

## Efeito Protetor do Pré-Condicionamento Isquêmico no Miocárdio Contra Lesão Remota de Tecidos após Isquemia Cerebral Focal Transitória em Ratos Diabéticos

*Protective Effect of Ischemic Preconditioning on Myocardium Against Remote Tissue Injury Following Transient Focal Cerebral Ischemia in Diabetic Rats*

Meltem Kumas,<sup>1</sup> Ozge Altintas,<sup>2</sup> Ersin Karatas,<sup>3</sup> Abdurrahim Kocyigit<sup>4</sup>

BezmiAlem Vakif University - Vocational School of Health Services - Medical Laboratory Techniques;<sup>1</sup> Kirklareli State Hospital, Neurology Clinic;<sup>2</sup> Gebze Technical University, Department of Molecular Biology and Genetics;<sup>3</sup> Bezmialem Vakif University - Medical Faculty - Medical Biochemistry Department<sup>4</sup> – Turquia

### Resumo

**Fundamentos:** O pré-condicionamento isquêmico remoto (IPreC) poderia fornecer efeito protetor de tecido em um local remoto por vias de sinalização anti-inflamatórias, neuronais e humorais.

**Objetivos:** O objetivo do estudo foi investigar os possíveis efeitos protetores do IPreC remoto no miocárdio após a oclusão transitória da artéria cerebral média (MCAo) em ratos com diabetes induzida por estreptozotocina (STZ) e ratos não diabéticos.

**Métodos:** 48 ratos Sprague Dawley machos foram divididos em oito grupos: grupos Sham, STZ, IPreC, MCAo, IPreC + MCAo, STZ + IPreC, STZ + MCAo e STZ + IPreC + MCAo. Induzimos MCAo sete dias após a diabetes induzida por STZ e realizamos IPreC 72 horas antes do MCAo. A lesão miocárdica remota foi investigada histopatologicamente. Os níveis de proteína Bax, Bcl2 e caspase-3 foram medidos pela análise Western Blot. O estado de antioxidante total (TAS), e o estado de oxidação total (TOS) do tecido miocárdico foram medidos por meio de um estudo colorimétrico. O índice de estresse oxidativo (OSI) foi calculado como a relação TOS-TAS. Para todas as análises estatísticas, os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

**Resultados:** Observamos danos graves, incluindo necrose, congestão e infiltração de células mononucleares no tecido miocárdico dos grupos diabético e isquêmico. Nesses grupos os níveis de TOS e OSI foram significativamente maiores; os níveis de TAS foram inferiores aos dos grupos relacionados com IPreC ( $p < 0,05$ ). O IPreC melhorou marcadamente as alterações histopatológicas e aumentou os níveis de TAS em IPreC + MCAo e STZ + IPreC + MCAo em comparação com os grupos MCAo e STZ + MCAo ( $p < 0,05$ ). Em ratos não diabéticos, MCAo ativou a morte celular apoptótica através do aumento da relação Bax / Bcl2 e dos níveis de caspase-3. IPreC reduziu a morte celular apoptótica pela supressão de proteínas pró-apoptóticas. O diabetes aumentou acentuadamente os níveis de proteína apoptótica e o efeito não foi revertido pelo IPreC.

**Conclusões:** Podemos sugerir que o IPreC atenua a lesão miocárdica através da melhora dos achados histológicos, ativando mecanismos antioxidantes e induzindo atividade antiapoptótica em ratos diabéticos. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(6):516-526)

**Palavras-chave:** Precondicionamento Isquêmico Miocárdico; Artéria Cerebral Média; Ratos; Diabetes Mellitus Experimental.

### Abstract

**Background:** Remote ischemic preconditioning (IPreC) could provide tissue-protective effect at a remote site by anti-inflammatory, neuronal, and humoral signaling pathways.

**Objectives:** The aim of the study was to investigate the possible protective effects of remote IPreC on myocardium after transient middle cerebral artery occlusion (MCAo) in streptozotocin-induced diabetic (STZ) and non-diabetic rats.

**Methods:** 48 male Sprague Dawley rats were divided into eight groups: Sham, STZ, IPreC, MCAo, IPreC+MCAo, STZ+IPreC, STZ+MCAo and STZ+IPreC+MCAo groups. We induced transient MCAo seven days after STZ-induced diabetes, and performed IPreC 72 hours before transient MCAo. Remote myocardial injury was investigated histopathologically. Bax, Bcl2 and caspase-3 protein levels were measured by Western blot analysis. Total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) of myocardial tissue were measured by colorimetric assay. Oxidative stress index(OSI) was calculated as TOS-to-TAS ratio. For all statistical analysis,  $p$  values  $< 0.05$  were considered significant.

**Results:** We observed serious damage including necrosis, congestion and mononuclear cell infiltration in myocardial tissue of the diabetic and ischemic groups. In these groups TOS and OSI levels were significantly higher; TAS levels were lower than those of IPreC related groups ( $p < 0.05$ ). IPreC had markedly improved histopathological alterations and increased TAS levels in IPreC+MCAo and STZ+IPreC+MCAo compared to MCAo and STZ+MCAo groups ( $p < 0.05$ ). In non-diabetic rats, MCAo activated apoptotic cell death via increasing Bax/Bcl2 ratio and caspase-3 levels. IPreC reduced apoptotic cell death by suppressing pro-apoptotic proteins. Diabetes markedly increased apoptotic protein levels and the effect did not reversed by IPreC.

**Conclusions:** We could suggest that IPreC attenuates myocardial injury via ameliorating histological findings, activating antioxidant mechanisms, and inducing antiapoptotic activity in diabetic rats. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(6):516-526)

**Keywords:** Ischemic Preconditioning Myocardial; Middle Cerebral Artery; Rats; Diabetes Mellitus, Experimental.

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

Correspondência: Ozge Altintas •

Kirklareli State Hospital, Kirklareli – Turquia

E-mail: dr.ozgealtintas@gmail.com

Artigo recebido em 23/01/2017, revisado em 20/06/2017, aceito em 31/07/2017

DOI: 10.5935/abc.20170164

### Introdução

O pré-condicionamento isquêmico (IPreC) foi descrito como redutor da lesão de isquemia-reperusão ao desencadear episódios transitentes e breves de isquemia para órgãos alvo. O IPreC pode ser induzido localmente quando o estímulo de pré-condicionamento é aplicado ao mesmo tecido ou pode ser uma proteção em tecidos distantes, um fenômeno conhecido como IPREC remoto (rIPreC).<sup>1</sup> O rIPreC pode aplicar-se principalmente a um órgão alvo, mas se uma isquemia breve é induzida em tecido não alvo, confere proteção em um local remoto, como o cérebro, tecido miocárdico adjacente não infartado, pulmão, rim, intestino ou músculo esquelético. O rIPreC produz um grau similar de proteção de tecido como faz o IPreC.<sup>1-5</sup> Estudos recentes indicaram que uma isquemia-reperusão breve induzida em tecido adicional poderia fornecer efeito protetor de tecido em um local remoto por vias de sinalização anti-inflamatórias, neuronais e humorais.<sup>1,6</sup>

Vários estudos mostraram que a hiperglicemia causa disfunção endotelial nas barreiras sanguíneas e cardiomiopatia diabética.<sup>7-9</sup> Estudos clínicos demonstraram que a hiperglicemia aumentou o tamanho da área de infarto isquêmico e causou pobre desfecho clínico após o AVC.<sup>10</sup>

O estresse oxidativo é um parâmetro principal para avaliação de lesões de isquemia/reperusão em pacientes com diabetes mellitus.<sup>11,12</sup> As células do miocárdio também sofrem morte em resposta a hiperglicemia e lesão de isquemia/reperusão.<sup>13</sup> No presente estudo, postulamos que existe um possível efeito remoto do pré-condicionamento isquêmico cerebral no miocárdio.

O banco de dados atual mostra a conexão entre doença cardíaca e AVC agudo. A arritmia cardíaca, a disfunção miocárdica e a elevação da enzima cardíaca sérica são conhecidas por se desenvolver após o acidente vascular cerebral agudo.<sup>14</sup> Os eventos cerebrovasculares isquêmicos agudos podem induzir várias alterações miocárdicas. As lesões cardíacas não são observadas antes de seis horas após o evento cerebral agudo, e não mais de duas semanas, ocorrendo lesão cardíaca como resultado da ativação intensa do sistema nervoso simpático.<sup>15</sup>

Diabetes é um importante fator de risco modificável para acidentes vasculares cerebrais, especialmente acidentes vasculares cerebrais isquêmicos. Neste estudo, nós hipotetizamos que o pré-condicionamento isquêmico poderia desempenhar um papel crucial na cardio-neuroproteção, que foi desencadeada pela hiperglicemia. Portanto, buscamos avaliar o efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto no tecido miocárdico após a lesão transitória intraluminal de reperusão isquêmica cerebral intra-angina em ratos diabéticos e não-diabéticos.

### Métodos

#### Animais

Todos os animais foram obtidos do Laboratório Experimental de Pesquisa Animal da Bezmialem Vakif University, Istambul, Turquia. Os animais tiveram acesso livre

aos alimentos e à água a temperatura ambiente controlada (22-25°C) sob um ciclo 12/12 horas diurno / noturno durante a duração do estudo. Durante os procedimentos cirúrgicos, a temperatura corporal foi monitorada usando um termômetro infravermelho Nimomed®.

