

## Efeitos do Consumo de Nitrato na Lesão de Isquemia-Reperfusão Miocárdica em Ratos Diabéticos

*Effects of Nitrate Intake on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Diabetic Rats*

Sajad Jeddi<sup>1</sup>, Saeedeh Khalifi<sup>2</sup>, Mahboubeh Ghanbari<sup>1</sup>, Fatemeh Bageripour<sup>1</sup>, Asghar Ghasemi<sup>1</sup>

Endocrine Physiology Research Center and Endocrine Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Teerã, Irã<sup>1</sup>; Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Teerã, Irã<sup>2</sup>

### Resumo

**Fundamentos:** A doença arterial coronariana é duas a três vezes mais comum em indivíduos diabéticos. O nitrato/nitrito dietético tem efeitos benéficos tanto para o diabetes quanto para a doença cardiovascular, assim como efeitos protetores contra a lesão de isquemia-reperfusão (IR) miocárdica em animais saudáveis. Porém, os efeitos do nitrato na lesão de IR miocárdica em ratos diabéticos ainda não foram investigados.

**Objetivos:** Foram examinados os efeitos sobre a lesão de IR miocárdica da adição de nitrato à dieta de ratos com diabetes mellitus tipo 2 induzido por estreptozotocina-nicotinamida.

**Métodos:** Os ratos foram divididos em quatro grupos (n = 7 em cada grupo): controle, controle+nitrato, diabetes e diabetes+nitrato. O diabetes foi induzido nos animais por injeção de estreptozotocina e nicotinamida. Nitrato (nitrato de sódio) foi adicionado à água de beber (100 mg/L) por 2 meses. Os corações foram perfundidos em sistema de Langendorff aos 2 meses e avaliados antes (basal) e após IR miocárdica em relação aos seguintes parâmetros: pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE), taxas máximas de variação positiva e negativa da pressão ventricular esquerda ( $\pm$ dP/dt), expressão do RNAm da óxido nítrico (NO) sintase (eNOS) endotelial (eNOS) e da NOS induzível (iNOS), além de níveis de malondialdeído (MDA) e metabólitos do óxido nítrico (NOx).

**Resultados:** A recuperação da PDVE e  $\pm$ dP/dt foi inferior nos ratos diabéticos versus controles, mas quase normalizou após ingestão de nitrato. Ratos diabéticos apresentaram expressão diminuída de eNOS e aumentada de iNOS tanto no estado basal quanto após IR, e o consumo dietético de nitrato restaurou estes valores para o estado normal após a IR. O nível de NOx cardíaco foi menor nos ratos diabéticos em comparação aos controles no momento basal, mas foi superior após a IR. Ratos diabéticos apresentaram níveis mais elevados de MDA tanto no estado basal quanto após IR que, juntamente com os níveis cardíacos de NOx, reduziram após consumo dietético do nitrato.

**Conclusões:** O consumo dietético de nitrato por ratos diabéticos ofereceu cardioproteção contra a lesão de IR através da regulação da expressão de eNOS e iNOS e inibição da peroxidação lipídica no coração. (Arq Bras Cardiol. 2016; 107(4):339-347)

**Palavras-chave:** Doença Arterial Coronariana; Nitratos; Nitritos; Reperfusão Miocárdica; Diabetes; Isquemia.

### Abstract

**Background:** Coronary artery disease is 2–3 times more common in diabetic individuals. Dietary nitrate/nitrite has beneficial effects in both diabetes and cardiovascular disease. It also has protective effects against myocardial ischemia-reperfusion (IR) injury in healthy animals. However, the effects of nitrate on myocardial IR injury in diabetic rats have not yet been investigated.

**Objective:** We examined the effects of dietary nitrate on myocardial IR injury in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats.

**Method:** Rats were divided into four groups (n=7 in each group): control, control+nitrate, diabetes, and diabetes+nitrate. Type 2 diabetes was induced by injection of streptozotocin and nicotinamide. Nitrate (sodium nitrate) was added to drinking water (100 mg/L) for 2 months. The hearts were perfused in a Langendorff apparatus at 2 months and assessed before (baseline) and after myocardial IR for the following parameters: left ventricular developed pressure (LVDP), minimum and maximum rates of pressure change in the left ventricle ( $\pm$ dP/dt), endothelial nitric oxide (NO) synthase (eNOS) and inducible NO synthase (iNOS) mRNA expression, and levels of malondialdehyde (MDA) and NO metabolites (NOx).

