

O Efeito do Alho e de Exercícios Físicos Voluntários na Angiogênese Cardíaca no Diabetes: O Papel do miRNA-126 e do miRNA-210

The Effect of Garlic and Voluntary Exercise on Cardiac Angiogenesis in Diabetes: The Role of MiR-126 and MiR-210

Roya Naderi,^{1,2} Gisou Mohaddes,³ Mustafa Mohammadi,⁴ Alireza Alihemmati,⁵ Amirmahdi Khamaneh,⁶ Rafighe Ghyasi,⁴ Rana Ghaznavi⁷

Nephrology and Kidney Transplant Research Center - Urmia University of Medical Sciences,¹ Urmia - Iran

Department of Physiology, faculty of Medicine - Urmia University of Medical Sciences,² Urmia - Iran

Neuroscience Research Centre of Tabriz University of Medical Sciences,³ Tabriz - Iran

Drug Applied Research Center of Tabriz University of Medical Sciences,⁴ Tabriz - Iran

Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences,⁵ Tabriz - Iran

School of advanced medical sciences - Tabriz University of Medical Sciences,⁶ Tabriz - Iran

Sports medicine research center, Neuroscience institute - Tehran University of Medical Sciences,⁷ Tehran - Iran

Resumo

Fundamento: O diabetes mellitus (DM) é um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, levando à disfunção endotelial e inibição da angiogênese. O miRNA-126 e o miRNA-210 promovem a resposta angiogênica em células endoteliais.

Objetivo: O presente estudo buscou explorar o efeito do alho e de exercícios físicos voluntários, isoladamente ou em conjunto, nas expressões do miRNA-126 e do miR-210 e na angiogênese cardíaca em ratos com diabetes tipo 1.

Métodos: Ratos Wistar machos foram divididos em cinco grupos (n = 7): Controle, Diabetes, Diabetes+Alho, Diabetes+Exercícios e Diabetes+Alho+Exercícios. Introduziu-se diabetes nos animais por estreptozotocina (ip, 50 mg/kg). Os ratos foram então alimentados com homogenato de alho fresco cru (250 mg/kg), ou foram submetidos a exercícios voluntários, ou a uma combinação de alho e exercícios voluntários, durante 6 semanas. As expressões do miRNA-126 e do miRNA-210 no miocárdio foram determinadas por PCR em tempo real, e o perfil lipídico sérico foi medido por kits enzimáticos. A angiogênese foi avaliada por imunocoloração por PECAM-1/CD31 no miocárdio

Resultados: O diabetes reduziu a expressão do miRNA-126 cardíaco e da angiogênese (p < 0,05). Por outro lado, houve um aumento da expressão do miRNA-210 no miocárdio dos animais diabéticos (p < 0,001). No entanto, tais efeitos foram revertidos com alho ou exercícios voluntários (p < 0,01). Além disso, o tratamento de ratos diabéticos conjuntamente com alho e exercícios voluntários teve um efeito adicional sobre as expressões do miRNA-126 e do miRNA-210 (p < 0,001). Além disso, tanto os exercícios voluntários quanto o alho melhoraram significativamente os perfis lipídicos séricos (p < 0,001).

Conclusões: A indução de diabetes diminuiu a angiogênese no miocárdio, enquanto nosso tratamento com exercícios voluntários de longa duração e alho melhorou a angiogênese miocárdica. Estas alterações devem-se, possivelmente, ao aumento das expressões do miRNA-126 e do miRNA no miocárdio. (Arq Bras Cardiol. 2019; 112(2):154-162)

Palavras-chave: Ratos; Alho; Allium Sativum; Exercício; Diabetes Mellitus; microRNAs; Indutores da Angiogênese; Neovascularização Fisiológica.

Abstract

Background: Diabetes mellitus (DM) is one of the major risk factors for cardiovascular disease, leading to endothelial dysfunction and angiogenesis impairment. MiR-126 and miR-210 support angiogenic response in endothelial cells.

Objective: The present study sought to explore the effect of garlic and voluntary exercise, alone or together, on miR-126 and miR-210 expressions and cardiac angiogenesis in rats with type 1 diabetes.

Methods: Male Wistar rats were divided into five groups (n = 7): Control, Diabetes, Diabetes+Garlic, Diabetes+Exercise, and Diabetes+Garlic+Exercise. Diabetes was induced in the animals by streptozotocin (ip, 50 mg/kg). The rats were then fed raw fresh garlic homogenate (250 mg/kg) or were subjected to voluntary exercise, or to combined garlic and voluntary exercise for 6 weeks. MiR-126 and miR-210 expressions in the myocardium were determined by real time PCR, and the serum lipid profile was measured by enzymatic kits. Angiogenesis was evaluated by immunostaining for PECAM-1/ CD31 in the myocardium.

Results: Diabetes reduced both cardiac miR-126 expression and angiogenesis (p < 0.05). On the other hand, there was a miR-210 expression increase in the myocardium of diabetic animals (p < 0.001). However, those effects reversed either with garlic or voluntary exercise (p < 0.01). Moreover, treating diabetic rats with garlic and voluntary exercise combined had an additional effect on the expressions of miR-126 and miR-210 (p < 0.001). Furthermore, both voluntary exercise and garlic significantly improved serum lipid profiles (p < 0.001).

Conclusion: The induction of diabetes decreased angiogenesis in the myocardium, whereas our treatment using long-term voluntary exercise and garlic improved myocardial angiogenesis. These changes were possibly owing to the enhancement of myocardial miR-126 and miR-210 expressions. (Arq Bras Cardiol. 2019; 112(2):154-162)

Keywords: Rats; Garlic; Allium Sativum; Exercise; Diabetes Mellitus; microRNAs; Angiogenesis Inducing Agents; Neovascularization; Physiologic. Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Mustafa Mohammadi •

Drug Applied Research Center of Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz - Iran

E-mail: m.mohammadin@yahoo.com

Artigo recebido em 05/02/2018, revisado em 02/08/2018, aceito em 02/08/2018

DOI: 10.5935/abc.20190002

Introdução

O diabetes mellitus (DM) é um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, levando à disfunção endotelial e à inibição da angiogênese.¹ A tendência atual em pesquisas e cuidados médicos concentra-se em fornecer terapias eficazes, com poucos efeitos colaterais e baixa toxicidade, capazes de ser usadas regularmente para o controle das complicações do diabetes.²

O exercício físico é uma poderosa estratégia terapêutica para melhorar a saúde cardiovascular em geral.³ No entanto, exercícios exaustivos podem ser problemáticos, uma vez que podem causar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).⁴ Portanto, exercícios voluntários, em que o animal tem livre acesso a uma roda de corrida, podem ser um modelo com efeitos mais positivos.⁵ Há evidências de que o treinamento aeróbico pode promover a angiogênese cardíaca,^{6,7} na qual o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) desempenha um papel crítico.⁵ Entretanto, os mecanismos subjacentes ao exercício físico ainda não foram completamente elucidados.