#### Indução de diabetes mellitus experimental por Estreptozotocina em ratos

A estreptozotocina (STZ) induz diabetes em 3 dias, destruindo as células beta pancreáticas.<sup>16,17</sup> A solução de estreptozotocina (STZ, Sigma Chemical Corp., Alemanha) foi preparada em tampão de citrato a 0,1 mol/L, pH 4,5, imediatamente antes da utilização. O diabetes foi induzido em ratos por uma única injeção de STZ na dose de 50 mg/kg do peso corporal intraperitonealmente e foram alimentados normalmente a partir de então. A insulina não foi administrada. Os outros grupos de animais receberam um volume igual de solução salina. As concentrações de glicose no sangue foram monitoradas antes da injeção de STZ, na 6ª hora após a injeção de STZ e no 3º dia após a injeção de STZ usando um ACCU-CHEK® (Active Glucometer, Roche Diagnostics GmbH, Alemanha). As amostras de sangue foram coletadas das veias dorsais do pé do rato. Os ratos com uma concentração de glicose superior a 300 mg/dL foram considerados diabéticos.<sup>18,19</sup> Todos os ratos tornaram-se diabéticos após a injeção de STZ. De acordo com a pesquisa experimental publicada, cerca de seis horas depois, ocorre hipoglicemia com altos níveis de insulina no sangue.<sup>11</sup> Para contra-arrestar a hipoglicemia inicial após a injeção de STZ, incluímos a opção de que os ratos tomassem 10% de dextrose na água fornecida aproximadamente 6 horas após a injeção de STZ, além da sua água normal, durante as primeiras 24 horas.

#### Pré-condicionamento isquêmico (IPreC)

O pré-condicionamento isquêmico (IPreC) envolveu três ciclos de 10 minutos de reperusão e 10 minutos de oclusão da Artéria carótida interna proximal unilateral esquerda.<sup>5</sup> O IPreC foi realizada 72 horas antes de MCAo e 4 dias após em ratos diabéticos induzidos por STZ. Os animais foram anestesiados com cetamina (4 mg / 100 g) e xilazina (1,5 mg / 100 g) por injeção intramuscular e colocados em uma placa de operação na posição supina. Suas cabeças e membros foram fixados. Após o barbeado e a esterilização, realizou-se uma incisão medial cervical (3-4 cm de comprimento). A fásia precervical e os músculos foram isolados com fórceps, e fásia e músculo no interior do esternocleidomastoideo foram dissociados. Os pulsos arteriais eram visíveis. Os tecidos que rodeavam a artéria foram cuidadosamente dissociados, sem lesão no nervo vago. A artéria carótida comum esquerda e a artéria carótida externa esquerda foram expostas através de uma incisão na linha média do pescoço. Primeiro, a artéria carótida interna esquerda (ACI) foi ocluída por micro clamp. Depois, o micro clamp foi removido para restaurar o fluxo sanguíneo após 10 minutos de reperusão, seguido de 10 minutos de oclusão. Após a remoção do micro clamp, observamos que a ACI esquerda foi reinjetada de forma anterograde. Os controles da cirurgia Sham foram operados com os mesmos procedimentos sem oclusão da artéria.

### Oclusão da artéria cerebral média (MCAo)

O modelo de AVC mais comum, devido à sua relevância para o acidente vascular cerebral humano, é o MCAo focal.<sup>20,21</sup> No presente estudo, induzimos um MCAo proximal transitório de 3 horas seguido de reperfusão de 3 horas para causar lesão remota de isquemia-reperfusão afim de medir o nível de marcadores de estresse oxidativo e verificar se eles estavam associados com danos no tecido miocárdico e também o possível efeito protetor do pré-condicionamento isquêmico. A isquemia cerebral focal foi induzida utilizando uma técnica endovascular de oclusão arterial cerebral média, conforme descrito anteriormente.<sup>20,21</sup> A operação sham consistiu na mesma manipulação, mas sem introdução do monofilamento.

### Design do estudo

A análise de potência foi utilizada para estimar o tamanho da amostra. O tamanho da amostra foi calculado para ser quarenta e oito com uma margem de erro de 3% em um nível de significância de 0,05 para o valor de potência de 80% (erro Tipo I = 0,05; potência estatística = 0,80). Quarenta e oito ratos machos Sprague-Dawley (450-500 g; 10-12 meses) foram divididos em oito grupos; Grupo operado Sham (n = 6), grupo de ratos diabéticos induzidos por STZ (STZ) (n = 6), grupo MCAo (n = 6), grupo pré-condicionamento isquêmico (IPreC) (n = 6), pré-condicionamento isquêmico (IPreC) + Grupo MCAo (n = 6), Grupo de diabéticos (STZ) pré-condicionamento isquêmico (IPreC) (n = 6), Grupo de Diabéticos (STZ) Grupo MCAo (n = 6) e Diabético (STZ) Pré-condicionamento isquêmico (IPreC) + Grupo MCAo (n = 6).

Um MCAo proximal transitório de 3 horas foi induzido nos grupos experimentais (MCAo, IPreC + MCAo, STZ + MCAo, STZ + IPreC + MCAo). Induzimos MCAo sete dias após a diabetes induzida por STZ e também realizamos IPreC 72 horas antes do MCAo para avaliar se o IPreC poderia ter um efeito protetor no tecido remoto. Todos os animais foram sacrificados na 6ª hora após 3 horas de oclusão seguida de 3 horas de reperfusão. Os volumes totais de infarto hemisférico de cada cérebro de ratos foram avaliados analisando.<sup>2,3,5</sup> alterações de coloração do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) nos gânglios basais e córtex, que são as localizações do núcleo isquêmico neste modelo. Além disso, todos os animais foram pesados todos os dias durante o período de estudo usando uma escala digital. As concentrações de glicose no sangue foram monitoradas antes da injeção de STZ, na 6ª hora após a injeção de STZ, no 3º dia após a injeção de STZ e após o sacrifício dos ratos.

### Avaliação do volume de infarto

Os volumes de infarto foram calculados usando seções cerebrais tingidas com TTC, conforme descrito anteriormente.<sup>5</sup> Após o sacrifício, os cérebros foram removidos imediatamente e cortados em seções coronais de 2 mm. As amostras foram então incubadas durante 30 min numa solução a 2% de TTC a 37°C e fixadas por imersão em 10% de solução de formalina tamponada. Cinco seções cerebrais por animal foram coradas com TTC e depois fotografadas. Os volumes de infarto cerebral foram avaliados utilizando o programa de análise de imagem do Adobe Photoshop CS5 estendido (versão 12.1).

### Homogeneização de tecidos

O ventrículo esquerdo foi cortado em pedaços adequadamente pequenos para análise (300 mg) e colocado em tubos de microcentrifugado, lavado 3x com 1 ml de PBS e aspirado. Foram utilizadas pérolas de aço inoxidável (mistura de 1,6 mm) para homogeneização com tampão de lise NP-40 (Tris-Cl 2 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol a 10% e NP-40 a 0,2% mais um coquetel inibidor de protease). Após a homogeneização, os homogeneizados foram centrifugados a 19,700 x g durante 30 minutos a + 4°C. O sobrenadante foi usado como amostra de proteína.

### Medição do estado do oxidante total

O nível de TOS do miocárdio foi medido usando um novo método automatizado desenvolvido por Erel.<sup>22</sup> Os oxidantes presentes numa amostra oxidam o íon ferroso de um complexo de o-dianisidina para íon férrico. A oxidação é aumentada pelo glicerol, que é abundante no meio de reação, e o íon férrico forma um complexo colorido com laranja xilenol em condições ácidas. A intensidade da cor, que pode ser medida por espectrofotometria, está associada ao nível total de oxidantes presentes. O peróxido de hidrogênio é usado para calibrar o ensaio e os resultados são expressos em termos de micromoles de peróxido de hidrogênio equivalente por litro (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> equiv./l).

### Medição do estado antioxidante total

O nível de TAS do miocárdio foi medido usando outro método inovador automatizado desenvolvido por Erel.<sup>23</sup> Envolve a produção do radical hidroxilo, que é um potente reagente biológico. Uma solução de íons ferrosos (Reagente 1) é misturada com peróxido de hidrogênio (Reagente 2). Os radicais produzidos pelo radical hidroxilo, incluindo o catião do radical dianisidínio marrom, também são potentes em termos biológicos. Assim, é possível medir a capacidade antioxidante de uma amostra em termos de inibição de reações de radicais livres iniciadas pela produção do radical hidroxilo. A variação nos dados de ensaio é muito baixa (menos de 3%) e os resultados são expressos como mmol Trolox equiv./l. Os resultados foram dados para 1 mg de proteína total em tecido.

