

Testosterona e Exercício Voluntário, Individualmente ou em Conjunto, Aumentam a Ativação Cardíaca de AKT e ERK1/2 em Ratos Diabéticos

Testosterone and Voluntary Exercise, Alone or Together Increase Cardiac Activation of AKT and ERK1/2 in Diabetic Rats

Leila Chodari,¹ Mustafa Mohammadi,¹ Gisou Mohaddes,² Mohammad Reza Alipour,¹ Vajiheh Ghorbanzade,¹ Hassan Dariushnejad,¹ Shima Mohammadi¹

Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences;¹ Neuroscience Research Center of Tabriz University of Medical Sciences,² Tabriz – Irã

Resumo

Fundamento: Angiogênese prejudicada em tecido cardíaco é uma das principais complicações das diabetes. As vias de sinalização da proteína-quinase B (AKT) e a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) exercem um importante papel durante a formação de uma rede similar à capilar no processo de angiogênese.

Objetivos: Determinar os efeitos da testosterona e exercícios voluntários sobre os níveis de vascularidade, AKT fosforilada (P- AKT) e ERK fosforilada (P-ERK) sobre o tecido cardíaco de ratos diabéticos e castrados diabéticos.

Métodos: A diabetes tipo 1 foi induzida através de injeção intraperitoneal de 50 mg/kg de estreptozotocina em animais. Após 42 dias de tratamento com testosterona (2mg/kg/dia) ou exercícios voluntários, individualmente ou em conjunto, as amostras de tecidos cardíacos foram coletadas e usadas para avaliação histológica e determinação de níveis de P-AKT e P-ERK através do método ELISA.

Resultados: Os nossos resultados mostraram que a testosterona ou os exercícios aumentaram a capilaridade, os níveis de P-AKT, e P-ERK nos corações de ratos diabéticos. O tratamento de ratos diabéticos com testosterona e exercícios obteve um efeito sinérgico sobre a capilaridade, níveis de P-AKT, e P-ERK no coração. Além disto, na capilaridade do grupo diabético castrado, os níveis de P-AKT e P-ERK diminuíram significativamente no coração, ao passo que o tratamento com testosterona ou o treinamento com exercícios reverteu tais efeitos. O tratamento simultâneo de ratos diabéticos castrados com testosterona e exercícios obteve um efeito aditivo sobre os níveis de P-AKT e P-ERK.

Conclusão: Nossas descobertas sugerem que a testosterona e exercícios, em conjunto ou individualmente, podem aumentar a angiogênese nos corações de ratos diabéticos e castrados diabéticos. Os efeitos favoráveis à angiogênese da testosterona e dos exercícios estão associados à ativação reforçada de AKT e ERK1/2 no tecido cardíaco. (Arq Bras Cardiol. 2016; 107(6):532-541)

Palavras-chave: Testosterona; Ratos; Diabetes Mellitus; Exercício; Angiogênese; Proteínas c-akt; MAP Quinases Reguladas por Sinal Extracelular.

Abstract

Background: Impaired angiogenesis in cardiac tissue is a major complication of diabetes. Protein kinase B (AKT) and extracellular signal regulated kinase (ERK) signaling pathways play important role during capillary-like network formation in angiogenesis process.

Objectives: To determine the effects of testosterone and voluntary exercise on levels of vascularity, phosphorylated Akt (P- AKT) and phosphorylated ERK (P-ERK) in heart tissue of diabetic and castrated diabetic rats.

Methods: Type I diabetes was induced by i.p injection of 50 mg/kg of streptozotocin in animals. After 42 days of treatment with testosterone (2mg/kg/day) or voluntary exercise alone or in combination, heart tissue samples were collected and used for histological evaluation and determination of P-AKT and P-ERK levels by ELISA method.

Results: Our results showed that either testosterone or exercise increased capillarity, P-AKT, and P-ERK levels in the heart of diabetic rats. Treatment of diabetic rats with testosterone and exercise had a synergistic effect on capillarity, P-AKT, and P-ERK levels in heart. Furthermore, in the castrated diabetes group, capillarity, P-AKT, and P-ERK levels significantly decreased in the heart, whereas either testosterone treatment or exercise training reversed these effects. Also, simultaneous treatment of castrated diabetic rats with testosterone and exercise had an additive effect on P-AKT and P-ERK levels.

Conclusion: Our findings suggest that testosterone and exercise alone or together can increase angiogenesis in the heart of diabetic and castrated diabetic rats. The proangiogenesis effects of testosterone and exercise are associated with the enhanced activation of AKT and ERK1/2 in heart tissue. (Arq Bras Cardiol. 2016; 107(6):532-541)

Keywords: Testosterone; Rats; Diabetes Mellitus; Angiogenesis; Exercise; Proto-Oncogene Proteins C-akt; Extracellular Signal-Regulated MAP Kinases.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Dr. Mustafa Mohammadi •

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Irã

Email: m.mohammadin@yahoo.com

Artigo recebido em 11/01/16; revisado em 08/07/16; aceito em 04/08/16

DOI: 10.5935/abc.20160174

Introdução

A diabetes mellitus é uma doença metabólica com uma alta e crescente prevalência ao redor do mundo.¹ As complicações cardiovasculares são as principais causas da mortalidade e morbidade em indivíduos diabéticos, e a supressão da angiogênese nos sistemas cardíaco coronário e vascular periférico pode ter efeitos influenciadores sobre este caso.² A AKT e a ERK são as duas principais vias de sinalização que exercem um papel central na regulação de proliferação, migração e sobrevivência celular através de seus alvos a jusante.^{3,4} Existem provas de que vias de sinalização dependentes da AKT exercem um papel crítico na regulação do crescimento cardíaco, função contrátil e angiogênese coronária.^{5,6} Foi provado que as vias de sinalização de AKT aumenta a angiogênese no tecido cardíaco.⁷ A sinalização de MAPK-ERK exerce um importante papel durante a angiogênese, e é necessária para o surgimento de células endoteliais.⁸

A testosterona é um importante androgênio gonadal nos homens. A deficiência de testosterona é comum em homem com diabetes e em ratos machos com diabetes induzidas através de estreptozotocina.⁹ Além disto, é observado que doenças cardiovasculares aumentam com a deficiência de testosterona.¹⁰ Estes achados podem indicar que a suplementação de testosterona em homens diabéticos pode ser benéfica para atenuar a doença cardiovascular.

Exercícios possuem efeitos benéficos sobre as propriedades funcionais dos músculos cardíacos saudáveis e diabéticos. Além disto, exercícios físicos melhoram o metabolismo de glucose no sangue, a ação da insulina e fatores de riscos cardiovasculares em indivíduos diabéticos.¹¹ Foi demonstrado que exercícios voluntários, como exercícios leves/moderados¹² diminuem as doenças cardiovasculares.¹¹ No modelo animal de exercícios voluntários, o animal tem acesso livre a uma roda de corrida, e utiliza a roda de acordo com seu limite fisiológico para atividades físicas.¹²

Apesar de o sistema cardiovascular ser um importante objetivo dos exercícios e ações androgênicas, o sistema molecular da ação da testosterona e exercícios voluntários nos corações de diabéticos permanece amplamente inexplorada. Portanto, o propósito deste estudo era investigar o efeito da terapia de reposição de testosterona e treinamentos físicos, individualmente ou em conjunto, sobre os níveis de P-AKT e P-ERK (como fatores favoráveis à angiogênese) nos tecidos cardíacos de ratos diabéticos e castrados diabéticos.