**Results:** Recovery of LVDP and  $\pm$ dP/dt was lower in diabetic rats versus controls, but almost normalized after nitrate intake. Diabetic rats had lower eNOS and higher iNOS expression both at baseline and after IR, and dietary nitrate restored these parameters to normal values after IR. Compared with controls, heart NOx level was lower in diabetic rats at baseline but was higher after IR. Diabetic rats had higher MDA levels both at baseline and after IR, which along with heart NOx levels decreased following nitrate intake.

**Conclusion:** Dietary nitrate in diabetic rats provides cardioprotection against IR injury by regulating eNOS and iNOS expression and inhibiting lipid peroxidation in the heart. (Arq Bras Cardiol. 2016; 107(4):339-347)

**Keywords:** Coronary Artery Disease; Nitrates; Nitrites; Myocardial Reperfusion; Diabetes; Ischemia.

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

Correspondência: Asghar Ghasemi •

Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, No. 24, Parvaneh Street, Yaman Street, Velenjak, Postal Code 1985717413. Teerã, I.R. Irã.

E-mail: ghasemi@endocrine.ac.ir

Artigo recebido em 06/10/15; revisado em 21/03/16; aceito em 21/03/16.

DOI: 10.5935/abc.20160137

## Introdução

A prevalência mundial de diabetes aumentou mais do que o dobro recentemente e é estimada a alcançar 592 milhões até 2035.<sup>1</sup> A doença arterial coronariana é duas a três vezes mais comum em pacientes diabéticos e é a causa da mortalidade de mais da metade destes indivíduos.<sup>2</sup> Embora vários tratamentos sejam atualmente disponíveis para pacientes com diabetes, eles não possuem eficácia suficiente. Portanto, novas estratégias devem ser examinadas.<sup>3</sup>

O consumo de nitrato é considerado uma nova estratégia potencial no manejo do diabetes tipo 2.<sup>3</sup> Durante os últimos 50 anos, o consumo de nitrato na dieta não tem sido considerado seguro devido a uma teórica associação com o desenvolvimento de doenças (incluindo o câncer gástrico).<sup>4</sup> Esta visão vem sendo questionada após demonstração da produção tecidual não-enzimática de óxido nítrico (NO) a partir de nitrato/nitrito.<sup>5</sup> A via nitrato/nitrito/NO é um sistema auxiliar na via da L-arginina-NO sintase (NOS), principalmente em condições com disfunção da NOS.<sup>6,7</sup> Dependendo da isoforma envolvida da NOS, o NO pode ter efeitos protetores ou prejudiciais sobre o coração.<sup>8</sup> A NOS endotelial (eNOS) está localizada nas caveólas, a partir das quais controla a frequência, contração, relaxamento diastólico e consumo de oxigênio do coração. A NOS induzível (iNOS) não está presente em corações saudáveis, mas é expressa durante estados patológicos, incluindo isquemia e hiperglicemia, e contribui para prejudicar a função da eNOS, possivelmente piorando a lesão miocárdica.<sup>9-11</sup>

O consumo dietético de nitrato reduz a pressão arterial, previne a disfunção endotelial e inibe a agregação plaquetária.<sup>12</sup> Investigações recentes em animais indicam que o nitrato/nitrito dietético tem efeitos benéficos no diabetes e pode aumentar o fluxo sanguíneo pancreático e secreção de insulina,<sup>13</sup> além de melhorar a resistência à insulina<sup>14</sup> e a tolerância à glicose.<sup>15</sup> O nitrato/nitrito tem efeitos protetores contra a lesão de isquemia-reperfusão (IR) miocárdica em animais saudáveis.<sup>6,16</sup> No entanto, não há estudos que tenham abordado até o momento os efeitos do nitrato na lesão de IR miocárdica no diabetes. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar os efeitos cardioprotetores do nitrato na lesão de IR em ratos com diabetes induzido por nicotinamida (NA) e estreptozotocina (STZ).