### Medição do índice de estresse oxidativo (OSI)

O nível de OSI foi a relação do TOS-miocárdico e o TAS miocárdico, mas os valores de TAS foram alterados para mmol/l. Cada OSI foi calculado da seguinte forma: OSI (unidades arbitrárias) = TOS (mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/l) / TAS (mmol Trolox/l).<sup>24</sup>

### Análise histopatológica

O ventrículo esquerdo também foi avaliado para análise histopatológica. As seções foram coradas com os métodos de hematoxilina-eosina e tricromo de Masson. Usamos hematoxilina-eosina para detecção rotineira de alterações patológicas, incluindo necrose, congestionamento e infiltração. O método tricrômico de Masson foi escolhido para determinar a fibrose no miocárdio, se houver. As seções foram examinadas e marcadas por um observador que era cego à identificação dos grupos usando um microscópio Nikon

Eclipse i5 com câmera Nikon DS-Fi1c e sistemas de análise de imagem Nikon NIS Elements versão 4.0 (Nikon Instruments Inc., Tóquio, Japão). O dano do miocárdio foi avaliado em termos de necrose, congestionamento e infiltração de células mononucleares. Cada dado foi classificado como: 0: ausente, 1: mínimo, 2: moderado, 3: dano severo.

### Western Blot

A proteína de membrana total foi extraída das amostras de tecido homogeneizado do modo seguinte. Os tecidos cardíacos de todos os grupos foram homogeneizados em tampão de lise (Tris-Cl 2 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol a 10% e coquetel inibidor de protease NP-40 + 0,2%) durante 30 min em gelo. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados (Beckman Coulter, Krefeld, Alemanha) a 19,700 x g durante 10 min a 4° C, e o sobrenadante final foi utilizado como proteína de membrana total. As amostras de gel foram feitas adicionando 100 µl de tampão de amostra de Laemmli contendo 2% de SDS (Santa Cruz, Paso Robles, CA) a uma proteína total de 10 mg. A concentração de proteína foi medida usando o método de Bradford, foram carregados 40 microgramas de proteína total de cada amostra em um gel de electroforese de poli-acrilamida de poliéster de sódio a 8% a 12% (PAGE) para separação. A proteína separada foi transferida para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (Millipore, Billerica, MA). Após a incubação em 5% de leite desnatado durante 2 h à temperatura ambiente para bloquear a ligação não específica, a membrana de PVDF foi feita reagir durante 16 h a 4° C. Os anticorpos monoclonais de coelho anti-rato caspase 3, Bax e Bcl-2 foram adquiridos da Sigma -Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Todos os anticorpos foram diluídos 1: 1000 em solução salina tamponada com Tris mais Tween 20 (TBST: Tris HCl 20 mM, NaCl 137 mM e Tween-20 a 0,1%, pH 7,6) contendo 5 de leite em pó desnatado. A membrana foi então lavada com solução salina tamponada com tris mais Tween (TBST: Tris HCl 20 mM, NaCl 137 mM e Tween-20 a 0,1%, pH 7,6) três vezes durante 10 minutos cada vez e incubadas com peroxidase de rábano (HRP) - Anticorpos de IgG anti-coelho marcados diluídos 1: 5000 em TBS contendo 5% de leite desnatado (Santa Cruz). Finalmente, a membrana de PVDF foi lavada três vezes com TBST por 10 min cada vez, feita reagir com o substrato de transferência Western Pierce ECL (Thermo Scientific) e visualizada utilizando o Fusion Fx7 Imaging System (Vilber Lourmat SA, França). O anticorpo do β-actina (Santa Cruz) foi utilizado como um controle de carga. Para análise semiquantitativa, as escalas de cinza das bandas Caspase-3, Bax, Bcl-2 e β-actina foram medidas usando o software Image J. A proporção de Caspase 3, Bax, Bcl-2 para β-actina foi calculada.

### Análise estatística

A normalidade de todos os dados foi testada com o teste Kolmogorov-Smirnov D. Uma vez que eles foram normalmente distribuídos (teste Kolmogorov-Smirnov D,  $p \geq 0,05$ ), o teste ANOVA paramétrico (post-hoc: HSD de Tukey) foi utilizado para comparações múltiplas. As medidas contínuas são expressas como média e desvio padrão (média ± 2SD) para cada grupo. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todas

as análises estatísticas e gráficos de barras foram realizadas com SPSS 20.0 (IBM, Nova York, EUA), MS Office Excel e Graph Pad Prism 6.

## Resultados

### Avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo

O valor de TAS miocárdico médio mais baixo foi detectado em  $0,96 \pm 0,15$  (média ± 2SD) do grupo STZ + MCAo, enquanto os valores mais altos foram medidos como  $1,58 \pm 0,56$  e  $1,57 \pm 0,88$  nos grupos sham e IPreC + MCAo, respectivamente. A indução de lesão por reperfusão de isquemia diminuiu significativamente o TAS miocárdico em todos os grupos relacionados quando comparado aos grupos sham e IPreC ( $p = 0,003$  e  $p = 0,042$ , respectivamente). Além disso, o pré-condicionamento isquêmico aumentou significativamente o valor médio de TAS do miocárdio após lesão de isquemia-reperfusão em ratos não-diabéticos (IPreC + MCAo versus MCAo ( $1,07 \pm 0,30$ ),  $p = 0,008$ ), enquanto o efeito protetor não apareceu em ratos diabéticos (STZ + MCAo + IPreC ( $1,13 \pm 0,50$ ) versus STZ + MCAo ( $0,96 \pm 0,30$ ),  $p > 0,05$ ).

Os níveis médios de TOS do miocárdio dos grupos STZ e MCAo foram  $12,79 \pm 1,12$  e  $12,74 \pm 1,54$ , respectivamente. Assim, esses níveis de grupos IPreC ( $11,17 \pm 1,26$ ) e sham ( $11,05 \pm 1,56$ ) foram semelhantes. O resultado pode indicar que o pré-condicionamento isquêmico não excede o limiar de danos nos tecidos. Além disso, um estudo clínico relatou que o diabetes pode prevenir o pré-condicionamento isquêmico.<sup>25</sup> Em contraste, descobrimos que o pré-condicionamento isquêmico reduziu a capacidade oxidante em ratos diabéticos (STZ vs. IPreC + STZ ( $11,62 \pm 1,74$ ),  $p = 0,036$ ). Da mesma forma, o IPreC reduziu significativamente o nível médio de TOS miocárdico em ratos diabéticos e não diabéticos submetidos à oclusão da artéria cerebral média (MCAo vs. IPreC + MCAo ( $10,96 \pm 1,72$ ),  $p < 0,001$ ; STZ + MCAo ( $12,81 \pm 1,46$ ) vs. STZ + MCAo + IPreC ( $12,33 \pm 0,58$ ),  $p = 0,04$ ).

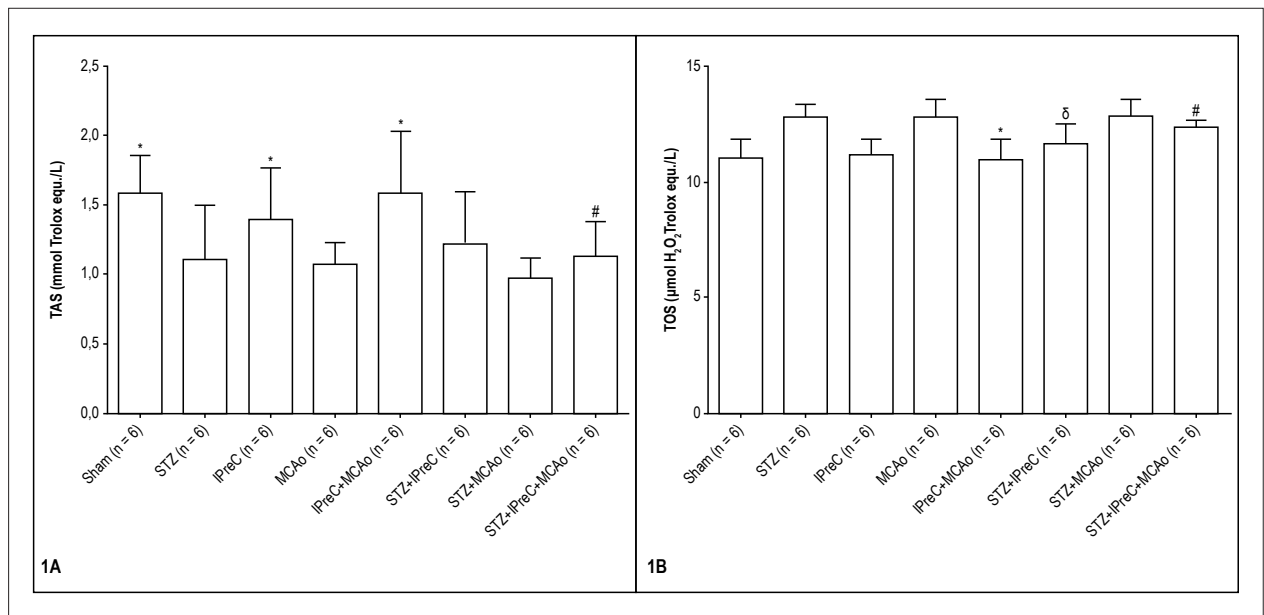
Em todos os grupos de estudo, o maior valor do OSI, que é determinado com base na relação miocárdica TOS/TAS, foi detectado como  $12,15 \pm 4,26$  e  $13,61 \pm 5,28$  nos grupos MCAo e STZ + MCAo, respectivamente. Tanto os ratos diabéticos como os não diabéticos que foram induzidos por lesão de isquemia-reperfusão, demonstraram significativamente valores inferiores de OSI após IPreC, em comparação com os não relacionados a IPreC (MCAo vs. IPreC + MCAo,  $p = .005$  e STZ + MCAo vs. STZ + IPreC + MCAo,  $p = 0,037$ ).

