

Universidade de São Paulo  
Instituto de Ciências Biomédicas

**CAROLINA CAVALCANTE DE PAULA**

**O efeito benéfico do exercício físico contra a destruição de células  $\beta$   
em modelo murino de DM1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo  
2019

**CAROLINA CAVALCANTE DE PAULA**

**O efeito benéfico do exercício físico contra a destruição de células  $\beta$   
em modelo murino de DM1.**

**Versão original corrigida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia de Sistemas

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Ortis

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Carolina Cavalcante de Paula

Titulo da Dissertação/Tese: O efeito benéfico do exercício físico contra a destruição de células  $\beta$  em modelo murino de DM1

Orientador: Fernanda Ortis

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **14 / 08 / 2019**, considerou o(a) candidato(a):

( **X** ) **Aprovada**                      (    ) **Reprovada**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: Maria Lúcia Cardillo Corrêa Giannella  
Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: Patrícia Rodrigues Lourenço Gomes  
Instituição: Universidade de São Paulo -ICB

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: Patrícia Pereira Coltri  
Instituição: Universidade de São Paulo -ICB

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: Fernanda Ortis  
Instituição: Universidade de São Paulo -ICB



Grande Universidade "Armando de Sáles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB 1E - 05508-000  
 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone: (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.001/2017

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 066/2015/CEUA, datado de 27/07/2015, e por solicitação da Profa. Dra. **Fernanda Ortis**, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do(a) aluno(a) **Carollina Cavalcante de Paula** ao Projeto de Pesquisa "*Estudo da ativação diferencial de NFkB em células beta pancreáticas e dos mecanismos que podem ser modulados para a prevenção de seu caráter pró-apoptótico*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 05 de janeiro de 2017.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**  
 Coordenador da CEUA-ICB/USP

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº 66/2015/CEUA, de 27/07/2015, relativo ao projeto intitulado "*Estudo da ativação diferencial de NF-kB em células beta pancreáticas e dos mecanismos que podem ser modulados para a prevenção de seu caráter pró-apoptótico*", de responsabilidade da Profa. Dra. **Fernanda Ortis**, do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, aprovo as seguintes inclusões e conforme detalhamento da solicitação:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Camundongo	C57BL/6	Macho	8-12 semanas	3º ano: 16 4º ano: 16

- Metodologia: prevenção da morte das células beta induzidas pelo sistema imune, conforme descrição na solicitação datada de 07/03/2017.

São Paulo, 23 de agosto de 2017.

Dra. **Luciane Valéria Sita**  
 Coordenadora da CEUA-ICB/USP

*Dedico este trabalho à minha família, meus pais Helena e Francisco, e meu irmão Vinícius, que me apoiaram e incentivaram ao longo de toda a trajetória. E aos meus amigos, companheiros de laboratório e minha orientadora, por toda a ajuda e ensinamentos, por me proporcionar as maiores alegrias da vida, sem eles nada disso seria possível.*

## AGRADECIMENTOS

Só tenho a agradecer a todos que me ajudaram nessa caminhada, deixando um carinho, um conforto, uma experiência e muita alegria. Tenha certeza que cada um foi essencial para a realização e conclusão deste trabalho, e por isso tento agora esboçar meus sinceros agradecimentos.

Agradeço à minha família pelo apoio e o amor incondicional.

Agradeço à todos do laboratório pela ajuda infinita e todos os ensinamento, aos colegas do instituto pela disposição em ajudar e ensinar.

Agradeço à minha querida e estimada orientadora Fe (Dra. Fernanda Ortis), que mesmo sem nenhuma referência aceitou em seu laboratório uma menina do Estado de Goiás, não mensurou esforços para me ajudar, me ensinou muito, orientou com atenção todos os meus passos no laboratório, me recebeu como uma filha, cuidou de mim nesse período longe da minha família.

À doce Elô (Eloisa Vilas Boas) que me recebeu muito bem, me ensinou tudo com tanto carinho e atenção, sem você esse trabalho não teria acontecido! Ao Angelito (Angelo Di Stefano) pelas conversas amigáveis e as boas risadas. À Vivi (Viviane Rosa) por toda ajuda com as células e pela amizade. Ao pequeno Davidson (Davidson Almeida) pelas risadas e a ajuda com as células. À Jaque (Jaqueline Leite) por todo o ensinamento com os animais, dos procedimentos laboratoriais e também pela amizade fora ICB, por me alegrar, incluir e dividir o dia-a-dia comigo, uma irmã que São Paulo me deu!

Agradeço ao Rafael Ribeiro, um parceiro que a vida me deu, que me apoiou em todos os instante, e sem ele esse sonho jamais teria começado.

Aos Profs. Sérgio Ferreira de Oliveira e Maria Inês Borella, por me ajudar com os procedimentos laboratoriais, e ceder o espaço/ equipamentos que viabilizaram esse trabalho.

Ao técnico Cruz Alberto Mendoza Rigonati, por toda ajuda com o processamento do tecido pancreático, pelo apoio e suporte técnico.

À Sandrinha (Dra. Sandra Mara Ferreira), por toda atenção, carinho, dicas e disponibilidade, sem ela esse trabalho também não aconteceria, esse trabalho é nosso! Ao Cruz, que corrigiu meus erros de técnica e execução de diversas atividades, sempre com muita paciência, bom humor e dedicação, e que também se tornou um querido amigo.

Agradeço ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro para a realização desse trabalho.

*“Você pode sonhar, criar, desenhar e construir o lugar mais maravilhoso do mundo. Mas é necessário ter pessoas para transformar seu sonho em realidade.”*

*Walt Disney*





## RESUMO

Paula CC. O efeito benéfico do exercício físico contra a destruição de células  $\beta$  em modelo murino de DM1 [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2019.

Diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) é uma doença autoimune causada por um ataque específico as células  $\beta$  pancreáticas pelo sistema imune, instaurando um quadro de hiperglicemia, com necessidade de insulina exógena para sobrevivência do indivíduo.. À longo prazo, alguns efeitos colaterais podem surgir quando o tratamento com insulina não conduzido adequadamente, por isso outras terapias como dieta e exercício são indicados. O exercício físico aumenta a captação de glicose independente de insulina pela musculatura esquelética, reduz o estresse oxidativo e melhora a produção de insulina pelas células  $\beta$ , melhorando a viabilidade e função de células  $\beta$ . Estudos reportam uma função endócrina para o músculo esquelético, através de imunomoduladores como a interleucina 6 (IL-6) que provoca uma cascata de eventos anti-inflamatórios. A IL-6 parece mediar os efeitos protetores do exercício nas células  $\beta$  através do *crosstalk* entre o músculo esquelético e as células  $\beta$ . Tendo em vista que o exercício é uma estratégia terapêutica para tratamento de DM1, e que é capaz de induzir na musculatura esquelética a produção e secreção de fatores anti-inflamatórios, buscamos avaliar o potencial efeito benéfico do exercício na sobrevivência e manutenção da função de células  $\beta$  em modelo animal experimental de DM1, induzido por doses múltiplas e baixas de estreptozotocina (MLDZ). Utilizamos 32 camundongos machos da linhagem C57BL/6J divididos em: grupo Controle, Diabético, Treinado e Treinado Diabético. Os animais treinados fizeram 60 min./dia de corrida à 70% da velocidade máxima, 5 dias por semana durante 3 semanas. A indução ao DM1 aconteceu após a fase de treino, por 5 dias consecutivos e a glicemia plasmática foi monitorada ao longo do estudo. O pâncreas dos animais foi coletado e a presença e distribuição de células  $\beta$  e  $\alpha$  (insulina e glucagon), a taxa de proliferação (PCNA) e a indução da morte e inflamação em células da ilhota (ativação de NF- $\kappa$ B) foi avaliada. Também buscamos compreender se os efeitos do exercício observados em ilhotas pancreáticas seriam devido a produção de IL-6, para isso utilizamos a linhagem celular INS-1E e avaliamos o efeito de IL-6 quando essas células são exposta a IL-1 $\beta$  + IFN $\gamma$ . Observamos que o exercício foi capaz de proteger parcialmente os camundongos da hiperglicemia induzida por MLDZ, assim como a perda de células  $\beta$  funcionais, redução da inflamação nas ilhotas e da morte de células  $\beta$  (diminuição da ativação de NF- $\kappa$ B). Além disso, em animais treinados observamos um aumento na marcação para PCNA em células presentes nas ilhotas (proliferação dessas células). Apesar desses efeitos benéficos observados

*in vivo*, o tratamento com IL-6 na linhagem celular INS-1E aumentou a morte induzida por IL-1 $\beta$  e INF $\gamma$ , indicando que outros fatores produzidos pela musculatura esquelética durante o exercício físico, além de IL-6, devem estar presentes para que os efeitos benéficos sejam observados nas células  $\beta$ . De maneira geral nossos dados indicam que o exercício pode ter um grande impacto na plasticidade das células na ilhota, e que podem levar a uma diminuição da inflamação local e morte de células  $\beta$ , além de possivelmente induzir re-aparecimento células  $\beta$  após destruição induzida por inflamação.

**Palavras-chave:** Diabetes *mellitus* tipo 1, exercício físico, citocinas pró-inflamatórias.

## ABSTRACT

Paula CC. The beneficial effect of physical exercise against the destruction of  $\beta$  cells in murine model of DM1. [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2019.

Type 1 Diabetes Mellitus (DM1) is an autoimmune disease caused by a specific attack on pancreatic  $\beta$  cells by the immune system, establishing a hyperglycemia, requiring exogenous insulin for survival. In the long run, some side effects may arise. when insulin treatment is not conducted properly, other therapies such as diet and exercise are indicated. Physical exercise increases insulin-independent glucose uptake by skeletal muscle, reduces oxidative stress, and improves insulin production by  $\beta$ -cells, improving  $\beta$ -cell function and viability. Studies report an endocrine function for skeletal muscle, through immunomodulators such as interleukin 6 (IL-6), which causes a cascade of anti-inflammatory events. IL-6 appears to mediate the protective effects of exercise on  $\beta$ -cells through crosstalk between skeletal muscle and  $\beta$ -cells. Considering that exercise is a therapeutic strategy for the treatment of DM1 and that it is capable of inducing in the skeletal muscles the production and secretion of anti-inflammatory factors, we sought to evaluate the potential beneficial effect of exercise on the survival and maintenance of  $\beta$ -cell function in an experimental animal model of DM1, induced by multiple and low doses of streptozotocin (MLDZ). We used 32 male mice of the C57BL / 6J lineage divided into: Control group, Diabetic, Trained and Diabetic trained. The trained animals did 60 min./day of running at 70% of maximum speed, 5 days a week for 3 weeks. Induction to DM1 occurred after the training phase for 5 consecutive days and plasma glucose was monitored throughout the study. The pancreas of the animals was collected and the presence and distribution of  $\beta$  and  $\alpha$  cells (insulin and glucagon), proliferation rate (PCNA) and induction of death and inflammation in islet cells (NF- $\kappa$ B activation) were evaluated. We also sought to understand if the effects of exercise observed on pancreatic islets were due to IL-6 production, for that we used the cell line INS-1E and evaluated the effect of IL-6 when these cells are exposed to IL-1 $\beta$  + IFN $\gamma$ . We observed that the exercise was able to partially protect the mice from MLDZ-induced hyperglycemia, as well as loss of functional  $\beta$  cells, reduction of islet inflammation and  $\beta$ -cell death (decreased NF- $\kappa$ B activation). In addition, in trained animals an increase in PCNA labeling is observed in islet cells (proliferation of these cells). In addition, IL-6 and IL-6 inhibit IL-1 $\beta$  and IL-6 and IL-1 $\beta$  and IL-6, respectively, must be present for beneficial effects to be observed on  $\beta$ -cells. Overall, our data indicate that exercise may have a major impact on the islet cell plasticity, which could lead to a decrease in local

inflammation and  $\beta$ -cell death, in addition to possibly induce re-emergence of  $\beta$ -cells after destruction induced by inflammation.

**Keywords:** Type 1 diabetes mellitus, physical exercise, proinflammatory cytokines.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1-</b> Detalhamento das fases do protocolo experimental.....	28
<b>Figura 2-</b> Fluxograma de todas as etapas contempladas no estudo: Fase de adaptação, Fase de adaptação específica ao treino e Fase de treino.....	30
<b>Figura 3-</b> Comportamento da glicemia plasmática dos animais: teste de tolerância à glicose, teste de tolerância à insulina e análise de parâmetros glicêmicos.....	36
<b>Figura 4-</b> Insulinemia, avaliação da sensibilidade periférica à insulina e a capacidade funcional das células $\beta$ .....	40
<b>Figura 5-</b> Fotomicrografias representativa de cortes histológicos do tecido pancreático corados em técnica de Hematoxilina & Eosina nos camundongos Controle, Diabético, Treinado e Treinando Diabético após o exercício físico e tratamento com MLDZ: <i>Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM1 por MLDZ</i> .....	41
<b>Figura 6-</b> Análise morfométrica do tecido pancreático nos camundongos Controle, Diabético, Treinado e Treinando Diabético após o exercício físico e tratamento com MLDZ: <i>Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM1 por MLDZ</i> .....	43
<b>Figura 7-</b> Imuno-histoquímica representativa para insulina, glucagon, PCNA e NF- $\kappa$ B (p65) do tecido pancreático nos grupos: Controle, Diabético, Treinado e Treinando Diabético após o exercício físico e tratamento com MLDZ: <i>Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM1 por MLDZ</i> .....	44
<b>Figura 8-</b> Análise quantitativa das marcações de Imuno-histoquímica para insulina, glucagon, PCNA e NF $\kappa$ B em ilhotas dos camundongos após o exercício físico e tratamento com MLDZ: <i>Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM1 por MLDZ</i> .....	45
<b>Figura 9-</b> Teste de citocinas no soro dos animais: Controle, Diabético, Treinado e Treinando Diabético após o exercício físico e tratamento com MLDZ: <i>Efeito do exercício físico em ilhotas pancreáticas de animais induzidos ao DM1 por MLDZ</i> .....	46
<b>Figura 10-</b> Fluxograma das etapas do experimento <i>in vitro</i> com linhagem celular INS-1E e tratamento com citocinas: IL-6, IL-1 $\beta$ e IFN $\gamma$ .....	49
<b>Figura 11-</b> Análise de expressão proteica de caspase-3 e iNOS após diferentes tratamento com citocinas IL-6, IL-1 $\beta$ e IFN $\gamma$ .....	50

<b>Tabela 1-</b> Monitoramento da massa corporal e da concentração de glicose plasmática dos animais durante a fase de adaptação e Fase de treino.....	38
<b>Tabela 2-</b> Monitoramento da massa corporal e da concentração de glicose plasmática em diferentes momentos após Múltiplas Doses Baixas de Estreptozotocina.....	39
<b>Tabela 3-</b> Parâmetros morfométricos das ilhotas pancreáticas dos animais Controle, Diabético, Treinado e Treinado Diabético.....	48

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- AGEs: Produtos de glicação avançada
- AKT: Proteína quinase B
- AMP: Proteína monofosfato de adenosina
- AMPK: Proteína quinase ativada por AMP
- C: Controle
- Ca<sup>2+</sup>: Cálcio
- CS: Controle Sedentário
- CT: Controle Treinado
- CD: Grupo de diferenciação
- T CD8: Linfócito CD8
- D: Diabético
- DAB: 3'Di-Amino-Benzidina
- DM: Diabetes *mellitus*
- DM1: Diabetes *mellitus* do tipo 1
- DT: Diabético Treinado
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- ERN: Espécie reativa de Nitrogênio
- ERO: Espécie Reativa de Oxigênio
- GLP-1: Peptídeo semelhante a glucagon 1
- GP130: Glicoproteína 130
- GPx: Glutathione Peroxidase
- GTT: Teste de tolerância à glicose
- HLA: Antígeno leucocitário humano
- IFN- $\gamma$ : Interferon *gamma*
- IL: Interleucina
- IL-1 $\beta$ : Interleucina 1- *Beta*
- IL-1ra: Antagonista do receptor de interleucina-1
- sIL6R: Receptor solúvel de IL-6
- iNOS: Óxido Nítrico Sintase induzida
- ITT: Teste de tolerância à insulina
- I $\kappa$ B: Inibidor *Kappa B*
- JAKs: Proteínas Janus quinase
- MCP-1: Fator quimiotático para monócitos e macrófagos

MLDZ: Múltiplas doses baixas de estreptozotocina

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear kappa B

NO: Óxido Nítrico

PCNA: Antígeno Nuclear de Células em Proliferação

PI3K: Proteína fosfatidilinositol 3-quinase

RE: Retículo Endoplasmático

STAT: Transdutor de sinal e ativador de transcrição

STZ: Estreptozotocina

T: Treinado

TD: Treinado Diabético

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	9-20
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	1-26
2.1. O Pâncreas endócrino .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	1
2.2. Desenvolvimento e regeneração da célula $\beta$ .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	1-22
2.3. Diabetes <i>mellitus</i> do tipo 1 .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	2-23
2.4. Inflamação e DM1 .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	3-24
2.5. Exercício físico no DM1: resposta imunomoduladora	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	4-26
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	7
3.1. Objetivo geral.....		27
3.2. Objetivos específicos.....		27
3.2.1. Avaliar o efeito do exercício físico no pâncreas endócrino de camundongos induzidos ao DM1 por MLDZ sobre: a, b, c e d.....		27
3.2.2. Avaliar o possível papel de IL-6 na proteção de células $\beta$ contra citocinas pró-inflamatórias em linhagem de células $\beta$ INS-1E.....		27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	8-37
4. Protocolo experimental animal.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	8
4.1. Protocolo de treinamento.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	8-29
4.1.1. Fases do treinamento .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	9
4.1.2. Teste de velocidade máxima .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	9-30
4.2. Indução farmacológica ao DM1 por doses baixas e múltiplas de estreptozotocina.....		30-31
4.3. Monitoramento da massa corporal e glicemia plasmática.....		31
4.4.1 Teste de tolerância à glicose (GTT) .....		31
4.4.2. Teste de tolerância à insulina (ITT) .....		31
4.4.3. Dosagem de insulina por radioimunoensaio .....		31-32
4.4.4. kGTT, kITT, HOMA-IR e HOMA- $\beta$ .....		32
4.5. Dosagem de citocinas no soro .....		32
4.6. Histologia do pâncreas e análise das ilhotas .	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	2-33
4.6.1. Coleta do pâncreas e inclusão do tecido em parafina	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	2-33
4.6.1.2. Técnicas histológicas para estudo do pâncreas	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	3

4.6.1.3. Coloração do tecido pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE).....	<b>Erro!</b>
<b>Indicador não definido.</b>	<b>3</b>
4.6.1.4. Análises morfológica do tecido pancreático através da técnica de coloração HE.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>3</b>
4.6.2. Imunohistoquímica em ilhotas pancreáticas....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>4</b>
4.6.2.1. Análise quantitativa das imunomarcações do tecido	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>5</b>
4.7. Protocolo experimental in vitro.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>5</b>
4.7.1. Culturas celulares .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>5</b>
4.7.2. Tratamentos da linhagem celular com citocinas	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>6</b>
4.7.3. Análise da expressão proteica por western blot	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>6-37</b>
4.8. Análise Estatística .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>7</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
	<b>8-50</b>
5.1. Controle ponderal e glicêmico após a fase de treino.....	<b>38</b>
5.2. Controle do peso corporal e glicêmico após a Fase de treino e indução do DM1.....	<b>38-39</b>
5.3. Teste de GTT e ITT.....	<b>39-41</b>
5.4. Insulinemia e modelo de avaliação da homeostase.....	<b>41-48</b>
5.5. Análise histomorfológica e imunohistoquímica do tecido pancreático.....	<b>49</b>
5.6. Análise de citocinas: IL-6, IL-10 e IL-13.....	<b>49</b>
5.7. Efeito de IL-6 sob a viabilidade de células INS-1E expostas a citocinas pro-inflamatórias.....	<b>49-50</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>51-59</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61-66</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* (DM) compreende um grupo de doenças metabólicas, de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crônica com alteração no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas como resultado de defeitos na secreção de insulina, ação da insulina ou ambos (1–3)

Diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) é a classificação dos casos de DM oriundos de uma doença autoimune crônica com forte componente inflamatório (4,5) que causa um ataque específico das células  $\beta$  pancreáticas pelo sistema imune (6–8). As ilhotas são invadidas por células mononucleares em uma reação inflamatória, com contato direto com macrófagos ativados e células T e exposição a mediadores como citocinas, instaurando o quadro de insulite, que contribuiu para a diminuição no número total de células  $\beta$  (7,8). Mediadores inflamatórios como quimiocinas e citocinas, amplificam a resposta imune contra células  $\beta$  pancreáticas (9–11) o que resulta em morte e disfunção celular via a ativação de dois principais fatores de transcrição: NF- $\kappa$ B e STAT-1. Além de controlar o processo de morte e disfunção celular, NF- $\kappa$ B também controla redes gênicas que modulam o fenótipo diferenciado das células  $\beta$  pancreáticas e atração de células do sistema imune (7).