## Métodos

A proposta deste estudo foi aprovada pelo Comitê Institucional para o Cuidado e Uso de Animais (IACUC) do *Research Institute for Endocrine Sciences* (RIES, protocolo no. 12 EC RIES 92/10/25) da *Shahid Beheshti University of Medical Sciences* (Teerã, Irã).

### Animais

Ratos Wistar machos (2 meses de idade, 170–200 g) foram obtidos do centro de animais de laboratório do RIES na *Shahid Beheshti University of Medical Sciences*. Durante o estudo, os animais permaneceram no biotério a uma temperatura de  $22 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $50 \pm 6\%$ , com livre acesso à ração padrão para ratos (Pars Co., Teerã) e água de torneira.

Os animais foram adaptados a um ciclo alternado de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão por 2 semanas.

O diabetes foi induzido nos animais por injeção intraperitoneal (IP) de NA (95 mg/kg) 15 minutos antes de uma injeção IP de STZ (65 mg/kg). Dez dias após a injeção de STZ-NA, amostras de sangue foram coletadas da veia caudal dos ratos, e os animais com níveis de glicose  $> 126$  mg/dL foram considerados diabéticos.<sup>17</sup> Em seguida, os ratos foram distribuídos em quatro grupos com sete animais em cada grupo: controle (C), controle-nitrato (CN), diabetes (D) e diabetes-nitrato (DN). Cada grupo foi dividido em dois subgrupos: pré-IR (basal) e pós-IR. Nitrato (nitrato de sódio, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Alemanha) foi adicionado à água de beber dos ratos nos grupos CN e DN a uma concentração de 100 mg/L por 2 meses.

### Medidas dos parâmetros hemodinâmicos nos corações perfundidos pela técnica de Langendorff

Após 2 meses, todos os ratos foram anestesiados por injeção IP de cetamina/xilazina (50 mg/kg e 10 mg/kg) e os corações dos ratos em todos os grupos foram rapidamente removidos e imersos em uma solução tampão de perfusão gelada. Após canulação da aorta, os corações foram perfundidos pela técnica de Langendorff com solução de Krebs-Henseleit (contendo [em mM] NaCl 118, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 4,7, MgCl<sub>2</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 2,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, glicose 11 e pH=7,4) sob pressão constante (75 mmHg) e temperatura de 37 °C. A solução de Krebs foi oxigenada com O<sub>2</sub> a 95% e CO<sub>2</sub> a 5%. Após 20 minutos de estabilização, os corações dos ratos em todos os grupos foram expostos a 30 minutos de isquemia global seguidos de 60 minutos de reperfusão. Um balão de látex foi inserido no ventrículo esquerdo para permitir a medição de parâmetros hemodinâmicos, incluindo a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), a pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE), e as taxas máximas de variação positiva e negativa da pressão ventricular esquerda ( $\pm dP/dt$ ). A PDFVE, PDVE e  $\pm dP/dt$  foram digitalizadas através de um sistema de aquisição de dados (Power Lab, AD Instrument, Austrália). Os parâmetros hemodinâmicos pós-isquêmicos foram avaliados pela recuperação da PDFVE, PDVE e  $\pm dP/dt$ .

### Avaliação da peroxidação lipídica

Os níveis de malondialdeído (MDA), um marcador indireto de lesão celular que reflete a extensão da peroxidação lipídica sistêmica no coração, foram medidos pelo método de Oshawa et al.<sup>18</sup> Resumidamente, amostras foram coletadas dos corações no momento basal e durante o período pós-IR e homogeneizadas em tampão fosfato salino (PBS; 1:5, w/v) com uso de um mini-homogeneizador (MICCRA mini-D1, Alemanha). Os tecidos homogeneizados foram centrifugados (1.000 g, 4 °C, 10 min) e os sobrenadantes foram coletados para medida dos níveis de MDA; 2,5 mL de solução de ácido tricloroacético (20%) foram adicionados a 0,5 mL de sobrenadante seguido pela adição de 1 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%). A mistura foi colocada em um banho de água a 95 °C por 30 min e, após refrigerada, recebeu adição de 4 mL de n-butanol. A mistura foi agitada em vortex

e após centrifugação a 1.100 g por 10 min, a absorbância da camada superior foi medida a 532 nm com uso de um leitor ELISA (BioTek, Power wave XS2). A concentração de MDA foi calculada com uso de uma curva padrão de 1, 1, 3, 3-tetraetoxipropano e expressa em  $\mu\text{mol/L}$ .