Métodos

Animais

Os animais usados neste estudo foram fornecidos pela colônia da nossa universidade. Os animais foram abrigados em instalações com temperatura controlada (21 -23°C), mantidos em um ciclo de claro-escuro de 12-12h, com alimentos e água fornecidos *ad libitum*. Todos os experimentos com animais foram realizados seguindo as diretrizes de usos humanos e cuidados de animais de

laboratório para pesquisas biomédicas publicadas pelos Institutos Nacionais de Saúde (8ª edição, revisada em 2011), e em conformidade com a Declaração de Helsinki. O Comitê de Ética da Universidade de Tabriz aprovou o protocolo experimental. Sessenta e três ratos machos Wistar (250 - 270 g) foram designados aleatoriamente para grupos com tratamento com testosterona ou placebo, e grupos de exercícios voluntários ou sedentários. Então, os animais foram divididos em nove grupos (n = 7): 1- Grupo diabético castrado *sham* + placebo (Dia-S- Cas), 2- Grupo diabético + placebo (Dia), 3- Grupo diabético + testosterona (Dia-T), 4- Grupo diabético + exercícios + placebo (Dia-E), 5- Grupo diabético + exercícios + testosterona (Dia-T-E), 6- Grupo diabético + castrado + placebo (Dia-Cas), 7- Grupo diabético + castrado + testosterona (Dia-Cas-T), 8-Grupo diabético + castrado + exercício (Dia-Cas-E), 9- Grupo diabético + castrado + testosterona + exercício (Dia-Cas-T-E) .

Castração e terapia de reposição hormonal

Ratos machos sexualmente adultos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/kg) e cloridrato de xilazina (5 mg/kg). Então, os animais foram colocados em uma posição supina e seus testículos foram removidos através de uma incisão abdominal média baixa ou permaneceram intactos. Para evitar a interrupção de influência hormonal, a reposição de testosterona foi iniciada imediatamente após a cirurgia.¹³ Propionato de testosterona (UNIGEN, Life Science) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO), administrado por via subcutânea numa dose fisiológica (2 mg/kg /dia) por 6 semanas.¹⁴ Os ratos nos grupos Dia-S- Cas, Dia, Dia-E, Dia-Cas e Dia-Cas-E foram injetados com a mesma quantidade de veículo de DMSO.

Indução de diabetes

Todos os animais foram injetados com estreptozotocina (50 mg/kg) (Sigma, St. Louis Mo, EUA), para induzir diabetes tipo I.¹⁵ A estreptozotocina foi dissolvida em 10 mM de citrato de sódio, pH de 4,5, com 0,9% de NaCl. Diabetes foi constatada 72 h depois, através de avaliação dos níveis de glicose no sangue, utilizando um glicosímetro (Elegance, Modelo: no: CT-X10, Alemanha). Ratos com um nível de glicose no sangue ≥ 300 mg/dL foram considerados diabéticos.¹⁶ A indução de diabetes nos animais foi realizada sete dias após a cirurgia de castração.

Exercícios voluntários

Os exercícios voluntários são considerados exercícios leves/moderados. Neste estudo, os ratos nos grupos de exercício foram abrigados individualmente em gaiolas equipadas com uma roda de corrida vertical de aço inoxidável (Tajhiz Gostar, Tehran), e tinham livre acesso à roda 24h por dia, por 6 semanas. As rodas estavam conectadas a um sensor permanente que ativava um contador digital das rotações das rodas. As circulações totais das rodas foram registradas diariamente, com a distância total corrida por dia determinada através da multiplicação do número de rotações das rodas pela circunferência das rodas. Os animais que tivessem corrido menos de 2.000 m/dia eram substituídos.¹⁵

Processamento de tecidos e medição de proteína

Ao final do estudo, os tecidos cardíacos foram excisados e congelados em nitrogênio líquido imediatamente. Amostras de tecidos do ventrículo esquerdo foram armazenadas em temperatura de -70 °C até a medição de fosfo-AKT (serina 473) e fosfo-ERK 1/2 (treonina 202/ tirosina 204). De modo a mensurar os níveis de proteína no tecido cardíaco, as amostras foram homogeneizadas em PBS (pH 7,2-7,4), e centrifugadas por 20 minutos na velocidade de 3000 rpm a 4°C. Os sobrenadantes resultantes foram removidos, e as proteínas alvo foram extraídas. As formas fosforiladas e ativadas de AKT (Eastbiopharm Co., Ltd., Hangzhou, China) e os níveis de ERK1/2 (Abcam, Cambridge, U.K.) foram mensurados através de ELISA de alta sensibilidade, e normalizados à concentração total de proteínas para cada amostragem, conforme determinado pelo ensaio de Bradford.

Avaliação histológica

As amostras do tecido do ventrículo esquerdo foram isoladas imediatamente e afixadas em uma solução de solução de formalina a 10% tamponada, desidratadas em classes ascendentes de álcool e embebidas em parafina. Seções de 5 µm foram retiradas, coradas com hematoxilina-eosina (H-E), e examinadas em microscópio de luz (Olympus BH-2, Tóquio, Japão), de um modo cego. Os tecidos cardíacos foram avaliados em termos de edema intersticial, congestão, infiltração de leucocitose e mionecrose.

Ensaio de angiogênese

A angiogênese foi medida através de densidade microvascular (DMV) em cinco sessões a intervalos de 50mm da área intensamente vascularizada, com microscópio de luz, por dois observadores independentes e cegos às condições experimentais. Os números de microvasos para cada sessão foram contados e calculados, para determinar o número médio de microvasos por sessão.¹⁷

Análise estatística

Os dados são expressos como média ± EPM. Após avaliar a homogeneidade da variação e distribuição normal dos dados, foi usada uma análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, além do teste de Tukey para comparar dados quantitativos. O teste de Mann-Whitney U foi utilizado para testar variáveis histológicas. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. A análise estatística de dados foi realizada utilizando o software estatístico SPSS (Versão 17,0).