Os níveis médios de estado antioxidante total do miocárdio (TAS, Figura 1A), estado de oxidação total (TOS, Figura 1B) e índice de estresse oxidativo calculado (OSI: TOS/TAS, Figura 2) para todos os grupos são mostrados em gráficos de barras.

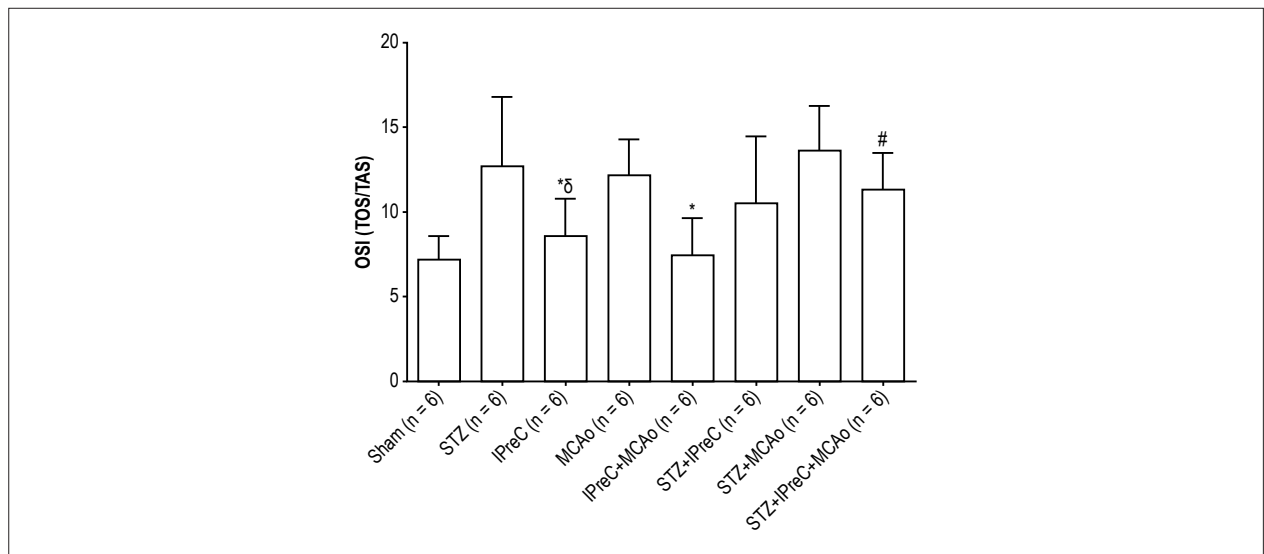
### Histopatologia do miocárdio

A arquitetura histológica dos tecidos cardíacos do grupo IPreC foi semelhante à do grupo sham (Figura 3 (1)). Os tecidos cardíacos de grupos isquêmicos e diabéticos apresentaram alterações histopatológicas graves, incluindo





**Figura 1** – Nivel médio de TAS do miocárdio (estado antioxidante total) e TOS (estado do oxidante total) em todos os grupos. (\*  $p < 0,05$  versus grupo MCAo,  $np < 0,05$  vs. STZ + grupo MCAo,  $\delta p < 0,05$  vs. grupo STZ. ANOVA unidirecional, teste HSD de Tukey pós-hoc. (STZ, diabéticos induzidos por Estreptozotocina, IPreC, Pré-condicionamento isquêmico, MCAo, oclusão da artéria cerebral média).

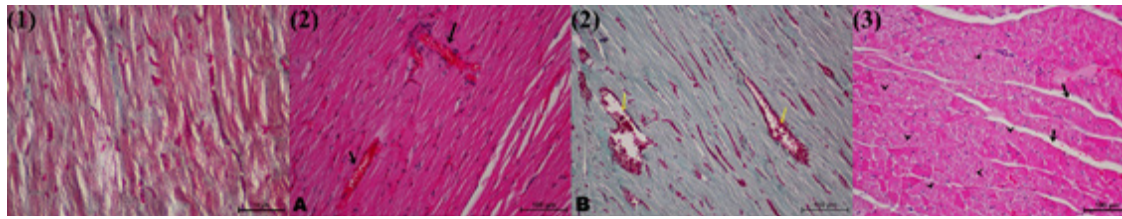


**Figura 2** – Valores médios de OSI (índice de estresse oxidativo) em todos os grupos. (\*  $p < 0,05$  versus grupo MCAo,  $np < 0,05$  vs. STZ + grupo MCAo,  $\delta p < 0,05$  vs. grupo STZ. ANOVA unidirecional, teste HSD de Tukey pós-hoc. (STZ, diabéticos induzidos por Estreptozotocina, IPreC, Pré-condicionamento isquêmico, MCAo, oclusão da artéria cerebral média).

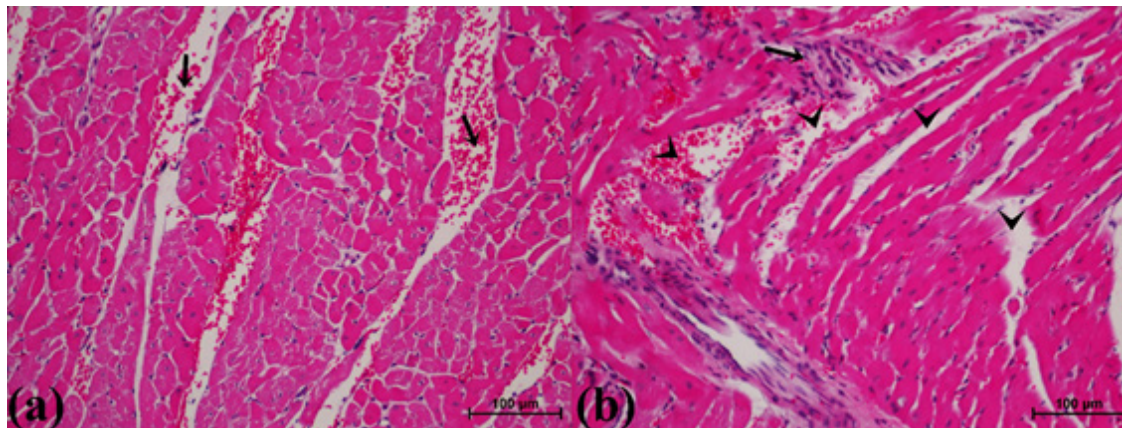
congestão, necrose e infiltração de células mononucleares. O escore médio de congestão (MCS) do tecido miocárdico foi semelhante entre STZ e MCAo ( $p > 0,05$ ,  $2,00 \pm 1,42$ ,  $2,00 \pm 1,26$ , respectivamente). O valor médio de congestionamento miocárdico mais alto foi avaliado no grupo STZ + MCAo ( $2,50 \pm 1,10$ ). O IPreC remoto diminuiu o escore de congestão miocárdica nos grupos IPreC + MCAo ( $1,85 \pm 0,76$ ) (Figure 3 (2a)) e STZ + IPreC + MCAo ( $1,87 \pm 1,78$ ) (Figure 3 (2b)) quando comparados aos grupos MCAo e STZ + MCAo, respectivamente.

Essas diferenças não foram encontradas estatisticamente significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

As fibrilas necróticas raramente apareceram no tecido miocárdico de grupos IPreC e sham. O escore de necrose média (MNS) do miocárdio no grupo IPreC foi registrado como  $2,00 \pm 1,26$ . Esse escore não foi encontrada significativamente diferente da do grupo sham ( $p > 0,05$ ). Diabetes e isquemia causaram necrose coagulativa extensa ao longo do parênquima cardíaco, em comparação com o grupo sham ( $p = 0,001$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente).



**Figura 3** – (1) Visão histológica normal das miofibrilas cardíacas no grupo IPreC. (Seção longitudinal, Coloração de Masson Trichrome, ampliação: 40X). (2) Congestão nos grupos IPreC + MCAo (A) e STZ + IPreC + MCAo (B). Visão geral da miofibrila é aparência quase normal. (Seção longitudinal, A. H-E, coloração B. Coloração Masson Trichrome, ampliação: 20X). (3) As áreas coradas eosinofílicas mostram miofibrilas necróticas que são falta de núcleos (pontas de seta) no grupo STZ. As setas indicam espaços entre miofibrilas cardíacas. Esses espaços indicam área necrótica e, provavelmente edema intersticial. (STZ, diabéticos induzidos por Estreptozotocina, IPreC, pré-condicionamento isquêmico, MCAo, oclusão da artéria cerebral média, seção transversal, coloração H-E, ampliação: 20X).



**Figura 4** – (a) Congestão (setas) destruiu miofibrilas no grupo STZ + MCAo. As miofibrilas cardíacas estão separadas umas das outras, juntamente com a área congestiva. Essas áreas provavelmente parecem ser áreas necróticas acompanhadas de edema intersticial. (Seção transversal, coloração H-E, ampliação: 20X). (b) Infiltração de células mononucleares, congestão e edema intersticial em áreas necróticas (setas) destruiu miofibrilas cardíacas no grupo STZ + MCAo (STZ, diabéticos induzidos por Estreptozotocina, IPreC, pré-condicionamento isquêmico, MCAo, oclusão da artéria cerebral média, seção longitudinal, coloração HE, Ampliação: 20X).