Uma das plantas mais tradicionais da fitoterapia é o *Allium sativum L*, sobre o qual já se tem relatado que possui efeitos benéficos para a saúde. É utilizado como agente terapêutico em vários distúrbios, como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes, por meio de diferentes mecanismos, incluindo a inibição ou a estimulação da angiogênese.^{2,8,9} Considerando os efeitos do alho na proteção contra as doenças cardiovasculares, bem como a seus efeitos sobre a angiogênese em diferentes tecidos, é interessante examinar os efeitos do alho sobre a angiogênese miocárdica e os mecanismos a ela relacionados.

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificadores que funcionam no silenciamento do RNA e na regulação pós-transcricional da expressão gênica.¹⁰ Os miRNAs são mediadores intracelulares essenciais em muitos processos, como a inflamação, o metabolismo mitocondrial, a apoptose e a angiogênese, que podem ser ajustados por meio de exercícios.¹¹ Portanto, os miRNAs podem ser clinicamente úteis no tratamento de vários distúrbios. Além disso, os miRNAs são liberados na urina e na corrente sanguínea após a ocorrência de lesão tecidual, tornando-se biomarcadores úteis à detecção precoce, diagnóstico e prognóstico de distúrbios. Recentemente, descobriu-se que essas moléculas estão envolvidas em doenças cardiovasculares.¹² Isso inclui uma expressão elevada de miRNA-126 no endotélio cardíaco, bem como seu envolvimento na angiogênese.^{12,13} Os níveis circulantes de miRNA-126 encontram-se reduzidos no diabetes,^{14,15} sugerindo que sua deficiência pode prejudicar a vascularização.¹⁶ Além disso, segundo Fasanaro et al.,¹⁷ o miRNA-210 induzido por hipóxia contribui para a resposta angiogênica em células endoteliais, e que seu bloqueio por transfeção de anti-miRNAs inibe a formação de estruturas semelhantes a capilares.¹⁷

É bem sabido que muitas complicações do diabetes estão associadas a distúrbios lipídicos. De fato, a dislipidemia prejudica vários órgãos e é reconhecida como um importante fator de muitas complicações diabéticas, incluindo anormalidades vasculares.¹⁸

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito dos exercícios voluntários e do tratamento com alho, isolados

ou conjuntamente, sobre as expressões do miRNA-126 e miRNA-210, sobre o perfil lipídico sérico, e também sua relação com a angiogênese cardíaca no diabetes.

Métodos

Os animais e o desenho experimental

O Comitê de Ética em Experimentação Animal aprovou o plano de estudo, e todos os experimentos foram conduzidos de acordo com o National Institute of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Ratos Wistar machos (200 - 250 g) foram fornecidos pela colônia da nossa universidade. Todos os animais foram alojados em uma instalação com temperatura controlada (21-23°C), mantida em ciclo claro-escuro de 12:12h, com alimento e água disponíveis *ad libitum*.

Neste estudo, trinta e cinco ratos machos foram divididos em cinco grupos (n = 7): Controle, Diabetes, Diabetes+Alho, Diabetes+Exercícios e Diabetes+Alho+Exercícios. Os animais de controle receberam 0,4 mL de tampão de citrato de sódio, pH 4,5. O diabetes foi induzido utilizando-se uma dose intraperitoneal única (50 mg/kg) de Estreptozotocina (Sigma, St. Louis, Mo, EUA). O nível de glicose no sangue foi medido 72 horas depois, utilizando um glicosímetro (Elegance, Modelo No. CT-X10 Alemanha), e o diabetes induzido era identificado se o nível de glicose no sangue fosse > 300 mg/dL (16,67 mmol/L).

Neste estudo, o tamanho da amostra foi determinado com base em nossos estudos prévios similares.^{8,19}

Exercícios voluntários

Os ratos dos grupos de exercício voluntário foram alojados individualmente em gaiolas contendo rodas de corrida de aço inoxidável (1,00m de circunferência, TajhizGostar) e tiveram livre acesso à roda 24h por dia, durante 6 semanas. A distância de corrida foi monitorada diariamente. Se a distância de corrida fosse inferior a 2.000 m/dia, o animal era excluído do estudo. Ratos sedentários foram alojados em gaiolas-padrão, sem rodas de corrida, durante o mesmo período.

O preparo do homogenato de alho

Cabeças de alho (*Allium sativum*) foram compradas em um mercado local. Os dentes foram descascados, fatiados, moídos e depois dissolvidos em água destilada. O homogenato de alho foi preparado todos os dias.

Amostragem

No final da 6a semana, os ratos foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (35 mg/kg, i.p.), foram coletadas amostras de sangue da veia cava inferior para a medição do perfil lipídico.

Em seguida, o coração foi rapidamente removido através de toracotomia mediana, e o ventrículo esquerdo foi excisado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em congelamento (-70°C) para medições posteriores. O miocárdio foi utilizado para extração de miRNA, estudo de PCR em tempo real e determinação da angiogênese.

Extração do miRNA e PCR em tempo real

O miRNA foi extraído do miocárdio utilizando-se um kit de isolamento miRCURYTM RNA (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) conforme o protocolo do fabricante.^{20,21} O procedimento foi realizado com base em coluna de spin, utilizando-se uma resina proprietária como matriz para separar o RNA de outros componentes celulares. O conteúdo e a pureza do RNA foram medidos com o espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo scientific, Wilmington, DE 19810 EUA). O perfil de expressão do miRNA-126 foi obtido para os extratos de RNA total utilizando-se um kit universal de síntese de cDNA. Resumidamente, o RNA total contendo microRNA foi poliadenilado, e o cDNA foi sintetizado utilizando-se um iniciador poli(T) com uma âncora 3' degenerada e um marcador universal 5' (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca). Cada cDNA foi utilizado como matriz para PCR quantitativo em tempo real de microRNA, utilizando-se a mistura principal SYBR Green (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca). Os conjuntos de iniciadores diretos e reversos de ácido nucléico bloqueado (LNA) (Exiqon, Vedbaek, Dinamarca) para microRNA estão listados na Tabela 1. As reações de PCR em tempo real foram realizadas com um sistema de detecção Bio-Rad iQ5 (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA). A quantidade de produtos de PCR foi normalizada com rno-miRNA-191 para o miRNA-126 e o miRNA-210.³⁷ Utilizamos o método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ para determinar os níveis quantitativos relativos de miRNA-126 e miRNA-210. Os resultados foram expressos como diferença (razão) em relação aos controles relevantes.

