D was expected because animals fed gluten-free diet and were not in germ-free environment [32,33]. However, NOD mice presents ~60% of immune cell infiltration in islets even in absence of T1D [27], which is consistent with our findings. Exercise lower this rate to 30%.

Reduction on body weight gain with exercise is well documented. This result found here show the magnitude of training on caloric balance. On the other hand, overweight induce chronic inflammatory status [34]. Besides, there is an Overload Hypothesis which propose that environment factors, such as obesity, increase T1D risk [12]. Therefore the weight control can be one mechanism to explain insulinitis reduction in T and TC groups.

Another possible mechanism to explain the effects of training is through dendritic cells modulation. Dendritic cells modulate both innate and adaptive immune responses. Recently, Pane et al. claims that these cells has important role in T1D development [35]. Several studies have been showed that exercise decrease the number of dendritic cells or attenuates it response [36–39]. Thus, exercise may mitigate autoimmunity by shaping dendritic cells activation.

Since 2000, IL-6 is recognized as one of the myokines produced during exercise [40]. In 2010, a paper review related myokines as responsible to anti-inflammatory environment of exercise and its prevention action on type 2 diabetes, cardiovascular diseases, cancer and dementia [41]. Although TNF- α remain unchanged, the training

increase more than two fold the mean of IL-6 in trained group ($p=0.07$). In an *ex vivo* study, pancreas of trained animals had fewer values of apoptosis markers than sedentary when it was submitted to inflammatory cytokines. After, when added IL-6 blocker, apoptosis markers raised to sedentary values [42]. Thus, the benefit of exercise in β cell survivor is through IL-6 pathway. Our results, together with literature, give evidence that suggest lack of exercise in childhood as one more environment factor responsible to increase incidence of autoimmune diseases.

First limitation of this study was the lack of mechanism that establishes casual effect. So, literature presented just point out some possible mechanism. Therefore, further analysis is needed to find mechanisms which explain this phenomenon about exercise and autoimmunity. Also, prospective studies are necessary to elucidate this question. Second limitation is absence of curcumin level measurement in the beta cells; route of administration and dose of curcumin was established based on previous literature[30] and to simulate a rich polyphenol diet.

References:

1. Wållberg M, Cooke A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends Immunol.* 2013;34:583–91.
2. Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* 2003;2:119–25.
3. The autoimmune diseases coordinating committee (ADCC). Progress in Autoimmune Diseases Research Progress. National Institutes of Health. 2005;1–129.
4. Forlenza GP, Rewers M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us? *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* [Internet]. 2011;18:248–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21844707>
5. Egro FM. Why is type 1 diabetes increasing? *J. Mol. Endocrinol.* 2013;51.
6. Antico A, Tampoia M, Tozzoli R, Bizzaro N. Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmun. Rev.* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;12:127–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2012.07.007>
7. Bach, JF; Chatenoud L. The Hygiene Hypothesis : An Explanation for the Increased Frequency of Insulin-Dependent Diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2:1–10.
8. Ludwig DS. Relation between consumption of sugar sweetened drinks and childhood obesity: a prospective observational analysis. *Lancet.* 2001;357:505–8.
9. Ayer J, Charakida M, Deanfield JE, Celermajer DS, Ng M, Fleming T, et al. Lifetime risk: childhood obesity and cardiovascular risk. *Eur. Heart J.* [Internet]. 2015;36:1371–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25810456>

