

Avaliação da lesão muscular após estiramento controlado em ratos diabéticos

Evaluation of muscle injury after controlled stretching in diabetic rats

Vanessa de Godoi¹; Rafael Paolo Rossi¹; Rodney Capp Pallotta²; Shaiane Silva Tomazoni¹; Simone Teixeira³ Luciano Ramos⁴

¹Mestrando em Ciências Biomédicas – Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, ICB – USP, São Paulo, SP – Brasil.

²Doutorando em Ciências – Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, ICB – USP, São Paulo, SP – Brasil.

³Doutora – USP, SP – Brasil. Técnica do Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, ICB – USP, São Paulo, SP – Brasil.

⁴Doutor em Ciências – Laboratório de Farmacologia e Terapêutica Experimental, ICB – USP, São Paulo, SP – Brasil.

Endereço para correspondência

Luciano Ramos
R. Camélia, 43, Monte Castelo
12215-410 – São José dos Campos – SP [Brasil]
lunoramos@yahoo.com.br

Local da pesquisa

Instituto de Ciências Biomédicas – Departamento de Farmacologia
Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP [Brasil].

Resumo

Introdução: O diabetes é uma doença autoimune multifatorial cuja suscetibilidade é determinada por fatores químicos, genéticos e ambientais. **Objetivo:** Avaliar parâmetros bioquímicos e funcionais do processo inflamatório após lesão muscular em ratos diabéticos. **Métodos:** Por meio de uma flexão plantar foi realizado o estiramento controlado do músculo tibial anterior nos grupos lesão (n=5) e lesão diabético (n=5). O extravasamento proteico foi determinado por Azul de Evans, citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 por ELISA e avaliação funcional pela *walking track analysis*. **Resultados:** Observou-se um maior extravasamento proteico nos grupos les e les + diab em relação ao grupo hígido (p<0,01 e p<0,05). Houve um aumento significativo nos níveis de TNF- α , IL-10 e IL-6 nos grupos les, diab e les + diab (p<0,001) e IL-1 β nos grupos les (p<0,05), diab e les + diab (p<0,01) em relação ao grupo hígido. Verificou-se um aumento do índice funcional no grupo les p<0,001) e les + diab (p<0,01) comparados ao grupo hígido e ao grupo diab. **Conclusão:** A lesão por estiramento controlado no músculo tibial anterior de ratos induziu uma resposta imune reduzida no animal diabético e um déficit na função motora.

Descritores: Azul Evans; Citocinas; Diabetes mellitus.

Abstract

Introduction: Diabetes is a multifactorial autoimmune disease whose susceptibility is determined by chemical, genetic and environmental factors. **Objective:** Evaluate functional and biochemical parameters of inflammation after muscle injury in diabetic rats. **Methods:** Through a plantar flexion was performed controlled stretch the tibialis anterior muscle in groups les (n=5) and les+diab (n=5). The protein extravasation was determined by Evans Blue, cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 by ELISA and functional evaluation by walking track analysis. **Results:** We observed an increase in protein extravasation in groups les and les+diab compared to the healthy group (p<0.01 and p<0.05). There was a significant increase of TNF- α , IL-10 and IL-6 groups les, les+diab and diab (p<0.001) and IL-1 β les groups (p <0.05) les+diab and diab (p<0.01) compared to the healthy group. We observed an increase in the functional index les group (p<0.001) and les+diab (p<0.01) compared to the healthy group and the group diab. **Conclusion:** The controlled stretch injury in the tibial anterior muscle of rats, induce an immune response reduced in diabetic animals and a deficit in motor function.

Key words: Cytokines; Diabetes mellitus; Evans Blue.