Resultados

Efeitos da testosterona e exercícios voluntários sobre níveis de P-AKT no tecido cardíaco de ratos diabéticos tipo I e diabéticos castrados

A ANOVA de uma via mostrou que a castração fez os níveis de proteína P-AKT diminuir significativamente ($p < 0,01$) no tecido cardíaco dos ratos diabéticos. O tratamento dos grupos diabéticos ($p < 0,01$) e castrados diabéticos

($p < 0,05$) com testosterona aumentou significativamente os níveis de proteína P-AKT no tecido cardíaco em comparação com o grupo diabético (Figura 1A). A Figura 1B (análise através de ANOVA de uma via) mostra que o tratamento de seis semanas de grupos diabéticos ($p < 0,01$) e castrados diabéticos ($p < 0,001$) com exercício aumentou significativamente os níveis de proteína P-AKT no coração, em comparação com os grupos diabéticos e castrados diabéticos, respectivamente. A ANOVA de duas vias na figura 1C mostra que a terapia de combinação com testosterona e exercícios em ratos diabéticos melhorou os níveis de proteína P-AKT significativamente ($p < 0,001$) no tecido cardíaco em comparação com o grupo diabético. Além disto, a terapia de combinação com testosterona e exercício em ratos diabéticos mostrou um efeito de aumento significativo sobre níveis de proteína P-AKT em comparação com os grupos de testosterona ($p < 0,001$) ou exercício ($p < 0,01$).

A Figura 1D mostra que no grupo diabético-castrado, uma terapia de combinação de seis semanas com testosterona e exercícios eleva significativamente ($p < 0,001$) os níveis de proteína no tecido cardíaco em comparação com o grupo diabético-castrado. Além disto, a terapia de combinação com testosterona e exercícios em ratos diabéticos castrados mostrou um efeito significativo de aumento ($p < 0,05$) sobre os níveis de proteína P-AKT em comparação com grupos de testosterona ou exercício. A análise de dados para o grupo *sham* não aparentou diferença significativa em comparação com o grupo diabético (dados não-fornecidos).

Efeitos da testosterona e exercícios voluntários sobre níveis de proteína P-ERK 1/2 no tecido cardíaco de ratos diabéticos tipo 9 e castrados diabéticos

A ANOVA de uma via demonstrou que, no grupo diabético castrado, os níveis de proteína P-ERK 1/2 diminuíram significativamente ($p < 0,05$) em comparação com o grupo diabético. O tratamento de seis semanas de grupos diabéticos ($p < 0,05$) e castrados diabéticos ($p < 0,001$) com testosterona reforçou significativamente os níveis de proteína P-ERK 1/2 no tecido cardíaco em comparação com os grupos Dia e Dia-Cas, respectivamente (Figura 2A).

A Figura 2B (análise através de ANOVA de uma via) mostra que o tratamento de seis semanas de grupos diabéticos ($p < 0,05$) e castrados diabéticos ($p < 0,001$) com exercício aumentou significativamente os níveis de proteína P-ERK 1/2 no coração em comparação com os grupos diabéticos e castrados diabéticos, respectivamente.

De acordo com a Figura 2C (análise através de ANOVA de duas vias), seis semanas de terapia de combinação com testosterona e exercícios em ratos diabéticos reforçou significativamente ($p < 0,001$) os níveis de proteína P-ERK 1/2 no tecido cardíaco em comparação com o grupo diabético. Também, a terapia de combinação com testosterona e exercícios em ratos diabéticos demonstrou um efeito de aumento significativo sobre os níveis de proteína P-ERK 1/2 em comparação com os grupos de testosterona ($p < 0,05$) ou exercício ($p < 0,01$).

A Figura 2D mostra que, no grupo diabético-castrado, a terapia de combinação com testosterona e exercícios