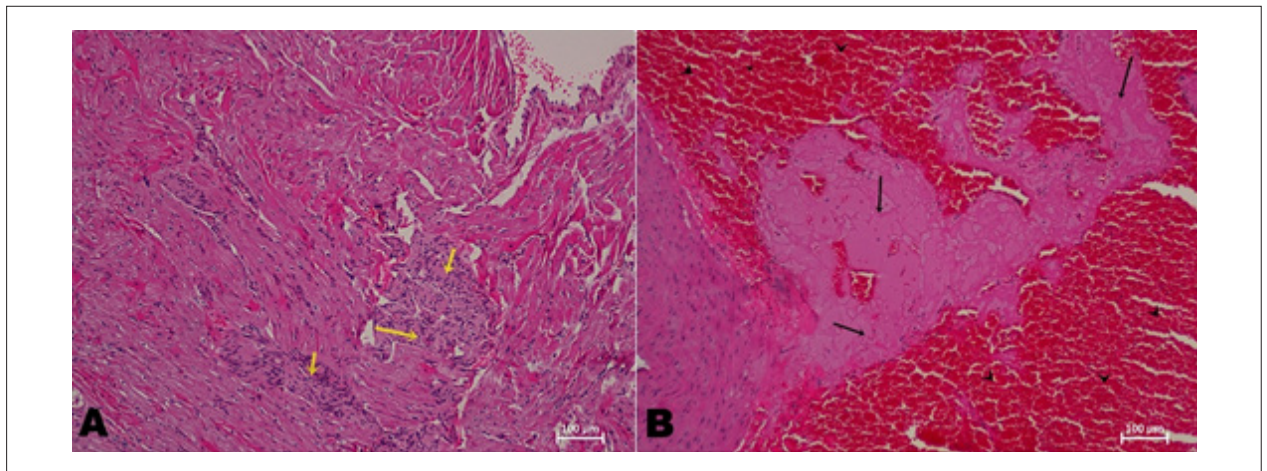
Após a lesão de isquemia-reperfusão em ratos diabéticos, as fibrilas miocárdicas e os núcleos de miócitos tornaram-se pouco visíveis e quase desapareceram (Figura 3 (3)) e os espaços entre fibrilas miocárdicas se tornaram maiores, provavelmente indicando edema intersticial (Figura 4 (b)). O MNS mais alto foi detectado como  $2,66 \pm 1,04$  no grupo STZ + MCAo. Mais uma vez, existem diferenças consistentes entre os grupos IPreC + MCAo e STZ + IPreC + MCAo e os grupos MCAo e STZ + MCAo quanto ao escore de necrose média ( $p < 0,001$ , para ambos).

A infiltração de células mononucleares foi observada principalmente em torno das áreas necróticas acompanhadas de edema intersticial em grupos isquêmicos, incluindo MCAo e STZ + MCAo (Figura 4 (b)). Os valores médios de infiltração mais altos (MIS) foram registrados no grupo MCAo e STZ + MCAo. A infiltração destruiu severamente as miofibrilas e degenerou o miocárdio nos grupos MCAo (Figura 5A) e STZ + MCAo (Figura 5B). O pré-condicionamento isquêmico remoto reduziu a infiltração de células mononucleares no parênquima miocárdico após MCAo em ratos diabéticos e não-diabéticos em comparação com controles não

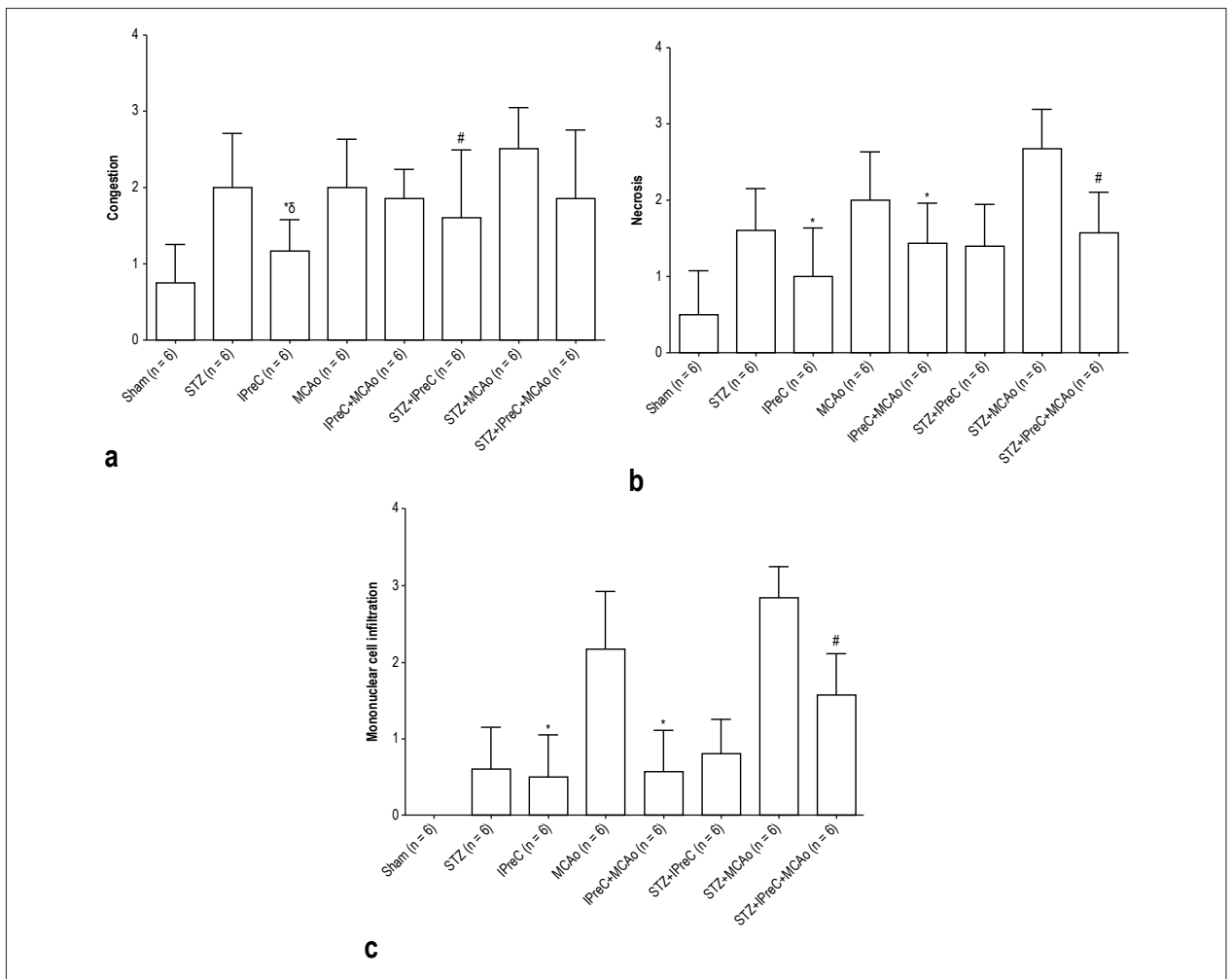
pré-condicionados (MCAo ( $2,16 \pm 1,5$ ) vs. IPreC + MCAo ( $0,57 \pm 0,46$ ),  $p = 0,013$  e STZ + MCAo ( $2,83 \pm 0,82$ ) vs. STZ + IPreC + MCAo ( $1,57 \pm 1,06$ ),  $p < 0,001$ ). Entre os grupos STZ, IPreC e STZ + IPreC, não houve diferença significativa em relação ao MIS ( $p > 0,05$ ). Como resultado, induzir estímulos de pré-condicionamento isquêmico remoto abaixo do limiar de dano, poderia reprimir a resposta inflamatória e oxidativa celular a lesões isquêmicas e diabetes, o que poderia prevenir lesões cardíacas remotas. Os escores de lesões do miocárdio como escore médio de congestão, escore de necrose média e escore médio de infiltração de células mononucleares para todos os grupos de estudo são mostrados na Figura 6 (a), 6 (b) e 6 (c), respectivamente.

#### Análise Western Blot

No grupo MCAo, a relação Bax/Bcl2 foi de  $1,18 \pm 0,26$ , e essa proporção foi encontrada como  $0,72 \pm 0,3$  no grupo IPreC ( $p = 0,026$ ) e  $0,09 \pm 0,06$  no grupo sham ( $p < 0,001$ ). Relação Bax/Bcl2 marcadamente reduzida no grupo IPreC + MCAo em comparação com o grupo MCAo ( $p < 0,001$ ).



**Figura 5** – A) Miocárdio degenerado causado por infiltração de células mononucleares (setas) no grupo MCAo. B) Miodegeneração severa com edema intersticial, necrose (setas) e congestão (pontas de seta), no grupo STZ + MCAo. (STZ, diabéticos induzidos por Estreptozotocina, IPreC, pré-condicionamento isquêmico, MCAo, oclusão da artéria cerebral média, seção longitudinal, coloração H-E, ampliação: 10X).