Introdução

O diabetes é uma doença autoimune multifatorial cuja suscetibilidade é determinada pela combinação de fatores químicos, genéticos e ambientais¹. Ele consiste em um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, a qual é o resultado de defeitos na ação e na secreção de insulina ou em ambas. O diabetes *mellitus* tipo 1, forma presente em 5 a 10% dos casos, é caracterizado por uma deficiência de insulina determinada pela destruição gradual das células beta ou B produtoras desse hormônio no pâncreas. Na maioria dos casos, essa destruição das células beta é mediada por autoimunidade; porém, existem casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referida como forma idiopática do diabetes *mellitus* tipo 1. Esse processo, mediado pelo sistema imunológico, ocasiona um quadro permanente de hiperglicemia o qual é característico da doença. No diabetes *mellitus* tipo 1, ocorrem alterações no metabolismo de hidratos de carbono, lipídios e proteínas, assim como alterações estruturais em diversos sistemas orgânicos incluindo microangiopatia (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macroangiopatia (doença coronariana, insuficiência arterial periférica)².

A hiperglicemia induz um estado pró-inflamatório que inclui células inflamatórias e estresse oxidativo. A inflamação a nível celular pode ser descrita como um aumento no fator de transcrição nuclear kappa B ($\text{NF}\kappa\beta$). A ativação de $\text{NF}\kappa\beta$ induz a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, tais como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), moléculas de adesão e outros genes que regulam a transcrição, apoptose e a proliferação celular³. Apesar de a hiperglicemia induzir esse estado pró-inflamatório, ela tem efeitos específicos que bloqueiam o sistema imune inato, o que provavelmente contribui para os resultados negativos observados em estudos clínicos, em particular aqueles que demonstram aumento de complicações.

Pacientes com diabetes tipo 1 de longa duração apresentam um decréscimo na força muscular das articulações do tornozelo e joelho⁴. A fraqueza muscular observada pode ser explicada, em parte, pela atrofia secundária à neuropatia diabética⁵. Entretanto, outros mecanismos celulares podem estar envolvidos na alteração do desempenho muscular associado ao diabetes⁶.

Diferentes condutas, tanto farmacológicas quanto não farmacológicas, têm sido prescritas para a prevenção e tratamento do paciente diabético. Dentre essas, o exercício físico é, sem dúvida, de grande importância. Exercícios físicos de resistência são recomendados para pacientes com diabetes *mellitus* devido à melhora no controle da glicose e redução de outros fatores de risco⁷. Entretanto, lesões musculares são muito comuns na prática desportiva, podendo causar, na maioria das vezes, dor e incapacidade, levando a um comprometimento nas atividades ocupacionais e nas de lazer⁸.

A cicatrização ou reparo tecidual de lesões musculares segue um padrão morfológico independente dos diferentes mecanismos indutores da lesão (contusão, estiramento ou ruptura) em indivíduos normais. Esse processo é composto por três fases: destruição, reparo e remodelamento. No entanto, pouco se sabe a respeito da dinâmica da ação inflamatória e do reparo tecidual após uma lesão muscular na vigência do quadro de diabetes⁹. O objetivo neste trabalho foi estudar o processo inflamatório e aspectos funcionais decorrentes da lesão muscular por estiramento em ratos diabéticos, comparados a ratos não diabéticos.

Materiais e métodos

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética e Pesquisa em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo nº 139, seguidos dos princípios éticos da experimentação animal, de acordo com as Normas

Internacionais de Proteção aos Animais e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando em torno de 200 g, com 8 a 10 semanas de vida.

Indução do diabetes *mellitus*

Após restrição alimentar de 12 horas, o diabetes foi induzido por injeção intravenosa (veia caudal) de aloxana (40 mg/kg), dissolvida em solução salina (cloreto de sódio 0,9%). Ratos do grupo controle receberam igual volume de solução salina. Após o período de dez dias, foram coletadas amostras de sangue da cauda dos animais que receberam aloxana, ocorrendo o mesmo procedimento com os do grupo controle para análise de glicemia por meio de glicosímetro portátil. Os ratos que receberam a injeção de aloxana e que apresentaram glicemia < 200 mg/dL não foram utilizados no experimento. Já aqueles que receberam aloxana e que apresentaram glicemia > 200 mg/dL foram divididos aleatoriamente em dois grupos de cinco animais: grupo lesão diabético e diabético. Os ratos do grupo controle foram distribuídos de igual maneira em dois grupos de cinco animais: grupo hígido e lesão.