A ausência do hormônio insulina proveniente da perda das células  $\beta$  leva ao quadro de hiperglicemia e hipoinsulinemia, e conseqüente alteração no metabolismo e utilização da glicose (1,12–14). O DM1 representa de 10 a 15% dos casos de Diabetes *mellitus* e sua incidência vem crescendo mundialmente (1,2).

O tratamento recomendado é pautado na administração de doses diárias de insulina exógena (1,2), e apesar de bem-sucedido, exige autocontrole e disciplina, então terapias são associadas à esse tratamento afim de melhorar o tratamento e minimizar à incidência de mortalidade e morbidade no DM1 por complicações (1,2,10). Sendo assim, preconiza-se dieta e exercício físico aliado ao tratamento medicamentoso.

Estudos demonstram que o exercício físico é capaz de aumentar a captação de glicose independente de insulina, pela musculatura esquelética (10), reduz o estresse oxidativo e melhora a produção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas (10).

Tem sido reportada em vários trabalhos uma função endócrina para o músculo esquelético (13–18) onde durante o exercício físico imunomoduladores são produzidos, como a interleucina 6 (IL-6), uma citocina pleiotrópica importante do sistema imunológico (12). A IL-6 quando secretada durante o exercício físico via contração muscular, estimula a secreção de outras citocinas anti-inflamatórias como IL-1Ra (antagonista do receptor da interleucina-1)

e a IL-10 (interleucina-10) e inibe a produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF $\alpha$  (11,12).

Recentemente a IL-6 tem sido associada à sobrevivência da célula  $\beta$ , exposta a condições pro-inflamatórias (18,19), porém os mecanismos moleculares envolvidos nessa proteção ainda não foram totalmente elucidados. Essa proteção parece envolver a inibição da ativação de vias controladas por STAT1 e NF- $\kappa$ B, diminuindo a ativação do estresse de RE (20).

Visto que o exercício físico é uma estratégia terapêutica para o tratamento de DM1 e que é capaz de induzir na musculatura esquelética a produção e secreção de fatores anti-inflamatórios, buscamos avaliar o potencial efeito protetor do exercício físico na prevenção e/ou retardo no desenvolvimento do DM1 em um modelo experimental de camundongos, induzida por doses múltiplas e baixas de estreptozotocina (MLDZ). Para isso avaliamos a presença de células  $\beta$  e  $\alpha$ , o grau de proliferação e ativação de NF- $\kappa$ B em ilhotas pancreáticas por imunomarcção de pâncreas para insulina, glucagon, PCNA e NF- $\kappa$ B nuclear, respectivamente. Para avaliar se os efeitos benéficos observados *in vivo* seriam devido a secreção de IL-6 pela musculatura esquelética durante o exercício físico, como outros trabalhos sugeriram (21–23), avaliamos *in vitro* o efeito da pré-exposição de linhagem de células  $\beta$  à IL-6 sobre a ativação da expressão de iNOS, uma via conhecida pro-apoptótica induzida em células  $\beta$  ativada por exposição à IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  (20,22–27). Nossos esforços foram para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nessa modulação que possam ser desencadeado por sinais produzidos durante o exercício físico pensando em novos avanços terapêuticos na prevenção da destruição das células  $\beta$  pancreáticas, portanto, para a sobrevivência da célula  $\beta$  durante o desenvolvimento do DM1 e/ou em transplantes de ilhotas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. O Pâncreas Endócrino**

O pâncreas é uma glândula mista constituída por tecido endócrinos e exócrinos. Aproximadamente 2% do órgão representa o tecido endócrino, organizado na unidade funcional chamada ilhotas de Langherans ou pancreáticas, que compreende as células alfa, beta, delta, épsilon e PP, que secretam respectivamente os hormônios glucagon, insulina, somatostatina, grelina e polipeptídio pancreático (28).

As células  $\beta$  pancreáticas constituem maior parte da massa total da ilhota pancreática (em murinos 70-80% e em humanos aproximadamente 55%) e são responsáveis pela síntese, armazenamento e secreção de insulina (29). A insulina é um hormônio polipeptídico que apresenta 51 aminoácidos em sua estrutura, é capaz de regular diversos processos fisiológicos: controle glicêmico, crescimento e diferenciação celular (30).

Em humanos, as células  $\beta$  presentes no pâncreas humano embrionário são oriundas da neogênese de células precursoras diferenciadas (31). A proliferação das células  $\beta$ , que é insignificante no pâncreas humano embrionário, começa após o nascimento, continua em sua taxa mais alta por volta de um ano, e então declina rapidamente na primeira infância (32).

### **2.2. Desenvolvimento e regeneração da célula $\beta$**

Em murinos, o desenvolvimento do pâncreas ocorre aproximadamente 8.5 dias pós-coito (28). O desenvolvimento morfológico do pâncreas torna-se evidente no desenvolvimento embrionário a partir de um prolongamento de dois brotos pancreáticos ao longo do duodeno e estômago, com epitélio pancreático indiferenciado circundado por células mesenquimais. Com intensa proliferação celular os brotos pancreáticos dão origem à estruturas tubulares ramificadas, com alterações morfológicas e diferenciação das células endócrinas, acinares e ductais. Em um último estágio o pâncreas adquire forma de um órgão maduro, dividido anatomicamente em região da cabeça, corpo e cauda, com aglutinação de células acinares em torno das extremidades da rede ductal e agregados celulares endócrinos-ilhotas de Langerhans, espalhados ao longo do órgão (31).

Como citado, a proliferação e diferenciação celular é um processo acentuado ao longo do desenvolvimento do órgão, e apenas próximo ao nascimento inicia-se uma agregação de células endócrinas para formar ilhotas maduras (31). Vale ressaltar que mesmo que a formação do órgão maduro, com a presença de células endócrinas maduras, ocorra apenas no último estágio do desenvolvimento do pâncreas, é possível detectar a expressão dos hormônios glucagon e insulina nos estágios iniciais do desenvolvimento pancreático (28).

O processo de expansão e proliferação de células  $\beta$  em murinos, pode ocorrer da re-diferenciação de células  $\beta$  desdiferenciadas, e também através da transdiferenciação de outros tipos celulares (células  $\alpha$ ,  $\delta$  ou enteroendócrinas) em células  $\beta$  (31,33) O pico de proliferação das células  $\beta$ , é consideravelmente aumentado, com replicação de células neonatais em 10–30% e parece estar associado à idade, com taxas maiores de replicação celular em estágios juvenis entre 2 a 3 meses de idade (31,34).

### 2.3. Diabetes *mellitus* do tipo 1

Diabetes *mellitus* (DM) é o termo geral para distúrbios heterogêneos do metabolismo, com alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, que resulta em hiperglicemia crônica (6), devido a problemas com secreção, em conjunto ou não, com a ação prejudicada da insulina (1,2). De acordo com a American Diabetes Association (ADA), O DM pode ser classificado em diferentes tipos, segundo sua etiologia, sendo que Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) ocorre à destruição auto-imune das células  $\beta$ , geralmente levando à deficiência absoluta de insulina, diabetes tipo 2 (DM2) devido a uma perda progressiva da secreção de insulina das células  $\beta$  com frequência de resistência à insulina, diabetes mellitus gestacional (DMG), que é diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gravidez sem manifestação de DM antes da gestação e tipos específicos de diabetes devido a outras causas, exemplo, DM neonatal (síndromes monogênicas), DM de maturidade dos jovens (MODY), doenças do pâncreas exócrino (como fibrose cística e pancreatite) e DM induzido por substâncias químicas/medicamentos, como com uso de glicocorticoide, no tratamento do HIV / AIDS ou após transplante de órgãos (2)

Diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) é uma doença grave, resultado de um processo autoimune, onde a inflamação crônica resulta em destruição específica de células  $\beta$  pancreáticas, se desenvolvendo ao longo de vários anos, o que resulta na falta ou ausência de produção de insulina (7,35,36). A homeostase normal da glicose é interrompida no DM1 como resultado da redução gradual na massa das células  $\beta$  e subsequente falha das células  $\beta$  secretoras de insulina residuais em compensar (29).

Os sintomas clínicos do DM1 só surgem quando 70-80% da massa total de células  $\beta$  é perdida, sendo que a taxa líquida de perda celular excede a taxa de substituição de células  $\beta$  (37). Kalscheuer e Lehnert (38), sugerem a utilização de alguns critérios para classificação do DM1: Cetose, perda rápida de peso, Índice de Massa Corpórea (IMC)  $<25 \text{ kg/m}^2$ , Idade  $< 50$  anos na manifestação, histórico de doenças autoimunes conhecida ou de cunho familiar (38).

As recomendações atuais para DM1, de acordo com ADA são: O uso de glicemia plasmática, em vez de A1C, para diagnosticar o início agudo DM1 em indivíduos com sintomas de hiperglicemia. Atualmente, a triagem para DM1 com um painel de auto-anticorpos é recomendada apenas no cenário de um estudo de pesquisa ou histórico familiar. E persistência de dois ou mais auto-anticorpos prediz diabetes clínico e pode servir como indicação de intervenção no cenário de um ensaio clínico (2). O DM1 representa 10 a 15% de todos os casos de DM (1,2).

Apesar da eficácia insulino terapia exógena, ainda pode existir complicações a longo prazo como cegueira, insuficiência renal e doença cardiovascular oriundas de um tratamento mal realizado. Embora muitas vezes esquecido, o músculo esquelético também é afetado no DM1, com desequilíbrios físicos e metabólicos (39,40).

O controle glicêmico inadequado aumenta a probabilidade de desenvolver resistência à insulina, hiperglicemia e glicotoxicidade. A etiologia da resistência à insulina no DM1 não é muito usual, mas afeta aproximadamente 20% dos pacientes com DM1 e pode ser decorrente do acúmulo de produtos finais glicêmicos avançados (AGEs), mecanismos autoimunes, dentre outros fatores (41).

#### **2.4. Inflamação e DM1**

O desenvolvimento do DM1 envolve uma interação complexa de múltiplos locus genéticos como genes do locus MHC (complexo principal de histocompatibilidade) classe I (HLA locus A, B e C), classe II (HLA locus DR, DQ e DP) e classe III, além de genes não-MHC (o polimorfismo no gene da insulina situado no cromossomo 11 e os genes para o TAP (transportador envolvido na apresentação de antígenos) (6) e ambientais, e é atribuída à imunidade adaptativa e também inflamação inata (6,42,43).

Células inflamatórias migram para local afetado através de moléculas de adesão como selectinas e as integrinas (6), os linfócito T CD-4 após ativação desencadeiam a produção de várias citocinas, que são sintetizadas e liberadas de células das ilhotas pancreáticas, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$  e IL-12 (23), que são mediadores proteicos de baixo peso molecular, para promover a proliferação e diferenciação de linfócitos T e outras células, como linfócitos B e macrófagos (6).

A apoptose é a principal causa de morte de células  $\beta$  durante o desenvolvimento do DM1, e citocinas pró-inflamatórias podem regular respostas deletérias para a sobrevivência das células  $\beta$ . A IL-1 $\beta$ , induz óxido nítrico sintase (iNOS) e toxicidade na célula  $\beta$  (6), com produção de espécies reativas de oxigênio, fragmentação de DNA, dano mitocondrial,

produção excessiva de polipeptídeo amilóide de ilhotas via estresse do retículo endoplasmático (RE), alterações em mecanismos de autofagia, formação e ativação de inflamassoma, que resulta no aumento do estresse oxidativo produzido pelo dano mitocondrial (44). O IFN- $\gamma$  potencializa os efeitos sobre a produção de iNOS e NO em combinação com IL-1 $\beta$  (4,45–47). A IL-1 $\beta$  ativa diversos fatores de transcrição, entre eles o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (48,49). Este quando ativado, regula negativamente a expressão de outros fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação e função das células  $\beta$ . NF- $\kappa$ B leva, entre outros, à produção de NO e quimiocinas e depleção do cálcio do ER (35) e essa cascata de eventos moleculares leva a morte, principalmente por apoptose das células  $\beta$ . Sendo assim, a resposta celular e humoral amplifica a resposta imunológica durante a DM1 (6).

### **2.5. Exercício físico no DM1: resposta imunomoduladora**

Como discutido acima, a expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias leva a um aumento da resposta inflamatória no ambiente da ilhota e resulta na morte das células  $\beta$  (7). O exercício físico é uma ferramenta não farmacológica eficiente no tratamento do DM (50), é capaz de induz vários benefícios, reduzir à inflamação e melhorar as defesas antioxidantes.

Recentemente, o músculo esquelético passou a ser considerado um órgão endócrino devido à capacidade de *crosstalk* entre os tecidos através da liberação de miocinas, que são citocinas produzidas e secretada pela contração do músculo (51), surgindo assim a associação do exercício físico e efeitos imunomoduladores (13,15,21,52–54).

As citocinas são glicoproteínas que comandam, amplificam e regulam a magnitude e duração dos eventos inflamatórios, podendo ter atividade pró-inflamatória (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6), anti-inflamatória (IL-6, IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 e IL-1ra), ou ainda, de modulação da inflamação (IL-6) (55). As miocinas por sua vez, fazem parte de uma rede de comunicação interórgãos, exercendo efeitos auto-/parácrinos e endócrinos (11,15,48,51).

A primeira miocina descrita na literatura foi a IL-6, sendo também a mais estudada (56) é uma citocina pleiotrópica (22-28 kD) que é sintetizada como uma proteína precursora de 212 aminoácidos. É produzida por diversas células como monócitos, macrófagos, fibroblastos, dentre outros, o que reflete a importância do seu papel na modulação do sistema imunológico (57). A IL-6 é considerada uma citocina pró-inflamatória e uma miocina anti-inflamatória (58) com impacto fundamental na imunorregulação e eventos não imunes na maioria dos tipos celulares e tecidos fora do sistema imunológico (8). As ações anti-



inflamatórias da IL-6 incluem efeitos inibitórios sobre a produção e secreção de TNF- $\alpha$  e estímulo da síntese das citocinas anti-inflamatórias como IL-1ra e IL-10 (55).

A IL-6 pertence a uma família de citocinas que são caracterizadas pelo uso comum do receptor da gp130 (também conhecido como IL-6R $\beta$  ou CD130 como uma subunidade de sinalização. Os dois receptores de IL-6, gp130 e IL-6R $\alpha$  (também conhecidos como gp80 ou CD126), pertencem à família de receptores de citocinas do tipo I (8).

A sinalização de IL-6 é clássica e inicia-se pela ligação da citocina ao receptor de IL-6 ligado à membrana (IL-6R), que recruta a glicoproteína 130 (gp 130) que é um transdutor de sinal formando um complexo IL-6/IL-6R/gp130 de alta afinidade, que ativa mecanismos moleculares que levam a ativação de STAT3 e STAT1, os quais estão envolvidos nas respostas anti-inflamatórias e regenerativas da IL-6 (15,26,48,51,52).

A ligação de IL-6 a seu receptor pode também ativar outras potencialmente protetoras contra apoptose, como a via PI3K/Akt (26). Existe também o processo de trans-sinalização, no qual a IL-6 liga-se sIL-6R (uma forma solúvel de IL-6R sem os domínios transmembrana e citoplasmático) formando o complexo IL-6/sIL-6R, com alta afinidade. O complexo IL-6/sIL-6R atua como um agonista da sinalização de IL-6 mediada por gp130 e expande o espectro de potenciais alvos da IL-6 para virtualmente qualquer tipo de célula, devido à expressão onipresente da gp130 (26). Vale ressaltar que gp130 também apresenta uma forma solúvel, e pode associar-se ao complexo IL-6/sIL-6R e leva à inibição da trans-sinalização de IL-6, sem afetar a sinalização clássica. A via trans-sinalização de IL-6 está associada as respostas pró-inflamatórias e estados patológicos (26).

A resposta celular à sinalização da IL-6 depende da via de sinalização que predomina no tipo de célula individual, do estado metabólico da célula, combinação de estímulos externos (8).

Devido às ações pleiotrópicas da IL-6 em vários tecidos e órgãos e a possibilidade de *crossstalk* entre os tecidos e órgãos afetados, surge também a possibilidade dessa citocina atuar na modulação da função endócrina do músculo esquelético, permitindo a adaptação metabólica ao aumento da demanda de insulina e a melhora da função das células  $\beta$  em resposta ao exercício físico (26).

O exercício físico através de efeito anti-inflamatório é capaz de reduzir o dano a célula  $\beta$  durante o DM provocado por STZ (3). Em modelos experimentais de DM1 em murinos o exercício físico levou ao aumento de conteúdo e secreção de insulina e preservou a viabilidade das células  $\beta$  (50).

Além da melhoria na função e viabilidade celular, o exercício induz melhoria na ação da insulina, observa-se que uma única sessão aguda de exercício aumenta a captação de glicose independente de insulina no músculo, a sensibilidade à insulina associadas ao exercício físico é atribuída à mecanismos moleculares na expressão e/ou atividade de proteínas envolvidas na transdução de sinal da insulina no músculo esquelético, como a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (59). Além disso, vale lembrar que musculatura esquelética corresponde a aproximadamente 40% da massa corporal total e é responsável por 30% do dispêndio energético, sendo um dos principais tecidos responsável pela captação e o armazenagem de glicose (60).

Desta forma, o exercício físico, através dos seus efeitos imunomoduladores têm sido associado positivamente no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes, como DM1 e artrite reumatóide. Somasse a seus benefícios o fato de propiciar o aumento da capacidade oxidativa no músculo, regulando a oxidação lipídica e a expressão de proteínas envolvidas na biogênese mitocondrial (59), podendo assim reduzir o risco de complicações diabética em pacientes com DM1 (61).

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do exercício físico aeróbico de moderada intensidade na prevenção e/ou retardo na destruição das células  $\beta$  em ilhotas de camundongos induzidos ao modelo de DM1 por doses múltiplas e baixas de estreptozotocina (MLDZ). Assim como, *in vitro*, avaliar o papel de IL-6 na preservação da célula  $\beta$  frente a uma exposição a citocinas pro-inflamatórias.

#### 3.2. Objetivos específicos

**3.2.1. Avaliar o efeito do exercício físico no pâncreas endócrino de camundongos induzidos ao DM1 por MLDZ sobre:**

- a) Homeostase glicêmica por avaliação da glicemia, GTT, ITT e insulinemia e avaliação de HOMA- $\beta$  e HOMA-IR;
- b) Análise do pâncreas endócrino em relação a parâmetros morfométricos, tamanho e número de ilhotas por histologia;
- b) Análise da presença e distribuição de células  $\beta$  e  $\alpha$  funcionais através de imunohistoquímica para insulina e glucagon;
- c) Avaliação do grau de proliferação das células das ilhotas por imunohistoquímica para PCNA;
- d) Avaliação do grau de indução de morte por inflamação através da marcação nuclear de NF- $\kappa$ B, sabidamente ativado em células  $\beta$  expostas a citocinas pro-inflamatórias e que leva a morte das células  $\beta$ .