#### Medida dos metabólitos do NO (NOx)

Os níveis de NOx nos corações foram medidos pelo método Griess. Resumidamente, amostras de corações coletadas nos períodos basal e pós-IR foram lavadas e homogeneizadas em PBS (1:5, v/v) e, em seguida, centrifugadas a 15.000 g por 20 min. O sobrenadante foi desproteínizado com adição de sulfato de zinco (15 mg/mL). A seguir, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram transferidos para uma placa de microtitulação e 100  $\mu\text{L}$  de cloreto de vanádio (III) a 8 mg/mL foram adicionados em cada poço para reduzir o nitrato a nitrito; 50  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida (2%) e 50  $\mu\text{L}$  de N-1-(naftil) etilenodiamina (0,1%) foram adicionados e as amostras foram incubadas por 30 min a 37 °C. A absorbância foi lida a 540 nm no leitor ELISA. A concentração de NOx foi determinada a partir de uma curva padrão linear estabelecida com 0–50  $\mu\text{mol/L}$  de nitrato de sódio. Os níveis teciduais de NOx foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$ .

#### Avaliação dos marcadores de lesão miocárdica no fluxo coronariano (FC)

No início da reperfusão, o FC foi coletado por um período de 5 minutos para medida do extravasamento de enzimas miocárdicas (marcadores de lesão miocárdica), incluindo a creatina quinase fração MB (CK-MB) e a lactato desidrogenase (LDH). Níveis de CK-MB e LDH no FC foram medidos através de kits comerciais (Pars Azmoon, Teerã, Irã).

Os coeficientes de variação intraensaio para as medidas de NOx, CK-MB e LDH foram de 3,7%, 4,1% e 4,7%, respectivamente.

#### Extração de RNA, síntese de DNA e PCR em tempo real

Em todos os grupos, amostras do ventrículo esquerdo do coração nos períodos basal e pós-IR foram obtidas para extração de RNA através de um método cirúrgico padrão e estéril. O RNA total foi extraído do tecido cardíaco com uso do kit de solução RNX-Plus (Fermentase, Cinagen Co., Irã) de acordo com descrição do fabricante e tratado com RNase-free DNase para remoção de qualquer resíduo de DNA genômico. A quantidade e a pureza do RNA foram medidas com NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA); DNAs complementares (DNAc) foram sintetizados a partir da incubação do RNA total com RevertAid H Minus Reverse Transcriptase, DNase I, Random Hexamer Primer, dNTPs, and RiboLock RNase Inhibitor por 10 min a 25 °C e em seguida, por 60 min a 42 °C em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . A reação foi encerrada por aquecimento a 70 °C durante 5 min.

Foi realizada PCR quantitativa em tempo real (RT-PCR) com analisador Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science, Corbett Research, Sydney, Austrália). As reações foram realizadas em alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  contendo 12,5  $\mu\text{L}$  de SYBR Green PCR Master Mix (Jena Bioscience, Alemanha), 1  $\mu\text{L}$  de primer direto, 1  $\mu\text{L}$  de primer reverso, 8,5  $\mu\text{L}$  de água RNase-free