Protocolo de lesão por estiramento

Os grupos lesão e lesão diabético foram submetidos à anestesia dissociativa com Quetamina e Xilazina (90 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente; König, Avellaneda, Argentina), por via intraperitoneal (ip), antes de serem submetidos ao protocolo de alongamento passivo do músculo tibial anterior.

Após a pesagem, cada animal foi posicionado em decúbito dorsal, sobre cortiça acoplada ao sistema de alongamento. O membro posterior direito ficou firmemente preso com uma linha que passa por uma roldana e se prende a uma pisseta com volume de água correspondente a 150% do peso corporal do animal. Essa linha foi fixada sobre o dorso da pata do animal, reali-

zando uma flexão plantar, alongando o músculo tibial anterior de sua pata posterior direita. O protocolo foi realizado uma única vez, tendo o animal recebido a tração durante 40 minutos.

Extravasamento proteico

Após anestesia os animais receberam o corante azul de Evans (25mg/Kg, intravenosa) uma hora antes de serem sacrificados para determinação do extravasamento proteico. Em seguida ao sacrifício dos animais – realizado com uma superdose de anestésico –, o músculo tibial anterior foi coletado, pesado e conservado por 24 horas a 37 °C em um tubo de vidro com solução de formamida (5 ml/g) para extração do azul de Evans das amostras do músculo. Em seguida, 200 µl do corante extraído pela formamida foram transferidos para microplacas de 96 poços para leitura de absorbância, em leitor de a 620 nm. A solução de formamida foi usada como branco para o teste. As leituras foram interpoladas por regressão linear em uma curva padrão do corante.

Dosagens de citocinas

As dosagens das citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-10 foram realizadas pelo teste imunoenzimático, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100µl de anticorpo monoclonal para cada citocina: anti-IL-1 β e IL-6 foram diluídos em tampão carbonato de sódio (0,1 M, pH 9,6), enquanto anti-IL-10 e TNF- α foram diluídos em tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 6,5). As placas foram incubadas (4 °C) por 18 horas. Para o bloqueio, as placas foram lavadas com solução PBS contendo 0,05% de Tween 20, por quatro vezes, e depois preenchidas com 300 µl/poço de solução de bloqueio a 37 °C por três horas e submetidas a novo ciclo de lavagens. A seguir, 100µl das amostras devidamente diluídas ou dos padrões das citocinas recombinantes foram adicionados à placa e deixadas por 18 horas em temperatura de 4 °C. Após lavagem, 100µl dos respectivos anticorpos



biotinilados específicos de detecção para cada citocina foram acrescentados e deixados por uma hora em temperatura ambiente. Após lavagem das placas, o volume de 100µl de estreptavidina – peroxidase foi adicionado e deixado por uma hora em temperatura ambiente (22 °C) seguida de novas lavagens. A reação foi revelada pela adição de 100µl/poço da solução de 3.3'5.5' tetrametilbenzidina e interrompida pela adição de 50µl/poço de ácido sulfúrico (2 N). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm com correção de 570 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. O limite de detecção para IL-1 β , IL-10 e TNF- α foi 1,95 pg/ml, enquanto para IL-6 foi 15,6 pg/ml.

Avaliação funcional

A avaliação funcional foi realizada utilizando a *walking track analysis*. O início da avaliação se deu com o animal sendo liberado no início de um corredor, por onde caminhou em direção ao ambiente escuro, deixando impressas as marcas das patas traseiras em tiras de papel. Todos os ratos tiveram uma adaptação e exploração do local. As seguintes medidas foram coletadas com paquímetro, após o registro em papel: 1) o espaço entre a segunda e a quarta falange distal (ITS, *intermediary toe spready*); 2) o espaço entre a primeira e a quinta falange distal (TS, *toe spready*) e 3) o espaço entre a borda proximal do pé e a terceira falange distal (PL, *print length*). Após serem calculados os valores nos testes de *walking track*, foi realizado o cálculo do SFI (*sciatic function index*) antes do protocolo de alongamento para registro da normalidade de cada animal (pré-lesão) e também uma hora antes do sacrifício (pós-lesão).