**3.2.2. Avaliar o possível papel de IL-6 na proteção de células  $\beta$  contra citocinas pro-inflamatórias em linhagem de células  $\beta$  INS-1E**

- a) Avaliar os efeitos sobre a viabilidade de células  $\beta$  pancreáticas da exposição a citocinas pro-inflamatórias na presença ou ausência de IL-6, analisando a expressão de Caspase-3 e iNOS por western blot.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

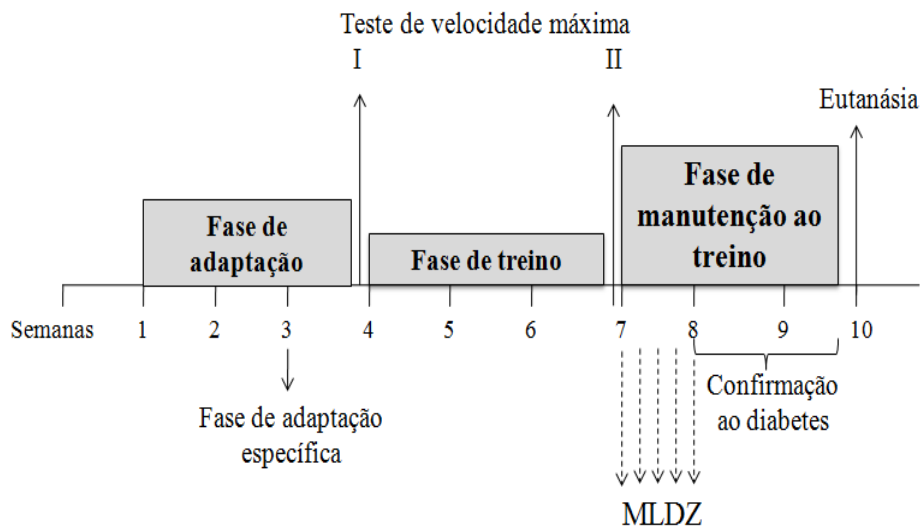
Foram utilizados 32 camundongos machos linhagem C57BL/6J com 6-7 semanas de idade (19-27g) adquiridos da Anilab animais de laboratório criação e comércio (Paulínia/SP, Brasil) que foram mantidos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, alojados em gaiola padrão (até quatro animais por gaiola), à temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa do ar de 55% e sob ciclo de iluminação (claro/escuro) de 12/12 h (luz acesa às 6:00h). A ração e água foram ofertadas *ad libitum* por meio de ração específica para roedores (Nuvilab cr1, Nuvital Nutrientes LTDA, Curitiba). A massa corporal e a glicemia plasmática dos animais foram monitoradas ao longo de todo o protocolo experimental. O estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animal, da Universidade de São Paulo, Brasil (processo CEUA nº: 066/2015).

### 4. Protocolo experimental animal

#### 4.1. Protocolo de treinamento

O protocolo de treinamento utilizado neste estudo foi adaptado do protocolo de exercício descrito anteriormente por Paula e colaboradores (17), e foi estruturado em três fases: **Fase de adaptação**, **Fase de treino** e de **Fase de manutenção ao treino** (Figura 1).

**Figura 1- Esquema das fases do protocolo experimental**



Todos os animais foram aleatoriamente randomizados em dois grupos: grupo Controle Sedentário (que permaneceram em suas gaiolas sem treinamento) e grupo Controle Treinado (executam o protocolo de treinamento na fase de treino e de manutenção de treino). Vale ressaltar que ambos os grupos Controle e Treinado executaram a Fase de adaptação.

E com a indução ao diabetes (após à Fase de Treino e durante a Fase de Manutenção ao treino) os animais foram subdivididos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo Controle Treinado (Treinado e Treinado Diabético) e Grupo Controle Sedentário (Controle e Diabético).

#### **4.1.1. Fases do treinamento:**

**Fase de adaptação:** Nas primeiras duas semanas os animais permaneceram no biotério sem qualquer manipulação para minimizar o estresse do transporte e adaptação ao ambiente, com água e ração *ad libitum*. Após ambientação os animais passaram pela Fase de adaptação específica ao treino (por uma semana), para adaptação ao tapete rolante (Esteira motorizada: esteira digital para ratos e camundongos- AVS projetos- SP, Brasil) na qual os animais passaram por cinco sessões de exercício leve com velocidade constante de 10 m/min., iniciando com 10 min. e progredindo ao longo da semana com a adição de 10 min./dia (Figura 1).

**Fase de treino:** Após a fase da adaptação, todos os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo. A média dos valores obtidos no teste foi utilizada para determinar a intensidade do treinamento. O protocolo de exercício físico consistiu em 60 min./dia de corrida em tapete rolante com intensidade de aproximadamente 70% da velocidade máxima, 5 dias por semana durante 3 semanas. Todos os animais permaneceram na sala de treinamento durante o treino e foram manuseados, mas o grupo Controle Sedentário (não-exercitado) permaneceu em suas gaiolas enquanto o grupo Controle Treinado realizavam o treinamento (Figura 1).

**Fase de manutenção do treino:** Nessa fase os animais Controle Treinado (que foram divididos em Treinados e Treinados Diabéticos) continuaram o treino de 60 min./dia de corrida em tapete rolante (intensidade de aproximadamente 70% da velocidade máxima) durante 5 dias/semana, no período de indução ao diabetes, confirmação do diabetes e até a eutanásia (Figura 1).

#### **4.1.2. Teste de velocidade máxima**

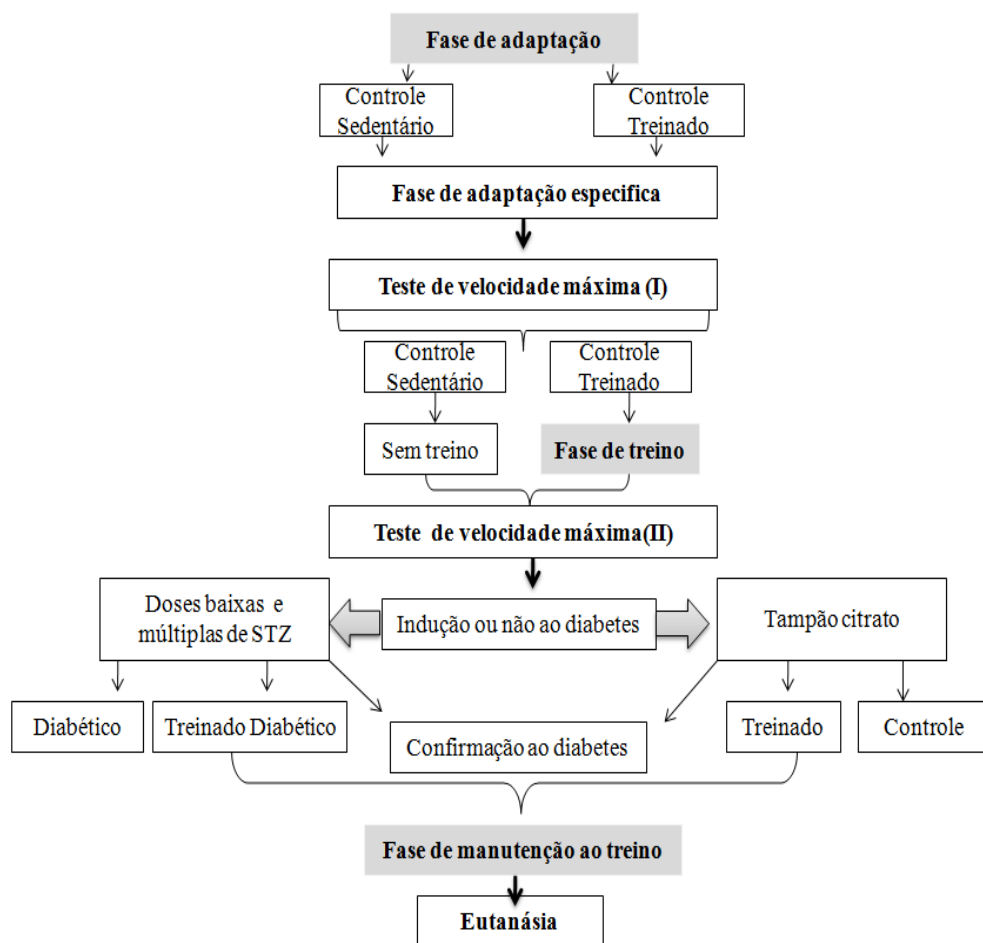
O teste de velocidade máxima foi realizado através do aumento progressivo da velocidade na esteira rolante até que os animais chegassem à exaustão e a sua finalidade foi estipular a carga de treinamento dos animais. No início do teste, os animais caminhavam por 5 min. na velocidade de 10 m/min. no tapete rolante, após o sexto min. essa velocidade era acrescida em 3 m/min. até que os animais atingissem a exaustão (definida pela ausência de

movimento no qual o animal permanece parado por mais de 10 segundos). Este teste foi realizado antes da Fase de treino (I) e após a Fase de treino (II), Figura 1.

#### 4.2. Indução farmacológica ao DM1 por doses baixas e múltiplas de estreptozotocina (MLDZ)

O desenho experimental é detalhado na figura 2, onde em negrito são indicadas as fases mostradas na figura 1.

**Figura 2- Fluxograma das etapas do estudo**



Legenda: Na primeira fase do estudo foi realizada a **Fase de adaptação** (ambientação dos animais) divididos em: Controle Sedentário e Controle Treinado. Os animais passaram então por uma semana de **Fase de adaptação específica** (ao treino) e ao final da fase de adaptação específica foi feito o **Teste de velocidade máxima I**. Na **Fase de treino** os animais foram treinados na intensidade de aproximadamente 70% da velocidade máxima por três semanas (Controle Treinado) ou deixados nas gaiolas sem treino (Controle Sedentário). Após a fase de treino, todos os animais passaram pelo **teste II** e foram subdivididos em quatro grupos: Controle e Treinado (injetados com solução veículo por cinco dias consecutivos), Diabético e Treinado Diabético (tratados com MLDZ). Nas semanas seguintes (oitava e nona) os animais passaram pela confirmação da indução ao DM. Nos animais treinados (Treinado e Treinado Diabético) o exercício perdurou na **Fase de manutenção ao treino** até a confirmação do diabetes, após o mesmo foi realizado a **Eutanásia** de todos os animais.

Após a fase de treino foi realizado à indução ao DM1 por MLDZ (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), através de protocolo já padronizado com a administração de injeções intraperitoneais de 50 mg/kg de estreptozotocina (STZ) em 0.1 mmol/L de tampão de citrato (pH 4.5) no grupo induzido ao DM (Diabético e Treinado Diabético) ou somente de tampão citrato (solução veículo), no grupo controle (Controle e Treinado), durante 5 dias consecutivos (45,62,63). Para confirmação da indução do DM um dia após a última injeção de MLDZ iniciou-se o monitoramento da glicose plasmática em dias alternados (animais com restrição alimentar de 4hrs). Os animais foram considerados hiperglicêmicos após três medidas sequenciais com glicemia plasmática  $\geq 200$  mg/dl.

### **4.3. Monitoramento da massa corporal e glicemia plasmática**

A massa corporal dos animais foi mensurada por meio de balança eletrônica de precisão (SF-400 até 10 kg) e a glicose plasmática através do glicosímetro (OneTouch® UltraMini- ©Johnson & Johnson Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda,São Paulo, Brasil ) ao longo de todo o protocolo experimental.

### **4.4. Mensuração sérica**

#### **4.4.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)**

O GTT foi realizado na sétima (após a **Fase de treino**) e nona (após a **Fase de manutenção ao treino**) semana do protocolo experimental, após jejum alimentar, sendo o alimento retirado as 22:00 hrs e o experimento realizado as 8:00 hrs do dia seguinte. A concentração de glicose em sangue misto, obtido através da veia caudal, foi feita antes (0 min.) e após (15, 30, 60 e 120 min.) a administrada de injeção intraperitoneal de glicose na dose de 1g/kg de glicose dissolvida em solução salina (NaCl à 0.9%).

#### **4.4.2. Teste de tolerância à insulina (ITT)**

Após o final do GTT a ração foi ofertada aos animais por 1h e depois retirada por 2hrs. Após esse período o sangue misto foi coletado da veia caudal antes (0 min.) e após (5, 10, 15, 20, 30, 60 e 120 min.) a administrada intraperitoneal de 1U/kg de insulina dissolvida em solução salina (NaCl à 0.9%).

#### **4.4.3. Dosagem de insulina por radioimunoensaio**

Durante o GTT (tempo 0, 30 e 60 min.) foram coletados 2 capilares de sangue misto da veia caudal para dosagem de insulina por radioimunoensaio (17). As amostras de sangue

foram centrífugas à 5000 g, por 15 min. à 4°C e o soro de cada amostra foi armazenado à -20°C. Através das concentrações conhecidas de hormônio marcado radioativamente a concentração do hormônio de cada amostra foi determinada (17).

#### **4.4.4. HOMA-IR e HOMA-β**

A sensibilidade periférica à insulina e a capacidade funcional das células β pancreáticas foram avaliadas pelo modelo de avaliação da homeostase (HOMA). Foram utilizados os valores de glicemia plasmática iniciais (tempo 0min. do GTT) e insulinemia (tempo 5 min. do ITT) para calcular o índice de sensibilidade à insulina (HOMA-IR) e a capacidade secretora da célula β (HOMA-β), utilizando as equações descritas por Matthews e colaboradores (64) e adaptada por Van Dijk, et al. (65):

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{glicose} \times \text{insulina (64,65)}}{22,5}$$

$$\text{HOMA-}\beta = 20 \times \frac{\text{insulina (64,65)}}{\text{glicose} - 3,5}$$

#### **4.5. Dosagem de citocinas no soro**

Ao final de 9 semanas totais do protocolo experimental, na décima semana e com 4 hrs de restrição alimentar os animais foram eutanasiados por decapitação e amostras de sangue misto foram coletadas assim como o tecido pancreático. As amostras de sangue foram centrífugas à 5000g (por 15 min.) à 4° C e o soro de cada amostra foi armazenado à -80°C para a mensuração de citocinas (IL-6, IL-10 e IL-13) utilizando Kit Multiplex (tecnologia Luminex xMAP®). Para o ensaio foram utilizados 25 µl de amostra e foi realizado mediante incubação overnight (de acordo com recomendações do fabricante).

#### **4.6. Histologia do pâncreas e análise das ilhotas**

##### **4.6.1. Coleta do pâncreas e inclusão do tecido em parafina**

Dois dias após a realização dos testes de GTT e ITT (após a indução ao DM) os animais foram eutanasiados, e então o pâncreas dos animais foram coletado e imerso em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), pH 7,4, 4°C durante 24 hrs. E então o tecido pancreático passou por sucessivos banhos de etanol em diferentes tempos (uma vez em etanol à 70% durante 1h; 80% durante 20 min., 95% durante 20 min. três vezes em etanol 100% durante 15 min.) e Xilol também em diferentes tempos (Xilol I -50% Xilol absoluto e 50% etanol 100% durante 10 min. por duas vezes em Xilol II absoluto durante 25 min.), e na



sequência o tecido foi imerso em parafina por 1h durante duas vezes e incluídos em parafina para montagem de blocos de parafina. Foram feitos cortes seriados no tecido (5,0 µm de espessura) com micrótomo rotativo/semiautomático (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), estendidos em lâminas tratadas com poli-L-lisina (Lâmina de vidro para microscópio - SPLab, Jaguare, São Paulo) e utilizados posteriormente para coloração com Hematoxilina-Eosina ou ensaios imunológicos.

#### **4.6.1.2. Técnicas histológicas para estudo do pâncreas**

##### **4.6.1.2.1 Coloração do tecido pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE)**

Os tecidos depositados em lâminas tratadas com poli-L-lisina foram desparafinizados em Xilol absoluto durante 6 min. por duas vezes, e depois hidratados em sucessivos banhos de etanol à 100, 90 e 70% também durante 6 min. As lâminas permaneceram em água corrente por 2 min. e então foi adicionado o corante hematoxilina durante 2 min. Na sequência foi retirado o excesso do corante em água e as lâminas permaneceram por mais 3 min. em água corrente e foi adicionado o corante Eosina durante 2 min. Após a coloração os cortes foram desidratados em banhos sucessivos de etanol 90 e 100% durante 1min. e diafanizados em Xilol I e II durante 1 min., e só então que as lâminas foram montadas em resina de Dammar (resina diluída em xilol).

##### **4.6.1.2.2 Análises morfométrica do tecido pancreático através da técnica de coloração HE**

As lâminas dos cortes histológicos corados com a técnica HE foram fotodocumentadas em microscópio de luz (Axioskop 2- Primo Star Binocular, Zeiss, Alemanha) com a objetiva no aumento 10x e analisadas com o auxílio do software axiovision rel.4.8 (Material Science Software for Research and Engineering, Zeiss, Alemanha).

Foram utilizados três cortes seriados para a análise em relação à área. Foram calculadas: área total do tecido (AT), área total da ilhota (AI) e número de ilhotas no tecido, utilizando a somatória das áreas de três cortes seriados.

A massa da ilhota foi calculada através da equação previamente descrita por Tellez e Montanya (66), Ribeiro, Santos-Silva e Vettorazzi, (67), Santos-Silva, Ribeiro e Vettorazzi (68):

$$\text{Massa da ilhota: } \frac{\text{Peso do pâncreas (mg)} \times \text{área da ilhota}}{\text{área do tecido}} \quad (66-68)$$

#### 4.6.2. Imunohistoquímica em ilhotas pancreáticas

Os tecidos depositados em lâminas tratadas com poli-L-lisina permaneceram em estufa à 50°C por 10 min., após resfriamento em temperatura ambiente (TA) foram desparafinizados em Xilol absoluto durante 30 min. por duas vezes e hidratados em sucessivos banhos de etanol em diferentes tempos (100% durante 20 min. por duas vezes, 95% durante 15 min., 70% durante 5 min.) e permaneceram na sequência em PBS + Tween 0,03%, pH 7,32, por 5 min. Em seguida realizou-se bloqueio de peroxidases endógenas com solução PBS 0,3% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% (Merck), durante 30 min. Todas as etapas descritas acima foram realizadas em TA.

Seguido da exposição do epítipo antigênico (tampão citrato de sódio e Tween20 (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios, Diadema, São Paulo) 0,3% a 95°C, pH = 6,02 por 30 min. Após esse período as lâminas foram lavadas em solução PBS + Tween20, 0,3% por três vezes durante 5 min. e foi realizado o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos dos sítios antigênicos inespecíficos com solução PSB + BSA 5% (soro de cabra na proporção de 50:50%) por 1h. Seguiu-se, então, a incubação dos anticorpos primários: policlonais anti-*insulina* (guinea Pig #A0564, doado pelo Dr. Leclercq-Meyer, Université Libre de Bruxelles, Belgium) (1:500), anti-*glucagon* (Rabbit anti-glucagon #A0565, Dako North America) (1:500), anti-*NF-κB p65* (Rabbit C-20 #372, Santa Cruz) (1:200); e monoclonal anti-*PCNA* (Mouse PC10 #ab29, ABCAM) (1:200), diluídos em PBS/Tween20 0,3% por uma noite (overnight) a 4°C. Nas lâminas que serviram de controle negativo da reação, foi omitido o anticorpo primário.

No dia seguinte, os cortes foram incubados com os respectivos anticorpos secundários conjugados com peroxidase, anti-rabbit peroxidase-labeled (Santa Cruz) diluído 1:200 em PBS acrescido de Tween20 (0,3% pH 7,2 a 7,4) durante 2 horas e trinta min. em TA. Os cortes foram lavados em PBS, e o produto da reação foi revelado com DAB (3,3' Diaminobenzidina tetrahidroclorato) acrescido de 0,03% de peróxido de hidrogênio (Synth, Labsynth Produtos para Laboratórios, Diadema, São Paulo) durante 4 min. Seguiu-se uma rápida lavagem em PBS e água destilada. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Mayer, lavados e desidratados novamente em banhos sucessivos de etanol e Xilol (etanol a 95% durante 5 min., 100% durante 10 min. por duas vezes, Xilol I durante 10 min. por duas vezes e Xilol absoluto durante 10 min.) e montadas em resina de Dammar (resina diluída em xilol).

#### 4.6.2.1. Análise quantitativa das imunomarcações do tecido

As lâminas utilizadas para análises de imunohistoquímica foram fotodocumentadas em microscópio de luz (Axioskop 2 - Primo Star Binocular, Zeiss, Alemanha) com a objetiva no aumento de 40x e distribuição FIJI do software ImageJ e com o plugin FIJI (Schindelin, et al., 2012). Para o cálculo de marcação específica para insulina (células  $\beta$ ) e glucagon (células  $\alpha$ ) foi utilizado a área marcada especificamente para insulina (AI) ou para glucagon (AG) comparada a área total de ilhota. E a massa de células  $\beta$  e  $\alpha$ , foi calculada utilizando a equação previamente descrita por Tellez e Montanya (66), Ribeiro, Santos-Silva e Vettorazzi (67), Santos-Silva, Ribeiro e Vettorazzi (68):

$$\text{Massa de célula } \beta: \frac{\text{Peso do p\~{a}ncreas (mg) x \u00e1rea de c\u00e9lula } \beta}{\text{\u00e1rea do tecido}} \text{ (66-68)}$$

$$\text{Massa de c\u00e9lula } \alpha: \frac{\text{Peso do p\~{a}ncreas (mg) x \u00e1rea de c\u00e9lula } \alpha}{\text{\u00e1rea do tecido}} \text{ (66-68)}$$

Para a marcação de PCNA e NF- $\kappa$ B-p65 foram quantificados os núcleos marcados comparados ao número de núcleos totais na ilhota, evidenciados pela DAB, gerando um valor percentual de núcleos marcados.