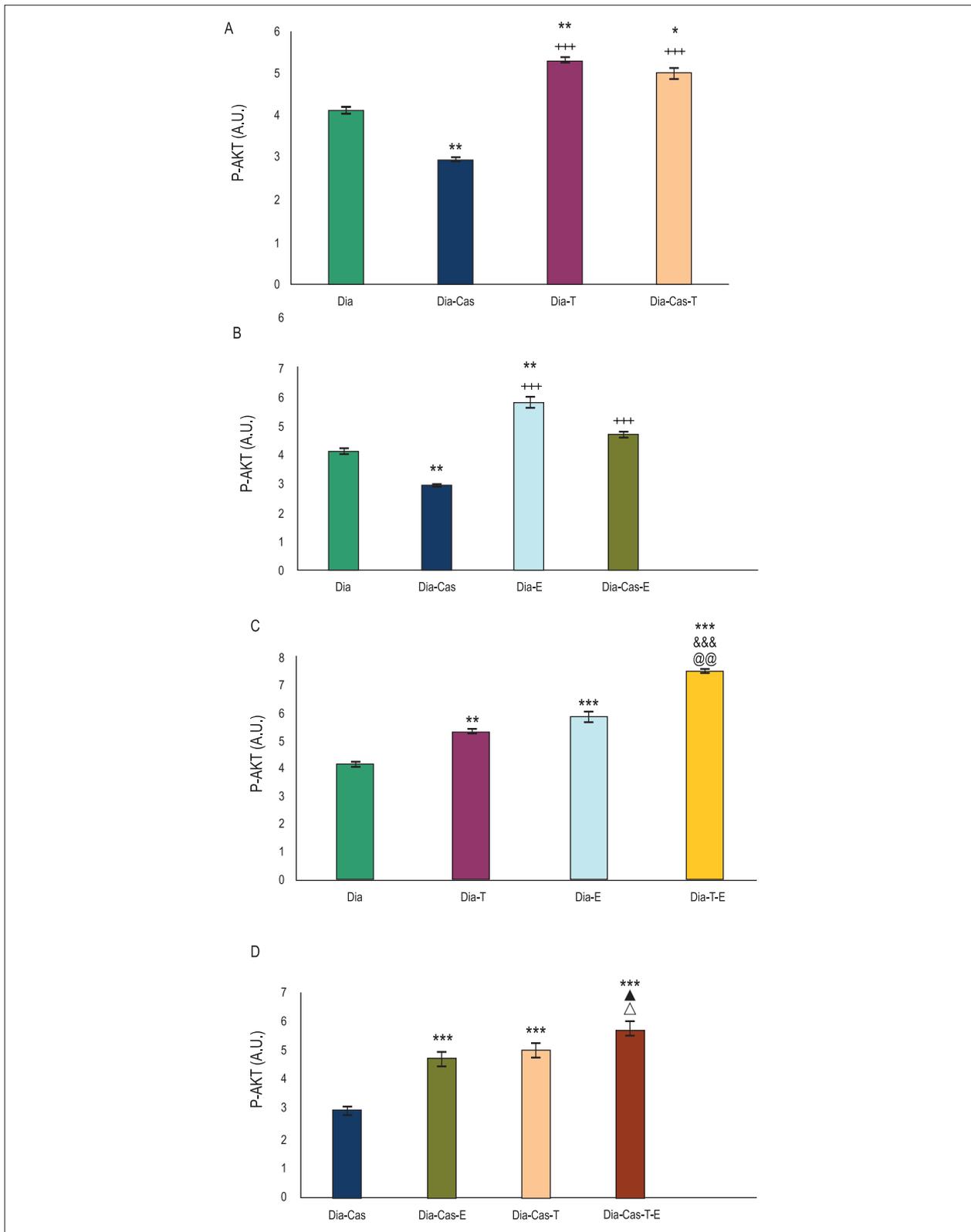


Figura 1 – A) Efeito de tratamento de 6 semanas sobre níveis de proteína P-AKT no tecido cardíaco de grupos diabéticos e castrados diabéticos; B) Efeito de 6 semanas de exercício sobre níveis de proteína P-AKT no tecido cardíaco de grupos diabéticos e castrados diabéticos; C) Efeitos de 6 semanas de testosterona e exercícios em níveis de proteína P-AKT no tecido cardíaco de grupo diabético; D) Efeitos de 6 semanas de testosterona e exercícios sobre níveis de proteína P-AKT no tecido cardíaco do grupo de castrados diabéticos (d). Os dados são expressos como média± EPM para 7 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus o grupo Dia, &&& $p < 0,001$ versus o grupo Dia-T, @@ $p < 0,01$ versus o grupo Dia-E, +++ $p < 0,001$ versus o grupo Dia-Cas, ▲ $p < 0,05$ versus o grupo Dia-Cas-E, △ $p < 0,05$ versus o grupo Dia-Cas-T.

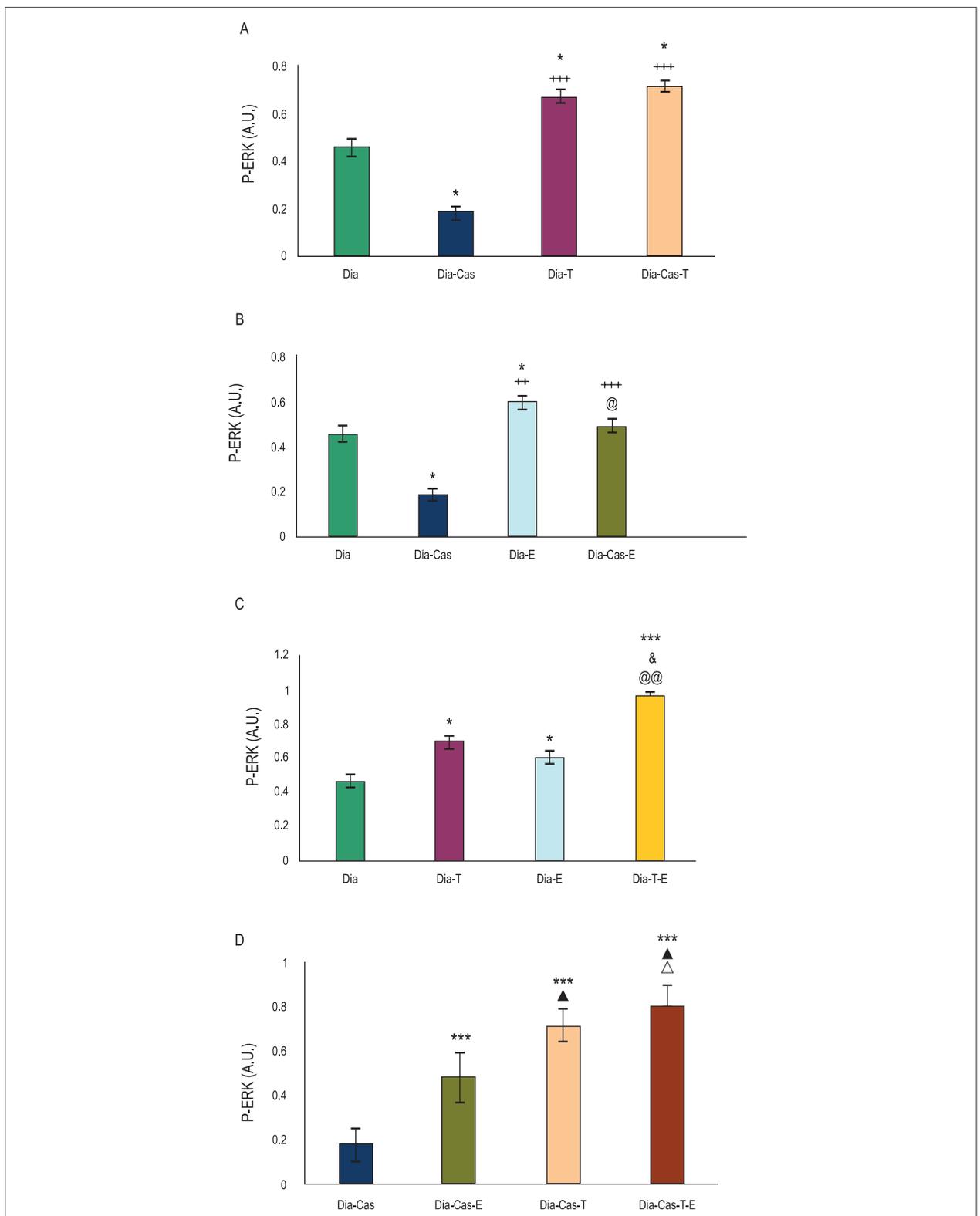


Figura 2 – A) Efeito de 6 semanas de tratamento de testosterona sobre níveis de proteína P-ERK 1/2 no tecido cardíaco de grupos diabéticos e castrados diabéticos; B) Efeito de 6 semanas de exercícios físicos sobre os níveis de proteína P-ERK 1/2 no tecido cardíaco de grupos diabéticos e castrados diabéticos; C) Efeitos de 6 semanas de testosterona e exercícios sobre os níveis de proteína P-ERK 1/2 no tecido cardíaco do grupo diabético; D) Efeitos de 6 semanas de testosterona e exercícios sobre os níveis de proteína P-ERK 1/2 no tecido cardíaco do grupo de castrados diabéticos. Os dados são expressos como média± EPM para 7 animais. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ versus o grupo Dia. & $p < 0,05$ versus o grupo Dia-T. @ $p < 0,05$, @@ $p < 0,01$ versus o grupo Dia-E. + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ versus o grupo Dia-Cas. ▲ $p < 0,05$ versus o grupo Dia-Cas-E. Δ $p < 0,05$ versus o grupo Dia-Cas-T.

aumentou significativamente ($p < 0,001$) os níveis de proteína-ERK 1/2 no tecido cardíaco em comparação com o grupo diabético-castrado. Além disto, a terapia de combinação com testosterona e exercícios em ratos diabéticos castrados demonstrou um efeito de aumento significativo ($p < 0,05$) sobre níveis de proteína P-ERK 1/2 em comparação com grupos de testosterona ou exercício. A análise de dados do grupo *sham* não demonstrou diferença significativa em comparação com o grupo diabético (dados não-fornecidos).