Após a coleta de dados, os resultados foram expressos como médias \pm EPM e submetidos ao teste t-Student não pareado ou análise de variância (ANOVA) seguida da aplicação do teste Tukey para múltiplas comparações. Valores

de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultado e discussão

O diabetes *mellitus* tipo 1 experimental pode ser induzido em ratos por meio da injeção de aloxana – substância que promove a destruição seletiva das células beta pancreáticas – sendo um dos produtos mais comumente utilizados para indução dessa doença em ratos¹⁰. Neste trabalho, a injeção de aloxana (40 mg/kg), via intravenosa, em ratos de 8 a 10 semanas, provocou um aumento da glicose, dez dias após a indução do diabetes (Figura 1). Esse achado confirma o estado diabético dos animais e caracterizam a doença.

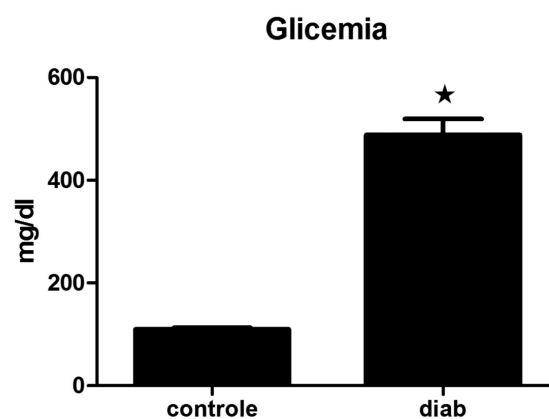


Figura 1: Gráfico da Glicemia basal dez dias após a injeção de aloxana nos ratos diabéticos e injeção de salina nos ratos controle. Os dados representam a média \pm EPM, n=5 (teste t-Student não pareado, $\star p < 0,0001$ vs. controle).

Nesse tipo de diabetes, a destruição das células beta pancreáticas promove ausência completa da secreção de insulina, o que resulta em hiperglicemia crônica¹¹, impedindo a captação de glicose pelos tecidos dependentes desse hormônio, aumentando a degradação e reduzindo a síntese de proteínas, e levando à perda do peso corporal¹².

O aumento do extravasamento de azul de Evans, encontrado no grupo lesão no protocolo de 12 horas, é resultado das mudanças vasculares que ocorrem quando há algum tipo de injúria tissular aguda (Figura 2). Nessas condições, ocorrem alterações do fluxo vascular, calibre e também na permeabilidade dos vasos sanguíneos. A quantidade de albumina que extravasa para os tecidos não é significativa em condições fisiológicas normais; no entanto, o extravasamento é importante na vigência de processo inflamatório¹³.

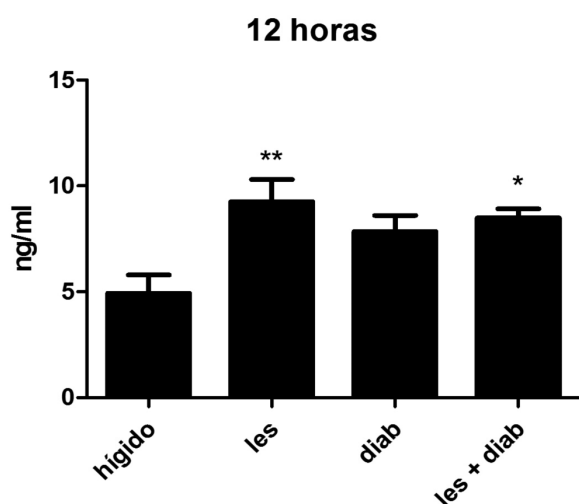


Figura 2: Gráfico do extravasamento plasmático do azul de Evans no músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média \pm EPM, n=5 (ANOVA seguida do teste Tukey, * $p < 0,05$ vs. hígido, ** $p < 0,01$ vs. hígido).

As alterações de permeabilidade vascular normalmente ocorrem devido à liberação inicial de substâncias, tais como histamina, serotonina e bradicinina que, além de causar dilatação arteriolar, tem como ação principal a indução do aumento de permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de macromoléculas proteicas do plasma para o interstício. A atividade edematogênica dos mediadores citados anteriormente pode ser potencializada pela ação concomitante de prostaglandinas vasodilatadoras¹⁴.