### 4.7. Protocolo experimental *in vitro*

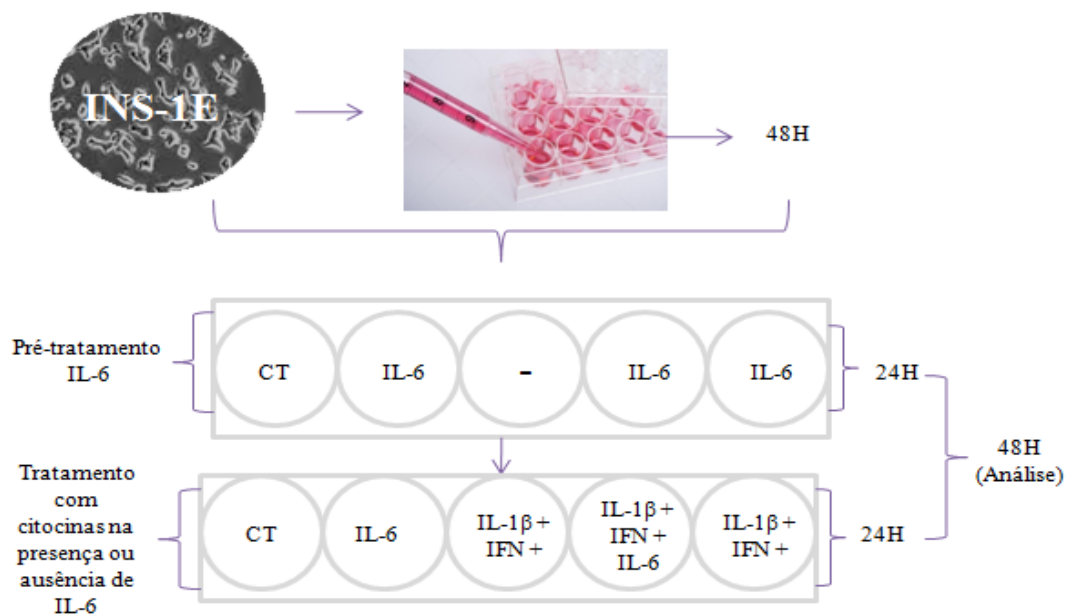
#### 4.7.1. Culturas celulares

Células de insulinoma de rato (linhagem INS-1E), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Claes B. Wollheim e Prof. Dr. Pierre Maechler (Universidade de Genebra, Suíça), foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Gib-co/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 10 mM HEPES, 100 U/mL, penicilina, 100  $\mu$ g/mL estreptomicina, 1 mM piruvato de sódio e 50  $\mu$ M 2-mercaptoetanol. A linhagem celular utilizada apresenta características similares às células  $\beta$  primárias de rato, tanto em relação à expressão gênica induzida por citocinas (69), quanto a secreção de insulina em resposta a glicose (70). As culturas dessas células foram mantidas em incubadora (CO-24, New Brunswick Scientific Co, Inc., New Jersey, USA) a 37°C, em atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.7.2. Tratamentos da linhagem celular com citocinas

As células foram plaqueadas e cultivadas por 48h antes de qualquer tratamento para garantir sua aderência à placa. As células foram expostas (pré-tratamento) ou não a 100 U/mL de IL-6 (Life Technologies, Grand Island, New York, USA) por 24h e então, expostas ou não a citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  recombinante humana (Promega) na concentração de 50 U/mL e IFN (Promega) na concentração de 10 U/mL na presença ou ausência de IL-6 por mais 24h. Com 48h de tratamento foi realizado a análise do efeito dos mesmos, conforme detalhado na Figura 3.

**Figura 3- Fluxograma das etapas do experimento *in vitro***



Legenda: Células de insulinoma de rato (linhagem INS-1E) foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 10 mM HEPES, 100 U/mL penicilina, 100  $\mu$ g/mL estreptomicina, 1 mM piruvato de sódio e 50  $\mu$ M 2-mercaptoetanol. As células foram mantidas incubadas a 37°C, em atmosfera umidificada a 5% de CO<sub>2</sub>, foram plaqueadas em placas de 24 poços e cultivadas por 48 hrs antes de qualquer tratamento para garantir sua aderência à placa. As células foram então expostas ou não a um pré-tratamento com 100 U/mL de IL-6 por 24 hrs e então expostas ou não a um tratamento com citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  na concentração de 50 U/mL e IFN na concentração de 10 U/mL na presença ou ausência de IL-6 por mais 24h. Os efeitos desses tratamentos foram analisados em 48h.

#### 4.7.3. Análise da expressão proteica por western blot

Extratos proteicos totais foram obtidos das células e 40 $\mu$ l da amostra foram submetidos à separação eletroforética em gel de poliacrilamida a 8-14% (de acordo com o tamanho das proteínas de interesse) contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) no aparelho PowerPac™ Basic Power (BioRad, Hercules, CA, USA).

A eletrotransferência de proteínas dos géis para membranas de nitrocelulose foi realizada por aproximadamente 2 hrs em amperagem constante, transferência úmida (BioRad, Hercules, CA, USA). As membranas foram bloqueadas e posteriormente incubadas durante a noite a 4°C com anticorpos primários específicos, para a proteína anti-*iNOS* (#IO117), anti-*caspase-3*, anti-  $\alpha$ -*tubulina* (#9026, Sigma-Aldrich) ou anti- *GAPDH* (#25778), todos os anticorpos foram diluídos em TBST acrescido de 5% de BSA (1:1000). As membranas foram incubadas com anticorpos secundários ligados a peroxidase (horseradish peroxidase-labeled anti-IgG) por 2 h e 30 min. em TA. Para a detecção das bandas específicas foi utilizado fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Health care Life Sciences) e a quantificação foi realizada por densitometria pelo programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD).

#### **4.8. Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). A normalidade foi previamente analisada pelo teste D'Agostino Pearson, teste Shapiro-Wilk ou Kolmogov-sminov com Wilkimon-Lilliefors. As diferenças estatísticas entre os grupos no protocolo *in vitro* foram analisadas usando o teste *t-Student* (pareado). Já para as análises no protocolo *in vivo* foi utilizado ANOVA de duas vias (*two-way* ANOVA) com multiplas comparações, seguido de teste pos-hoc Tukey ou teste *t-Student* (não-pareado) quando apropriado. Todos os resultados foram analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA, Estados Unidos). A diferença foi considerada estatisticamente significante com valor de  $P \leq 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Controle ponderal e glicêmico após a fase de treino

Os animais treinados dessa fase, chamado aqui de Controle Treinado (CT) não tiveram alteração do peso corporal, tanto quando comparado ao grupo de animais Controle Sedentário (CS) como dentro do mesmo grupo comparando-se a Fase de Adaptação e após a Fase de Treino (Tabela 1). Por outro lado, o treinamento físico induziu uma alteração na glicemia plasmática, a qual foi maior após a fase de treino no grupo CT, comparando-se o mesmo grupo na Fase de Adaptação (Tabela 1). Hipotetizamos que essa alteração glicêmica seja decorrente de adaptações fisiológicas ao estresse (visualmente detectado nos animais), provocando assim mecanismos fisiológicos contra-regulatórios.

Tabela 1- Monitoramento da massa corporal e da concentração de glicose plasmática dos animais durante a fase de adaptação e Fase de treino

		CS		CT	
		Peso Corporal (g)	Glicemia (mg dl <sup>-1</sup> )	Peso Corporal (g)	Glicemia (mg dl <sup>-1</sup> )
<i>Fase de adaptação</i>		22.44 ± 0.58	153.6 ± 7.71	22.31 ± 0.51	137.1 ± 5.84
<i>Fase de treino</i>		22.81 ± 0.60	170.3 ± 6.25	22.88 ± 0.50	159.5 ± 5.07*

Os valores do monitoramento do peso e glicemia plasmática dos animais em restrição alimentar de 1h, (CS). Controle Sedentário e (CT) Controle Treinado, correspondem às médias ± SEM (n=16). Foi utilizado *test t* não pareado. \*P ≤ 0.05 vs Fase de Adaptação e Fase de Treino nos respectivos grupos.

### 5.2. Controle do peso corporal e glicêmico após a Fase de treino e indução do DM1

Após o início do tratamento com MLDZ continuamos o monitoramento do peso corporal e glicêmico nos animais agora divididos em 4 grupos: Controle (C), Diabético (D), Treinado (T) e Treinado Diabético (TD) (Tabela 2). Não houve alteração no peso corporal dos animais após tratamento com MLDZ. Em relação ao monitoramento glicêmico, observamos um aumento significativo da glicemia plasmática no grupo D e TD, a partir do terceiro dia após início do tratamento com MLDZ, quando comparado com o primeiro dia, permanecendo mais alta ao longo de todo o monitoramento (nono dia após MLDZ) nesses grupos. Esse aumento da glicemia plasmática comprova a eficácia do modelo utilizado nesse estudo para indução do diabetes.

No mesmo período foi feita avaliação da glicemia dos animais injetados apenas com o veículo (T e C). Sendo que como esperado glicemia foi menor nos animais C e T em relação

aos animais diabéticos (tratados com MLDZ). Os animais T tiveram uma redução significativa da glicemia no quinto dia após injeções do veículo (tampão citrato), quando comparado com o primeiro dia, o que não foi observado nos animais C (Tabela 2).

Tabela 2- Monitoramento da massa corporal e da concentração de glicose plasmática em diferentes momentos após Múltiplas Doses Baixas de Estreptozotocina

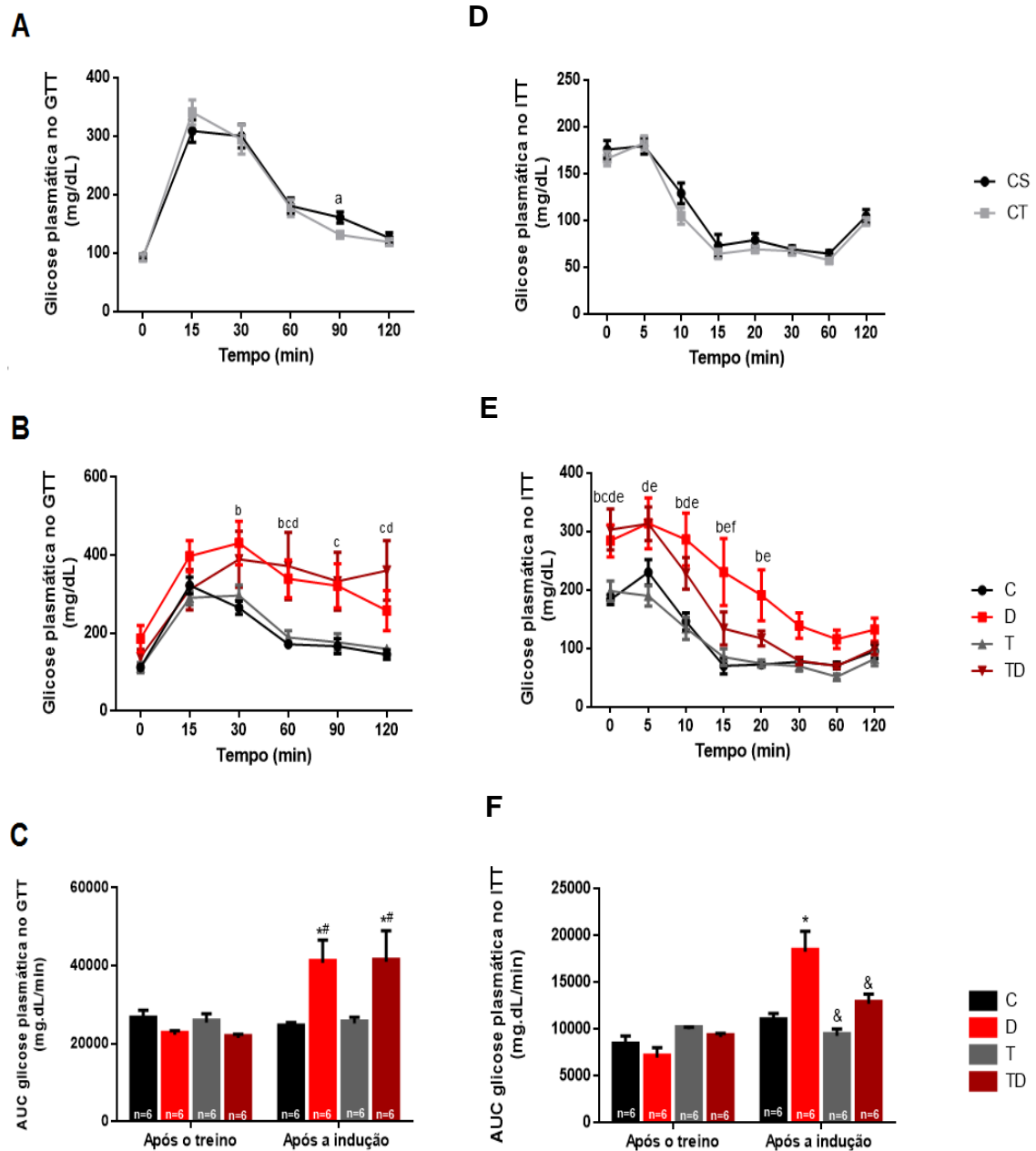
		<i>1º dia após MLDZ</i>	<i>3º dia após MLDZ</i>	<i>5º dia após MLDZ</i>	<i>7º dia após MLDZ</i>	<i>9º dia após MLDZ</i>
Massa corporal (g)	<b>C</b>	23.88±0.7	24.25±0.5	23.88±0.7	24.75±0.6	24.5±0.8
	<b>D</b>	23.63±0.9	23.63±0.9	23.88±0.7	24.25±0.9	24.13±0.8
	<b>T</b>	23.38±0.5	23.75±0.5	23.5±0.6	24.25±0.5	24.13±0.6
	<b>TD</b>	23.38±1.1	23.88±0.10	23.5±0.9	24±0.8	24.13±0.7
Glicemia (mg dl <sup>-1</sup> )	<b>C</b>	133±7.45	144.13±7.5	137±7.0	155.5±12.27	155.13±7.5
	<b>D</b>	158.38±7.4	237.5±10.7*	231.75±14.0*	269.88±20.1*	292.75±31.6*
	<b>T</b>	165.13±4.6	159.13±10.2	145.38±5.0*	159.88±8.6	171.38±5.7
	<b>TD</b>	143.88±6.7	198.13±19.6*	226.13±18.3*	243.13±16.9*	274.38±37.4*

Os dados são expressos em média ± SEM (n=8) da massa corporal e da glicemia plasmática dos animais (C) Controle, (D) Diabético, (T) Treinado e (TD) Treinado Diabético. Foi realizado *test t* não pareado. \*P ≤ 0.05 vs 1º dia após MLDZ ou solução veículo nos respectivos grupos.

### 5.3. Teste de GTT e ITT

Logo após a Fase de Treino, o exercício físico não teve um grande efeito sobre a tolerância a glicose, sendo que os animais do grupo Controle Treinado (CT) apresentaram uma melhor tolerância a glicose apenas no tempo de 90 min., comparado aos animais do grupo Controle Sedentário (CS) (Figura 4A). A indução ao DM1 levou a uma pior tolerância a glicose tanto nos animais Treinados Diabéticos (TD) como nos animais não treinados Diabéticos (D), comparados aos grupos controle (C) e treinados (T) (Figura 4B-C). Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos Diabético (D) e Treinado Diabéticos (TD), observamos no segundo grupo, que a curva de ascensão da glicemia nos primeiros minutos após a injeção de glicose (15-30 min.) é mais similar a curva dos animais controle do que dos animais Diabéticos (Figura 4B), não havendo diferença estatística no ponto 30 entre C e TD, sendo que nesse tempo há diferença entre o grupo C e D. Isso parece indicar que o grupo TD pode ter uma melhor tolerância a glicose, devido ao treinamento físico, comparado ao grupo Diabético. O que pode estar relacionado a uma melhora na secreção de insulina ou uma melhora na sensibilidade a esse hormônio, o que poderia ser observado nos ensaios de ITT.

**Figura 4- Teste de tolerância à glicose (GTT) e teste de tolerância à insulina (ITT) após fase de treino e após indução ao MLDZ**



Legenda: Para o GTT os animais foram deixados por 10-12h sem alimento e as concentrações de glicose plasmática foram mensuradas antes (0min.) e após administração intraperitoneal de 1.25g/kg de glicose por 15, 30, 60, 90 e 120 min. Os animais foram então deixados por 2h com restrição alimentar e os níveis de glicose plasmática foi monitorado antes (0 min.) e após administração de 1U/kg de insulina intraperitoneal por 5, 10, 15, 20, 30, 60 e 120 min. **A:** Concentração de glicose sanguínea no GTT, após Fase de Treino, de 12 animais do grupo Controle Sedentário (CS) e 12 animais do grupo Controle Treinado (CT). **B:** Concentração de glicose sanguínea no GTT após MLDZ de 6 animais de cada grupo Controle (C), Diabético (D), Treinado (T) e Treinado Diabético (TD). **C:** Área sob a curva de **B**. **D:** Concentração da glicose sanguínea no ITT, após Fase de Treino, de 12 animais do grupo Controle Sedentário (CS) e 12 animais do grupo Controle Treinado (CT). **E:** Concentração de glicose sanguínea no ITT após MLDZ de 6 animais de cada grupo Controle (C), Diabético (D), Treinado (T) e Treinado Diabético (TD). **F:** Área sob a curva de **E**. Todos os valores são expressos em média  $\pm$  SEM, considerando  $p \leq 0,05$  estatisticamente significativo. <sup>a</sup> vs CS no mesmo tempo por teste *t* não-pareado. <sup>b</sup>  $P \leq 0,05$  C vs D; <sup>c</sup>  $P \leq 0,05$  C vs TD; <sup>d</sup>  $P \leq 0,05$  T vs TD; <sup>e</sup>  $P \leq 0,05$  D vs T; <sup>f</sup>  $P \leq 0,05$  D vs TD; \*  $P \leq 0,05$  vs C; & vs D e #  $P \leq 0,05$  vs T, por teste ANOVA *two-way* com pós teste de *Tukey's* de múltiplas comparações.

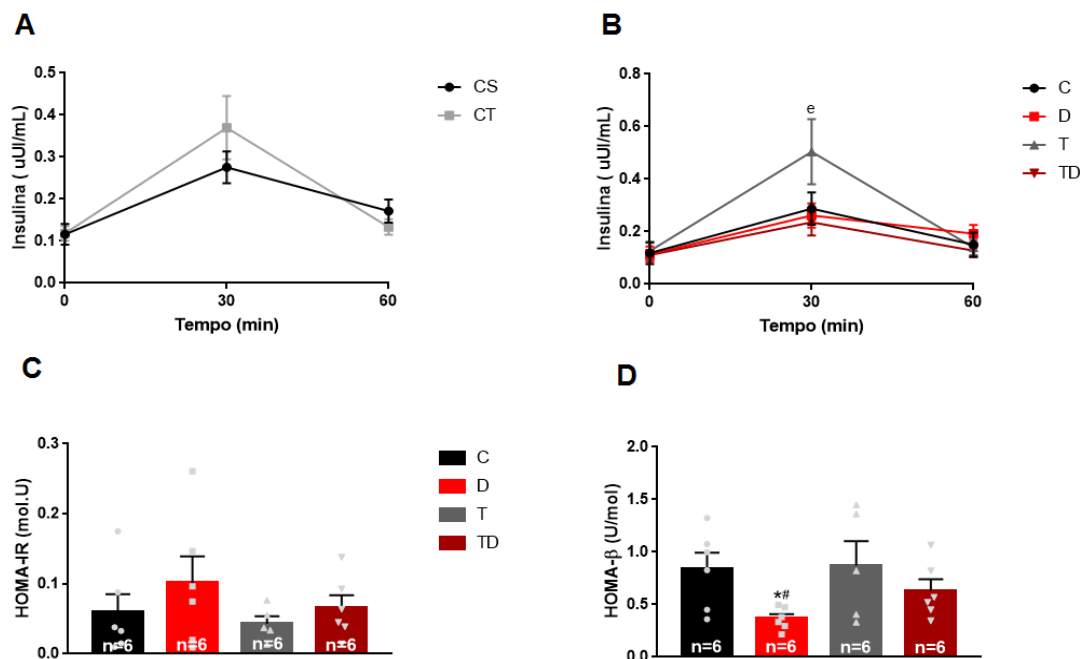


Logo após a Fase de Treino, não observamos uma diferença na sensibilidade a insulina entre animais CS e animais CT (Figura 4D). Após a indução do DM, período que os animais estavam na Fase de Manutenção do treino, fizemos novos ensaios ITT, e observamos que os animais diabéticos (D) apresentaram diminuição na sensibilidade a insulina, comparado a todos os outros grupos estudados (Figura 4 E-F). Essa perda de sensibilidade é prevenida pelo exercício físico, não sendo mais observada nos animais TD (Figura 4F).