10. Downing KL, Hnatiuk J, Hesketh KD. Prevalence of sedentary behavior in children under 2years: A systematic review. *Prev. Med. (Baltim)*. [Internet]. Elsevier Inc.; 2015;78:105–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ypmed.2015.07.019>
11. Noutsios GT, Floros J. Childhood asthma: causes, risks, and protective factors; a role of innate immunity. *Swiss Med. Wkly*. [Internet]. 2014;144:w14036. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25539126>
12. Dahlquist G. Can we slow the rising incidence of childhood-onset autoimmune diabetes? The overload hypothesis. *Diabetologia*. 2006;49:20–4.
13. Bonaccio M, Pounis G, Cerletti C, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Mediterranean diet, dietary polyphenols and low-grade inflammation: results from the moli-sani study. *Br. J. Clin. Pharmacol*. [Internet]. 2016;n/a-n/a. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/bcp.12924>
14. Sahebkar A. Are curcuminoids effective C-reactive protein-lowering agents in clinical practice? evidence from a meta-analysis. *Phyther. Res*. 2014;28:633–42.
15. Shehzad A, Rehman G, Lee YS. Curcumin in inflammatory diseases. *BioFactors*. 2013;39:69–77.
16. Srivastava RM, Singh S, Dubey SK, Misra K, Khar A. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *Int. Immunopharmacol*. [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;11:331–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.014>
17. Ji LL, Zhang Y. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise: role of redox signaling. *Free Radic. Res*. [Internet]. 2013;48:1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24083482>
18. Nielsen S, Pedersen BK. Skeletal muscle as an immunogenic organ. *Curr. Opin. Pharmacol*. 2008;8:346–51.
19. Wasinski F, Gregnani MF, Ornellas FH, Bacurau AVN, Câmara NO, Araujo RC, et al. Lymphocyte glucose and glutamine metabolism as targets of the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of exercise. *Mediators Inflamm*. 2014;2014.
20. Ringeis R, Eder K, Mooren FC, Kruger K. Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise. *Exerc. Immunol. Rev*. 2015;21:58–68.
21. Driver JP, Serreze D V, Chen Y-G. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin. Immunopathol*. [Internet]. 2011;33:67–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20424843>
22. Pearson JA, Wong FS, Wen L. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J. Autoimmun*. [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;66:76–88. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.019>

23. Fu Z, Yuskavage J, Liu D. Dietary flavonol epicatechin prevents the onset of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2013;61:4303–9. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23578364>

24. Fu Z, Zhen W, Yuskavage J, Liu D. Epigallocatechin gallate delays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice. *Br. J. Nutr.* 2011;105:1218–25.

25. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J. Nutr.* 1993;123:1939–51.

26. Edition E. Guide [Internet]. *Guid. Care Use Lab. Anim.* 2011. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595115>

27. Reddy S, Chai RCC, Rodrigues JA, Hsu TH, Robinson E. Presence of residual beta cells and co-existing islet autoimmunity in the NOD mouse during longstanding diabetes: A combined histochemical and immunohistochemical study. *J. Mol. Histol.* 2008;39:25–36.

28. Zhang C, Todorov I, Lin C-L, Atkinson M, Kandeel F, Forman S, et al. Elimination of insulinitis and augmentation of islet beta cell regeneration via induction of chimerism in overtly diabetic NOD mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [Internet]. 2007;104:2337–42. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/content/abstract/104/7/2337>

29. Signore A, Annovazzi A, Giacalone P, Beales PE, Valorani MG, Vestri AR, et al. Reduced cumulative incidence of diabetes but not insulinitis following administration of chimeric human IL-15-murine IgG2b in NOD mice. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* 2003;19:464–8.

30. Begum AN, Jones MR, Lim GP, Morihara T, Kim P, Heath DD, et al. Curcumin structure-function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008;326:196–208.

31. Castro CN, Barcala Tabarozzi AE, Winnewisser J, Gimeno ML, Antunica Noguerol M, Liberman AC, et al. Curcumin ameliorates autoimmune diabetes. Evidence in accelerated murine models of type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 2014;177:149–60.

32. Marietta E V., Gomez AM, Yeoman C, Tilahun AY, Clark CR, Luckey DH, et al. Low incidence of spontaneous type 1 diabetes in non-obese diabetic mice raised on gluten-free diets is associated with changes in the intestinal microbiome. *PLoS One.* 2013;8:1–9.

33. Hoorfar J, Buschard K, Dagnaes-Hansen F. Prophylactic nutritional modification of the incidence of diabetes in autoimmune non-obese diabetic (NOD) mice. *Br J Nutr.* 1993;69:597–607.

34. Odegaard JI, Chawla A. Pleiotropic actions of insulin resistance and

inflammation in metabolic homeostasis. *Science* [Internet]. 2013;339:172–7.

Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3725457&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

35. Pane JA, Fleming FE, Graham KL, Thomas HE, Kay TWH, Coulson BS. Rotavirus acceleration of type 1 diabetes in non-obese diabetic mice depends on type I interferon signalling. *Sci. Rep.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016;6:29697. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep29697>

36. Morgado JM, Rama L, Silva I, De Jesus Inácio M, Henriques A, Laranjeira P, et al. Cytokine production by monocytes, neutrophils, and dendritic cells is hampered by long-term intensive training in elite swimmers. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2012;112:471–82.