Neste estudo, os resultados demonstram um aumento na expressão de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , e IL-10 nos grupos lesão, diabético e lesão + diabético no protocolo de 12 horas, como mostram as Figuras 3 a 6.

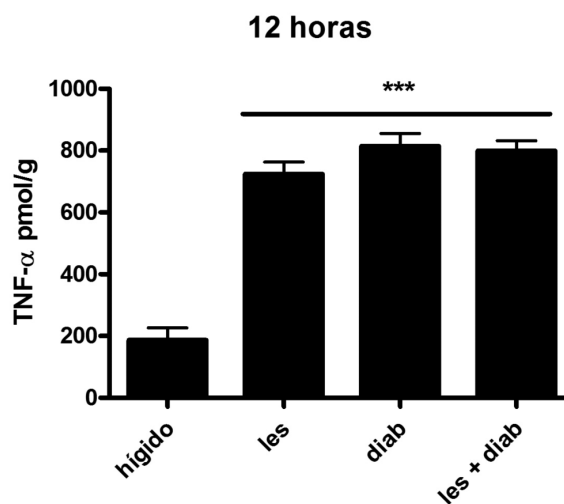


Figura 3: Gráfico dos níveis de $\text{TNF-}\alpha$ em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média \pm EPM, n=5 (ANOVA seguida do teste Tukey, *** $p < 0,001$ vs. hígido).

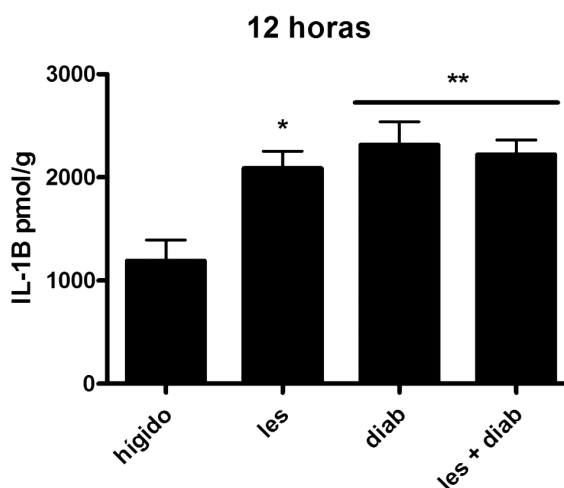


Figura 4: Gráfico dos níveis de $\text{IL-1}\beta$ em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média \pm EPM, n=5 (ANOVA seguida do teste Tukey, * $p < 0,05$ vs. hígido, ** $p < 0,01$ vs. hígido).

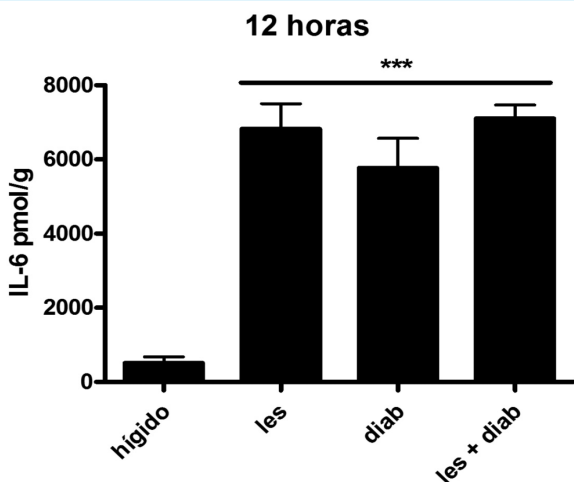


Figura 5: Gráfico dos níveis de IL-6 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média \pm EPM, n=5 (ANOVA seguido do teste Tukey, ***p<0,001 vs. hígido).