Observações histopatológicas

Efeitos da testosterona e exercícios voluntários em tecidos do miocárdio em ratos diabéticos tipo I e castrados diabéticos

De acordo com a Figura 3 e a tabela 1A, analisada através do teste de Mann-Whitney U, a castração aumentou o edema intersticial (significativamente, $p < 0,05$), infiltração de leucócitos, e a mionecrose no grupo diabético. No grupo diabético, o tratamento com testosterona resultou

em uma acentuada atenuação do edema intersticial, infiltração de leucócitos e mionecrose (significativamente, $p < 0,05$) em comparação com o grupo diabético. Além disto, os ratos no grupo diabético, após treinamento físico de seis semanas, tinham diminuídos edema intersticial, infiltração de leucócitos (significativamente, $p < 0,05$) e mionecrose (significativamente, $p < 0,001$) (Tabela 1B). A terapia de combinação com testosterona e exercícios em ratos diabéticos demonstrou um efeito de diminuição sobre os danos dos tecidos do miocárdio em comparação com os grupos Dia, Dia-E e Dia-T (Tabela 1C). A Tabela 1A demonstrou que no grupo Dia-Cas, o tratamento de testosterona resultou em uma acentuada atenuação do edema intersticial (significativamente, $p < 0,05$), infiltração de leucócitos (significativamente, $p < 0,01$) e mionecrose (significativamente, $p < 0,001$) em comparação com o grupo Dia-Cas. Além disto, os ratos que se exercitaram por seis semanas no grupo Dia-Cas tinham diminuídos edema intersticial (significativamente, $p < 0,01$), infiltração de leucócitos (significativamente, $p < 0,05$) e mionecrose (significativamente, $p < 0,01$) em comparação com o grupo Dia-Cas (Tabela 1B). A análise de Mann-Whitney

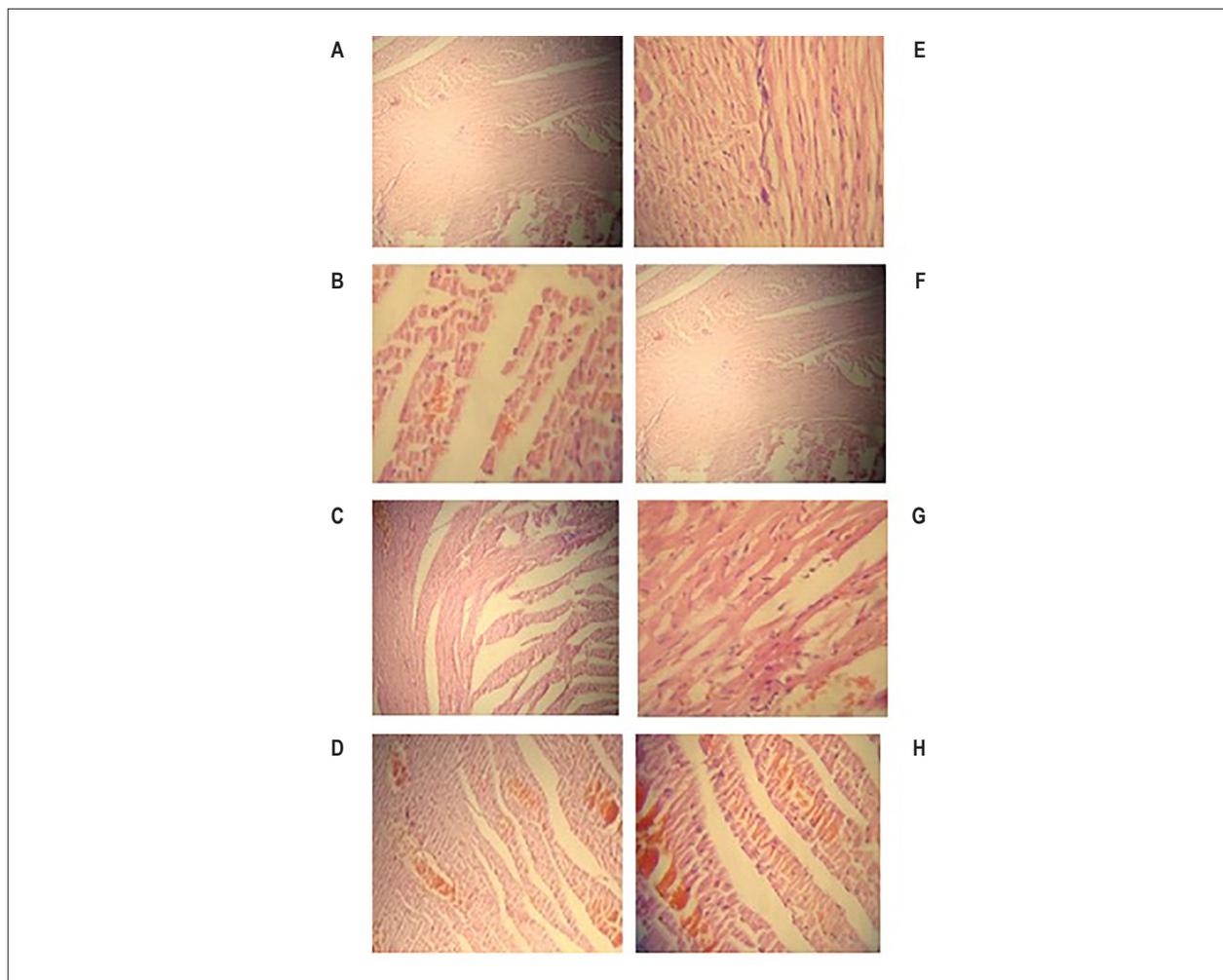


Figura 3 – A-H) As imagens histológicas de microscopia de luz dos tecidos do ventrículo esquerdo coradas com hematoxilina e eosina (40 × HE). A) Grupo Dia; B) Grupo Dia-T; C) Grupo Dia-E; D) Grupo Dia-T-E; E) Grupo Dia- Cas; F) Grupo Dia- Cas-T; G) Grupo Dia- Cas-E; H) Grupo Dia- Cas-T-E.

Tabela 1 – A) Efeito de 6 semanas de tratamento de testosterona sobre as alterações histológicas de cardiomiócitos em grupos diabéticos e castrados diabéticos; B) Efeito de 6 semanas de exercícios físicos sobre as alterações histológicas de cardiomiócitos em grupos diabéticos e castrados diabéticos; C) Efeitos de 6 semanas de testosterona e exercícios alterações histológicas de cardiomiócitos em grupo diabético; D) Efeitos de 6 semanas de testosterona e exercícios alterações histológicas de cardiomiócitos em grupo de castrados diabéticos