37. Nickel T, Emslander I, Sisic Z, David R, Schmaderer C, Marx N, et al. Modulation of dendritic cells and toll-like receptors by marathon running. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2012;112:1699–708.

38. Deckx N, Wens I, Nuyts AH, Hens N, De Winter BY, Koppen G, et al. 12 Weeks of Combined Endurance and Resistance Training Reduces Innate Markers of Inflammation in a Randomized Controlled Clinical Trial in Patients With Multiple Sclerosis. *Mediators Inflamm.* Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016.

39. MacKenzie B, Andrade-Sousa AS, Oliveira-Junior MC, Assumpção-Neto E, Alves-Rangel MB, Silva Renno A, et al. Dendritic Cells Are Involved in the Effects of Exercise in a Model of Asthma. *Med. Sci. Sport. Exerc.* [Internet]. 2016;1. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005768-9000000000-97559>

40. Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *Br. J. Sports Med.* 2000;34:246–51.

41. Pedersen BK, Brandt C. The role of exercise-induced myokines in muscle homeostasis and the defense against chronic diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010;2010.

42. Paula FMM, Leite NC, Vanzela EC, Kurauti MA, Freitas-Dias R, Carneiro EM, et al. Exercise increases pancreatic β -cell viability in a model of type 1 diabetes through IL-6 signaling. *FASEB J.* [Internet]. 2015;29:1805–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609426>

Ethical approval: All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

Author contributions: L.K.O. conceived, designed the study, performed the experiments, analyzed the data, and wrote the paper. C.D.M. and

A.M.N. conceived and designed the study, contributed to discussions and edited the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Conflict of Interest: Author L.K.O., Author C.D.M., and Author A.M.N declare that they have no conflict of interest.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como finalidade contribuir com a ciência sobre o papel do estilo de vida no desenvolvimento de doença autoimune, mais precisamente o diabetes mellitus tipo 1. Para contribuir com esse complexo conjunto de conhecimentos foi testado a hipótese de que o exercício físico e/ou o enriquecimento da alimentação com um composto bioativo pudesse inibir a progressão de diabetes mellitus tipo 1 em um modelo experimental geneticamente predisposto a desenvolver espontaneamente o DM1. Como conclusão foi observado efeito protetor do exercício na resposta do sistema imune contra as células beta do pâncreas mas não houve efeito da suplementação de curcumina. Isso sugere que o exercício físico tem uma resposta anti-inflamatória com maior magnitude do que o composto testado considerando a forma de administração utilizada no presente estudo. Para melhor compreensão do papel que o estilo de vida tem sobre o desenvolvimento de doenças autoimunes, mesmo quando existe pré-disposição genética, serão necessários estudos prospectivos de coorte que comecem desde a infância e acompanhem até a fase adulta. Devido a dificuldade desse tipo de estudo, trabalhos como esse aqui apresentado auxiliam no suporte para futuras evidências.

REFERÊNCIAS

1. Stanford KI, Goodyear LJ. Exercise and type 2 diabetes: molecular mechanisms regulating glucose uptake in skeletal muscle. *Adv Physiol Educ* [Internet]. 2014;38(4):308–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25434013>
2. Soltesz G, Patterson CC, Dahlquist G. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence--what can we learn from epidemiology? *Pediatr Diabetes*. 2007;8 Suppl 6:6–14.
3. Reimann M, Bonifacio E, Solimena M, Schwarz PEH, Ludwig B, Hanefeld M, et al. An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus. *Pharmacol Ther* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;121(3):317–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.11.009>
4. Canivell S, Gomis R. Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):403–7.
5. Danne T, Lange K, Kordonouri O. New developments in the treatment of type 1 diabetes in children. *Arch Dis Child*. 2007;92(11):1015–9.
6. Brazilian Society of Diabetes. [Guidelines of the Brazilian Society of Diabetes 2013-2014]. São Paulo: AC Farmacêutica; 2014. 382 p.
7. Forlenza GP, Rewers M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* [Internet]. 2011;18(4):248–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21844707>