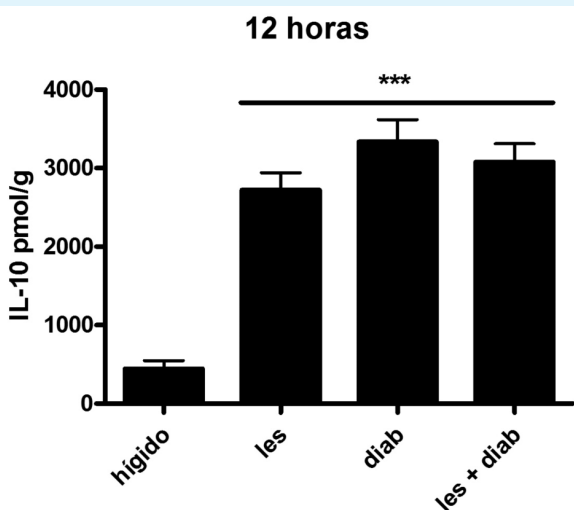


Figura 6: Gráfico dos níveis de IL-10 em músculo tibial anterior de ratos Wistar após 12 horas do protocolo de alongamento passivo. Os dados representam a média \pm EPM, n=5 (ANOVA seguida do teste Tukey, ***p<0,001 vs. hígido).

O início da resolução de uma lesão foi previamente definido como o momento seguinte ao dano, em que o número de neutrófilos na região afetada começa a diminuir⁹. No entanto, a resolução de lesões musculares é multifacetada e

envolve vários processos que incluem três fases principais: a resolução da inflamação, angiogênese e reparação do tecido muscular em si¹⁵. A resposta inicial a uma lesão muscular inclui a liberação de diversas substâncias pró-inflamatórias. Fatores quimiotáticos estimulam a infiltração de neutrófilos, incluindo prostaglandinas, TNF- α e as interleucinas IL-1 β e IL-6. O aumento no número de macrófagos presentes no tecido muscular lesionado, cerca de 2 dias após a lesão, coincide com o declínio do número de neutrófilos¹⁶. Entretanto, existe uma série de inibidores biológicos de citocinas inflamatórias, como, por exemplo, IL-10, que contribui para o término da resposta inflamatória¹⁷.

Bunn et al.¹⁸ realizaram um estudo analisando o comportamento das citocinas utilizando como modelo experimental a lesão musculoesquelética por queda de massa. No grupo exposto a uma contusão leve (queda de 130 milímetros de uma massa de 100 g), o nível de IL-1 β e TNF- α teve pico no músculo em quatro dias após a lesão. Nessa mesma contusão, o nível de IL-6 permaneceu inalterado em todos os instantes. No grupo exposto a uma contusão grave (queda de 130 milímetros de uma massa de 200 g) os níveis de IL-1 β e de TNF- α aumentaram de forma mais gradual e contínua até o oitavo dia pós-lesão. A expressão de IL-6 foi relativamente alta em dois dias após a contusão grave, diminuindo no quarto dia e, em seguida, aumentou novamente no oitavo dia pós-lesão.

Ainda em relação às citocinas, existem evidências de que o TNF- α possui um papel fisiológico na regeneração do músculo lesionado. A inibição de sua atividade durante o processo de cicatrização resulta em déficit na recuperação da força muscular¹⁹. Assim como o TNF- α , a IL-6 também tem o potencial de ativar a proliferação de células miogênicas, como as satélite. Uma mesma substância pode ter diferentes funções quando secretadas por macrófagos ou por neutrófilos. Isso se deve às diferenças na disponibilidade de fatores promotores ou inibidores. A prova de tais interações é uma mesma citocina, por exemplo IL-6, possuir funções opostas em

diferentes momentos durante a resposta à lesão. IL-6 é uma citocina pró e anti-inflamatória que regula uma variedade de funções celulares²⁰.

Coletivamente, esses achados mostram que o papel e a maneira como as citocinas se apresentam, pode diferir dependendo do local, gravidade, tipo e estágio da lesão muscular.

Um estudo realizado por Devaraj et al.²¹ constatou níveis elevados de IL-6 em indivíduos diabéticos tipo 1. Nesse mesmo trabalho, os monócitos ativados expressaram níveis elevados de IL-1 β quando comparados aos indivíduos controle. Já Ohno et al.²² (1993) relataram em sua pesquisa uma menor expressão de IL-1 β e IL-6 nos pacientes diabéticos tipo 1, comparados aos de tipo 2 e aos indivíduos saudáveis, além disso, não houve diferença na expressão de TNF- α no sangue periférico de pacientes com diabetes tipo 1 em relação aos controles saudáveis. Entretanto, Hussain et al.²³ relataram aumento na expressão de TNF- α em pacientes diabéticos tipo 1.