A	Edema intersticial	Infiltração de leucócitos	Necrose e congestão de cardiomiócitos
Dia	1,57 ± 0,78	2,42 ± 0,78	2,57 ± 0,53
Dia-Cas	2,71 ± 0,48*	2,8571 ± 0,37	3,0 ± 0
Dia-T	1,71 ± 0,75++	1 ± 1 ++	0,85 ± 0,89*+++
Dia-Cas-T	1,85 ± 0,69+	1,42 ± 0,78* ++	1,42 ± 0,05**+++
B	Edema intersticial	Infiltração de leucócitos	Necrose e congestão de cardiomiócitos
Dia	1,57 ± 0,78	2,42 ± 0,78	2,57 ± 0,53
Dia-Cas	2,71 ± 0,48*	2,8571 ± 0,37	3,0 ± 0
Dia-E	1,42 ± 0,53	1,28 ± 1*	1,0 ± 0***
Dia-Cas-E	1,85 ± 0,37 ++	2,14 ± 0,69007+@	2,14 ± 0,69+++@@
C	Edema intersticial	Infiltração de leucócitos	Necrose e congestão de cardiomiócitos
Dia	1,57 ± 0,78	2,42 ± 0,78	2,57 ± 0,53
Dia-T	1,71 ± 0,75	1,85 ± 0,37	0,85 ± 0,89*
Dia-E	1,42 ± 0,53	1,28 ± 1.00 *	1,0 ± 0***
Dia-T-E	1,85 ± 0,37	2,14 ± 0,69*	2,14 ± 0,69**
D	Edema intersticial	Infiltração de leucócitos	Necrose e congestão de cardiomiócitos
Dia-Cas	2,71 ± 0,48	2,8571 ± 0,37	3,0 ± 0
Dia-Cas-T	1,85 ± 0,69+	1,42 ± 0,78++	1,42 ± 0,05+++
Dia-Cas-E	1,85 ± 0,37++	2,14 ± 0,69007+	2,14 ± 0,69++
Dia-Cas-T-E	1,28 ± 0,48+++▲	1,28 ± 0,48+++▲	1,28 ± 0,48+++▲

Os dados são expressos como média ± EPM para 7 animais. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 versus o grupo Dia. @ p<0,05, @@ p<0,01 versus o grupo Dia-E. + p<0,05, ++ p<0,01, +++ p<0,001 versus o grupo Dia-Cas. ▲ p<0,05 versus o grupo Dia-Cas-E.

U demonstrou que a terapia de combinação com testosterona e exercícios em ratos diabéticos castrados diminuiu o edema intersticial (significativamente, p<0,01), a infiltração de leucócitos e mionecrose (significativamente, p<0,001) em comparação com o grupo Dia-Cas (Tabela 1D).

Efeitos da testosterona e exercícios voluntários sobre a densidade microvascular (DMV) em ratos diabéticos tipo I e castrados diabéticos

A ANOVA de uma via mostrou que a castração diminuiu significativamente (p<0,01) o número de DMV no tecido cardíaco de ratos diabéticos. O tratamento dos grupos Dia e Grupo Dia-Cas com testosterona reforçou significativamente (p<0,01) o número de DMV em comparação com os Grupos Dia e Dia-Cas, respectivamente (Tabela 2A). A Tabela 2B mostrou que nos Grupos Dia e Dia-Cas, treinamento físico de seis semanas aumentou significativamente (p<0,01) significativamente o número de DMV no tecido cardíaco em comparação com os Grupos Dia e Dia-Cas, respectivamente. De acordo com a tabela 2C (análise através de ANOVA de duas vias), seis semanas de terapia de comparação com testosterona e exercícios em ratos diabéticos reforçou significativamente (p<0,001) o número

de DMV no tecido cardíaco em comparação com o grupo diabético. Além disto, a terapia de combinação com testosterona e exercícios em ratos diabéticos mostrou um efeito de aumento significativo (p<0,01) sobre o número de DMV em comparação com os grupos tratados com testosterona ou exercício. A Figura 2D (análise de ANOVA de duas vias), mostra que, no grupo diabético-castrado, seis semanas de terapia de combinação com testosterona e exercícios aumentou significativamente (p<0,001) o número de DMV no tecido cardíaco em comparação com o grupo diabético-castrado. Além disto, a terapia de combinação com testosterona e exercícios em ratos diabéticos-castrados apresentou um efeito de aumento significativo (p<0,05) sobre o número de DMV em comparação com grupos tratados com exercícios. A análise de dados para o grupo sham não demonstrou diferenças significativas em comparação com o grupo diabético (dados não-fornecidos).

Discussão

Neste estudo, fornecemos novas informações de que a testosterona e os exercícios aumentaram os níveis de P-AKT e P-ERK 1/2 no tecido cardíaco de ratos diabéticos tipo I. Nossas descobertas mostraram que a castração prejudicou a ativação de

Tabela 2 – A) Efeito de 6 semanas de tratamento de testosterona sobre as DMV de tecidos cardíacos de grupos diabéticos e castrados diabéticos; B) Efeito de 6 semanas de exercícios físicos sobre as DMV de tecidos cardíacos de grupos diabéticos e castrados diabéticos; C) Efeitos de 6 semanas de testosterona e exercícios sobre as DMV de tecidos cardíacos do grupo diabético; D) Efeitos de 6 semanas de testosterona e exercícios sobre as DMV de tecidos cardíacos de grupo de castrados diabéticos

A	Dia	Dia-Cas	Dia-T	Dia-Cas-T
Densidade microvascular		**	**	++
	239,57±11,76	196,00±14,70	281,00±9,50	245,42±9,66
B	Dia	Dia-Cas	Dia-E	Dia-Cas-E
Densidade microvascular		**	**	++
	239,57±11,76	196,00±14,70	269,1429±12,42	226,57±28,17
C	Dia	Dia-T	Dia-E	Dia-T-E
Densidade microvascular		**	**	*** && @@
	239,57±11,76	281,00±9,50	269,1429±12,42	305,7143±9,4
D	Dia-Cas	Dia-Cas-T	Dia-Cas-E	Dia-Cas-T-E
Densidade microvascular		+++	+	+++ ▲
	196,00±14,70	245,42±9,66	226,57±28,17	259,14±7,96

Os dados são expressos como média± EPM para 7 animais. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus o grupo Dia. && $p < 0,01$ versus o grupo Dia-T. @@ $p < 0,01$ versus o grupo Dia-E. + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ versus o grupo Dia-Cas. ▲ $p < 0,05$ versus o grupo Dia-Cas-E.

AKT e ERK 1/2 no tecido cardíaco de ratos diabéticos, e a terapia de reposição de testosterona aumentou os níveis destas proteínas. Especificamente, demonstramos que o tratamento simultâneo de ratos diabéticos e castrados-diabéticos com testosterona e exercícios teve um efeito sobre a ativação destas proteínas. O presente estudo revelou que os níveis de P-AKT e P-ERK 1/2 foram reforçados em grupos treinados com exercícios em comparação com os grupos sedentários. Além disto, a testosterona e os exercícios induziram alterações histológicas, como a organização do tecido e a vascularização no tecido cardíaco. Brevemente, os danos aos miocárdios dos ratos diabéticos e diabéticos-castrados diminuíu com o tratamento com testosterona ou treinamento físico. Adicionalmente, o tratamento simultâneo com testosterona e exercícios aumentou a vascularização no tecido cardíaco de ratos diabéticos e diabéticos-castrados.