Imunocoloração para PECAM-1/CD31

Para investigar a angiogênese no miocárdio, secções transversais dos ventrículos, realizadas em sua porção intermediária, foram imediatamente isoladas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10%, desidratadas em graus ascendentes de álcool e embebidas em parafina. Em seguida, cortes seriais de 3µm de espessura foram cortados e flutuados em lâminas de vidro carregadas conforme o processamento histológico padrão. Os pedaços de tecido foram desparafinados em xileno e desidratados em uma série graduada de etanol. As lâminas foram incubadas sequencialmente em proteinase K e 0,3% de peróxido de hidrogênio, para bloquear a atividade da peroxidase endógena. As secções foram cobertas pelo anticorpo primário CD31 (Santa Cruz, EUA) – um marcador de angiogênese – e incubadas a +4 °C durante a noite. Depois, as secções foram lavadas e incubadas com complexo avidina-biotina padrão (ABC; Santa Cruz) conforme o protocolo. Em seguida, as lâminas foram incubadas em DAB (Diamino-benzidina, Santa Cruz) como cromato, e contra-coradas com a hematoxilina de Mayer. Finalmente, as secções foram limpas em xileno, montadas com Entellan e analisadas com um microscópio de luz.

Avaliação de imunocoloração

Para avaliar a imunocoloração, 3 a 5 secções de 1 mm² foram selecionadas aleatoriamente em uma ampliação de 400×, dependendo do tamanho da secção da amostra. Tanto a intensidade da coloração quanto o número de células positivas foram avaliados semi-quantitativamente. A classificação da intensidade de coloração do CD31 foi obtida dentro de cada área, em uma ampliação de 400x. Cada aglomerado de células endoteliais com CD31 expressando imunorreatividade, bem como lúmen ou vasos em formação, foram contados como microvasos individuais. Estruturas vasculares positivas para CD31 foram contadas para 5 a 6 lâminas por animal e 10 campos por lâmina.

Para avaliar a imunocoloração, utilizou-se o tecido de granulação como controle positivo, e a intensidade da coloração foi classificada da seguinte forma: 0 (< 10%); 1 (10% a 25%); 2 (25% a 50%); 3 (50% a 75%) ou 4 (75% a 100%).²²

Medição do perfil lipídico

Amostras de sangue foram obtidas da veia cava inferior, centrifugadas a 3500 rpm, por 10 minutos, a 4°C, e o soro foi coletado. O nível sérico de triglicerídeos foi determinado por kits enzimáticos (ZiestChem Diagnostic kits, Irã), utilizando-se o glicerol como padrão. Adicionalmente, os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram determinados com base em métodos enzimáticos através de kits de diagnóstico, (ZiestChem, Irã) utilizando-se o colesterol como padrão.

Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média ± EPM para sete animais, e as análises foram realizadas com o software estatístico SPSS, versão 16. Todos os parâmetros foram testados para normalidade usando o teste de Kolmogorov-Smirnov de uma amostra. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do teste de Tukey. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

Resultados

Efeitos do alho e dos exercícios voluntário sobre o miRNA-126 no miocárdio

Como mostrado na Figura 1, o nível de expressão do miRNA-126 no miocárdio foi significativamente mais baixo ($p < 0,05$) em ratos com diabetes do que no grupo controle. O tratamento com alho ($p < 0,001$), exercício voluntário ($p < 0,01$), ou ambos em conjunto aumentaram

Tabela 1 – Lista de seqüências-alvo para os miRNAs

Nome do gene	Número de acesso	Seqüência-alvo*
rno-miRNA-191	MIMAT0000440	CAACGGAUCCCAAAGCAGCUG
hsa-miRNA-126	MIMAT0002957	UCGUACCGUGAGUAAUUAUGC
dme-miRNA- 210	MIMAT0001233	UUGUGCGUGUGACAGCGGCUA

*As seqüências foram obtidas no miRNABase (www.mirbase.org).

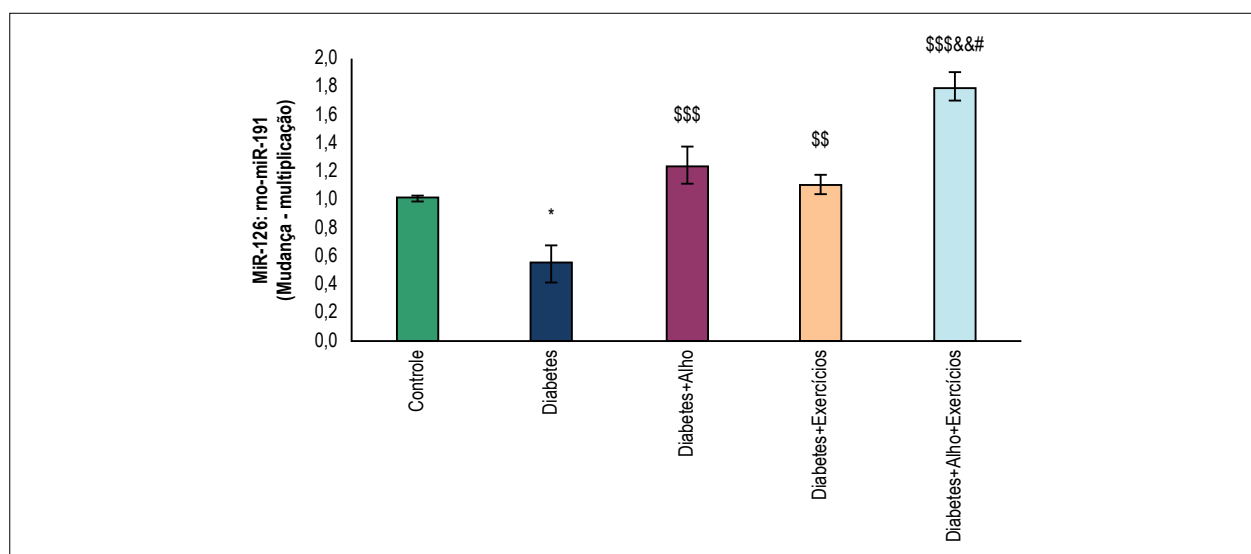


Figura 1 – Análise de PCR quantitativo em tempo real de miRNA-126 no tecido cardíaco dos grupos experimentais. Os valores representam médias \pm S.E.M para 7 animais. * $p < 0,05$ vs. grupo controle, $^{**}p < 0,01$ e $^{***}p < 0,001$ vs. grupo diabetes, $^{**}p < 0,01$ vs. grupo Diabetes+Exercícios, e $^{*}p < 0,05$ vs. grupo Diabetes+Alho.