Em um trabalho no qual foi realizada a infusão de glicose, aumentando agudamente seu nível no plasma e também o bloqueio da secreção de insulina endógena por ocreotide (uma substância que mimetiza a ação da somatostatina endógena, a qual inibe a secreção de insulina e também de glucagon), detectou-se aumento das citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α em voluntários saudáveis. Pacientes hiperglicêmicos internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) também apresentaram níveis elevados de IL-6 e IL-10. Além disso, a glicose induz um aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) e reduz a disponibilidade de óxido nítrico, e, conseqüentemente, criam um ambiente de estresse oxidativo, inflamação, constrição vascular e hiperagregabilidade plaquetária. Esse círculo vicioso é propagado diminuindo a liberação de insulina por células beta e bloqueando a resposta inflamatória³.

A hiperglicemia também tem efeitos específicos sobre a defesa do hospedeiro. A curto prazo ela afeta todos os principais componentes da resposta imune inata. A atividade de neutrófilos é reduzida, levando a quimiotaxia diminu-

ída, a diminuição da fagocitose, da morte bacteriana e do excesso de radicais. Além de mudanças na função celular, outros componentes da resposta imune inata contribuem para o estado pró-inflamatório na hiperglicemia. *In vitro*, os monócitos humanos mostram um aumento na expressão de TNF- α e IL-6 dependente da glicose. Então, apesar de a hiperglicemia ser globalmente pró-inflamatória, ela tem efeitos específicos que bloqueiam o sistema imune inato³. Isso provavelmente contribuiu para os resultados encontrados neste estudo em relação aos animais diabéticos, em que o protocolo de lesão muscular por estiramento não provocou aumento na expressão de citocinas no grupo lesão + diabético, quando comparado ao grupo diabético (Figura 7).

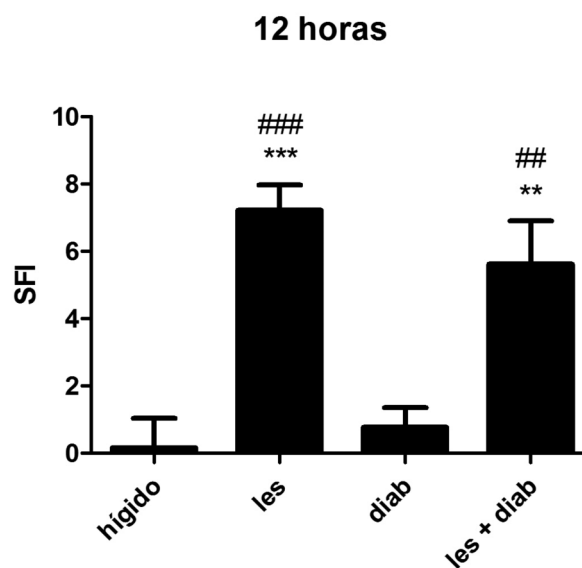


Figura 7: Gráfico comparativo entre as diferenças das médias do índice funcional obtido no teste *walking track*. Os dados representam a média \pm EPM, n=5 (ANOVA seguida do teste Tukey, ***p<0,001 vs. hígido, **p<0,01 vs. hígido, ###p<0,001 vs. diabético e ##p<0,01 vs. diabético).

No estudo aqui apresentado, avaliou-se a função motora. A lesão muscular frequentemente produz déficits motores que são observados durante a locomoção. Esses déficits tornaram-se nítidos neste protocolo de 12 horas pós a indu-

ção da lesão. No protocolo de 12 horas, os dois grupos (lesão e lesão+diabético) que sofreram o estiramento muscular passivo, demonstraram uma perda da função motora com consequente alteração no padrão de marcha, retratada pela transferência de peso para o lado não lesionado do animal, retratando provavelmente a persistência de dor, produzida por uma variedade de agentes pró-inflamatórios²⁴.