#### 5.4. Insulinemia e modelo de avaliação da homeostase

O treinamento aumentou a secreção de insulina durante o GTT, mostrado na Figura 4A, nos animais Controle Treinado (CT) em comparação com o grupo Controle Sedentário (CS) (Figura 4A). Esse efeito parece ser perdido pela indução ao DM, visto que animais do grupo Treinado Diabético (TD) não apresentam aumento na secreção da insulina durante o GTT, como observado no grupo Treinado (T) (Figura 5B).

**Figura 5- Insulinemia, HOMA-IR e HOMA- $\beta$**



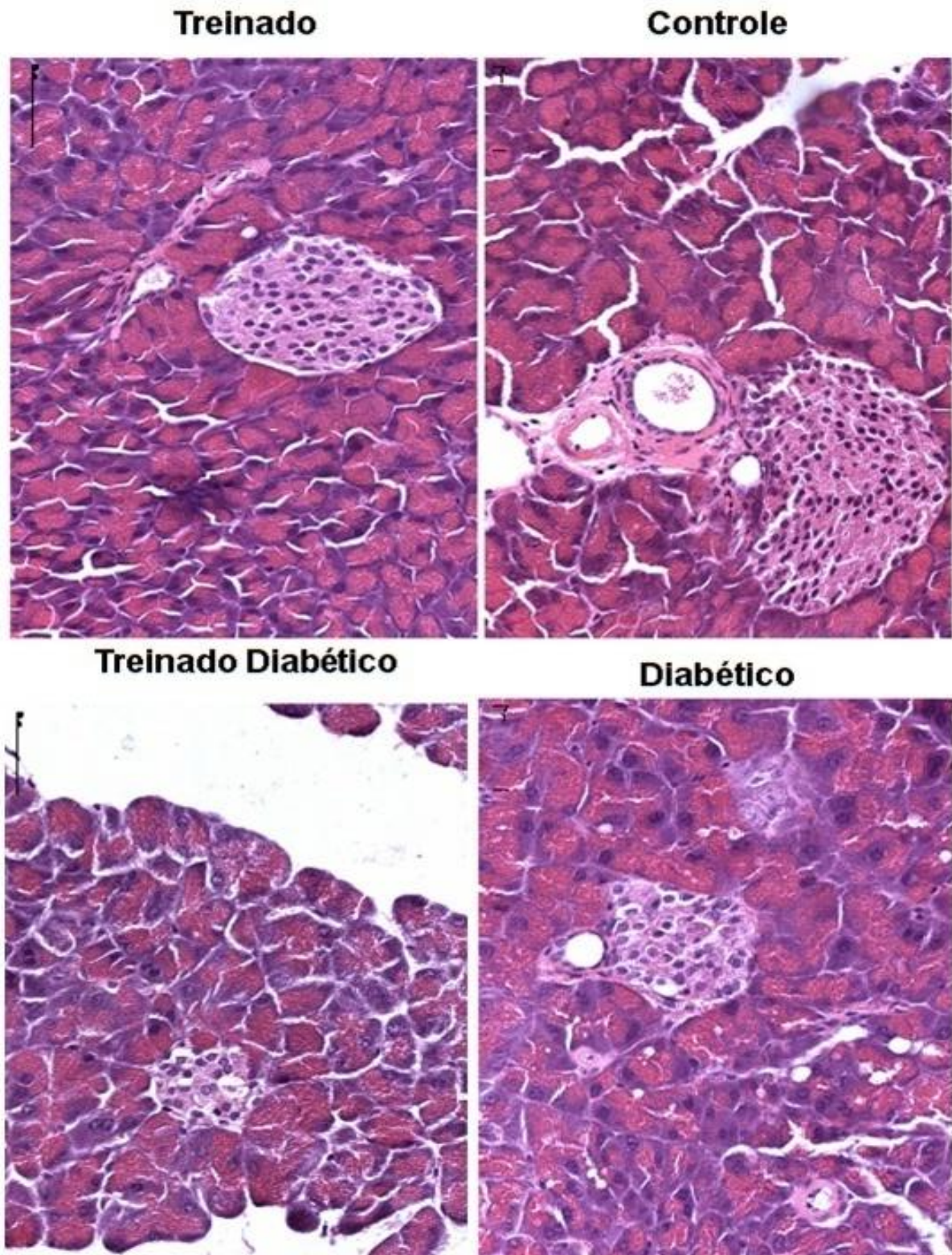
Legenda: **A-B:** Insulinemia por radiomunoensaio. Durante o GTT, foram coletados aproximadamente dois capilares de sangue misto no momento zero (0.min) e após 30 e 60min. da administração intraperitoneal de 1.25g/kg de glicose, para a dosagem posterior de insulina através de radioimunoensaio. **A.** Concentração de insulina no sangue dos animais (CS) Controle Sedentário (n=12) e (CT) Controle Treinado (n=12) coletado durante o GTT. **B.** Concentração de insulina no sangue dos animais (C) Controle (n=6), (D) Diabético (n=6), (T) Treinado (n=6) e (TD) Treinado Diabético (n=6) coletado durante o GTT. **C-D:** Avaliação da sensibilidade periférica à insulina e a capacidade funcional das células  $\beta$  pancreáticas através do modelo de avaliação da homeostase (HOMA) que foi calculado através da glicemia plasmática do tempo 0 min. do GTT e da insulinemia dos animais. **C.** HOMA-IR. **D.** HOMA- $\beta$ . Todos os valores são expressos em média  $\pm$  SEM.  $P \leq 0.05$ .  $^{\circ}$ T vs TD;  $^{*}$ vs Controle e  $^{\#}$  vs Treinando no mesmo tempo, por ANOVA *two-way* com pós teste de *Tukey's* de múltiplas comparações.

A avaliação do índice HOMA-IR, que é um indicativo do grau de resistência à insulina, dos diferentes grupos após a indução ao DM, parece corroborar que o exercício físico leva a uma melhora na resistência induzida pelo tratamento com MLDZ, como observado na Figura 4F, visto que o grupo D apresenta uma resistência maior, ainda que não estatisticamente significativa, o que não é mais observada no grupo TD (Figura 5C). Para o índice HOMA- $\beta$ , um indicativo da função secretora das células  $\beta$ , observamos que, como esperado, a indução ao Diabetes (D) leva a uma piora na função secretora das células  $\beta$  (Figura 5D, barra vermelha), quando comparado aos animais Controle (C) e Treinado (T). Interessante notar que o exercício físico parece exercer um efeito benéfico, visto que no grupo Treinado Diabético (TD) não foi observada a mesma piora da função da célula  $\beta$  (Figura 5D, barra vinho).

### **5.5. Análise histomorfológica e imunohistoquímica do tecido pancreático**

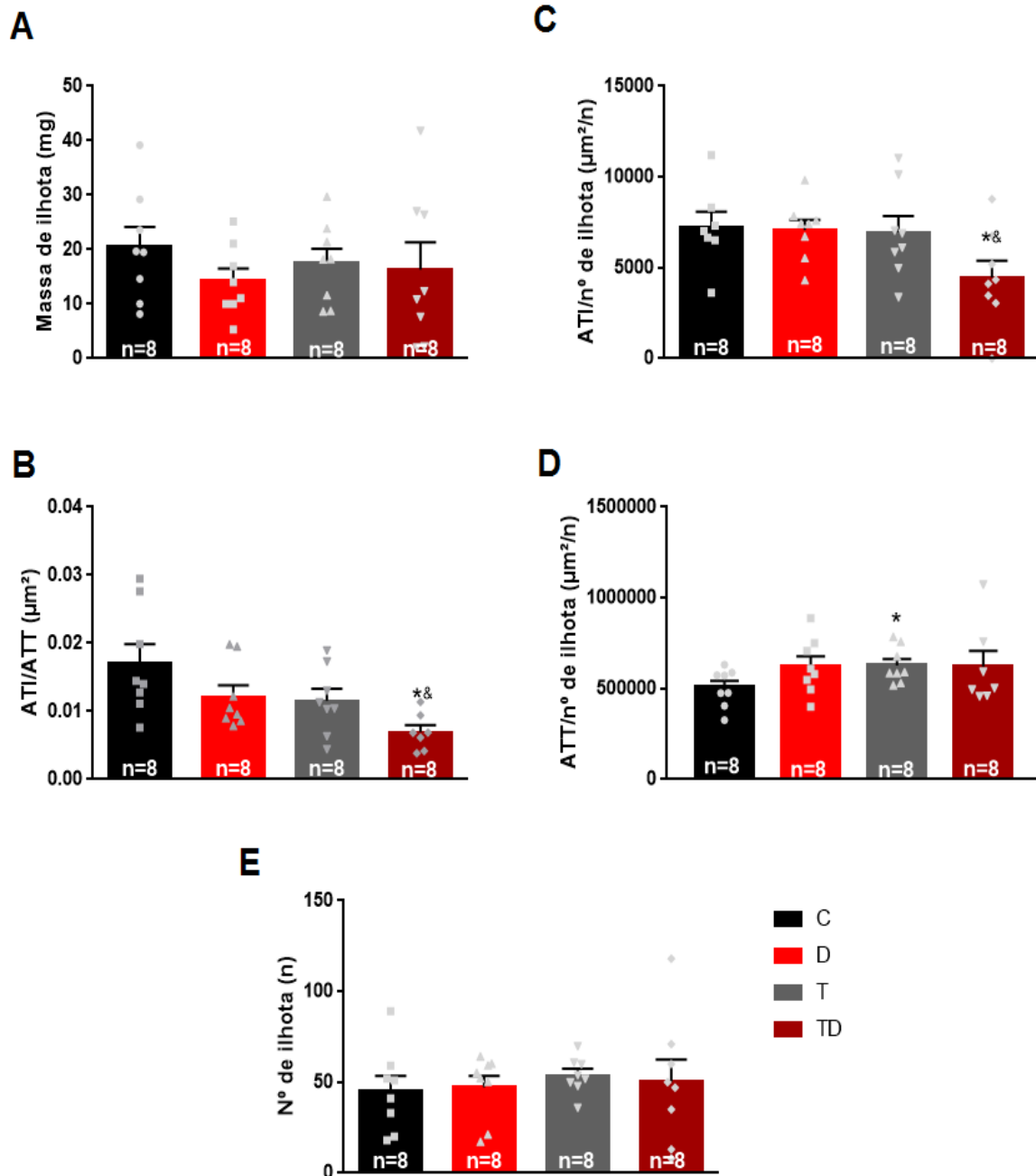
O tratamento com MLDZ parece induzir uma leve diminuição no tamanho das ilhotas (Figura 6 e 7 respectivamente), isso pode ser observado também pela tendência a uma menor massa de ilhotas no grupo Diabético (D) (Figura 7A). Nos animais Treinados Diabéticos (TD) o exercício físico não provoca diminuição da massa de ilhotas (Figura 7A), porém induz uma diminuição na área de ilhotas/área total de tecido (Figura 7B) e também na área da ilhotas/número de ilhotas (Figura 7C) quando comparado ao grupo Controle (C) e Diabético (D). Essa diminuição parece ser devido a esse grupo apresentar ilhotas de tamanho mais reduzido, em relação ao demais grupos. O exercício físico induz aumento na área total de tecido pancreático (Figura 7D) quando comparado ao grupo Controle (C), esse efeito é perdido com o tratamento com MLDZ (Figura 7D). Não houve diferença no número de ilhota entre os grupos (Figura 7E).

**Figura 6- Fotomicrografias representativa do tecido pancreático**



Legenda: Os cortes seriados do tecido pancreático (5.0  $\mu\text{m}$  de espessura) estendidos em lâminas tratadas com poli-L-lisina e corados em técnica de HE nos grupos Controle, Diabético, Treinado e Treinando Diabético. O tratamento com MLDZ leva a redução da área de ilhota e o exercício físico parece que não é capaz de minimizar essa redução. Imagens em aumento de 10x.

**Figura 7- Análise morfométrica das ilhotas pancreáticas dos animais após tratamento com MLDZ e treinamento**



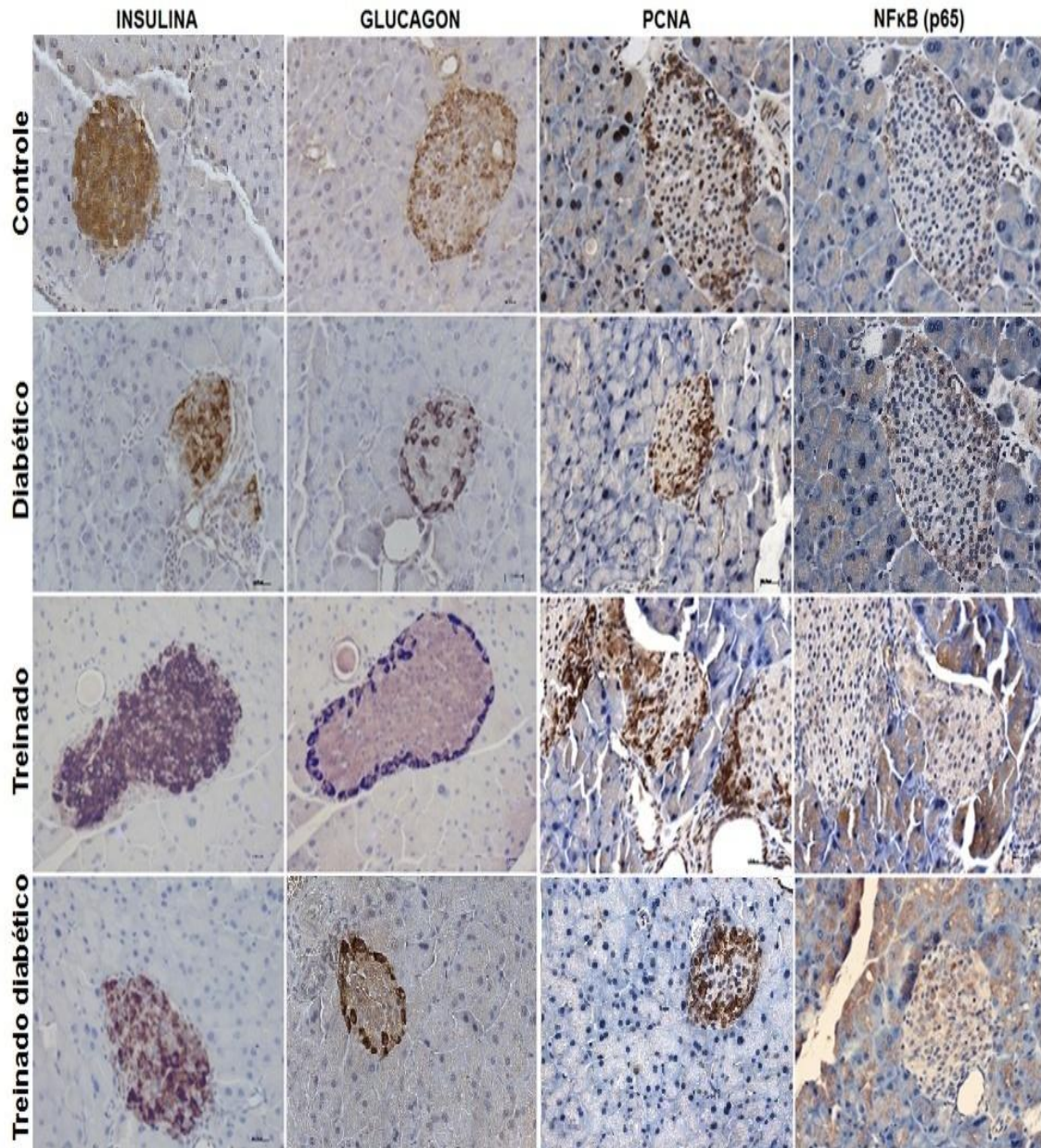
Legenda: O pâncreas foi coletado, o tecido processado e incorporado em parafina para preparação dos cortes no micrótomo. Foram feitos cortes seriados do tecido (5.0  $\mu\text{m}$  de espessura) e corados pela técnica de HE. Os valores dos parâmetros morfométricos foram obtidos através da análise de 3 cortes seriados do pâncreas de cada animal. Foi calculado a massa de ilhota, área total do tecido (ATT), a área total de ilhotas (ATI) em  $\mu\text{m}^2$ , e o número total de ilhotas por campo/animal (nº de ilhotas). **A.** Massa da ilhota. **B.** Razão da ATI e ATT. **C.** Razão da ATI e número de ilhotas. **D.** Razão da ATT e número de ilhotas. **E.** Número de ilhotas por animal. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM (n=8) para os grupos (C) Controle, (D) Diabético, (T) Treinado e (TD) Treinado Diabético. Foi utilizado *teste t* não-pareado,  $P \leq 0.05$  \*vs controle e &vs diabético.

A imunomarcção para insulina marcou positivamente células presentes na parte central das ilhotas, onde, em roedores, estão as células  $\beta$ , já a marcação para glucagon marcou



preferencialmente células presentes na região periférica das ilhotas, onde espera-se encontrar células  $\alpha$  (Figura 8).

**Figura 8- Fotomicrografias representativa e citoarquitetura de ilhotas pancreáticas**

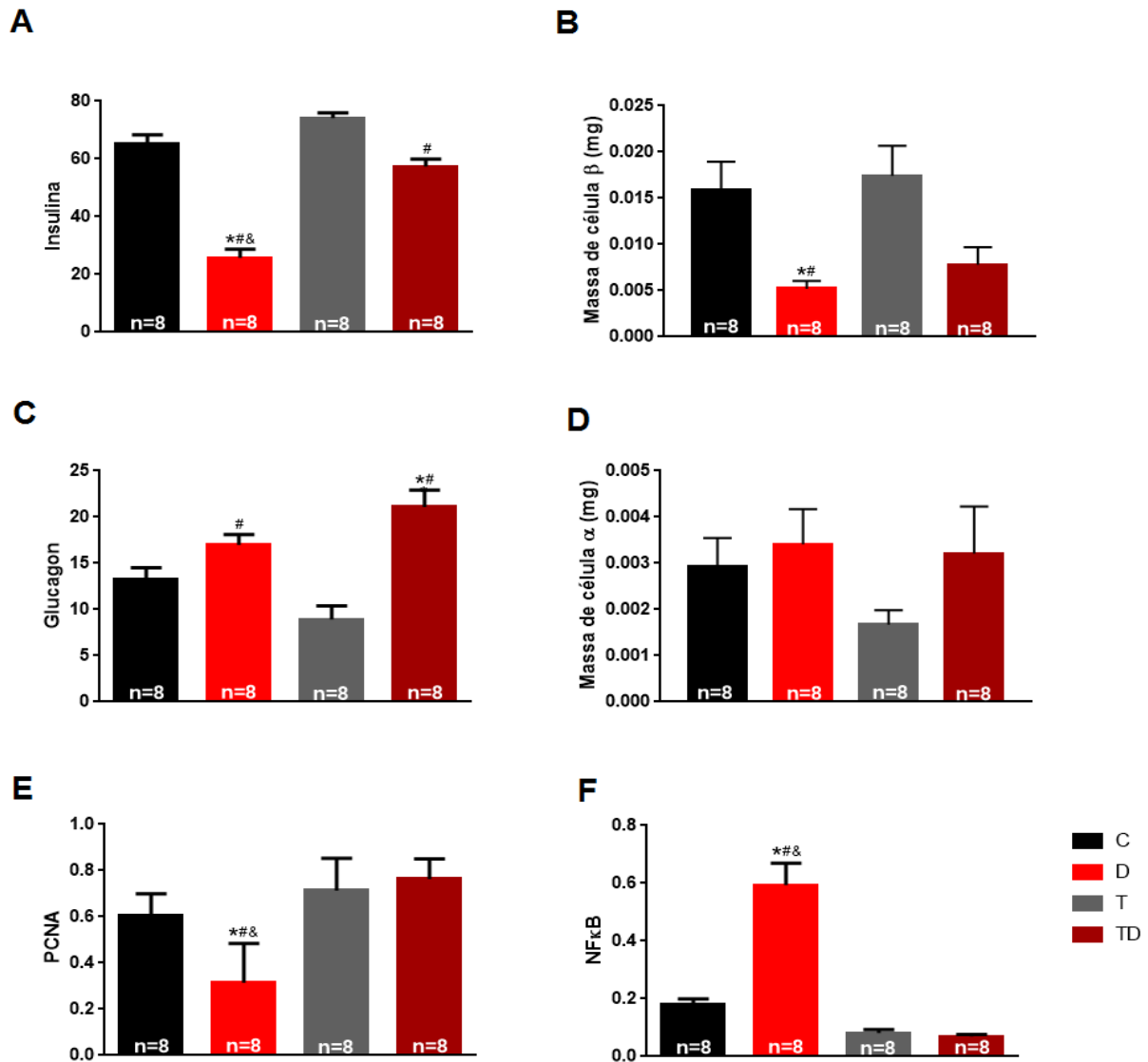


Legenda: Os cortes seriados do tecido pancreático (5,0  $\mu\text{m}$  de espessura) estendidos em lâminas tratadas com poli-L-lisina dos animais Controle, Diabético, Treinado e Treinado Diabético, imunologicamente marcada para insulina, glucagon, PCNA e NFκB (p65). Imagens em aumento de 40x.