significativamente ($p < 0,001$) a expressão do miRNA-126 no miocárdio em ratos diabéticos em comparação com o grupo diabético. Além disso, o grupo Diabetes+Alho+Exercícios apresentou um nível significativamente maior de expressão de miRNA-126 em comparação com o grupo apenas de tratamento de alho ($p < 0,05$) e o grupo apenas de exercícios voluntários ($p < 0,01$) em animais diabéticos.

Efeitos do alho e dos exercícios voluntário sobre o miRNA-210 no miocárdio

Como mostrado na Figura 2, a expressão do miRNA-210 aumentou significativamente ($p < 0,001$) em animais com diabetes, em comparação com o grupo controle. O tratamento com alho ($p < 0,01$), exercícios voluntários ($p < 0,01$) ou ambos combinados reduziram significativamente ($p < 0,001$) a expressão do miRNA-210 no miocárdio em ratos diabéticos, em comparação com o grupo diabético. O grupo combinado Alho+Exercícios reduziu significativamente a expressão do miRNA-210 em comparação com os grupos Diabetes+Exercícios ($p < 0,05$) e Diabetes+Alho ($p < 0,01$).

Efeitos do alho e dos exercícios voluntário sobre a angiogênese no miocárdio

Realizou-se a imunocoloração com o marcador CD31 para a avaliação da angiogênese na secção transversal da porção média dos ventrículos. Os tecidos corados em marrom mostram células endoteliais imunocoradas pelo CD-31. Na Figura 4, os graus de intensidade de coloração são classificados da seguinte forma: 0 (<10%); 1 (10% a 25%); 2 (25% a 50%); 3 (50% a 75%) ou 4 (75% a 100%). Conforme mostrado nas Figuras 3 e 4, a análise estatística de nosso estudo imuno-histoquímico revelou que a angiogênese diminuiu significativamente ($p < 0,01$) no grupo diabético em comparação com grupo controle. Seis semanas de tratamento com alho, com exercícios voluntários ou com

ambos em conjunto nos grupos com diabetes aumentaram significativamente ($p < 0,001$) a angiogênese no ventrículo esquerdo, em comparação com o grupo com diabetes (Figuras 3 e 4). A combinação de consumo de alho e exercício em animais diabéticos induziu mais angiogênese em comparação com apenas alho e apenas exercícios, embora a diferença não fosse significativa.

Efeitos do alho e dos exercícios voluntário sobre o perfil de lipídio sérico

As alterações no perfil lipídico dos diferentes grupos são mostradas na Tabela 2. A indução do diabetes nos animais aumentou significativamente ($p < 0,001$) os níveis séricos de TGs e LDL, enquanto houve redução nos níveis séricos de HDL e HDL/LDL em comparação com os animais controle. Exercícios voluntários reduziram significativamente ($p < 0,05$) os níveis séricos de triglicérides no grupo diabético, em comparação com o grupo controle. Seis semanas de tratamento com apenas alho ou apenas exercícios voluntários diminuíram significativamente ($p < 0,01$) os níveis de triglicérides nos animais com diabetes. Nestes, os níveis de LDL no soro diminuíram significativamente ($p < 0,001$) após somente alho e somente exercícios ou uma combinação dos ambos. No entanto, o nível sérico de HDL foi significativamente aumentado ($p < 0,001$) pelo tratamento com alho, exercícios voluntários ou a combinação de ambos em ratos diabéticos. Além disso, a razão HDL:LDL foi significativamente maior ($p < 0,001$) nos grupos Diabetes+Alho, Diabetes+Exercícios e Diabetes+Alho+Exercícios em comparação com o grupo diabético.

Discussão

O presente estudo mostrou que a indução de diabetes prejudicou o perfil lipídico sérico, diminuiu a angiogênese miocárdica e a expressão do miRNA-126 e aumentou a expressão miocárdica do miRNA-210. No entanto, o tratamento