Sabe-se que no diabetes *mellitus* ocorre retardo da resposta inflamatória, reduzida formação do tecido de granulação e conseqüente prejuízo na cicatrização²⁵.

Conclusão

Os resultados demonstram que o diabetes *mellitus* é um estado pró-inflamatório, com persistente expressão de citocinas e agentes quimiotáticos. A lesão por estiramento controlado no músculo tibial anterior de ratos induziu uma resposta imune reduzida no animal diabético e um déficit na função motora.

Referências

1. Porth CM. Pathophysiology concepts of altered health states. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
2. Dandona P, Chaudhuri A, Ghanim H, Mohanty P. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effect of insulin: relevance to cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2007;99(4A):15B-26B.
3. Collier B, Dossett LA, May AK, Diaz JJ. Glucose control and the inflammatory response. *Nutr Clin Pract*. 2008;23(1):3-15.
4. Andersen H. Muscular endurance in long-term IDDM patients. *Diabetes Care*. 1998;21(4):604-9.
5. Andersen H, Gadeberg PC, Brock B, Jakobsen J. Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. *Diabetologia*. 1997;40(9):1062-9.
6. Armstrong RB, Phelps RO. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am J Anat*. 1984;171(3):259-72.
7. Albright A, Franz M, Hornsby G, Kriska A, Marrero D, Ullrich I, Verity LS. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and type 2 diabetes. *Med Sci Sports Exerc*. 2000;32(7):1345-60.
8. Kirkendall DT, Garrett WE Jr. Clinical perspectives regarding eccentric muscle injury. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(403 Suppl):S81-9.
9. Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 2005;33(5):745-64.
10. Spadella CT, Suarez OA, Lucchesi AN, Marques SF, Cataneo AJ. Effects of pancreas transplantation on oxidative stress in pulmonary tissue from alloxan-induced diabetic rats. *Transplant Proc*. 2010;42(6):2087-91.
11. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813-21.
12. Smith OL, Wong CY, Gelfand RA. Skeletal muscle proteolysis in rats with acute streptozocin-induced diabetes. *Diabetes*. 1989;38(9):1117-22.
13. Yasuda S, Ikuta K, Uwatoku T, Oi K, Abe K, Hyodo F et al. In vivo magnetic resonance imaging of atherosclerotic lesions with a newly developed Evans blue-DTPA-gadolinium contrast medium in apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res*. 2008;45(2):123-8.
14. Rákos G, Kis Z, Nagy D, Lür G, Farkas T, Hortobágyi T, Vécsei L, Toldi J. Evans Blue fluorescence permits the rapid visualization of non-intact cells in the perilesional rim of cold-injured rat brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2007;67(2):149-54.
15. Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med*. 2008;38(11):947-69.
16. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(2):R345-53.
17. Pedersen BK, Ostrowski K, Rohde T, Bruunsgaard H. The cytokine response to strenuous exercise. *Can J Physiol Pharmacol*. 1998;76(5):505-11.

18. Bunn JR, Canning J, Burke G, Mushipe M, Marsh DR, Li G. Production of consistent crush lesions in murine quadriceps muscle--a biomechanical, histomorphological and immunohistochemical study. *J Orthop Res.* 2004;22(6):1336-44.
19. Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, Simeonova PP. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J.* 2002;16(12):1630-2.
20. Cavaillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001;47(4):695-702.
21. Devaraj S, Glaser N, Griffen S, Wang-Polagruto J, Miguelino E, Jialal I. Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006;55(3):774-9.
22. Ohno Y, Aoki N, Nishimura A. In vitro production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(4):1072-7.
23. Hussain MJ, Maher J, Warnock T, Vats A, Peakman M, Vergani D. Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia.* 1998;41(3):343-9.
24. Scott A, Khan KM, Roberts CR, Cook JL, Duronio V. What do we mean by the term "inflammation"? A contemporary basic science update for sports medicine. *Br J Sports Med.* 2004;38(3):372-80.
25. Liu R, Desta T, He H, Graves DT. Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology.* 2004;145(6):2997-3003.