Utilizando-se a quantificação da marcação específica para insulina (Figura 9A) foi calculada a massa de células  $\beta$  (Figura 9B). Observa-se que a indução do diabetes leva a uma diminuição na marcação de insulina e conseqüentemente na massa de célula  $\beta$ , comparando-se grupo Diabético (D) com o grupo Controle (C), a qual é prevenida pelo exercício físico,

visto que o grupo Treinado Diabético (TD) tem marcação para insulina similar ao grupo Controle (C) (Figura 9A).

**Figura 9- Marcação através de Imuno-histoquímica para insulina, glucagon, PCNA e NFκB em ilhotas dos camundongos após tratamento com MLDZ e treinamento**



Legenda: Após a fase de manutenção ao treino e indução ao diabetes os animais foram eutanasiados e o pâncreas foi coletado e imerso em paraformaldeído durante 24 hrs. Então o tecido foi incorporado em parafina para preparação dos cortes no micrótomo. Foram feitos cortes seriados do tecido (5,0 μm de espessura). As lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-insulina, anti-glucagon, anti-PCNA, anti-NFκB ou deixadas sem anticorpo (controle negativo não apresentado), as secções foram incubadas com anticorpo secundário e as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e revelada por DAB e peróxido de hidrogênio. **A.** Razão das áreas marcadas para insulina e área total da ilhota. **B.** Massa de célula β calculada através da razão da área de insulina marcada pela área total da ilhota. **C.** Razão das áreas marcadas para glucagon e a área total da ilhota. **D.** Massa de célula α calculada através da razão da área de glucagon marcado (multiplicada pelo peso do pâncreas -mg) pela área total da ilhota. **E.** Razão de núcleos marcados para PCNA e núcleos totais. **F.** Razão de núcleos marcados para NFκB (p65) e núcleos totais. Os resultados são apresentados como média ± SEM (n=8) para os grupos (C) Controle, (D) Diabético, (T) Treinado e (TD) Treinado Diabético. Foi utilizado ANOVA *two-way* com pós teste de *Tukey's* de múltiplas comparações,  $P \leq 0.05$  \*vs Controle; &vs Diabético e #vs Treinando.

Apesar dessa melhora na marcação para insulina, os animais do grupo Treinado Diabético (TD) parecem não serem capazes de reestabelecer completamente a massa de células  $\beta$ , quando comparado ao grupo controle (Figura 9B), apesar de não haver mais diferença estatística entre esses dois grupos, mostrando que o exercício físico é benéfico para a função da célula  $\beta$ , corroborando com os achados da Figura 5D. A marcação para glucagon foi maior no grupo Diabético (D), quando comparado ao grupo Controle (C) (Figura 9C), apesar do exercício físico sozinho não induzir nenhuma mudança significativa na marcação para o glucagon, ele foi capaz de aumentar ainda mais a marcação para glucagon no grupo Treinado Diabético (TD) (figura 9C). Não houve alteração estatisticamente significativa na massa de células  $\alpha$  em nenhum dos grupos estudados, apesar do grupo Treinado apresentar uma tendência a diminuição da massa de células  $\alpha$  (Figura 9D).

A indução ao Diabetes levou a uma diminuição na marcação nuclear de PCNA em células das ilhotas (Figura 9E) no grupo Diabético (D), comparado aos outros grupos. O Exercício físico foi capaz de prevenir essa diminuição, sendo que o grupo Treinado Diabético apresenta marcação para PCNA nos mesmos níveis do grupo Controle e Treinado (Figura 9E). Interessante notar que essa marcação é mais evidente na periferia das ilhotas (Figura 8).

A marcação nuclear de NF- $\kappa$ B-p65 esta aumentada em ilhotas de animais Diabéticos (D) (Figura 9F) comparado aos outros grupos, o treinamento físico foi capaz de prevenir esse aumento, sendo que a marcação para NF- $\kappa$ B-p65 nuclear no grupo Treinado Diabético (TD) é similar aos grupos Treinado e Controle (Figura 9F).

Todos os parâmetros de análise histomorfológica e imunohistoquímica, análise do tecido pancreático, dimensão do mesmo, área de célula  $\beta$  e  $\alpha$  (marcação positiva para insulina e glucagon), área de célula não-  $\beta$ , assim como o peso do tecido pancreático estão expressos na tabela 3.

Tabela 3- Parâmetros morfométricos das ilhotas pancreáticas dos animais Controle, Diabético, Treinado e Treinado Diabético

	<b>C (n=8)</b>	<b>D (n=8)</b>	<b>T (n=8)</b>	<b>TD (n=8)</b>	<b>p=</b>
<b>Pâncreas (mg)</b>	450 ± 36.0	417.8 ± 38.7	399.6 ± 36.4	430.9±39.2	0.9579
<b>Área total do pâncreas: célula β (µm<sup>2</sup>)</b>	13481250 ± 1260537.6	12021250 ± 1693131.5	8890000 ± 613979.9	10315000± 1999201.6	0.9047
<b>Área total do pâncreas: células não- β (µm<sup>2</sup>)</b>	6234835.29 ± 1740091.6	4281578.375 ± 64746148	3423962.89± 281225.0	18340000 ± 728789.6	0.9928
<b>Área do tecido/corte da ilhota : célula β (µm<sup>2</sup>)</b>	992566.75 ± 141489.75	593417.63 ± 105427.72	993827.77 ± 280618.6	246847.86 ± 67355.2 <sup>*,&amp;</sup>	0.0390; 0.0386
<b>Área do tecido/corte da ilhota: células não- β (µm<sup>2</sup>)</b>	6234635± 1740112	4281314 ± 647337	3041332 ± 281229	3449635 ± 728772	0.9929
<b>Área célula β (µm<sup>2</sup>)</b>	439.17 ±59.46	142.95 ± 26.36 <sup>*</sup>	394.59 ± 75.14 <sup>#</sup>	167.61 ± 39.41 <sup>*</sup>	0.0110; 0.0210;
<b>Área de célula α (µm<sup>2</sup>)</b>	9946959.9 ± 140993	596947.5 ± 111895	1019274 ± 271545	271510.1 ± 72660.2 <sup>*,&amp;</sup>	0.0439; 0.0358
<b>% de célula β</b>	4.66 ± 0.6	2.76 ± 0.6	4.42 ± 0.9	7.44±1.97 <sup>#</sup>	0.0496
<b>Nº de Ilhotas por corte (célula β)</b>	11.6 ± 1.55	9 ± 1.48	8 ± 1.24	5±0.6 <sup>*</sup>	0.0084
<b>Nº de Ilhotas por corte (células não- β (µm<sup>2</sup>))</b>	7.38 ± 0.52	6.08 ± 0.77	6.83 ± 0.69	4.92±0.57 <sup>*</sup>	0.0278
<b>Nº de Ilhotas analisadas (célula β )</b>	6.63 ± 0.75	5.38 ± 0.5	5.75 ± 0.73	4.13±0.35	0.9767
<b>Nº de Ilhotas analisadas (células não- β )</b>	4.65 ± 0.42	3.79 ± 0.34	4.41± 0.22	3.54±0.24	0.9677

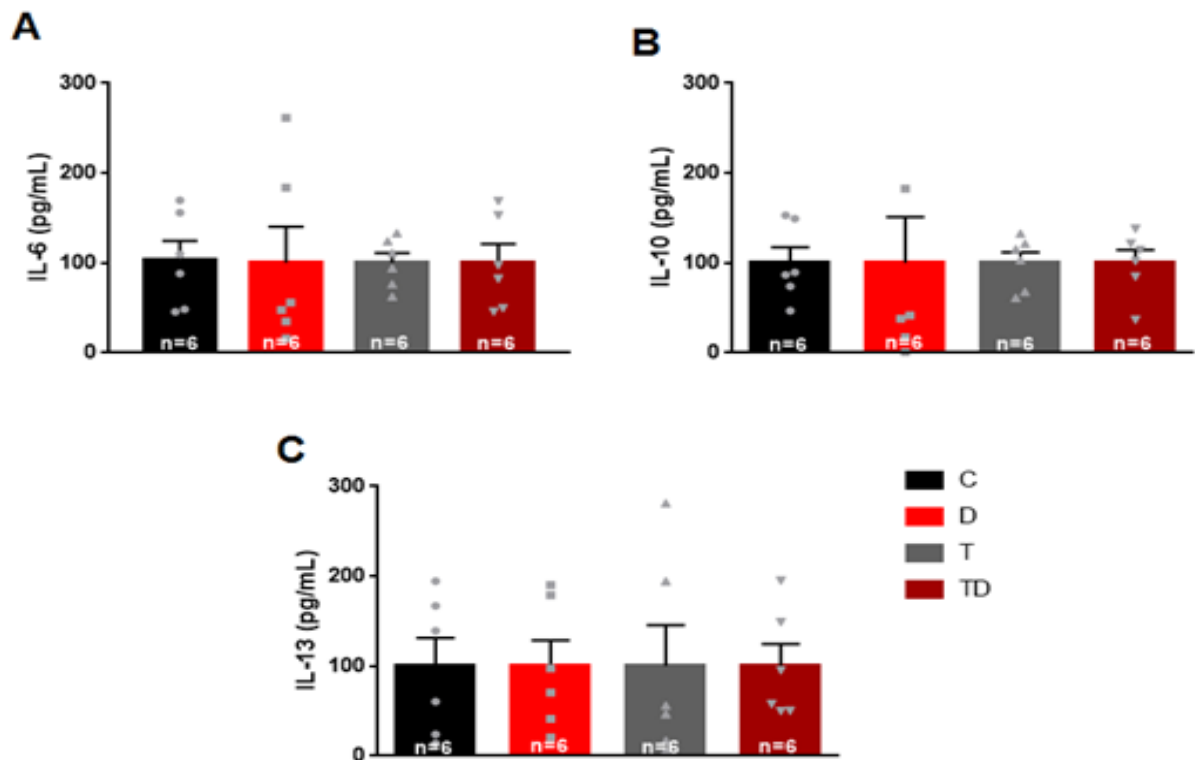
Os valores dos parâmetros morfométricos, mostrados na tabela, correspondem às médias ± SEM do número total de ilhotas de cada grupo de animais. Os resultados são representativos de ilhotas de oito camundongos (C) controle (sem exercício e injeções de MLDZ), (D) diabéticos (sem exercício e com injeções de MLDZ), (T) treinado (exercitados e sem injeções de MLDZ) e (TD) treinado diabético (exercitados e com injeções de MLDZ). Célula não β = Células marcadas positivamente para Glucagon, PCNA e NFκB. Foi utilizado ANOVA two-way com teste de Tukey de múltiplas comparações. P ≤ 0.05 \* vs controle; # vs diabético; & vs treinando e vs treinando diabético.



### 5.6. Análise de citocinas: IL-6, IL-10 e IL-13

Estudos anteriores mostraram que os benefícios para a viabilidade das células  $\beta$  durante o exercício físico seria devido a secreção por parte da musculatura esquelética de miocinas, especialmente IL-6 (14–16), porém não observamos alteração na concentração das citocinas IL-6, IL-10 e IL-13 em nenhum dos grupos estudados (Figura 10).

**Figura 10- Teste de citocinas no soro dos animais**

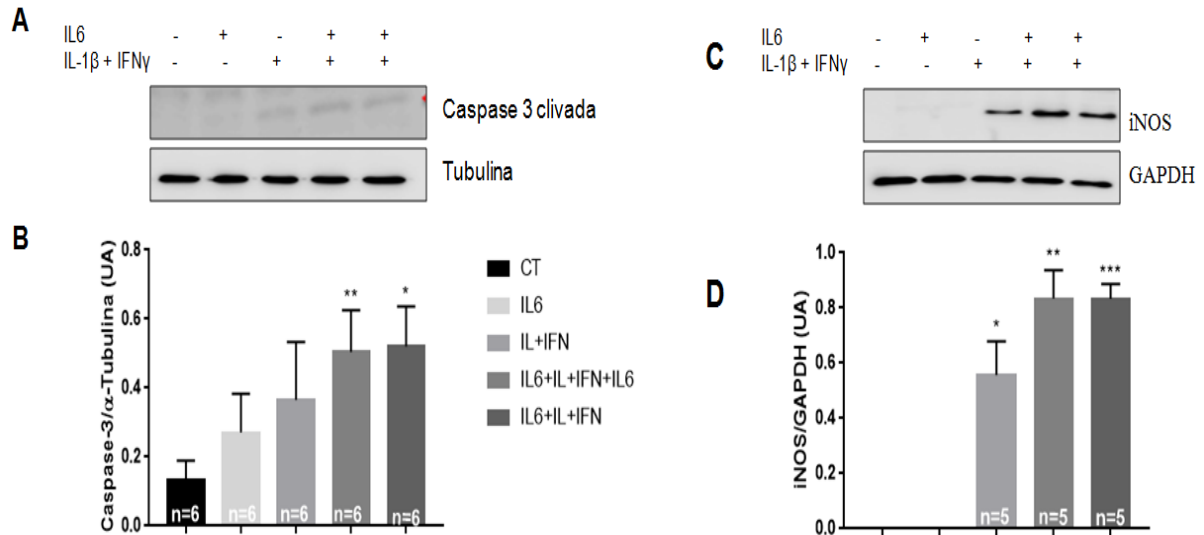


Legenda:A-C: Após passarem pela fase de adaptação, treino e manutenção do treino os animais foram eutanasiados por decaptação e foi coletado aproximadamente 2 ml de sangue, o qual foi centrifugado por 15 min. em 5000 RPM à 4°C, o soro foi coletado e armazenado. As amostras foram processadas através do kit multiplex. **A.** Os níveis de IL-6 no soro de camundongos. **B.** Os níveis de IL-10 no soro de camundongos. **C.** Os níveis de IL-13 no soro de camundongos. Os valores são expressos em média  $\pm$  SEM (n=8) para os grupos controle (C), diabético (D), treinado (T) e treinado diabético (TD).  $P \leq 0.05$  \*vs controle; #vs diabético; &vs treinando e §vs treinando diabético.

### 5.7. Efeito de IL-6 sob a viabilidade de células INS-1E expostas a citocinas pró-inflamatórias

A exposição das células INS-1E à citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$ ) leva a um aumento na expressão de Caspase-3 e iNOS (Figura 11), sendo esses dois marcadores para a indução da morte dessas células, e iNOS dependente da ativação de NF- $\kappa$ B nessas células. O pré-tratamento com IL-6 sozinho não alterou a expressão desses dois marcadores, porém significativamente aumentou essa expressão induzida por IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  (Figura 11).

**Figura 11- IL-6 aumenta a expressão de caspase-3 e iNOS induzida por IL-1 $\beta$ +IFN em células INS-1E**



Legenda: As células foram expostas a IL-6 (IL6) ou deixadas sem tratamento (CT). Depois de 24h expostas a IL-1 $\beta$  e IFN na ausência (IL+IFN) ou na presença de pré-tratamento com IL-6 (IL6+IL+IFN) ou tratamento contínuo de IL-6 (IL6+IL+IFN+IL6). **A.** Imagem representativa de western blot para as proteínas caspase-3 e  $\alpha$ -tubulina. **B.** Gráfico da média dos valores obtidos em 6 experimentos independentes corrigidos pela proteína “housekeeping”  $\alpha$ -tubulina. **C.** Imagem representativa de western blot para as proteínas iNOS e GAPDH. **D.** Gráfico da média dos valores obtidos em 5 experimentos independentes corrigidos pela proteína “housekeeping” GAPDH, e, normalizados pelo valor maior, considerado como 1. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs controle (CT). Foi utilizado *teste t* pareado.

## 6. DISCUSSÃO

DM é uma doença metabólica que reflete anormalidades na função das células  $\beta$  (62). Modificações no tecido pancreático e a progressão do diabetes provocam mudanças em vários parâmetros metabólicos e celular (71) como a perda das células  $\beta$  que leva ao quadro de hiperglicemia e hipoinsulinemia (1,2,39). De maneira geral, em nosso estudo, mostramos que o exercício físico atua no reequilíbrio da homeostase glicêmica em camundongos diabéticos induzidos com MLDZ, e também que o exercício físico pode ter um grande impacto na plasticidade das células na ilhota, através de modificações estruturais e ultra-estruturais do tecido pancreático, sendo capaz de promover a diminuição da inflamação local e morte de células  $\beta$ , além de possivelmente induzir re-aparecimento células  $\beta$  funcionais após destruição induzida por inflamação.

A célula  $\beta$  é capaz de modular a síntese e secreção de insulina de acordo com a demanda metabólica, alterações nas concentrações sanguíneas de insulina e glicose ocorrem no modelo clássico de DM1 devido a apoptose na célula  $\beta$  pancreática, e o fármaco STZ é usado para induzir modelos de diabetes (dependente ou não de insulina) (62). A STZ prejudica a biossíntese e secreção de insulina (62), e o modelo MLDZ, é bastante utilizado para se estudar DM1 por acarretar a destruição gradual das ilhotas pancreáticas, mimetizando o quadro de insulite na ilhota pancreática durante o desenvolvimento do DM1 (72).

O fármaco STZ provoca a diminuição gradual da massa de células  $\beta$ , perturbações nas necessidades de insulina ou na produção de insulina (45,73,74). O exercício físico parece melhorar o controle glicêmico, melhorar o conteúdo total e secreção de insulina (10). Em nosso estudo, o treinamento físico foi capaz de induzir redução significativa na glicemia plasmática, após a fase de treino e também em animais diabéticos treinados, após a indução ao DM. Outros estudos (10,41,75,76), também mostraram que diferentes exercício atuam no controle da glicemia. Farrell e colaboradores (76) mostraram que o treinamento resistidos progressivos por 8 semanas também foi capaz de reduzir a glicemia basal dos animais diabético. Dotzert, et al, (75) utilizaram o mesmo protocolo de indução do diabetes por MLDZ que foi utilizado em nosso estudo, e investigaram os efeitos do treinamento combinado (aeróbico + resistência) *versus* treinamento aeróbio e observaram que combinar dois tipos de treinamento parece ser uma estratégia útil para reduzir o risco de hipoglicemia pós-exercício em DM1, resultando em um programa de exercícios mais seguro, que potencializa as adaptações metabólicas ao exercício no músculo esquelético.

Em nosso estudo, no teste GTT realizado após a fase de treino, o exercício físico parece não influenciar a tolerância a glicose, observamos melhor tolerância a glicose apenas

nos últimos tempos (90 e 120 min.), ou seja, apenas ao final do teste. Já através do teste GTT realizado após a indução ao DM1, observamos que a indução ao DM1 influencia uma piora na tolerância a glicose, que é amenizado pelo o treinamento físico, que é capaz de melhorar a tolerância a glicose. Esse efeito pode estar associado a uma melhora na secreção de insulina ou sensibilidade ao hormônio. Observamos que o exercício não modifica a sensibilidade a insulina entre os animais, mas previne a perda de sensibilidade provocada pela indução do DM em animais diabéticos, isso ocorre pois o treinamento físico influencia na secreção de insulina, sendo capaz de aumentar a secreção desse hormônio durante o GTT, já a indução ao DM provoca a perda desse efeito, observa-se então que não ocorre o aumento da secreção de insulina nos animais treinados tratados com MLDZ.