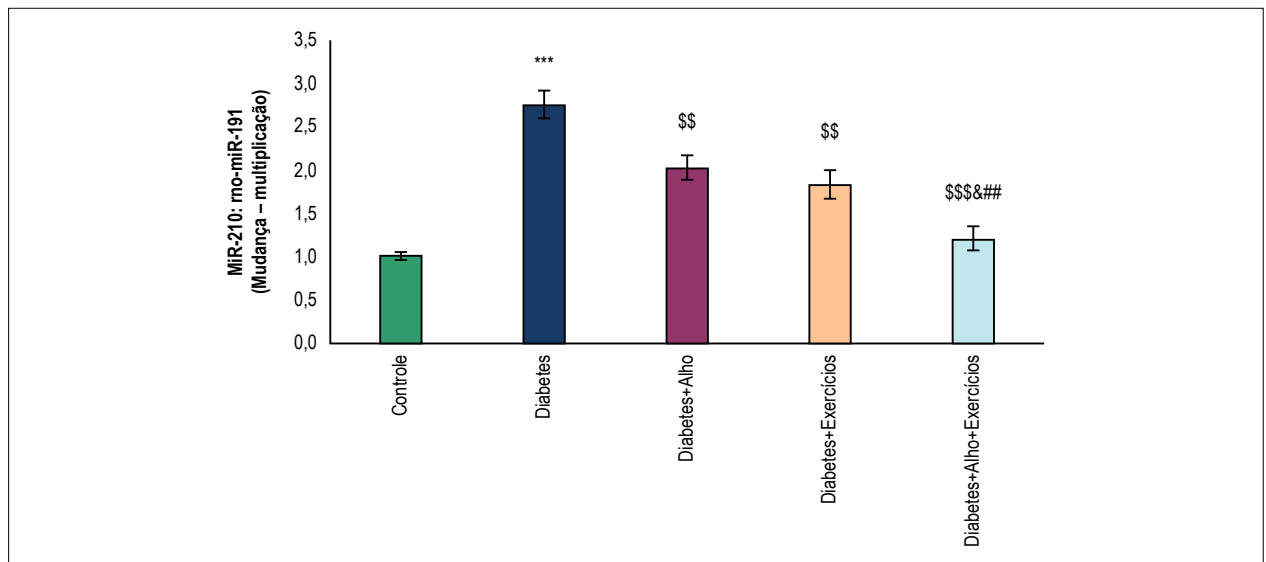


Figura 2 – Análise de PCR quantitativo em tempo real de miRNA-210 no tecido cardíaco dos grupos experimentais. Os valores representam médias \pm S.E.M para 7 animais. *** $p < 0,001$ vs. grupo controle, \$\$ $p < 0,01$ e \$\$\$ $p < 0,001$ vs. grupo diabetes, \$ $p < 0,05$ vs. grupo Diabetes+Exercícios, e ## $p < 0,01$ vs. grupo Diabetes+Alho.

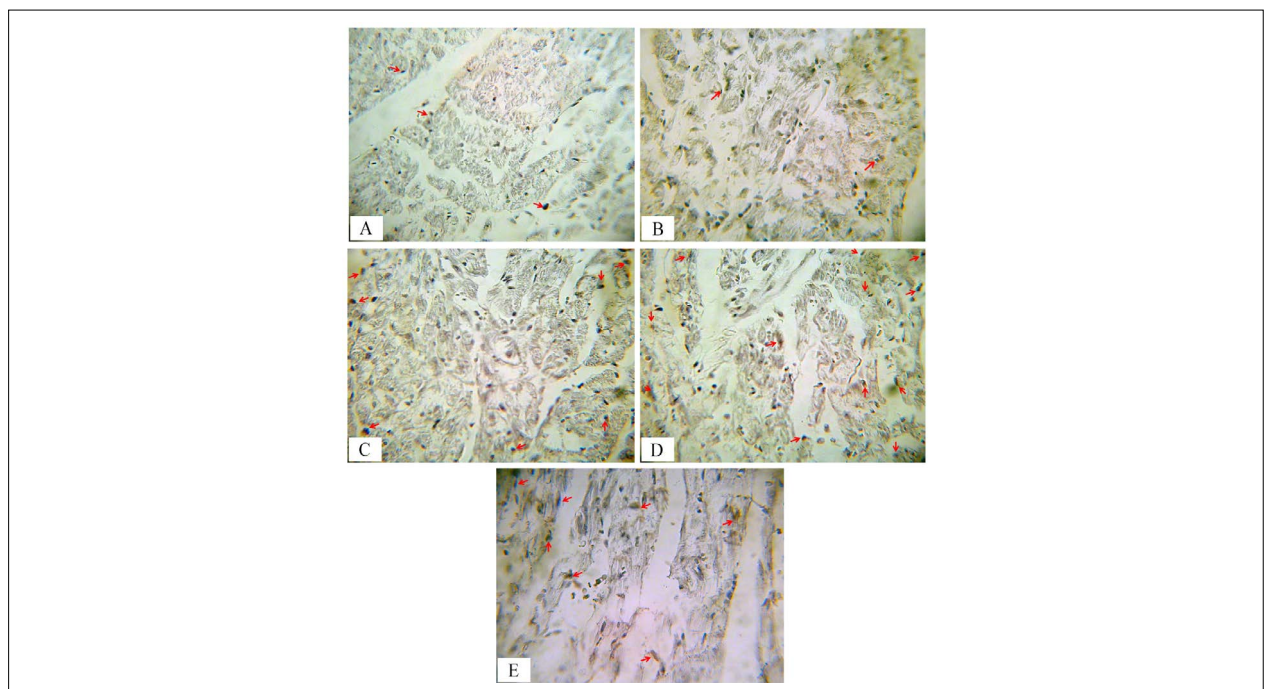


Figura 3 – Detecção imuno-histoquímica de CD31 nos vasos miocárdicos dos diferentes grupos. Tecidos corados em marrom mostram células endoteliais CD-31 imunocoradas em: (A) Controle; (B) Diabetes; (C) Diabetes+Alho; (D) Diabetes+Exercícios; e (E) Diabetes+Alho+Exercícios. A intensidade da imunocoloração para o CD31 (pontas das setas) diminuiu no grupo Diabetes em comparação com o grupo Controle. O tratamento com alho e exercícios, separadamente ou em conjunto, aumentaram a angiogênese no diabetes em comparação com o grupo diabético (a ampliação foi de 400x).

somente com alho, somente com exercícios voluntários ou com ambos em conjunto melhoraram esses efeitos no miocárdio de animais diabéticos. Curiosamente, tratar ratos diabéticos simultaneamente com alho e exercícios voluntários teve um efeito adicional sobre a expressão cardíaca do miRNA-126 e do miRNA-210. Em sintonia com o nosso estudo, pesquisas

têm demonstrado que o diabetes leva a um prejuízo da função das células progenitoras endoteliais precoces, resultando em uma capacidade reduzida de neovascularização e angiogênese no miocárdio de ratos diabéticos.²³ O VEGF, como indutor de angiogênese, é um mitógeno altamente específico para células endoteliais.²⁴ Sabe-se que a expressão do VEGF-A e