e 2  $\mu\text{L}$  de DNAc. As sequências de primers utilizadas para a RT-PCR foram: direta 5'-TACAGCTTACCACACAGC-3' e reversa 5'-CACACTGCTAGAGGTGCTGGAA-3' para a beta-actina; direta 5'-ATGCCACAGGATTCCATACC-3' e reversa 5'-TGTGCTGGCTTTGGTGAGGTTTGA-3' para a eNOS; e direta 5'-TGGCCTCCCTCTGGAAAGA-3' e reversa 5'-TGCTGAGCTGACAGAGTAGTA-3' para a iNOS. As amplificações por PCR foram realizadas através dos três seguintes programas de ciclos: (1) Desnaturação do DNAc (1 ciclo: 10 min a 95 °C), (2) amplificação (40 ciclos: 15 seg a 95 °C, 30 seg a 60 °C e 30 seg a 72 °C), (3) análise da curva de dissociação (1 ciclo: 72 a 95 °C com taxa de transição de temperatura de 1 °C/seg durante 5 seg.). A quantificação em tempo real foi monitorada pela medida da atividade de fluorescência. Para comparar os grupos, níveis de RNAm da eNOS e iNOS foram medidos como expressão relativa com uso de valores  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  e normalizados para beta-actina gerada na mesma amostra; onde  $\Delta\Delta\text{CT} = [\text{CT}_{\text{iNOS ou eNOS (caso)}} - \text{CT}_{\text{beta-actina (caso)}}] - [\text{CT}_{\text{iNOS ou eNOS (controle)}} - \text{CT}_{\text{beta-actina (controle)}}]$ .<sup>19</sup> A especificidade das reações de PCR foi verificada pela análise de curva de dissociação.

#### Análise estatística

Todos os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada com o programa SPSS, versão 20 (SPSS, Chicago, IL, EUA). Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk foram utilizados para verificação da normalidade dos dados, com valores de  $p > 0,05$  indicando distribuição normal. Testes paramétricos e não paramétricos foram utilizados para a análise de dados com distribuição normal e não normal, respectivamente.<sup>20</sup> A análise de variância por medidas repetidas (ANOVA) foi utilizada para comparação dos parâmetros hemodinâmicos (PDVE, PDFVE e  $\pm$  dp/dt) em diferentes momentos. O teste *t* de Student foi utilizado para comparar os níveis de MDA e NOx nos momentos basal e pós-IR em cada grupo. ANOVA unifatorial com teste *post hoc* de Tukey foi utilizado para comparação dos níveis de MDA, NOx, CK-MB e LDH entre os diferentes grupos. O teste U de Mann-Whitney foi utilizado para comparação da expressão gênica nos diferentes grupos. Valores de  $p$  (bicaudal)  $< 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### Resultados

A glicemia inicial e os pesos do corpo e do coração dos animais foram semelhantes em todos os grupos. Em comparação aos animais controles, os ratos diabéticos apresentaram após injeção de STZ-NA níveis sanguíneos aumentados de glicose (196,8  $\pm$  26,4 versus 82,6  $\pm$  4,5 mg/dL;  $p < 0,05$ ), diminuição do peso corporal (239,7  $\pm$  12,3 versus 331,7  $\pm$  13,7 g;  $p < 0,05$ ) e aumento significativo da razão do peso do coração sobre o peso corporal (0,48  $\pm$  0,01 versus 0,37  $\pm$  0,01%). Ao final do estudo (dia 70), a área sob a curva da concentração plasmática de glicose durante um teste intravenoso de tolerância à glicose (TOTG) foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior em ratos diabéticos (20.264  $\pm$  659 mg/dL/60 min) quando comparada à de ratos do grupo controle (7.825  $\pm$  247 mg/dL/60 min,  $p < 0,05$ ).