**Figura 6** – A) Escore médio do congestionamento em todos os grupos. (\*  $p < 0,05$  versus grupo MCAo, #  $p < 0,05$  vs. STZ + grupo MCAo,  $\delta p < 0,05$  vs. grupo STZ. B) Escore médio de necrose em todos os grupos. (\*  $p < 0,05$  vs. MCAo grupo, #  $p < 0,05$  vs. STZ + grupo MCAo. C) Escore médio de infiltração de células mononucleares em todos os grupos. (\*  $p < 0,05$  vs. MCAo grupo, #  $p < 0,05$  vs. STZ + grupo MCAo (ANOVA unidirecional, HSD Tukey pós-hoc Teste STZ, diabéticos induzidos por estreptozotocina, IPreC, pré-condicionamento isquêmico, MCAo, oclusão da artéria cerebral média).



O nível de Caspase 3 foi maior no grupo MCAo ( $1,29 \pm 0,12$ ) em comparação com os grupos sham ( $0,35 \pm 0,06$ ) e IPreC ( $0,82 \pm 0,30$ ) ( $p < 0,001$ ). Portanto, esse nível foi menor no grupo IPreC + MCAo ( $0,52 \pm 0,02$ ,  $p < 0,001$ ). IPreC suprimiu o progresso da apoptose em ratos isquêmicos não-diabéticos.

A apoptose do miocárdio foi severamente induzida pela diabetes em todos os grupos de estudo com diabetes, incluindo os grupos STZ, STZ + IPreC, STZ + MCAo e STZ + IPreC + MCAo. A maior relação de Bax/Bcl2 e os níveis de proteína da caspase 3 foram detectados nesses grupos. A diabetes isolada principalmente induziu a morte das células apoptóticas através de proteínas ativadas Bax e Caspase-3 e suprimiu a atividade de Bcl-2. O pré-condicionamento não mostrou nenhum efeito protetor contra a apoptose em grupos diabéticos. A análise de Western blots e a razão média de Bax/Bcl-2 e os níveis de caspase 3 de todos os grupos são mostrados na Figura 7 e 8, respectivamente.

### Pré-condicionamento isquêmico reduz o volume total de infarto

Não observamos nenhuma área de infarto nas seções cerebrais tingidas com TTC dos grupos STZ, Sham, IPreC e STZ + IPreC. O pré-condicionamento isquêmico antes da isquemia cerebral reduziu significativamente o tamanho do infarto em comparação com os demais grupos [IPreC + MCAo ( $27,26 \pm 20,04 \text{ mm}^3$ ) vs. MCAo ( $109,07 \pm 30,56 \text{ mm}^3$ )  $p < 0,001$ ; STZ + IPreC + MCAo ( $38,70 \pm 19,18 \text{ mm}^3$ ) vs. STZ + MCAo ( $165,87 \pm 82 \text{ mm}^3$ )  $p < 0,001$ , respectivamente]. Além disso, detectamos que o pré-condicionamento isquêmico poderia melhorar a lesão isquêmica em diabetes [STZ + IPreC + MCAo vs. MCAo  $p < 0,001$ ].

### Discussão

Distúrbios cardiovasculares, incluindo hipertensão, arritmias cardíacas, liberação de biomarcadores de lesão cardíaca e disfunção ventricular esquerda são observados principalmente após vários tipos de lesão cerebral, como trauma, acidente vascular cerebral isquêmico e hemorragia subaracnóidea.<sup>14,26,27</sup> A lesão cardíaca neurogênica aumenta o risco de mortalidade e morbidade.<sup>28,29</sup> A lesão neurológica afeta o tecido cardíaco através da inflamação e da liberação da catecolamina. Ambas causam morte de células cardíacas.<sup>30</sup> Diabetes é um importante fator de risco modificável para acidentes vasculares cerebrais, especialmente acidentes vasculares cerebrais isquêmicos. Foi afirmado em estudos anteriores que a hiperglicemia também causou cardiomiopatia e resultou em similares complicações cardiovasculares com isquemia.<sup>7,8,12</sup>

A resposta precoce das células do miocárdio contra a hiperglicemia é a morte de células cardíacas.<sup>13</sup> Dois tipos de morte celular, incluindo necrose e apoptose, são detectados em cardiomiócitos de animais diabéticos.<sup>31</sup> A necrose é uma morte celular descontrolada em resposta ao estresse oxidativo. Isso provoca depleção de ATP e muda rapidamente a integridade da membrana plasmática, que acompanha a inflamação e danifica seriamente não apenas as células relacionadas, mas também células vizinhas.<sup>32,33</sup> No presente

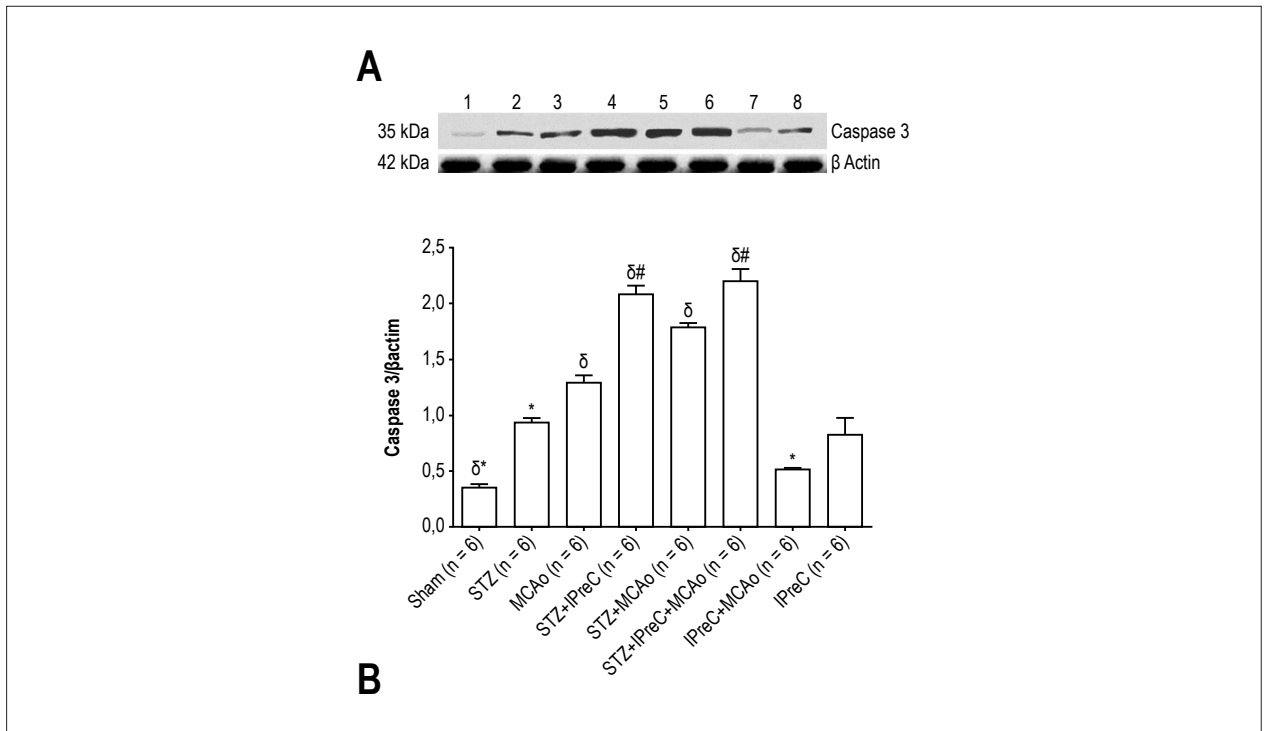
estudo, tentamos avaliar lesões cardíacas remotas após oclusão cerebral média em ratos diabéticos. Observamos extensas áreas necróticas no miocárdio de grupos STZ e MCAo, especialmente em grupos STZ + MCAo. Além disso, inflamação e edema foram vistos em torno das áreas necróticas desses grupos. O maior escore necrótico médio foi detectado no grupo STZ + MCAo em comparação com outros grupos ( $p < 0,05$ ). O IPreC é eficaz na redução do dano cardíaco induzido por MCAo por supressão da morte celular necrótica. Os escores mais baixos foram registrados em grupos pré-condicionados isquêmicos remotos. No entanto, os escores médios de necrose dos grupos STZ e STZ + IPreC foram quase similares entre si. Podemos relatar que o pré-condicionamento isquêmico remoto diminui a taxa de necrose induzida pela isquemia, mesmo que induzir a diabetes suprima o efeito protetor.