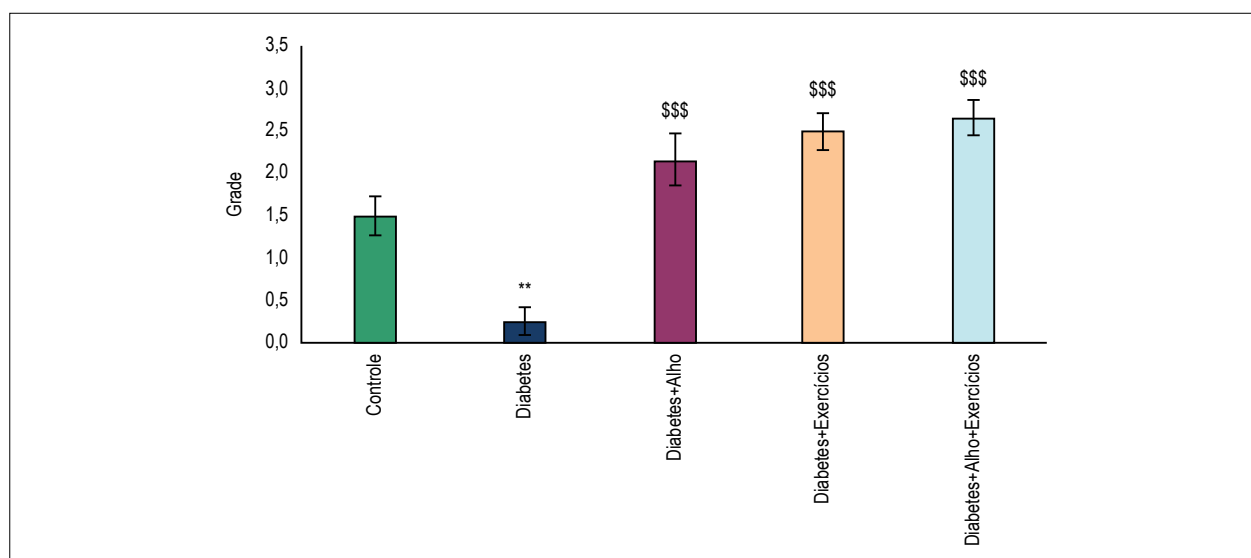


Figura 4 – Efeitos do tratamento com alho e exercícios voluntários na angiogênese em diferentes grupos experimentais. A intensidade da coloração foi classificada como: 0 (< 10%); 1 (10-25%); 2 (25-50%); 3 (50 a 75%); e 4 (75-100%). Os valores representam médias ± S.E.M para 7 animais. ***p* < 0,01 vs. grupo controle e \$\$\$*p* < 0,001 vs. grupo diabetes.

Tabela 2 – Perfis lipídicos séricos nos diferentes grupos após 6 semanas (Média ± SEM, n = 7)

Variante	Controle	Diabetes	Diabetes+ Alho	Diabetes+ Exercícios	Diabetes+Alho +Exercícios
TG (mg/dl)	21,3 ± 2,9	87,8 ± 14,3 ^{***}	42 ± 2,9 ^{SS}	50,1 ± 9,3 ^S	44,8 ± 3,7 ^{SS}
LDL (mg/dl)	41 ± 1,69	48,87 ± 1,21 ^{***}	38,66 ± 0,61 ^{SSS}	39 ± 0,81 ^{SSS}	38,33 ± 0,76 ^{SSS}
HDL (mg/dl)	28,8 ± 1,07	18,25 ± 0,83 ^{***}	28,16 ± 1,22 ^{SSS}	26,66 ± 1,47 ^{SSS}	27 ± 1,46 ^{SSS}
HDL/LDL	0,7 ± 0,03	0,36 ± 0,01 ^{***}	0,72 ± 0,03 ^{SSS}	0,67 ± 0,03 ^{SSS}	0,7 ± 0,04 ^{SSS}

****p* < 0,001 vs. grupo controle e \$\$\$*p* < 0,001 vs. grupo diabetes. TG: triglicerídeos; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade.

de seus receptores diminui no miocárdio de ratos e humanos diabéticos.²⁵ Entretanto, o processo propriamente dito do VEGF e redução de angiogênese no coração diabético ainda não foi totalmente elucidado.

Existe uma variedade de miRNAs no tecido cardíaco, e esses minúsculos reguladores são reconhecidos como novos alvos/medicamentos em vários campos, incluindo a cardiologia.¹² O miRNA-126 é conhecido como um miRNA específico do endotélio, modulador da angiogênese *in vivo*. Vários estudos demonstraram que o miRNA-126 contribui para a homeostase endotelial e a angiogênese,^{12,13,15} a qual é mediada por SPRED1 e PI3K2 na promoção da sinalização do VEGF.¹⁵ Além disso, o miRNA-126 ativa quinases de sobrevivência, tais como a ERK e a Akt, por meio da regulação negativa de seus alvos e pela promoção da ação do VEGF.²⁶ Osipova e colaboradores relataram em seu estudo que os níveis de miRNA-126 na urina encontravam-se reduzidos nos pacientes com diabetes; entretanto, os níveis circulantes de miRNA-126 no plasma não mostraram diferença significativa.¹

Há pouca informação disponível sobre a expressão do miRNA no miocárdio de ratos diabéticos em resposta a exercícios voluntários. Curiosamente, no presente estudo, observamos que o alho, os exercícios voluntários e a combinação

de ambos aumentaram os níveis de expressão do miRNA-126 e a angiogênese no miocárdio. Efeitos cardioprotetores do alho têm sido relatados em alguns estudos relacionados à melhora das atividades antioxidantes,⁸ ativação de AKT/GSK-3β/HIF-1α mediada por AMPK,²⁷ e vias de sinalização Akt-eNOS.²⁸ Além disso, em sintonia com nossos resultados, Silva et al.,⁶ mostraram que exercícios aeróbicos em ratos saudáveis aumentaram a expressão do miRNA-126 no miocárdio, possivelmente relacionada à angiogênese cardíaca induzida por exercícios.⁶ Ademais, estudos demonstraram que exercícios físicos aumentam a angiogênese no coração, tanto em condições saudáveis²⁹ como patológicas,^{5,7} o que destaca o efeito positivo da atividade física como ferramenta não farmacológica no tratamento de doenças cardiovasculares. Considerando-se o aumento da expressão do miRNA-126 após exercícios voluntários, a angiogênese cardíaca possivelmente está relacionada à expressão do miRNA-126 induzida por exercícios e à modulação do VEGF, que regula positivamente vias angiogênicas como o MAPK e PI3K/Akt/eNOS.⁶