8. Facts F, Diabetes ON. National Diabetes Fact Sheet , 2011. Centers Dis Control Prev US Dep Heal Hum Serv. 2011;CS217080A(Division of Diabetes Translation):1–12.
9. Wållberg M, Cooke A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. *Trends Immunol.* 2013;34(12):583–91.
10. Gupta S, Cerosaletti K, Long SA. Renegade homeostatic cytokine responses in T1D: Drivers of regulatory/effector T cell imbalance. *Clin Immunol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;151(2):146–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2014.02.007>
11. Noble JA, Erlich HA. Genetics of Type 1 Diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 Jan 1;2(1):a007732–a007732. Available from: <http://www.diapedia.org/type-1-diabetes-mellitus/genetics-of-type-1-diabetes>
12. Steck AK, Rewers MJ. Genetics of type 1 diabetes. *Clin Chem.* 2011;57(2):176–85.
13. Pundziūte-Lyckå A, Dahlquist G, Urbonaite B, Zalinkevicius R. Time trend of childhood type 1 diabetes incidence in Lithuania and Sweden, 1983-2000. *Acta Paediatr.* 2004;93(11):1519–24.
14. Miller LJ, Willis JA, Pearce J, Barnett R, Darlow BA, Scott RS. Urban-rural variation in childhood type 1 diabetes incidence in Canterbury, New Zealand, 1980-2004. *Heal Place* [Internet]. Elsevier; 2011;17(1):248–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healthplace.2010.10.010>
15. Imkampe AK, Gulliford MC. Trends in Type1 diabetes incidence in the

- UK in 0- to 14-year-olds and in 15- to 34-year-olds, 1991-2008. *Diabet Med.* 2011;28(7):811–4.
16. Patterson CC, Gyurus E, Rosenbauer J, Cinek O, Neu A, Schober E, et al. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989-2008: Evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia.* 2012;55(8):2142–7.
 17. Ball SJ, Haynes A, Jacoby P, Pereira G, Miller LJ, Bower C, et al. Spatial and temporal variation in type 1 diabetes incidence in Western Australia from 1991 to 2010: Increased risk at higher latitudes and over time. *Health Place [Internet]. Elsevier;* 2014;28:194–204. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.healthplace.2014.05.004>
 18. Von Herrath M. Can we learn from viruses how to prevent type 1 diabetes? the role of viral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes and the development of novel combination therapies. *Diabetes.* 2009;58(1):2–11.
 19. Bach, JF; Chatenoud L. The Hygiene Hypothesis : An Explanation for the Increased Frequency of Insulin-Dependent Diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(2):1–10.
 20. Knip M, Siljander H. The role of the intestinal microbiota in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol [Internet]. Nature Publishing Group;* 2016 Jan 4;12(3):154–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2015.218>
 21. Feng R, Li Y, Li G, Li Z, Zhang Y, Li Q, et al. Lower serum 25 (OH) D concentrations in type 1 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract [Internet]. Elsevier Ireland Ltd;* 2015;108(3):e71–5. Available

from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2014.12.008>

22. Takiishi T, Ding L, Baeke F, Spagnuolo I, Sebastiani G, Laureys J, et al. Dietary supplementation with high doses of regular vitamin D3 safely reduces diabetes incidence in NOD mice when given early and long term. *Diabetes*. 2014;63(6):2026–36.
23. Fu Z, Zhen W, Yuskavage J, Liu D. Epigallocatechin gallate delays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice. *Br J Nutr*. 2011;105(8):1218–25.
24. Fu Z, Yuskavage J, Liu D. Dietary flavonol epicatechin prevents the onset of type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2013;61(18):4303–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23578364>
25. Castro CN, Barcala Tabarrozzi AE, Winnewisser J, Gimeno ML, Antunica Noguerol M, Liberman AC, et al. Curcumin ameliorates autoimmune diabetes. Evidence in accelerated murine models of type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2014;177(1):149–60.
26. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnol Adv* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;32(6):1053–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.004>
27. Srivastava RM, Singh S, Dubey SK, Misra K, Khar A. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. *Int Immunopharmacol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;11(3):331–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2010.08.014>