A condição diabética altera mecanismos de neovascularização e prejudica a homeostase vascular. Assim, a angiogênese e a densidade capilar diminuíram nos corações de ratos diabéticos.¹⁸ Similarmente, estudos clínicos mostraram uma anormalidade na vasodilatação dependente do endotélio em pacientes com diabetes.¹⁹ Foi observado que as diabetes causam perturbações estruturais e funcionais no miocárdio através de fibrose do miocárdio, formação de colágeno, a formação de colágeno, hipertrofia dos miócitos, disfunção mitocondrial, e acumulação de ERRO.²⁰ Foi constatado que a expressão cardíaca de FCEV-A e

seus receptores foi reduzida em ratos diabéticos e no miocárdio de humanos com diabetes.²¹

Diversos fatores podem afetar a angiogênese no coração de indivíduos diabéticos; a testosterona e exercícios são os mais notáveis entre tais fatores.^{14,22} Assim, androgênios, incluindo a testosterona, mediam efeitos biológicos sobre todos os aspectos de mecanismos celulares, incluindo a proliferação, diferenciação e homeostase. Adicionalmente, foi notado que a testosterona está envolvida na proliferação de células endoteliais e na angiogênese, uma vez que a suplementação de testosterona aumenta a angiogênese nos corações de ratos castrados.²³ Além disto, estudos anteriores mostraram que deficiência de testosterona é comum em homens diabéticos e em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina.^{24,25} Testes clínicos relataram uma maior prevalência de hipogonadismo em homens diabéticos em comparação com não-diabéticos.²⁴ É visto que indivíduos diabéticos tipo I possuem menor testosterona livre em comparação com indivíduos controle.²⁶ Estas observações e outras evidências científicas sugerem que a deficiência de testosterona contribui, ou pelo menos está associada à fatores de riscos cardiovasculares em indivíduos diabéticos.^{27,28} Em nosso estudo, a terapia com testosterona aumentou a vascularidade no miocárdio dos Grupos Dia e Dia-Cas.

Uma vez que atividade física regular de intensidade moderada pode reduzir o risco de doença cardiovascular, ela

é recomendada para pacientes com diabetes tipo I (T1DM).²⁹ Diversas linhas de evidência sugerem que exercícios aumentam a angiogênese.³⁰ Nossos resultados mostraram DMV aumentada e intersticial, infiltração de leucócitos, e mionecrose diminuídas no tecido cardíaco dos Grupos Dia e Dia-Cass.

Para elucidar os mecanismos da testosterona e exercícios para promover a angiogênese, avaliamos AKT e ERK1/2 nas proteínas relacionadas à angiogênese. PI3K/Akt e MEK/ERK são duas principais vias de sinalização celular, ativadas pela insulina,^{31,32} e exercem um papel grandioso durante a angiogênese.³³ A AKT é expressada no tecido cardíaco em altos níveis.³⁴ Foi demonstrado que os eixos de sinalização PI3K-AKT e MAPK-ERK regulam diversos passos críticos na angiogênese.^{35,36} Dobrzynski et al.³⁷ seus colegas demonstraram que ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina tiveram reduções significativas em atividade cardíaca de AKT e o tratamento com insulina de ratos diabéticos por estreptozotocina melhorou a fosforilação retiniana de AK. Além disto, foi relatado que o pré-tratamento com insulina de células de hepatoma aumentou especificamente a fosforilação de ERK1/2 induzida pelo hormônio de crescimento.³³

É visível que a testosterona aumentou a fosforilação de AKT e ERK1/2 em cardiomiócitos de ratos neonatais.³⁸ Parece que a testosterona aumenta os níveis de HIF-1a e FCEV-A¹⁴ que atuam como os principais reguladores de neovascularização através de sinalização fosfo-AKT/AKT. Além disto, a testosterona pode realçar os níveis de FDS-1^a, o que diminui a apoptose e aumenta a angiogênese.¹⁴

Diversas linhas de evidência sugerem que exercícios podem aumentar a angiogênese através do aumento de fosforilação de FCEV e NO Endotelial pela AKT no coração pós-ischêmico a falhar em ratos.^{39,40} Além disto, foi revelado que exercícios podem ativar ERK no músculo esquelético de roedores.⁴¹ Em relação a isto, mostramos que exercícios voluntários aumentam P-AKT e P-ERK cardíacos em ratos diabéticos e castrados diabéticos, o que pode causar a angiogênese. Outros mecanismos possíveis são o aumento de FCEV-A e a diminuição de estresse oxidativo através de exercícios voluntários.¹⁶

Adicionalmente, pela primeira vez, nosso estudo mostrou que o tratamento com testosterona e exercícios físicos teve um efeito aditivo sobre a diminuição de lesão tecidual, vascularidade e ativação de AKT e ERK nos corações de ratos diabéticos. Em concordância com o nosso estudo, Fry e Lohnes⁴² mostraram que exercícios de resistência podem provocar uma resposta de elevação de testosterona, que explica parcialmente a hipertrofia muscular observada em atletas. Também foi relatado que quando exercícios são adicionados à suplementação de testosterona, processo de remodelação cardíaca, como alterações estruturais

ou bioquímicas, se torna mais eficaz.⁴³ Acerca das limitações deste estudo e resultados dos estudos anteriores, não medimos, a testosterona circulante após a castração.

Conclusão

Com base em nossas descobertas, concluímos que a testosterona e os exercícios aumentam a angiogênese e diminuem as anormalidades histológicas nos corações de ratos diabéticos tipo I, aumentando a P-AKT e P-ERK. De acordo com nossos achados, recomenda-se a realização de exercícios voluntários diários, além de doses de testosterona, para homens diabéticos com deficiência de testosterona para reduzir suas complicações cardíacas.

Agradecimentos

Reconhecemos com gratidão o apoio para esta investigação por parte do Centro de Pesquisa Aplicada em Medicamentos, e da Universidade de Ciências Médicas de Tabriz. Nossos dados neste trabalho foram retirados da tese da Sra. Leila Chodari para PhD em fisiologia (número de série da tese: 92/4-2/4).

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Redação do manuscrito: Chodari I, Mohammadi M, Mohaddes G; Obtenção de dados: Chodari I, Mohammadi M, Mohaddes G, Ghorbanzade V, Dariushnejad H, Mohammadi S; Análise e interpretação dos dados: Chodari I, Mohammadi M, Alipour MR, Ghorbanzade V, Dariushnejad H, Mohammadi S; Análise estatística: Chodari I, Mohammadi M, Alipour MR; Obtenção de financiamento: Mohammadi M; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Chodari I, Mohammadi M, Mohaddes G, Alipour MR.

Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado por Tabriz University of Medical Sciences.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Mustafa Mohammadi pela Tabriz University of Medical Sciences.

Referências

1. Soares RA. Angiogenesis in Diabetes. Unraveling the Angiogenic Paradox. *The Open Circulation and Vascular Journal*. 2010;3;3-9.
2. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653-60.
3. Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ*. 2001;12(7):363-9.
4. Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, et al. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett*. 2000;468(1):53-8.
5. DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*. 2006;113(17):2097-104.

6. McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, et al. Phosphoinositide 3-kinase (p110 α) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12355-60.
7. Liu L-Z, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PLoS One*. 2011;6(4):e19139.
8. Mavria G, Vercoulen Y, Yeo M, Paterson H, Karasarides M, Marais R, et al. ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. *Cancer Cell*. 2006;9(1):33-44.
9. Xu Q, Wells CC, Garman JH, Asico L, Escano CS, Maric C. Imbalance in sex hormone levels exacerbates diabetic renal disease. *Hypertension*. 2008;51(4):1218-24.
10. Rosano GM, Leonardo F, Pagnotta P, Pelliccia F, Panina G, Cerquetani E, et al. Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease. *Circulation*. 1999;99(13):1666-70. Erratum in: *Circulation* 2000;101(5):584.
11. Howarth FC, Al Ali S, Al-Sheryani S, Ljubicavijevic M. Effects of voluntary exercise on heart function in streptozotocina (STZ)-induced diabetic rat. *Int J Diabetes Metabolism*. 2007;15:32-7.
12. Kizaki T, Maegawa T, Sakurai T, Ogasawara JE, Ookawara T, Oh-ishi S, et al. Voluntary exercise attenuates obesity-associated inflammation through ghrelin expressed in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;413(3):454-9.
13. Maddali KK, Korzick DH, Tharp DL, Bowles DK. PKC δ mediates testosterone-induced increases in coronary smooth muscle Cav1. 2. *J Biol Chem*. 2005;280(52):43024-9.
14. Chen Y, Fu L, Han Y, Teng Y, Sun J, Xie R, et al. Testosterone replacement therapy promotes angiogenesis after acute myocardial infarction by enhancing expression of cytokines HIF-1 α , FDS-1 α and FCEV. *Eur J Pharmacol*. 2012;684(1-3):116-24.
15. Tripathi V, Verma J. Different models used to induce diabetes: a comprehensive review. *Int J Pharm Sci*. 2014;6(6):29-32.
16. 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.
17. Güzel D, Dursun AD, Fıçıcılar H, Tekin D, Tanyeli A, Akat F, et al. Effect of intermittent hypoxia on the cardiac HIF-1/FCEV pathway in experimental type 1 diabetes mellitus. *Anatol J Cardiol*. 2016;16(2):76-83.
18. 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.
19. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 1993;88(6):2510-6.
20. Falcão-Pires I, Leite-Moreira AF. Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment. *Heart Fail Rev*. 2012;17(3):325-44.
21. 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.
22. Chorbazadeh V, Mohammadi M, Dariushnejad H, Chodari L, Mohaddes G. Effects of crocin and voluntary exercise, alone or combined, on heart FCEV-A and HOMA-IR of HFD/ESTREPTOZOTOCINA induced type 2 diabetic rats. *J Endocrinol Invest*. 2016 Apr 19. [Epub ahead of print].
23. Lissbrant IF, Lissbrant E, Persson A, Damber JE, Bergh A. Endothelial cell proliferation in male reproductive organs of adult rat is high and regulated by testicular factors. *Biol Reprod*. 2003;68(4):1107-11.
24. Barrett-Connor E, Khaw KT, Yen SS. Endogenous sex hormone levels in older adult men with diabetes mellitus. *Am J Epidemiol*. 1990;132(5):895-901.
25. Khaneshi F, Nasrolahi O, Azizi S, Nejati V. Sesame effects on testicular damage in streptozotocina-induced diabetes rats. *Avicenna J Phytomed*. 2013;3(4):347-55.
26. Van Dam EW, Dekker JM, Lentjes EG, Romijn FP, Smulders YM, Post WJ, et al. Steroids in adult men with type 1 diabetes: a tendency to hypogonadism. *Diabetes Care*. 2003;26(6):1812-8.
27. Corona G, Rastrelli G, Vignozzi L, Mannucci E, Maggi M. Testosterone, cardiovascular disease and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(2):337-53.
28. Wang C, Jackson G, Jones TH, Matsumoto AM, Nehra A, Perelman MA, et al. Low testosterone associated with obesity and the metabolic syndrome contributes to sexual dysfunction and cardiovascular disease risk in men with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011;34(7):1669-75.
29. Chimen M, Kennedy A, Nirantharakumar K, Pang T, Andrews R, Narendran P. What are the health benefits of physical activity in type 1 diabetes mellitus? A literature review. *Diabetologia*. 2012;55(3):542-51.
30. Leosco D, Rengo G, Iaccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, et al. Exercise promotes angiogenesis and improves β -adrenergic receptor signalling in the post-ischaemic failing rat heart. *Cardiovasc Res*. 2008;78(2):385-94.
31. Hüser M, Lockett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S, et al. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *EMBO J*. 2001;20(8):1940-51.
32. Jiang BH, Zheng JZ, Aoki M, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1749-53.
33. Xu J, Keeton AB, Franklin JL, Li X, Venable DY, Frank SJ, et al. Insulin enhances growth hormone induction of the MEK/ERK signaling pathway. *J Biol Chem*. 2006;281(2):982-92.
34. Zdychova J, Komers R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol Res*. 2005;54(1):1-16.
35. Hood JD, Frausto R, Kiosses WB, Schwartz MA, Chersesh DA. Differential α integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. *J Cell Biol*. 2003;162(5):933-43.
36. Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*. 2002;90(12):1243-50.
37. Dobrzynski E, Montanari D, Agata J, Zhu J, Chao J, Chao L. Adrenomedullin improves cardiac function and prevents renal damage in streptozotocina-induced diabetic Rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(6):E1291-E8.
38. Altamirano F, Oyarce C, Silva P, Toyos M, Wilson C, Lavandero S, et al. Testosterone induces cardiomyocyte hypertrophy through mammalian target of rapamycin complex 1 pathway. *J Endocrinol*. 2009;202(2):299-307. Erratum in: *J Endocrinol*. 2009;202(3):485.
39. Chang E, Paterno J, Duscher D, Maan ZN, Chen JS, Januszky M, et al. Exercise induces stromal cell-derived factor-1 α -mediated release of endothelial progenitor cells with increased vasculogenic function. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(2):340e-50e.
40. Sakamoto K, Aschenbach WG, Hirshman MF, Goodyear LJ. Akt signaling in skeletal muscle: regulation by exercise and passive stretch. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285(5):E1081-E8.
41. Chen HC, Bandyopadhyay G, Sajan MP, Kanoh Y, Standaert M, Farese RV. Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribose (AICAR)-stimulated glucose transport. *J Biol Chem*. 2002;277(26):23554-62.
42. Fry A, Lohnes C. Acute testosterone and cortisol responses to high power resistance exercise. *Fiziol Cheloveka*. 2010;36(4):102-6.
43. Gonçalves L, de Souza RR, Maifino LBM, Caperuto ÉC, Carbone PO, Rodrigues B, et al. Resistance exercise and testosterone treatment alters the proportion of numerical density of capillaries of the left ventricle of aging Wistar Rats. *Aging Male*. 2014;17(4):243-7.