Importante miRNA induzido por hipóxia, o miRNA-210 é estimulado após a hipóxia e a ativação do HIF.³⁰ A elevação da expressão do miRNA-210 é evidência de condições hipóxicas no músculo cardíaco, no qual a hipóxia estimula

uma série de respostas fisiológicas, como a angiogênese através da expressão aumentada do miRNA-210 induzida por HIF-1 α .³¹ A expressão positiva do miRNA-210 é um elemento importante da resposta das células endoteliais à hipóxia, o que leva à angiogênese por meio de seu gene-alvo, Efrina-A3.¹⁷ Já foi demonstrado que a regulação positiva do miRNA-210 e do VEGF aumenta a angiogênese do miocárdio no infarto agudo do miocárdio em resposta a Receita de Anoxina Huoxue (HAR).³² Greco et al.,³³ descreveram que, além da hipóxia, a hiperglicemia é outro estimulador que regula positivamente a expressão do miRNA-210, o que se observa no diabetes.³³ Osipova et al.,¹ mostraram que o nível de miRNA-210 encontrava-se elevado no plasma e na urina de crianças diabéticas do tipo 1, bem como nos cardiomiócitos e células endoteliais de pacientes diabéticos.³³ Em sintonia com esses estudos, mostramos que a indução de diabetes aumentou o nível de miRNA-210 no miocárdio, e que esse nível foi reduzido tanto por alho quanto por exercícios voluntários e pela combinação de ambos. Da mesma forma, um estudo recente demonstrou que os níveis plasmáticos de miRNA-210 diminuíram na doença renal crônica após exercícios agudos.³⁴ Em contraste, alguns estudos mostraram que o miRNA-210 não se mostrava responsivo no tecido cardíaco durante exercícios agudos e exaustivos e durante exercícios aeróbicos sustentados¹¹ e natação.³⁵ Além disso, tanto o alho quanto os exercícios demonstraram estar envolvidos na obtenção de um bom controle glicêmico e na prevenção de complicações diabéticas no longo prazo.^{3,8,19} Portanto, no presente estudo, a diminuição da expressão do miRNA-210 de volta aos níveis normais parece dever-se ao controle glicêmico. Além disso, a angiogênese mediada pelo extrato de alho ocorre provavelmente através da regulação positiva da expressão da proteína c-kit neovasculogênica e da ativação das vias de sinalização PI3-K / K/Akt/NF- κ B,³⁶ que regulam a ativação da e-NOS e produção de NO.¹¹

A hiperglicemia é atualmente considerada a principal responsável pela alteração do perfil lipídico. Em geral, a dislipidemia está bem confirmada no diabetes mellitus; ela é conhecida como critério para o diagnóstico de diabetes tipo 1 e potencial lipotóxica de células beta.³⁷ Vale ressaltar que a dislipidemia está relacionada à aterosclerose e ao risco de doenças cardíacas.³⁷ A dislipidemia é possivelmente mediada pela alteração da expressão da LXR α no fígado e intestino, ativação das vias da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase e pela consequente inibição da atividade da eNOS, causando comprometimento da angiogênese.^{15,38} Além disso, a dislipidemia está relacionada à diminuição dos níveis de miRNA-126 circulante.¹³ Riedel et al.,³⁹ demonstraram que os exercícios em pacientes com insuficiência cardíaca crônica melhoraram significativamente a expressão de miRNA-126 induzida por HDL.³⁹ Neste estudo, o tratamento

com alho e exercícios voluntários, separadamente ou em conjunto, melhoraram o perfil lipídico no soro de ratos diabéticos, o que está de acordo com estudos anteriores.^{6,9,40} Portanto, o alho e os exercícios possivelmente modularam a angiogênese no miocárdio dos animais diabéticos, modulando o perfil lipídico sérico e a expressão de miRNAs pró-angiogênicos. Com relação às limitações deste estudo, não mensuramos outros fatores envolvidos na angiogênese. Mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos fisiopatológicos do alho e dos exercícios voluntários no tratamento de complicações diabéticas.

Conclusão

Este estudo mostrou que o alho e os exercícios voluntários modularam o perfil lipídico sérico e a expressão do miRNA-126, miRNA-210, aumentando assim a angiogênese no miocárdio de ratos diabéticos. Esses achados sugerem que o alho e os exercícios voluntário, separadamente ou em conjunto, podem trazer benefícios no tratamento do diabetes.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, análise e interpretação dos dados e análise estatística: Naderi R, Mohaddes G, Mohammadi M; obtenção de dados: Naderi R, Ghaznavi R, Ghyasi R; obtenção de financiamento, redação do manuscrito e revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Naderi R; Achado histológico e interpretação dos dados: Alihemmati A; Contribuiu para o protocolo PCR em tempo real: Khamaneh A.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado por uma bolsa do Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Roya Naderi pela Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Tabriz University of Medical Sciences sob o número de protocolo 91.4-2.4.

