

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 17/10/2018.

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

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**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

**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 insulínaterapia, 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 efetoras (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 locus 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 locus 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 homocigotos 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/*Gmifafa*) 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 lipídica, 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 κ B (NF κ B) 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-Kb* (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).

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. *Health 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 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(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, Frenzo-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>