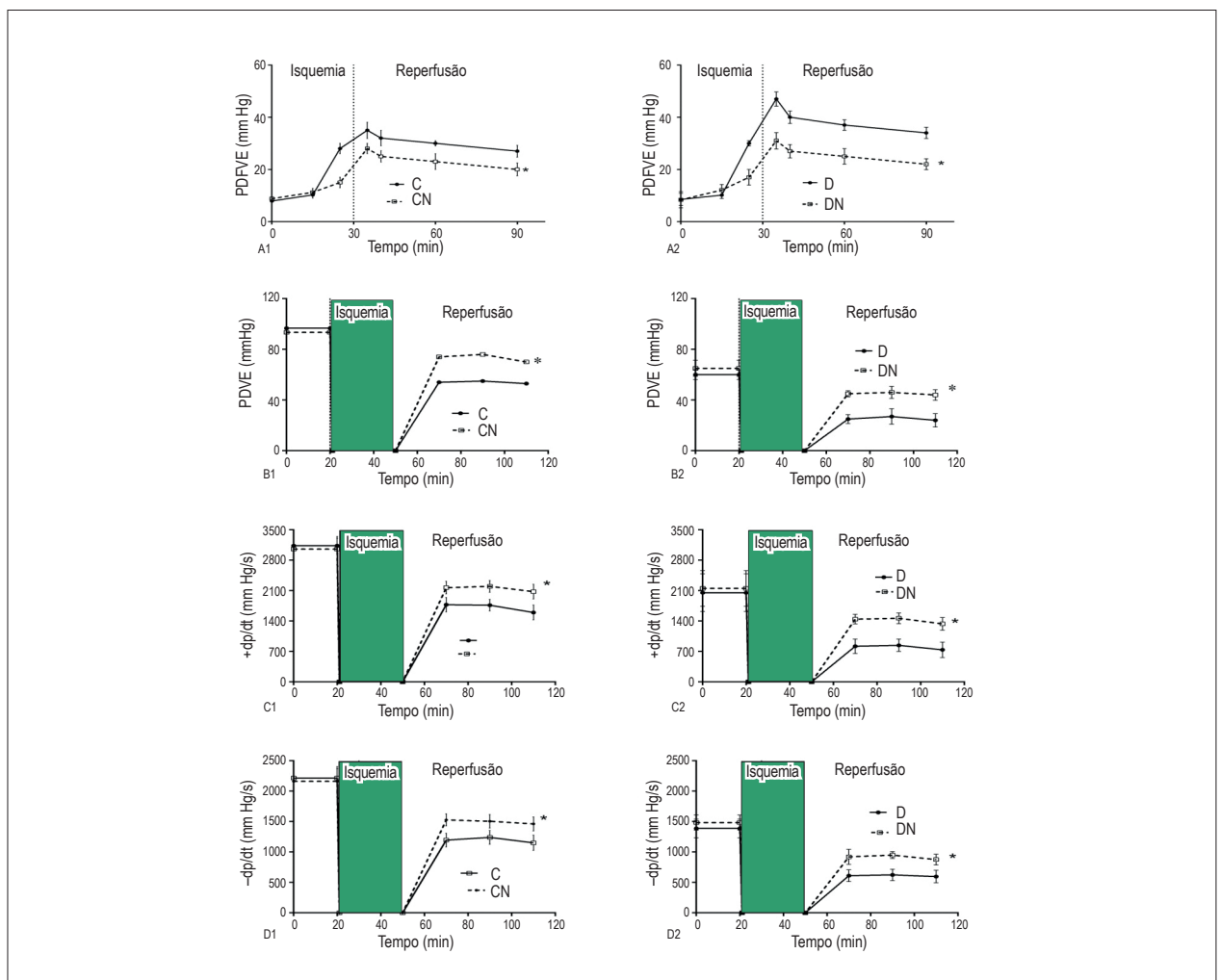
Os efeitos do nitrato dietético nos parâmetros hemodinâmicos em corações isolados durante o período de estabilização e IR estão mostrados na Tabela 1 e na Figura 1. Durante o período de estabilização, os corações de ratos diabéticos tinham PDVE e  $\pm dP/dt$  significativamente inferiores

( $p < 0,05$ ) em comparação aos dos ratos do grupo controle. O consumo de nitrato não teve efeito sobre a PDVE e  $\pm dP/dt$  no momento basal em amostras de corações de ratos CN e DN quando comparados aos de ratos controle e diabéticos, respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1 – Parâmetros da função cardíaca durante o período de estabilização**

	Controle	Controle-Nitrato	Diabetes	Diabetes-Nitrato
PDFVE (mmHg)	8,5 $\pm$ 2,2	8,8 $\pm$ 2,8	8,2 $\pm$ 1,8	7,9 $\pm$ 2,3
PDVE (mmHg)	96,7 $\pm$ 7,6	93,4 $\pm$ 6,6	60 $\pm$ 3,9*	65 $\pm$ 6,3*
+dP/dt (mmHg/s)	3.135 $\pm$ 211	3.055 $\pm$ 247	2.052 $\pm$ 434*	2.152 $\pm$ 412*
-dP/dt (mmHg/s)	2.215 $\pm$ 188	2.163 $\pm$ 205	1.387 $\pm$ 154*	1.484 $\pm$ 123*