28. Shehzad A, Rehman G, Lee YS. Curcumin in inflammatory diseases. *BioFactors*. 2013;39(1):69–77.
29. Aggarwal BB, Gupta SC, Sung B. Curcumin: An orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarkers. *Br J Pharmacol*. 2013;169(8):1672–92.
30. Armstrong MJ, Sigal RJ. Exercise as medicine: Key Concepts in Discussing Physical Activity with Patients who have Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes* [Internet]. Canadian Diabetes Association; 2015;39:S129–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcjd.2015.09.081>
31. Karstoft K, Pedersen BK. Exercise and type 2 diabetes: focus on metabolism and inflammation. *Immunol Cell Biol* [Internet]. 2016;94(2):146–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26568029>
32. Ghosh S, Golbidi S, Werner I, Verchere BC, Laher I. Selecting exercise regimens and strains to modify obesity and diabetes in rodents: an overview. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2010;119(2):57–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20402668>
33. Saraceni C, Broderick TL. Cardiac and metabolic consequences of aerobic exercise training in experimental diabetes. *Curr Diabetes Rev* [Internet]. 2007;3(1):75–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18220658>
34. Blair SN. Physical inactivity: The biggest public health problem of the 21st century. *Br Med J*. 2009;43(1):1–2.

35. Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr Physiol*. 2012;2(2):1143–211.
36. Teixeira De Lemos E, Oliveira J, Páscoa Pinheiro J, Reis F. Regular physical exercise as a strategy to improve antioxidant and anti-inflammatory status: Benefits in type 2 diabetes mellitus. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012.
37. Fragala MS, Kraemer WJ, Denegar CR, Maresh CM, Mastro AM, Volek JS. Neuroendocrine-immune interactions and responses to exercise. *Sport Med*. 2011;41(8):621–39.
38. Ji LL, Zhang Y. Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise: role of redox signaling. *Free Radic Res* [Internet]. 2013;48(October):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24083482>
39. Wasinski F, Gregnani MF, Ornellas FH, Bacurau AVN, Câmara NO, Araujo RC, et al. Lymphocyte glucose and glutamine metabolism as targets of the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of exercise. *Mediators Inflamm*. 2014;2014.
40. Ringeis R, Eder K, Mooren FC, Kruger K. Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2015;21:58–68.
41. Nielsen S, Pedersen BK. Skeletal muscle as an immunogenic organ. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(3):346–51.
42. Nimmo MA, Leggate M, Viana JL, King JA. The effect of physical activity on mediators of inflammation. *Diabetes, Obes Metab*. 2013;15(S3):51–60.

43. Belotto MF, Magdalon J, Rodrigues HG, Vinolo MAR, Curi R, Pithon-Curi TC, et al. Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes. *Clin Exp Immunol*. 2010;162(2):237–43.
44. Murphy EA, Davis JM, Barrilleaux TL, McClellan JL, Steiner JL, Carmichael MD, et al. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3(1)SV40Tag mice. *Cytokine* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;55(2):274–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2011.04.007>
45. Amani Shalamzari S, Agha-Alinejad H, Alizadeh S, Shahbazi S, Kashani Khatib Z, Kazemi A, et al. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. *Iran J Basic Med Sci*. 2014;17(4):231–6.
46. Castellani L, Root-McCaig J, Frendo-Cumbo S, Beaudoin M-S, Wright DC. Exercise training protects against an acute inflammatory insult in mouse epididymal adipose tissue. *J Appl Physiol* [Internet]. 2014;116(10):1272–80. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4044397&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
47. Kadoglou NPE, Moustardas P, Kapelouzo A, Katsimpoulas M, Giagini A, Dede E, et al. The anti-inflammatory effects of exercise training promote atherosclerotic plaque stabilization in apolipoprotein E knockout mice with diabetic atherosclerosis. *Eur J Histochem*. 2013;57(1):16–32.
48. Paula FMM, Leite NC, Vanzela EC, Kurauti MA, Freitas-Dias R, Carneiro EM, et al. Exercise increases pancreatic β -cell viability in a

model of type 1 diabetes through IL-6 signaling. *FASEB J* [Internet]. 2015;29(5):1805–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25609426>

ANEXO**1. Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO



— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3315-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 190/2014, sobre o projeto intitulado “*Efeitos da suplementação de curcumina e do exercício físico aeróbico sobre o desenvolvimento do D.M. tipo 1 em camundongos diabéticos não obesos (NOD)*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Anderson Marliere Navarro** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 25 de fevereiro de 2015.

We certify that the protocol nº 190/2014, entitled “*Effect of curcumin supplementation and aerobic exercise on development of D.M type 1 in non-obese diabetic mice (NOD)*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 02/25/2015.

Ribeirão Preto, 25 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética
no Uso de Animais, em exercício