A possível explicação para o resultado pode ser a ativação do sistema de defesa antioxidante. O estresse oxidativo é um determinante primário de lesões cerebrais e miocárdicas durante a reperfusão/isquemia cerebral e miocárdica em pacientes com diabetes mellitus.<sup>11,12</sup> Os diabéticos e os modelos animais experimentais induzidos por STZ apresentam alto estresse oxidativo devido à disfunção de células  $\beta$  resultante em toxicidade de glicose; por isso a atividade do sistema de defesa antioxidante é danificada pelo diabetes.<sup>11,34</sup> TAS, TOS e OSI são amplamente utilizados em estudos para determinar a atividade de estresse oxidativo. TOS indica a concentração de todos os radicais oxidantes livres causados por diabetes e isquemia contra dano oxidativo. Por outro lado, o TAS é um marcador importante para determinar as atividades do sistema de defesa antioxidante contra danos celulares.<sup>5</sup> No presente estudo, os níveis de TOS foram bem maiores em grupos induzidos por MCAo e STZ comparados com grupos sham e IPreC, enquanto que os níveis TAS mais baixos foram detectados nesses grupos ( $p < 0,001$ ). Observamos que a OSI foi mais alta em grupos diabéticos e isquêmicos em comparação com os grupos IPreC ( $p < 0,001$ ). O IPreC inibiu o estresse oxidativo em ratos diabéticos e não diabéticos. O TAS miocárdico foi notadamente ativado pelo pré-condicionamento em grupos diabéticos e isquêmicos.

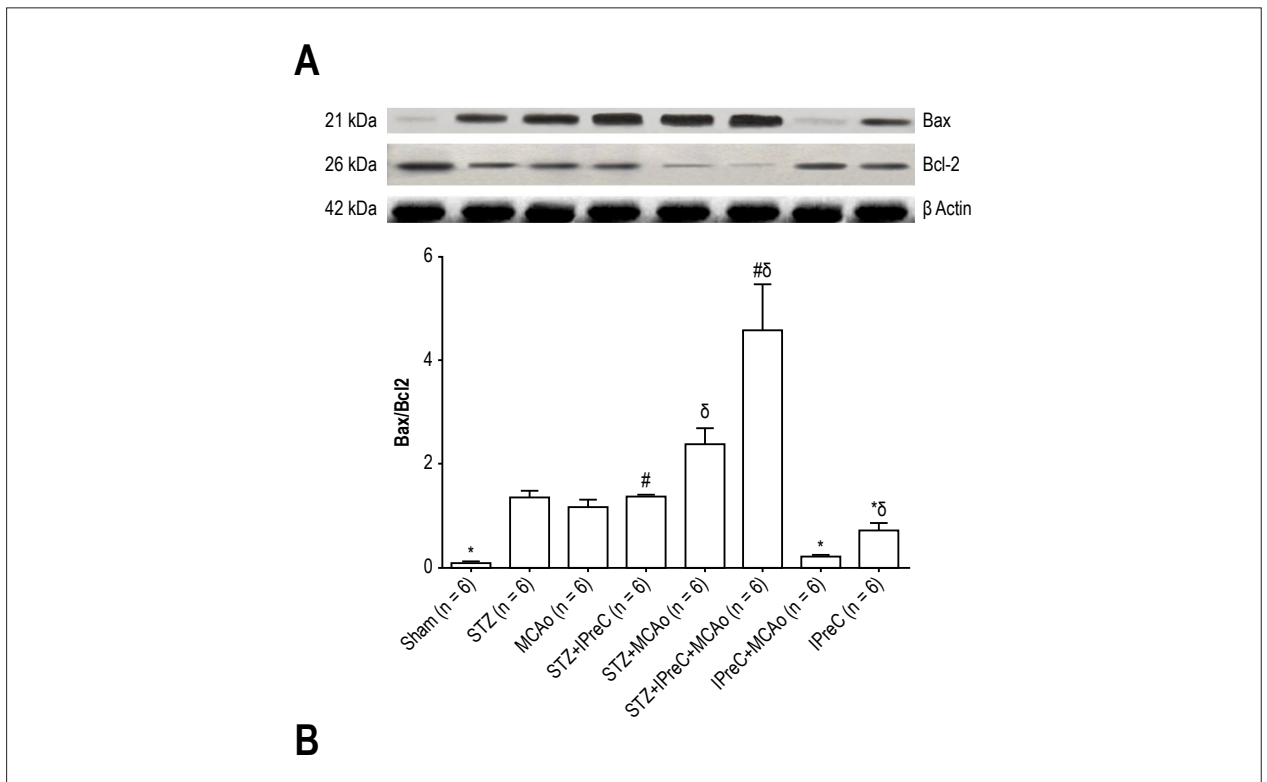
Os escores histopatológicos de outros parâmetros, incluindo congestão e infiltração celular também diminuíram nos grupos IPreC + MCAo e STZ + IPreC + MCAo. IPreC melhorou as alterações histopatológicas em grupos diabéticos e isquêmicos.

Em contraste com a necrose, a apoptose é uma morte celular programada fisiologicamente, remove apenas células danificadas sem provocar inflamação e danificar outras células vizinhas.<sup>33,35</sup> Estudos experimentais e baseados em humanos mostraram que a apoptose do miocárdio aumenta o diabetes e o diabetes induzido por STZ.<sup>36-38</sup> Assim, os miócitos cardíacos do miocárdio diabético são mais vulneráveis à apoptose do que os não diabéticos.<sup>37-39</sup> A apoptose dos miócitos cardíacos é comumente vista em várias doenças cardiovasculares, incluindo cardiomiopatia diabética, infarto do miocárdio, lesão por isquemia/reperfusão.<sup>36</sup> O pré-condicionamento é um mecanismo protetor contra a lesão orgânica induzida por isquemia/reperfusão. O pré-condicionamento isquêmico reduz acentuadamente a fragmentação do DNA e a morte celular apoptótica em miócitos.<sup>31</sup> O equilíbrio nas proteínas





**Figura 7 –** A) Análise Western blot das proteínas Bax e Bcl 2 em tecidos cardíacos de todos os grupos. B) Relação média dos níveis de Bax / Bcl 2 em todos os grupos. (\*  $p < 0,05$  versus grupo MCAo, grupo # $p < 0,05$  vs. STZ + MCAo,  $\delta p < 0,05$  vs. grupo STZ. ANOVA de sentido único, teste HSD de Tukey pós-hoc. (STZ, diabéticos induzidos por Estreptozotocina; IPreC, isquêmico Pré-condicionamento, MCAo, oclusão da artéria cerebral média).



**Figura 8 –** A) Análise de Western Blot da proteína Caspase 3 nos tecidos cardíacos de todos os grupos. B) Níveis médios de Caspase 3 em todos os grupos. (\*  $p < 0,05$  vs. grupo MCAo, # $p < 0,05$  vs. STZ + grupo MCAo,  $\delta p < 0,05$  vs. grupo STZ. ANOVA unidirecional, teste HSD post-hoc de Tukey. (STZ, diabéticos induzidos por Estreptozotocina, IPreC, Pré-condicionamento isquêmico, oclusão da MCAo, artéria cerebral média)

pró-apoptóticas Bax e anti-apoptóticas Bcl-2 regulam a via de morte celular mitocondrial.<sup>39-41</sup> Bcl-2 é importante na sobrevivência celular através da supressão da morte celular apoptótica e protege os miócitos cardíacos contra vários fatores de estresse. Por outro lado, o Bax é ativado pelo estresse oxidativo e a superexpressão da proteína Bax provoca a morte celular apoptótica.<sup>42</sup> Caspase-3 desempenha um papel fundamental na execução da apoptose, a ativação da caspase-3 sozinha foi suficiente para causar morte celular no músculo cardíaco.<sup>43</sup> A ativação da Caspase-3 está principalmente envolvida na morte celular apoptótica induzida pela hiperglicemia no miocárdio.<sup>11</sup> O IPreC inibe a apoptose alterando o equilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas e inibindo a atividade da caspase.<sup>44,45</sup> Em nosso estudo, descobrimos que o pré-condicionamento isquêmico remoto diminuiu a relação Bax/Bcl2 e a atividade da caspase 3 após lesão por isquemia-reperfusão (Grupo IPreC + MCAo vs. MCAo,  $p < 0,001$ ). Por isso, o índice de lesão miocárdica em ratos diabéticos induzidos por STZ foi detectado tão alto como nos ratos MCAo. Ao contrário dos ratos não-diabéticos, a IPreC remota não desempenhou um papel na inibição da morte celular apoptótica em ratos diabéticos.

### Conclusão

Como conclusão, o pré-condicionamento isquêmico cerebral atenua a lesão miocárdica através da melhora dos achados histológicos e ativando o mecanismo antioxidante e induzindo atividade anti-apoptótica em ratos diabéticos. O pré-condicionamento também tem efeito anti-apoptótico em ratos não-diabéticos, enquanto que não tem o mesmo efeito em ratos diabéticos. Podemos sugerir que a razão é que o processo de pré-condicionamento foi aplicado após a injeção de Estreptozotocina, portanto a apoptose já foi induzida pelo diabetes antes do processo de pré-condicionamento. Como resultado, poderíamos assumir que o IPreC remoto pode não ter mostrado efeito protetor contra a apoptose em ratos diabéticos. Mais estudos experimentais poderiam ser feitos para

determinar possíveis mecanismos que possam explicar a perda de pré-condicionamento isquêmico em corações diabéticos; as alterações vasculares e bioquímicas no miocárdio associadas à hiperglicemia induzida por STZ poderiam ser avaliadas em diferentes intervalos de tempo após pré-condicionamento isquêmico remoto.

### Agradecimentos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Cuidados e Uso Animal da Universidade de Bezmialem Vakif e realizados de acordo com as diretrizes institucionais (Decisão nº 2015-60). Este trabalho foi apoiado pela Fundação do Projeto de Pesquisa Científica fundada pela Universidade Bezmialem Vakif (3.2015/31).

### Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Obtenção de financiamento e Redação do manuscrito: Kumas M, Altintas O; Obtenção de dados: Altintas O; Análise e interpretação dos dados: Kumas M, Altintas O, Karatas E, Kocyigit A; Análise estatística: Kumas M, Karatas E; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Kumas M, Altintas O, Karatas E.

### Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo Bezmialem Vakif University, processo nº 3.2015/31.

### Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

### Referências

1. Gassanov N, Nia AM, Caglayan E, Er F. Remote ischemic preconditioning and renoprotection: from myth to a novel therapeutic option? *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(2):216-24. doi: 10.1681/ASN.2013070708.
2. Durukan A, Tatlisumak T. Preconditioning-induced ischemic tolerance: a window into endogenous gearing for cerebroprotection. *Exp Transl Stroke Med*. 2010;2(1):2. doi: 10.1186/2040-7378-2-2.
3. Bhuiyan MI, Kim YJ. Mechanisms and prospects of ischemic tolerance induced by cerebral preconditioning. *Int Neurolog J*. 2010;14(4):203-12. doi: 10.5213/inj.2010.14.4.203.
4. Pac-Soo CK, Mathew H, Ma D. Ischemic conditioning strategies reduce ischaemia/reperfusion-induced organ injury. *Br J Anaesth*. 2015;114(2):204-16. doi: 10.1093/bja/aeu302.
5. Altintas O, Kumas M, Altintas MO. Neuroprotective effect of ischemic preconditioning via modulating the expression of adropin and oxidative markers against transient cerebral ischemia in diabetic rats. *Peptides*. 2016;79:31-8. doi: 10.1016/j.peptides.2016.03.011.
6. Przyklenk K, Whittaker P. Remote ischemic preconditioning: current knowledge, unresolved questions, and future priorities. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011;16(3-4):255-9. doi: 10.1177/1074248411409040.
7. Johnstone MT, Veves A. (eds.). *Diabetes and cardiovascular disease*. 2nd ed. Totawa, New Jersey: Humana Press; 2000.
8. Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, et al. Impact of diabetes on cardiac structure and function: the Strong Heart Study. *Circulation*. 2000;101(19):2271-6. PMID: 10811594.
9. Alves MG, Martins AD, Cavaco JE, Socorro S, Oliveira PF. Diabetes, insulin-mediated glucose metabolism and Sertoli/blood-testis barrier function. *Tissue Barriers*. 2013;1(2):e23992. doi: 10.4161/tisb.23992.
10. Prakash R, Johnson M, Fagan SC, Ergul A. Cerebral neovascularization and remodeling patterns in two different models of type 2 diabetes. *PLoS One*. 2013;8(2):e56264. doi: 10.1371/journal.pone.0056264.
11. Muranyi M, Fujioka M, He Q, Han A, Yong G, Csiszar K, et al. Diabetes activates cell death pathway after transient focal cerebral ischemia. *Diabetes*. 2003;52(2):481-6. PMID: 12540624.

12. Ansley DM, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *J Pathol.* 2013;229(2):232-41. doi: 10.1002/path.4113.
13. Cai L, Kang YJ. Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy: a brief review. *Cardiovasc Toxicol.* 2001;1(3):181-93. PMID: 12213971.
14. Kolin A, Norris JW. Myocardial damage from acute cerebral lesions. *Stroke.* 1984;15(6):990-3. PMID: 6506127.
15. Song HS, Back JH, Jin DK, Chung PW, Moon HS, Suh BC, et al. Cardiac troponin T elevation after stroke: relationships between elevated serum troponin T, stroke location, and prognosis. *J Clin Neurol.* 2008;4(2):75-83. doi: 10.3988/jcn.2008.4.2.75.
16. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001;50(6):537-46. PMID: 11829314.
17. Akbarzadeh A, Norouzi D, Mehrabi MR, Jamshidi Sh, Farhangi A, Verdi AA, et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem.* 2007;22(2):60-4. doi: 10.1007/BF02913315.
18. Takeuchi K, Takehara K, Tajima K, Kato S, Hirata T. Impaired healing of gastric lesions in streptozotocin-induced diabetic rats: effect of basic fibroblast growth factor. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;281(1):200-7. PMID: 9103498.
19. Katayama S, Lee JB. Hypertension in experimental diabetes mellitus. Renin-prostaglandin interaction. *Hypertension.* 1985;7(4):554-61. PMID: 3891614.
20. Koizumi J, Yoshida Y, Nakaqawa Y, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke.* 1986;8:1-8. doi: <http://doi.org/10.3995/jstroke.8.1>
21. Altintas O, Antar V, Baran O, Karatas E, Altintas MO, Kesgin S, et al. Neuroprotective effects of hemicraniectomy in malign middle cerebral artery infarctions: experimental study. *J Neurosurg Sci* 2015 Oct 6. [Epub ahead of print].
22. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38(12):1103-11. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008.
23. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277-285. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015.
24. Hilali N, Vural M, Camuzcuoglu H, Camuzcuoglu A, Aksoy N. Increased prolidase activity and oxidative stress in PCOS. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;79(1):105-10. doi: 10.1111/cen.12110.
25. Yin X, Zheng Y, Zhai X, Zhao X, Cai L. Diabetic inhibition of preconditioning- and postconditioning-mediated myocardial protection against ischemia/reperfusion injury. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012:198048. doi: 10.1155/2012/198048.
26. van der Bilt IA, Hasan D, Vandertop WP, Wilde AA, Algra A, Visser FC, et al. Impact of cardiac complications on outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a meta-analysis. *Neurology.* 2009;72(7):635-42. doi: 10.1212/01.wnl.0000342471.07290.07.
27. Zygun D. Non-neurological organ dysfunction in neurocritical care: impact on outcome and etiological considerations. *Curr Opin Crit Care.* 2005;11(2):139-43. PMID: 15758594.
28. Lim HB, Smith M. Systemic complications after head injury: a clinical review. *Anaesthesia.* 2007;62(5):474-82. doi: 10.1111/j.1365-2044.2007.04998.x.
29. Banki NM, Zaroff JG. Neurogenic cardiac injury. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.* 2003;5(6):451-8. PMID: 14575622.
30. Gregory T, Smith M. Cardiovascular complications of brain injury. *Continuing Education Anaesthesia Critical Care & Pain.* 2012;12(2):67-71.
31. Iliodromitis EK, Lazou A, Kremastinos DT. Ischemic preconditioning: Protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(5):629-37. PMID: 18078014.
32. Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology.* 1973;7(3):253-66. doi: 10.1002/tera.1420070306.
33. Ishihara M, Inoue I, Kawagoe T, Shimatani Y, Kurisu S, Nishioka K, et al. Diabetes mellitus prevents ischemic preconditioning in patients with a first acute anterior wall myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(4):1007-1011. PMID: 11583873.
34. Bronner G, Mitchell K, Welsh FA. Cerebrovascular adaptation after unilateral carotid artery ligation in the rat: preservation of blood flow and ATP during forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18(1):118-21. doi: 10.1097/00004647-199801000-00012.
35. Kuo WW, Chung LC, Liu CT, Wu SP, Kuo CH, Tsai FJ, et al. Effects of insulin replacement on cardiac apoptotic and survival pathways in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct.* 2009;27(7):479-87. doi: 10.1002/cbf.1601.
36. Lee Y, Gustafsson AB. Role of apoptosis in cardiovascular disease. *Apoptosis.* 2009;14(4):536-48. doi: 10.1007/s10495-008-0302-x.
37. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, et al. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res.* 2000;87(12):1123-32. PMID: 11110769.
38. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: Mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes.* 2002;51(6):1938-48. PMID: 12031984.
39. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation.* 1996;94(7):1506-12. PMID: 8840837.
40. Huang Q, Bu S, Yu Y, Guo Z, Ghatnekar G, Bu M, et al. Diazoxide prevents diabetes through inhibiting pancreatic cells from apoptosis via Bcl-2/Bax ratio and p38-mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology.* 2007;148(1):81-91. doi: 10.1210/en.2006-0738.
41. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:395-419. doi: 10.1146/annurev.immunol.16.1.395.
42. Gustafsson AB, Tsai JG, Logue SE, Crow MT, Gottlieb RA. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation. *J Biol Chem.* 2004;279:21233-8. doi: 10.1074/jbc.M400695200.
43. Villapol S, Bonnin P, Fau S, Baud O, Renolleau S, Charriaud-Marlangue C. Unilateral blood flow decrease induces bilateral and symmetric responses in the immature brain. *Am J Pathol.* 2009;175(5):2111-20. doi: 10.2353/ajpath.2009.090257.
44. Marshall D, Sack MN. Apoptosis: a pivotal event or an epiphenomenon in the pathophysiology of heart failure? *Heart.* 2000;84(4):355-6. PMID: 10995395.
45. Piot CA, Martini JF, Bui SK, Wolfe CL. Ischemic preconditioning attenuates ischemia/reperfusion-induced activation of caspases and subsequent cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase in rat hearts in vivo. *Cardiovasc Res.* 1999;44(3):536-42. PMID: 10690285.