Os dados estão expressos em média  $\pm$  EPM. Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE); pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) e taxas máximas de variação positiva e negativa da pressão ventricular esquerda ( $\pm dP/dt$ ); \* $p < 0,05$  diferença estatisticamente significativa entre os grupos D versus C e grupos DN versus CN. Controle (C), controle-nitrato (CN), diabetes (D) e diabetes-nitrato (DN).



**Figura 1 - Recuperação da função cardíaca após lesão de IR. A) Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE); B) Pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE); C) Taxas máximas de variação positiva da pressão ventricular esquerda (+dP/dt); D) Taxas máximas de variação negativa da pressão ventricular esquerda (-dP/dt). Os valores estão expressos em média  $\pm$  EPM; (n = 7 em cada grupo); \* $p < 0,05$ , em comparação aos grupos controle e diabético. Controle (C), controle-nitrato (CN), diabetes (D) e diabetes-nitrato (DN).**

## Artigo Original

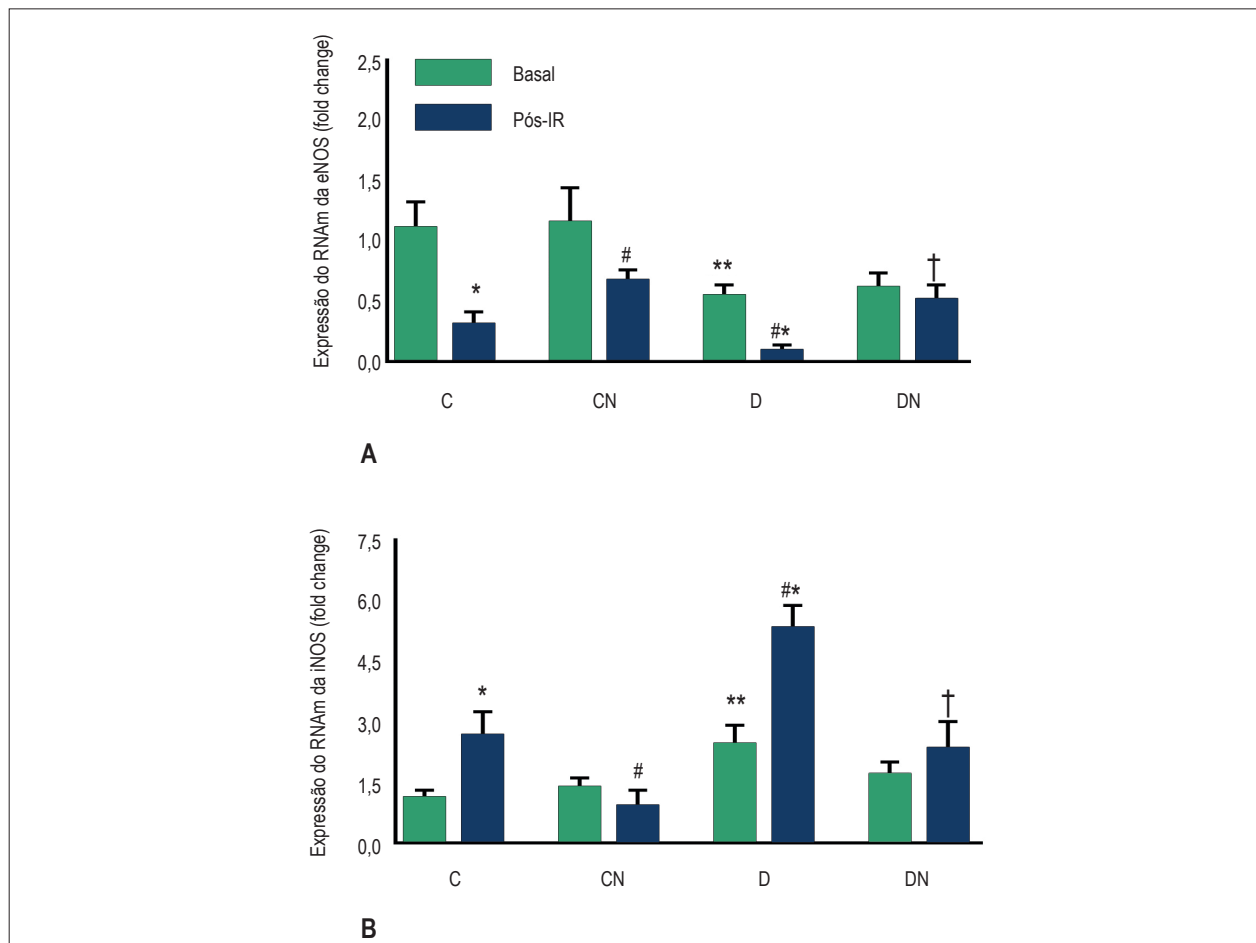
Em todos os grupos, a PDFVE aumentou gradualmente durante os 30 minutos de isquemia. No entanto, ratos diabéticos, quando comparados aos controles, exibiram um aumento significativo na PDFVE ( $p < 0,05$ ), enquanto que ratos CN e DN mostraram redução significativa ( $p < 0,01$ ) neste parâmetro quando comparados com ratos controles e diabéticos, respectivamente. O consumo de nitrato melhorou as propriedades diastólicas, como indicado por uma menor PDFVE durante a fase de reperfusão em amostras de coração de ratos nos grupos CN e DN e preveniu uma resposta hipercontrátil durante a fase precoce de reperfusão (Figura 1-A).