Para compreendermos melhor os mecanismos regulatórios envolvidos na homeostase da glicose durante o DM1, avaliamos também o grau de resistência à insulina e a função secretora das células  $\beta$  através dos índices HOMA-IR e HOMA- $\beta$  após a indução do DM, e observamos que o treinamento físico leva a uma diminuição no quadro de resistência induzida pelo tratamento com MLDZ, e como esperado, o tratamento com MLDZ induz uma piora na secreção das células  $\beta$  que é minimizada pelo exercício físico, que parece exercer um efeito benéfico na célula  $\beta$ . Segundo Oharomari, et al. (77) o exercício físico é capaz de modificar a sensibilidade periférica à insulina e em nosso estudo, observamos, que, de fato, os animais treinados diabéticos apresentaram uma tendência à menores valores de HOMA-IR.

Corroborando com nossos resultados, observamos que o MLDZ leva a uma piora na função da células  $\beta$ , pela avaliação do índice HOMA- $\beta$ . Esse efeito deletério é prevenido pelo exercício físico, reforçando a premissa que o exercício físico melhorar o controle glicêmico, melhorar o conteúdo total e secreção de insulina (10).

Vale ressaltar que em nosso estudo, os testes de GTT e ITT assim como os parâmetros de homeostase glicêmica foram realizados no período da manhã, respeitando o horário do biotério (12h/12h) e não consideramos o ciclo claro/escuro do animal, embora todos os testes tenham sido realizado com padronização de horário e protocolos, sabemos que isso pode em partes colaborar para esses achados.

O processo de evolução da disfunção celular do DM não é agudo mas lento (6), a progressão da doença acontece através de estágios, e é marcada por alterações na massa, fenótipo e função da célula  $\beta$  (71). A manutenção da arquitetura das ilhotas e o número de células  $\beta$  são importantes para a preservação da estrutura pancreática intacta e funcionamento adequado do órgão (78).

A manutenção da massa de células  $\beta$  é resultado de um equilíbrio dinâmico entre proliferação e apoptose celular. A partir do desenvolvimento embrionário, durante a organogênese, ocorre o aumento do número das células endócrinas do pâncreas, que se destacam da matriz exócrina, originando a organização estrutural da ilhotas maduras. O crescimento da ilhota deve-se tanto à hiperplasia quanto à hipertrofia celular (79).

Histologicamente o quadro de DM1 é caracterizado pela presença de infiltrado inflamatório do tipo linfomononuclear e a ausência de células  $\beta$  (6). Analisados parâmetros histológicos e observamos em nosso estudo, que o tratamento com MLDZ parece induzir uma leve diminuição no tamanho e também na massa de ilhotas, assim como menor área de ilhotas/área total de tecido. E, o exercício parece influenciar a massa de ilhotas pois não provoca diminuição da mesma, porém observamos que o exercício não melhora área de ilhotas/área total de tecido e também a área da ilhotas/número de ilhotas em animais diabéticos.

Huang, et al. (10) demonstrou que o exercício não impede a redução da perda da massa de células por ilhota em animais diabéticos tratados com STZ, e similar a esse achado observamos em nosso estudo que o tratamento com MLDZ altera a morfologia do tecido pancreático e induz redução no tamanho das ilhotas, e similar aos nossos achados, McDonald e colaboradores (80) observaram que o DM1 induzido por MLDZ, também leva a uma redução significativa no tamanho das ilhotas pancreáticas independente do treinamento físico.

Segundo, Wang, et al. (32), em modelos murinos com altas taxas de replicação de células  $\beta$ , a proliferação celular pode ser melhor investigada pela avaliação da massa total de células  $\beta$ , geralmente medida em mg. A massa de células  $\beta$  pode ser preservada através de dois mecanismos amplos: proliferação e redução da morte de células  $\beta$  (81), e observamos em nosso estudo que o exercício contribui para a preservação em célula  $\beta$  funcional. Ao longo da vida a massa das células  $\beta$  é regulada dinamicamente com a plasticidade das células  $\beta$  danificadas (29).

Em nosso estudo, observamos aumento significativo na área total de tecido pancreático em relação ao número de ilhotas com o treinamento físico, porém esse efeito é perdido com o tratamento com MLDZ. Segundo McDonald et al.,(80) existe diferentes subpopulações na ilhotas de acordo com o seu tamanho, e em nosso estudo, embora o treinamento influencie o tecido pancreático não observamos modificação no número de ilhota nos animais. Alguns estudos relatam a modificação no tecido pancreático mediante estímulo e/ou lesão (28,74,82–85). A STZ induz estresse oxidativo e resulta em danos às células  $\beta$  (3). O exercício físico melhora o estresse oxidativo através do seu efeito anti-inflamatório e

contribuiu para a viabilidade da célula  $\beta$ , resultando na prevenção contra a perda de massa de células  $\beta$  após o tratamento com MLDZ, e reduz o dano a célula  $\beta$  (3,10,22,59,60).

Avaliamos em nosso estudo através da técnica de imunomarcacão a presença dos tipos celulares na ilhota, em roedores as células  $\beta$  estão presentes na região central e célula  $\alpha$  presentes na região periférica (29), e conforme já esperado e descrito na literatura, observamos uma marcação positiva para insulina no centro da ilhota, e para glucagon na periferia da célula.

Observamos também que a indução do DM leva a uma diminuição na marcação de insulina e conseqüentemente na massa de célula  $\beta$ , e que o exercício físico previne a diminuição na marcação para insulina, sendo benéfico para a função da célula  $\beta$  e também é capaz de aumentar ainda mais a marcação para glucagon de células  $\alpha$ . Coskun et al. (3) também observou que o exercício promove aumento da intensidade na marcação para a insulina e a preservação do número de células  $\beta$  em animais diabéticos em relação aos animais diabéticos não treinados. Também similar ao nosso estudo Thorel, et al (86) e Scaglia et al (87) também observaram efeito positivo do treinamento físico na modificação nos tipos celulares presente na ilhota pancreática. Curiosamente, Coskun e colaboradores (3) mostraram que o melhor resultado na proteção do estresse oxidativo induzido por STZ e o dano às células  $\beta$  foi obtido a partir do exercício de intensidade moderada, corroborando mais uma vez com os nossos achados, no qual o modelo de treinamento utilizado em nosso estudo foi prescrito nesse limiar de intensidade.

A expansão de massa de célula  $\beta$  acontece por meio de mecanismos moleculares de adaptação funcional da massa de células  $\beta$ , afim de compensar a demanda metabólica e re-estabelecer a homeostase (28,73,88). Segundo Dor, et al (89) a neogênese pode iniciar com a proliferação celular, seguida da diferenciação da célula  $\beta$  e a sua migração para formar novas ilhotas ou reabastecer as ilhotas existentes. Pode ocorrer ainda a auto-duplicação de células  $\beta$  preexistentes e aumento no tamanho das ilhotas (88,24) e a possibilidade de *turnover* celular (74,83). O mecanismo subjacente de neogênese da célula  $\beta$  parece depender da extensão e/ou do método da lesão na célula  $\beta$ , e isso ainda não está totalmente esclarecido (28) sugeriu-se a importância da presença de células precursoras intra-ilhotas, bem como as células acinares para a neogênese das células  $\beta$  (28,83).

O processo de expansão e proliferação de células  $\beta$  em murinos, pode ocorrer da re-diferenciação de células  $\beta$  desdiferenciadas, e também através da transdiferenciação de outros tipos celulares (células  $\alpha$ ,  $\delta$  ou enteroendócrinas) em células  $\beta$  (32,33). Em relação ao pico de proliferação das células  $\beta$  em murinos, é consideravelmente aumentado, com replicação de

células neonatais em 10–30% (32) e parece está associado à idade, com taxas maiores de replicação celular em estágios juvenis (2 a 3 meses de idade).

A regeneração no tecido pancreático poderia ocorrer através de prováveis precursores das células  $\beta$ , como diferentes linhagens de células-tronco. A diferenciação de precursores multipotentes no próprio parênquima pancreático, células progenitoras ou mesenquimais poderia atuar na promoção da proliferação e reparo celular do pâncreas através da migração celular periférica (79).

A variação na taxa de proliferação diária de células  $\beta$  é dependente da idade do animal (28,37,74,83,89), animais adultos velhos apresentam menor taxa de *turnover* de células  $\beta$  quando comparados com animais jovens (83), o que é explicado pela redução na taxa de proliferação das demais células presentes no tecido pancreático e inatividade das células endócrinas de ilhotas adultas (83).

Na tentativa de manter a massa de células  $\beta$  constante, diante do aumento de apoptose e uma redução de replicação na célula  $\beta$ , ou seja, o dano à célula, Scaglia e colaboradores (87), sugerem que ocorra um remodelamento no tecido pancreático endócrino, uma plasticidade celular no pâncreas, a geração de novas células  $\beta$  e reprogramação espontânea das células, evidenciam a ocorrência da transdiferenciação do tecido.

A avaliação da proliferação de células  $\beta$  pode ser feita através de marcadores imunohistoquímicos, como Ki67, antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), fosfo-histona H3 (PHH3) e /ou 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) (32). Em nosso estudo, observamos que a indução ao DM leva a uma diminuição na marcação nuclear de PCNA em células das ilhotas e o treinamento físico previne esse efeito, re-estabelecendo os níveis de marcação para PCNA. Interessante notar que essa marcação é mais evidente na periferia das ilhotas.

Dotzert, et al (41) utilizaram um protocolo de treino e indução do DM similar ao nosso e ao avaliar a proliferação celular na ilhota desses animais, observaram proliferação intensa. Observaram ainda que 10% das células positivas para insulina eram células proliferativas (positivas para PCNA), mostrando que o processo de duplicação celular é importante para regeneração tecidual. Teta e colaboradores (83), avaliaram a expansão de células  $\beta$  em modelo murino tratado com MLDZ por 15 dias e observaram células positivas para a insulina proliferando em ilhotas de diferentes tamanhos e com taxas aproximadamente equivalentes.

Collombat, et al. (28), mostraram que o fator de transcrição Pax4 é crucial para o processo de transdiferenciação do tecido pancreático possibilitando a conversão das células  $\alpha$

em células  $\beta$  funcionais. Em nosso estudo, observamos que a marcação para PCNA localiza-se na região periférica da ilhota onde sabidamente localiza-se células  $\alpha$ . Embora não tenhamos avaliado Pax4 pensamos em fazê-lo no futuro para tentar avaliar melhor a conversão das células  $\alpha$  em células  $\beta$  funcionais como foi enfatizado por Collombat, et al.(28).

O estresse oxidativo desempenha um papel importante no DM1 mediado por MLDZ. As espécies reativas de oxigênio (EROs) ativam o eixo NF- $\kappa$ B que contribui para a patogênese do DM1 por sustentar o sinal pró-apoptótico e influencia a inflamação aguda (90,91) através da produção de citocinas inflamatórias (72) que induzem a morte de células  $\beta$  principalmente via apoptose (73,92–94) que é a principal causa de morte de células  $\beta$  no início DM1 (25).

O aumento em citocinas pró-inflamatórias e a perda concomitante de citocinas anti-inflamatórias pode provocar a redução da célula  $\beta$ , isso acontece pois, as citocinas anti-inflamatórias são antagonistas às pró-inflamatórias e são capazes de diminuir a resposta inflamatória e proteger as células de insultos citotóxicos, e no quadro de DM1 essa proteção é prejudicada (48).

Em nosso estudo observamos que de fato a indução ao DM aumenta a marcação nuclear de NF- $\kappa$ B-p65 nas ilhotas, e esse efeito é prevenido pelo treinamento físico, ou seja, mostramos que o exercício pode contribuir terapêuticamente para DM, atuando na taxa de proliferação e redução da morte celular.

As citocinas influenciam na sobrevivência, proliferação, diferenciação e função das células imunes e outros sistemas orgânicos (95) e o exercício físico moderado é capaz de aumentar os mediadores endógenos antioxidantes e anti-inflamatórios (10,77).

Através de análise proteômica do meio condicionado após estimulação extracelular do músculo esquelético, Yoon et al., (11) identificaram 254 proteínas derivadas do músculo esquelético, dos quais 33 proteínas cuja secreção foi modulada pela estimulação de insulina, 14 foram aumentadas e 19 diminuíram na presença de insulina, mostrando através do secretoma sob estimulação extracelular uma gama de informações para avaliar a resposta do tecido muscular a condições fisiológicas específicas.

Durante e após o exercício, alguns metabólitos e sinais endócrinos são aumentados na circulação (81), em resposta à contração muscular, temos a produção e secreção de IL-6 "fator de exercício" (21), que é posteriormente seguida por citocinas anti-inflamatórias, IL-1ra, IL-10 (13,26,53,56).

Algumas citocinas como IL-4, IL-13 e IL-10 atuam no controle da viabilidade das células  $\beta$ , promovem imunidade humoral e exercem efeitos anti-inflamatórios como a inibição



da produção de citocinas pró-inflamatórias, diferenciação celular e aumento da expressão de genes anti-inflamatórios e anti-apoptóticos e citoproteção (96).

A IL-6 aumenta a secreção de insulina e glucagon via sinalização da via de STAT3, no qual pode atuar também a IL-10 (48). A IL-4 ou IL-10 em determinadas condições, impede a ativação do NF $\kappa$ B via estabilização do I $\kappa$ B (96). Estudos demonstram que a IL-6 é necessária para mediar o efeitos do exercício sobre a viabilidade de células  $\beta$ , concentrações sistêmicas aumentadas de IL-6 melhoram a função das células  $\beta$ , a homeostase e tolerância da glicose (95).

Tekula, et al. (72), observaram uma melhora no estresse oxidativo com o exercício físico em animais tratados com MLDZ, mas observaram uma redução nas concentrações de IL-6. Em nosso estudo, não observamos alteração nas concentrações de IL-6, IL-10 e IL-13 no soros dos animais, outros autores também observaram que o exercício físico não era capaz de modificar concentrações de IL-6 e outras citocinas no DM (91,76).

A IL-6 parece mediar os efeitos protetores do exercício nas células  $\beta$  através do *crosstalk* entre o músculo esquelético e as células  $\beta$  pancreáticas (50). Recentemente demonstrou-se um papel direto de IL-6 na melhora da função e viabilidade de células  $\beta$  pancreáticas e expansão das células  $\alpha$  controlada pela IL-6 (24).

Desta forma, levando em conta diferentes trabalhos mostrando que o exercício físico protege e melhora a viabilidade da célula  $\beta$  (3,10,19,22,59,60,92), assim como pelos nossos resultados mostrando que o treinamento físico reduz a marcação nuclear de NF- $\kappa$ B-p65 nas ilhotas dos camundongos tratados com MLDZ buscamos investigar melhor o possível envolvimento de IL6, como a miocina responsável pela proteção de células  $\beta$  *in vivo*, contra ambientes inflamatórios. Para isso utilizamos a linhagem celular de insulinoma de rato, INS-1E para estudos *in vitro*.

Em nosso estudo observamos que o pre-tratamento com a IL-6 contribui para a apoptose celular e sensibiliza as células INS-1E para a morte induzida pelas citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IFN modulando positivamente a expressão de iNOS, que é regulado pela ativação de NF- $\kappa$ B. Citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1 $\beta$ , promover a expressão da iNOS com a produção local de NO (23,96). O IFN potencializa os efeitos sobre a produção de iNOS e NO em combinação com IL-1 $\beta$  (45). De acordo com Cnop et al. (97), a exposição *in vitro* de células  $\beta$  à IL-1 $\beta$  + IFN, provoca alterações funcionais semelhantes às observadas em pacientes pré-diabético. Deste modo, *in vitro*, IL-6 sozinho não foi capaz de mimetizar os efeitos benéficos observados pelo treinamento físico nas ilhotas pancreáticas observados em nosso estudo.

A IL-1 $\beta$  medeia a ativação da via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B que regula a expressão de numerosos genes que desempenham papéis importantes nas respostas ao estresse, crescimento, sobrevivência celular e apoptose. Tanto a IL-1 $\beta$  como o TNF- $\alpha$  induziram uma ativação prolongada e estável do NF- $\kappa$ B nas células INS-1E (25,97).

Paula, et al (22), observaram um papel direto de IL-6 na melhora da função e viabilidade de células  $\beta$  pancreáticas que apresentaram maior resistentes a morte induzida por citocinas pro-inflamatórias, com uma diminuição da indução de iNOS e caspase 3 clivada em células  $\beta$  pancreática. A iNOS desempenha um papel importante na disfunção das células  $\beta$ . A caspase-3 é uma caspase efetora, conduz a alterações morfológicas e induz a apoptose, leva à perda de células  $\beta$  e resulta em hiperglicemia (72).

O possível efeito imunomodulador do exercício físico na sobrevivência de célula  $\beta$  pancreática, foi demonstrado também por Christensen, et al. (100), e a IL-6 foi capaz de previne a apoptose em células INS-1 na ausência de IL-1 $\beta$  + IFN- $\gamma$ . Choi et al. (20) semelhante aos demais estudos citados observaram a proteção nas ilhotas pancreáticas e em células  $\beta$  contra a morte celular induzida por citocinas com o tratamento com IL-6. E, recentemente Paula, et al (19), mostraram que o exercício físico teria uma ação protetora contra o estresse do reticulo endoplasmático e apoptose celular também via IL-6.

Linnemann e colaboradores (23) pré-trataram com IL-6 células INS-1 por 24h e avaliaram apoptose celular, e observaram que o pre-tratamento com IL-6 torna as células  $\beta$  resistentes a apoptose induzida por citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ ), e essa a capacidade de proteção da IL-6 é via autofagia, então se a autofagia for inibida a IL-6 perde essa capacidade protetora, mostrando ainda que esse processo engloba AMPK, mTOR e a fosforilação de STAT3 (23).

Diferente dos estudos de Paula et al.(22), Christensen, et al. (98) e Choi et al. (20) semelhante ao que foi observado em nosso estudo, Oh e colaboradores (99), observaram também que IL-6 provoca redução na viabilidade celular das células INS-1E, observamos então que o papel da IL-6 na viabilidade de célula  $\beta$  é controverso e ambíguo. Vale ressaltar que o delineamento experimental pode interferir diretamente nos resultados e colaborar com efeito ambíguo, deve-se sempre levar em consideração o tempo de incubação, concentrações e as diluições assim como o manuseio corretamente dos equipamentos.

Estudos mais recentes sugerem que outras miocinas, secretadas durante o exercício físico, teriam também efeitos positivo na proliferação celular e proteção das células  $\beta$  à apoptose (100–102), não sendo esse efeito benéfico realizado somente por IL-6. Sabe-se que citocinas anti-inflamatórias como IL-13, IL-4 ou IL-10 reduzem a acumulação de nitritos na

presença de IL-1 $\beta$  sendo um mecanismo de citoproteção efetivo através da redução do estresse oxidativo (96).

Infelizmente, não há estudos clínicos em humanos que medem diretamente o efeito do exercício na saúde e função das ilhotas (5). Segundo Qu et al. (26), os experimentos imitam situações fisiopatológicas crônicas mas desconsideram o *crosstalk* entre diferentes tipos de células e tecidos e a IL-6, durante as reações inflamatórias e isso pode ser um fator limitante, por isso o papel exato da IL-6 na patogênese do DM deve ser examinado cuidadosamente de uma maneira celular e tecidual.

É importante maiores conhecimentos acerca das vias moduladas durante o exercício físico para maior entendimento de como prescrevê-lo de maneira mais efetiva e segura para DM1 uma vez que ainda são baixos os níveis de conhecimento sobre o controle do diabetes em torno de exercício (103).

Nossos resultados *in vivo* demonstram que o exercício físico é capaz de prevenir parcialmente a hiperglicemia induzida pelo tratamento com MLDZ, assim como induzir modificações estruturais no tecido pancreático, e partindo do pressuposto que as miocinas musculares estariam envolvidas na resposta imunomoduladora do exercício, e a fim de entender melhor os mecanismos moleculares subjacentes à proliferação, diferenciação e transdiferenciação da ilhota, ou seja, para compreender melhor as modificações estruturais do tecido pancreático, avaliamos os efeitos benéficos do exercício físico no tecido pancreático considerando o *crosstalk* entre os tecido, e assim analisamos *in vitro* o tratamento com IL-6. A citocina IL-6 parece aumentar a resposta deletéria na célula INS-1E, não sendo capaz de atenuar a apoptose celular, o que indica que outros sinais imunomoduladores produzidos durante o exercício físico podem estar envolvidos na proteção observada em nosso trabalho e em trabalhos anteriores.