Referências

- Osipova J, Fischer D-C, Dangwal S, Volkmann I, Widera C, Schwarz K, et al. Diabetes-associated microRNAs in pediatric patients with type 1 diabetes mellitus: a cross-sectional cohort study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):E1661-5.
- Tag H, Kalita P, Dwivedi P, Das AK, Namsa ND. Herbal medicines used in the treatment of diabetes mellitus in Arunachal Himalaya, northeast, India. *J Ethnopharmacol*. 2012;141(3):786-95.
- Chipkin SR, Klugh SA, Chasan-Taber L. Exercise and diabetes. *Cardiol Clin*. 2001;19(3):489-505.
- Huang KC, Wu WT, Yang FL, Chiu YH, Peng TC, Hsu BG, et al. Effects of freshwater clam extract supplementation on time to exhaustion, muscle damage, pro/anti-inflammatory cytokines, and liver injury in rats after exhaustive exercise. *Molecules*. 2013;18(4):3825-38.
- Wu G, Rana JS, Wykrzykowska J, Du Z, Ke Q, Kang P, et al. Exercise-induced expression of VEGF and salvation of myocardium in the early stage of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(2):H389-H95.
- Da Silva ND Jr, Fernandes T, Soci UP, Monteiro AW, Phillips MI, DE Oliveira EM. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. *Med Sci Sports Exerc*. 2012;44(8):1453-62.
- Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, et al. Exercise promotes angiogenesis and improves beta-adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. *Cardiovasc Res*. 2008;78(2):385-94.
- Naderi R, Mohaddes G, Mohammadi M, Alihemmati A, Badalzadeh R, Ghaznavi R, et al. Preventive effects of garlic (*Allium sativum*) on oxidative stress and histopathology of cardiac tissue in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Physiol Hung*. 2015;102(4):380-90.
- Bayan L, Koulivand PH, Gorji A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna J Phytomed*. 2014;4(1):1-14.
- Yin K-J, Hamblin M, Chen YE. Angiogenesis-regulating microRNAs and ischemic stroke. *Curr Vasc Pharmacol*. 2015;13(3):352-65.
- Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, Wang F, et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol*. 2011;589(Pt 16):3983-94.
- Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008;15(2):261-71.
- Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*. 2008;15(2):272-84.
- de Boer HC, van Solingen C, Prins J, Duijjs JM, Huisman MV, Rabelink TJ, et al. Aspirin treatment hampers the use of plasma microRNA-126 as a biomarker for the progression of vascular disease. *Eur Heart J*. 2013;34(44):3451-7.
- Liu Y, Gao G, Yang C, Zhou K, Shen B, Liang H, et al. The role of circulating microRNA-126 (miR-126): a novel biomarker for screening prediabetes and newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):10567-77.
- Breen EC, Johnson EC, Wagner H, Tseng HM, Sung LA, Wagner PD. Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *J Appl Physiol*. 1996;81(1):355-61.
- Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem*. 2008;283(23):15878-83.
- de Amorim Miranda PH, Monteiro OM, Rossoni JV Jr, Silva ME, de Lima WC, Costa DC. Vildagliptin induces β -cell neogenesis and improves the lipid profile in a later phase of type 1 diabetes. *Curr Pharm Biotechnol*. 2015;16(1):60-5.
- Naderi R, Mohaddes G, Mohammadi M, Ghaznavi R, Ghyasi R, Vatankhah AM. Voluntary exercise protects heart from oxidative stress in diabetic rats. *Adv Pharm Bull*. 2015;5(2):231-6.
- Biyashev D, Veliceasa D, Topczewski J, Topczewska JM, Mizgirev I, Vinokour E, et al. miR-27b controls venous specification and tip cell fate. *Blood*. 2012;119(11):2679-87.
- Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*. 2012(59):e3037.
- Mirzaei Babil F, Alipour MR, Keyhanmanesh R, Alihemmati A, Ghyasi R, Mohaddes G. Ghrelin decreases angiogenesis, HIF-1 α and VEGF protein levels in chronic hypoxia in lung tissue of male rats. *Adv Pharm Bull*. 2015;5(3):315-20.
- Khazaei M, Fallahzadeh AR, Sharifi MR, Afsharmoghaddam N, Javanmard SH, Salehi E. Effects of diabetes on myocardial capillary density and serum angiogenesis biomarkers in male rats. *Clinics*. 2011;66(8):1419-24.
- Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev*. 2004;56(4):549-80.
- Chou E, Suzuma I, Way KJ, Opland D, Clermont AC, Naruse K, et al. Decreased cardiac expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in insulin-resistant and diabetic states: a possible explanation for impaired collateral formation in cardiac tissue. *Circulation*. 2002;105(3):373-9.
- Ueki K, Fruman DA, Yballe CM, Fasshauer M, Klein J, Asano T, et al. Positive and negative roles of p85 α and p85 β regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem*. 2003;278(48):48453-66.
- Yu L, Di W, Dong X, Li Z, Xue X, Zhang J, et al. Diallyl trisulfide exerts cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic state, role of AMPK-mediated AKT/GSK-3 β /HIF-1 α activation. *Oncotarget*. 2017;8(43):74791-74805.
- Hayashida R, Kondo K, Morita S, Unno K, Shintani S, Shimizu Y, et al. Diallyl trisulfide augments ischemia-induced angiogenesis via an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Circ J*. 2017;81(6):870-8.
- Hakkila J. Studies on the myocardial capillary concentration in cardiac hypertrophy due to training; an experimental study with guinea pigs. *Ann Med Exp Biol Fenn*. 1955;33(Suppl 10):1-82.
- Chan YC, Banerjee J, Choi SY, Sen CK. miR-210: The master hypoxamir. *Microcirculation*. 2012;19(3):215-23.
- XU L, WANG F, Wei W, DAI W-q, HE S-s, WANG X-p, et al. Effects of hypoxia on the expressions of hypoxia-inducible factor-1 alpha and miR-210 in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Tumor*. 2011;31(6):502-7.
- Wang J, Zhang Y, Liu YM, Guo LL, Wu P, Dong Y, et al. Huoxue Anxin Recipe () promotes myocardium angiogenesis of acute myocardial infarction rats by up-regulating miR-210 and vascular endothelial growth factor. *Chin J Integr Med*. 2016;22(9):685-90.
- Greco S, Fasanaro P, Castelvechio S, D'Alessandra Y, Arcelli D, Di Donato M, et al. MicroRNA dysregulation in diabetic ischemic heart failure patients. *Diabetes*. 2012;61(6):1633-41.
- Van Craenenbroeck AH, Ledeganck KJ, Van Ackeren K, Jürgens A, Hoymans VY, Franssen E, et al. Plasma levels of microRNA in chronic kidney disease: patterns in acute and chronic exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309(12):H2008-16.
- Fernandes T, Baraúna VG, Negrão CE, Phillips MI, Oliveira EM. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015;309(4):H543-52.
- Chiang EP, Chiu SC, Pai MH, Wang YC, Wang FY, Kuo YH, et al. Organosulfur garlic compounds induce neovasculogenesis in human endothelial progenitor cells through a modulation of MicroRNA 221 and the PI3-K/Akt signaling pathways. *J Agric Food Chem*. 2013;61(20):4839-49.

37. Sorensen CM, Ding J, Zhang Q, Alquier T, Zhao R, Mueller PW, et al. Perturbations in the lipid profile of individuals with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus: lipidomics analysis of a Diabetes Antibody Standardization Program sample subset. *Clin Biochem*. 2010;43(12):948-56.
38. Mohammadi A, Oshaghi EA. Effect of garlic on lipid profile and expression of LXR alpha in intestine and liver of hypercholesterolemic mice. *J Diabetes Metab Disord*. 2014;13(1):20.
39. Riedel S, Radzanowski S, Bowen TS, Werner S, Erbs S, Schuler G, et al. Exercise training improves high-density lipoprotein-mediated transcription of proangiogenic microRNA in endothelial cells. *Eur J Prev Cardiol*. 2015;22(7):899-903.
40. Kostrzewa-Nowak D, Nowak R, Jastrzbski Z, Zarbska A, Bichowska M, Drobnik-Kozakiewicz I, et al. Effect of 12-week-long aerobic training programme on body composition, aerobic capacity, complete blood count and blood lipid profile among young women. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015;25(1):103-13.



Este é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos da licença de atribuição pelo Creative Commons