## 7. CONCLUSÕES

O treinamento físico atua na prevenção e/ou retardo no desenvolvimento do DM1 em modelo animal experimental induzido MLDZ, age no reequilíbrio da homeostase glicêmica em camundongos diabéticos, e também provoca modificações estruturais quantitativa e qualitativamente no tecido pancreático em modelo animal experimental de DM1 induzido MLDZ. O efeito benéfico nas ilhotas pancreáticas, pode ter um grande impacto na plasticidade das células na ilhota, prevenindo a perda de células  $\beta$  funcionais, aumentando a proliferação de células das ilhotas pancreáticas e diminuição da inflamação local e morte de células  $\beta$ , além de possivelmente induzir re-aparecimento células  $\beta$  após destruição induzida por inflamação. Esse efeito não parecem estar exclusivamente ligados a secreção de IL-6, tendo em vista que *in vitro*, exposição de células  $\beta$  á essa citocina torna as células INS-1E mais sensíveis à morte induzida por citocinas pro-inflamatórias IL-1 $\beta$  e INF- $\gamma$ . O que indica que possivelmente outros fatores oriundos do exercício físico estejam envolvidos na proteção celular observada em outros estudos.

Devido a grande complexidade dos mecanismos envoltos na fisiopatologia do DM1 e a gravidade da patologia, faz-se necessário aperfeiçoar o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na modulação do exercício no tecido pancreático, pensando em novos avanços terapêuticos para a sobrevivência da célula  $\beta$  pancreática e a melhorar o tratamento do DM1.

## REFERÊNCIAS

- Animated architecture": V.52 - p10, Derek Walker - Architectural Design, 1982.
1. Of S, Care diabetes M. Updates to the Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(9):2045–7.
  2. Care D, Suppl SS. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in Diabetesd2018. *Diabetes Care*. 2018;41(January):S13–27.
  3. Coskun O, Ocakci A, Bayraktaroglu T, Kanter M. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Tohoku J Exp Med*. 2004;203(3):145–54.
  4. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev*. 2008;29(1):42–61.
  5. Stehno-Bittel L. Organ-Based Response to Exercise in Type 1 Diabetes. *ISRN Endocrinol*. 2012;2012:1–14.
  6. Balda CA, Pacheco-Silva A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. *Rev Assoc Med Bras*. 1999;45(2):175–80.
  7. Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(2):156–65.
  8. Kristiansen OP, Mandrup-poulsen T. The Good, the Bad, or the Indifferent? *Diabetes*. 2005;54(December).
  9. Nathan DM. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: Overview. *Diabetes Care*. 2014;37(1):9–16.
  10. Huang H-H, Farmer K, Windscheffel J, Yost K, Power M, Wright DE, et al. Exercise Increases Insulin Content and Basal Secretion in Pancreatic Islets in Type 1 Diabetic Mice. *Exp Diabetes Res*. 2011;2011(1):1–10.
  11. Yoon JH, Yea K, Kim J, Choi YS, Park S, Lee H, et al. Comparative proteomic analysis of the insulin-induced L6 myotube secretome. *Proteomics*. 2009;9(1):51–60.
  12. Kurauti MA, Costa JM, Ferreira SM, Santos GJ, Sponton CHG, Carneiro EM, et al. Interleukin-6 increases the expression and activity of insulin-degrading enzyme. *Sci Rep*. 2017;7(April):1–12.
  13. Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*. 2006;55(10):2688–97.
  14. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil*. 2003;24(2–3):113–9.
  15. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1379–406.
  16. Febbraio MA, Hiscock N, Sacchetti M, Fischer CP, Pedersen BK. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes*. 2004;53(7):1643–8.
  17. Biensø RS, Knudsen JG, Brandt N, Pedersen PA, Pilegaard H. Effects of IL-6 on pyruvate dehydrogenase regulation in mouse skeletal muscle. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2014;466(8):1647–57.
  18. Karstoft K, Pedersen BK. Exercise and type 2 diabetes: Focus on metabolism and inflammation. *Immunology and Cell Biology*. 2016.
  19. Paula FMM, Leite NC, Borck PC, Freitas-Dias R, Cnop M, Chacon-Mikahil MPT, et

- al. Exercise training protects human and rodent  $\beta$  cells against endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *FASEB J.* 2018;32(3):1524–36.
20. Choi SE, Choi KM, Yoon IH, Shin JY, Kim JS, Park WY, et al. IL-6 protects pancreatic islet beta cells from pro-inflammatory cytokines-induced cell death and functional impairment in vitro and in vivo. *Transpl Immunol.* 2004;13(1):43–53.
  21. Yoon JH, Yea K, Kim J, Choi YS, Park S, Lee H, et al. Comparative proteomic analysis of the insulin-induced L6 myotube secretome. *Proteomics.* 2009;9(1):51–60.
  22. Paula FMM, Leite NC, Vanzela EC, Kurauti MA, Freitas-Dias R, Carneiro EM, et al. Exercise increases pancreatic  $\beta$ -cell viability in a model of type 1 diabetes through IL-6 signaling. *FASEB J.* 2015;29(5):1805–16.
  23. Linnemann AK, Blumer J, Marasco MR, Battiola TJ, Umhoefer HM, Han JY, et al. Interleukin 6 protects pancreatic b cells from apoptosis by stimulation of autophagy. *FASEB J.* 2017;31(9):4140–52.
  24. Cai Y, Yuchi Y, De Groef S, Coppens V, Leuckx G, Baeyens L, et al. IL-6-dependent proliferation of alpha cells in mice with partial pancreatic-duct ligation. *Diabetologia.* 2014;57(7):1420–7.
  25. Chen G, Hohmeier HE, Gasa R, Tran VV, Newgard CB. Selection of insulinoma cell lines with resistance to interleukin-1 $\beta$ - and  $\gamma$ -interferon-induced cytotoxicity. *Diabetes.* 2000;49(4):562–70.
  26. Qu D, Liu J, Lau CW, Huang Y. IL-6 in diabetes and cardiovascular complications. *Br J Pharmacol.* 2014;171(15):3595–603.
  27. Zhu Y, Liu Q, Zhou Z, Ikeda Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: Critical transcription regulators for beta cell development and regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):1–7.
  28. Collombat P, Xu X, Heimberg H, Mansouri A. Pancreatic beta-cells: From generation to regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21(8):838–44.
  29. Ding L, Gysemans C, Mathieu C.  $\beta$ -Cell differentiation and regeneration in type 1 diabetes. *Diabetes, Obes Metab.* 2013;15(S3):98–104.
  30. Hasnain SZ, Borg DJ, Harcourt BE, Tong H, Sheng YH, Ng CP, et al. Glycemic control in diabetes is restored by therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress. *Nat Med.* 2014;20(12):1417–26.
  31. Shih HP, Wang A, Sander M. Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2013;29(1):81–105.
  32. Wang P, Fiaschi-Taesch NM, Vasavada RC, Scott DK, García-Ocaña A, Stewart AF. Diabetes mellitus-advances and challenges in human  $\beta$ -cell proliferation. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(4):201–12.
  33. Vieira A, Courtney M, Druelle N, Avolio F, Napolitano T, Hadzic B, et al.  $\beta$ -Cell replacement as a treatment for type 1 diabetes: an overview of possible cell sources and current axes of research. *Diabetes, Obes Metab.* 2016;18(April):137–43.
  34. Wang J, Wang H. Oxidative Stress in Pancreatic Beta Cell Regeneration. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1–9.
  35. Eizirik DL, Cardozo AK, Cnop M. The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus. *Endocr Rev.* 2008;29(1):42–61.
  36. Ding L, Gysemans C, Mathieu C. ??-Cell differentiation and regeneration in type 1 diabetes. *Diabetes, Obes Metab.* 2013;15(S3):98–104.
  37. Willcox A, Richardson SJ, Bone AJ, Foulis AK, Morgan NG. Evidence of increased islet cell proliferation in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2010;53(9):2020–8.
  38. Kalscheuer H, Lehnert H. Zielgerichtete Erstdiagnostik bei Typ-1-Diabetes. *Dtsch Medizinische Wochenschrift.* 2017;142(10):723–30.

39. Krause MP, Riddell MC, Hawke TJ. Effects of type 1 diabetes mellitus on skeletal muscle: clinical observations and physiological mechanisms. *Pediatr Diabetes*. 2011;12(4pt1):345–64.
40. Gapp DA, Leiter EH, Coleman DL, Schwizer RW. Temporal changes in pancreatic islet composition in c57bl/6j-db/db (diabetes) mice. *Diabetologia*. 1983;25(5):439–43.
41. Dotzert MS, Murray MR, McDonald MW, Olver TD, Velenosi TJ, Hennop A, et al. Metabolomic Response of Skeletal Muscle to Aerobic Exercise Training in Insulin Resistant Type 1 Diabetic Rats. *Sci Rep*. 2016;6(April):1–10.
42. Needell JC, Zipris D. Targeting Innate Immunity for Type 1 Diabetes Prevention. *Curr Diab Rep*. 2017;17(11).
43. Cabrera SM, Henschel AM, Hessner MJ. Innate inflammation in type 1 diabetes. *Transl Res*. 2016;167(1):214–27.
44. Friesen NTE, Büchau AS, Schott-Ohly P, Lgssiar A, Gleichmann H. Generation of hydrogen peroxide and failure of antioxidative responses in pancreatic islets of male C57BL/6 mice are associated with diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin. *Diabetologia*. 2004;47(4):676–85.
45. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 2008;51(2):216–26.
46. Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death - The signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*. 2001;44(12):2115–33.
47. Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and B-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(4):219–26.
48. Linnemann AK, Blumer J, Marasco MR, Battiola TJ, Umhoefer HM, Han JY, et al. Interleukin 6 protects pancreatic b cells from apoptosis by stimulation of autophagy. *FASEB J*. 2017;31(9):4140–52.
49. Meyerovich K, Fukaya M, Terra LF, Ortis F, Eizirik DL, Cardozo AK. The non-canonical NF- $\kappa$ B pathway is induced by cytokines in pancreatic beta cells and contributes to cell death and proinflammatory responses in vitro. *Diabetologia*. 2016;59(3):512–21.
50. Osório J. Diabetes: IL-6 mediates the protective effects of exercise on  $\beta$  cells. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(4):193.
51. Görgens SW, Eckardt K, Jensen J, Drevon CA, Eckel J. Exercise and Regulation of Adipokine and Myokine Production. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;135:313–36.
52. Yoon HJ, Thakur V, Isham D, Fayad M, Chattopadhyay M. Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats. *Exp Neurol*. 2015;267:107–14.
53. Pedersen BK, Fischer CP. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(3):265–71.
54. Ropelle ER, Flores MB, Cintra DE, Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, et al. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKK $\beta$  and ER stress inhibition. *PLoS Biol*. 2010;8(8):31–2.
55. da Silva FOC, Macedo DV. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: Uma visão geral. *Rev Bras Cineantropometria e Desempenho Hum*. 2011;13(4):320–8.
56. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc*. 2004;63(02):263–7.
57. Pedersen BK, Steensberg A, Keller P, Keller C, Fischer C, Hiscock N, et al. Muscle-derived interleukin-6: Lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2003;446(1):9–16.
58. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory

- properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2011;1813(5):878–88.
59. Hawley JA, Lessard SJ. Exercise training-induced improvements in insulin action. *Acta Physiol.* 2008;192(1):127–35.
  60. Ropelle ER, Pauli JR CJ. Efeitos moleculares do exercício físico sobre as vias de sinalização insulínica Exercício e sinalização insulínica : perspectiva histórica Efeitos do exercício físico na via de sinalização da insulina. *Motriz.* 2005;11(1):49–55.
  61. Carney EF. Prevention: Intensive exercise associated with reduced risk of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(4):198.
  62. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537–46.
  63. Yan L-J, Wu J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$ -cell glucotoxicity. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther.* 2015;181.
  64. Matthews DR, Hosker JR, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC, et al. *Diabetologia.* 1985;412–9.
  65. Van Dijk JW, Manders RJF, Canfora EE, Van Mechelen W, Hartgens F, Stehouwer CDA, et al. Exercise and 24-h glycemic control: Equal effects for all type 2 diabetes patients? *Med Sci Sports Exerc.* 2013;45(4):628–35.
  66. Téllez N, Montanya E. Gastrin induces ductal cell dedifferentiation and  $\beta$ -cell neogenesis after 90% pancreatectomy. *J Endocrinol.* 2014;223(1):67–78.
  67. Ribeiro RA, Santos-Silva JC, Vettorazzi JF, Cotrim BB, Molioli DDM, Boschero AC, et al. Taurine supplementation prevents morpho-physiological alterations in high-fat diet mice pancreatic  $\beta$ -cells. *Amino Acids.* 2012;43(4):1791–801.
  68. Santos-Silva JC, Ribeiro RA, Vettorazzi JF, Irlles E, Rickli S, Borck PC, et al. Taurine supplementation ameliorates glucose homeostasis, prevents insulin and glucagon hypersecretion, and controls  $\beta$ ,  $\alpha$ , and  $\delta$ -cell masses in genetic obese mice. *Amino Acids.* 2015;47(8):1533–48.
  69. Kutlu B, Cardozo AK, Darville MI, Kruhøffer M, Magnusson N, Ørntoft T, et al. Discovery of Gene Networks Regulating Cytokine-Induced Dysfunction and Apoptosis in Insulin-Producing INS-1 Cells. *Diabetes.* 2003;52(11):2701–19.
  70. Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P. Glucose Sensitivity and Metabolism-Secretion Coupling Studied during Two-Year Continuous Culture in INS-1E Insulinoma Cells. *Endocrinology.* 2004;145(2):667–78.
  71. Weir GC, Bonner-weir S. Progression to Diabetes. *Diabetes.* 2004;53(December):16–21.
  72. Tekula S, Khurana A, Anchi P, Godugu C. Withaferin-A attenuates multiple low doses of Streptozotocin (MLD-STZ) induced type 1 diabetes. *Biomed Pharmacother.* 2018;106(July):1428–40.
  73. Akirav E, Kushner JA, Herold KC.  $\beta$ -Cell Mass and Type 1 Diabetes: Going, Going, Gone? *Diabetes.* 2008;57(11):2883–8.
  74. Kushner JA. Review series The role of aging upon  $\beta$  cell turnover. *J Clin Invest.* 2013;123(3):990–5.
  75. Dotzert MS, McDonald MW, Murray MR, Nickels JZ, Noble EG, Melling CWJ. Effect of Combined Exercise Versus Aerobic-Only Training on Skeletal Muscle Lipid Metabolism in a Rodent Model of Type 1 Diabetes. *Can J Diabetes.* 2018;42(4):404–11.
  76. Farrell PA, Fedele MJ, Hernandez J, Fluckey JD, Miller JL, Lang CH, et al. Hypertrophy of skeletal muscle in diabetic rats in response to chronic resistance



- exercise. *J Appl Physiol.* 2019;87(3):1075–82.
77. Oharomari LK, de Moraes C, Navarro AM. Exercise Training but not Curcumin Supplementation Decreases Immune Cell Infiltration in the Pancreatic Islets of a Genetically Susceptible Model of Type 1 Diabetes. *Sport Med - Open.* 2017;3(1).
  78. Jessen N, Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2005;99(1):330–7.
  79. Voltarelli JC, Couri CEB, Rodrigues MC, Moraes DA, Stracieri ABPL, Pieroni F, et al. Terapia celular no diabetes mellitus. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;31(SUPPL. 1):149–56.
  80. McDonald C. Editorial. *Int J Advert.* 2004;23(2):147–8.
  81. Narendran P, Solomon TP, Kennedy A, Chimen M, Andrews RC. The time has come to test the beta cell preserving effects of exercise in patients with new onset type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2015;58(1):10–8.
  82. Xu X, D'Hoker J, Stangé G, Bonn e S, De Leu N, Xiao X, et al.  $\beta$  Cells Can Be Generated from Endogenous Progenitors in Injured Adult Mouse Pancreas. *Cell.* 2008;132(2):197–207.
  83. Teta M, Long SY, Wartschow LM, Rankin MM, Kus JA. Very Slow Turnover of Beta-Cells in Aged Adult Mice Monica. *Diabetes.* 2005;54(September):2557–67.
  84. Chera S, Baronnier D, Ghila L, Cigliola V, Jensen JN, Gu G, et al. Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic  $\delta$ -cells into insulin producers. *Nature.* 2014;514(7253):503–7.
  85. Kataoka M, Kawamuro Y, Shiraki N, Miki R, Sakano D, Yoshida T, et al. Recovery from diabetes in neonatal mice after a low-dose streptozotocin treatment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;430(3):1103–8.
  86. Thorel F, N epote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, et al. HHS Public Access. *Nature.* 2010;464(7292):1149–54.
  87. Scaglia L, Cahill CJ, Finegood DT, Bonner-Weir S. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology.* 1997;138(4):1736–41.
  88. Li R-J, Qiu S-D, Tian H, Zhou S-W. Diabetes induced by multiple low doses of STZ can be spontaneously recovered in adult mice. *Dong wu xue yan jiu = Zool Res .* 2013;34(3):238–43.
  89. Yuval Dor, Juliana Brown, Olga I. Martinez, Douglas A. Melton. Adult pancreatic  $\beta$ -cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature.* 2004;429(6987):41–6.
  90. Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev.* 2001;15(2):111–27.
  91. Talebi-Garakani E, Safarzade A. Resistance training decreases serum inflammatory markers in diabetic rats. *Endocrine.* 2013;43(3):564–70.
  92. Jain D, Weber G, Eberhard D, Mehana AE, Eglinger J, Welters A, et al. DJ-1 protects pancreatic beta cells from cytokine- and streptozotocin-mediated cell death. *PLoS One.* 2015;10(9):1–16.
  93. Sherry NA, Kushner JA, Glandt M, Kitamura T, Brillantes AMB, Herold KC. Effects of autoimmunity and immune therapy on  $\beta$ -cell turnover in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006;55(12):3238–45.
  94. Keenan HA, Sun JK, Levine J, Doria A, Aiello LP, Eisenbarth G, et al. Residual insulin production and pancreatic  $\beta$ -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin medalist study. *Diabetes.* 2010;59(11):2846–53.
  95. Ellingsgaard H, Hauselmann I, Schuler B, Habib AM, Baggio LL, Meier DT, Eppler E, Bouzakri K, Wueest S, Muller YD, Hansen AMK, Reinecke M, Konrad D, Gassmann M,

- Reimann F, Halban PA, Gromada J, Drucker DJ, Gribble FM, Ehses JA, Donath MY. Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells. *Nat Med*. 2011;17(11):1481–9.
96. Russell MA, Morgan NG. The impact of anti-inflammatory cytokines on the pancreatic  $\beta$ -cell. *Islets*. 2014;6(3):1–10.
  97. Cnop M, Welsh N, Jonas J-C, Jorns A, Lenzen S, Eizirik DL. Mechanisms of Pancreatic  $\beta$ -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes Many Differences, Few Similarities. *Diabetes Care*. 2005;54(SUPPL. 2):16–23.
  98. Christensen CS, Christensen DP, Lundh M, Dahllöf MS, Haase TN, Velasquez JM, et al. Skeletal muscle to pancreatic  $\beta$ -cell cross-talk: The effect of humoral mediators liberated by muscle contraction and acute exercise on  $\beta$ -cell apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(10):E1289–98.
  99. Oh YS, Lee Y-J, Park EY, Jun H-S. Interleukin-6 treatment induces beta-cell apoptosis via STAT-3-mediated nitric oxide production. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011;27:813–819.
  100. Natalicchio A, Marrano N, Biondi G, Spagnuolo R, Labarbuta R, Porreca I, et al. The myokine irisin is released in response to saturated fatty acids and promotes pancreatic  $\beta$ -cell survival and insulin secretion. *Diabetes*. 2017;66(11):2849–56.
  101. Liu S, Du F, Li X, Wang M, Duan R, Zhang J, et al. Effects and underlying mechanisms of irisin on the proliferation and apoptosis of pancreatic  $\beta$  cells. *PLoS One*. 2017;12(4):1–12.
  102. Burger A. Medicinal Chemistry. *J Med Chem*. 1963;6(6):829–829.
  103. Lascar N, Kennedy A, Hancock B, Jenkins D, Andrews RC, Greenfield S, et al. Attitudes and barriers to exercise in adults with type 1 diabetes (T1DM) and how best to address them: A qualitative study. *PLoS One*. 2014;9(9).