Comparados com os animais controles, os ratos com diabetes induzido por STZ-NA apresentaram PDVE e  $\pm dP/dt$  significativamente inferiores. A ingestão de nitrato restaurou a PDVE e  $\pm dP/dt$  reduzidas para níveis próximos aos pré-isquêmicos tanto no grupo CN quanto no DN, comparados com os grupos controle e diabético, respectivamente ( $p < 0,01$ ) (Figura 1-B, C, D). Em comparação com os valores basais, a expressão da eNOS diminuiu significativamente e a da iNOS aumentou significativamente no grupo controle após IR. Houve diminuição da expressão de eNOS e aumento da expressão de iNOS em corações de ratos diabéticos quando

comparados com os dos animais controles tanto antes como depois da IR. O nitrato dietético restaurou a expressão de eNOS e iNOS para níveis próximos aos normais após IR nos grupos CN e DN. O consumo de nitrato não teve efeito sobre a expressão basal de eNOS e iNOS em corações de ratos nos grupos CN e DN em comparação aos encontrados em animais nos grupos controle e diabético, respectivamente (Figura 2).

Em todos os grupos, os níveis cardíacos de NOx aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) após IR em comparação aos valores basais. O nitrato dietético não teve efeito sobre os níveis cardíacos de NOx no período basal no grupo CN, que apresentou níveis comparáveis aos do grupo controle. Após a isquemia, os níveis cardíacos de NOx aumentaram no grupo controle, mas não no grupo CN ( $p < 0,05$ ), sugerindo um efeito protetor do nitrato. Em comparação aos animais controles, o nível cardíaco de NOx foi inferior nos ratos diabéticos antes da IR, mas foi superior após IR e diminuiu após ingestão de nitrato no grupo DN, tanto antes quanto depois da IR em comparação aos ratos diabéticos (Figure 3-A).

Em todos os grupos, os níveis cardíacos de MDA aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) após a



**Figura 2** - Efeito do consumo de nitrato na expressão do RNAm da eNOS (A) e (B) iNOS. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM; \* $p < 0,05$ , comparando o períodos pré-IR com o período pós-IR em cada grupo. \*\* $p < 0,05$  comparando o período pré-IR em cada grupo com controles. # $p < 0,05$  comparando o período pós-IR em cada grupo com controles. † $p < 0,05$  comparando o período pós-IR entre os grupos DN e D. Controle (C), controle-nitrato (CN), diabetes (D) e diabetes-nitrato (DN).

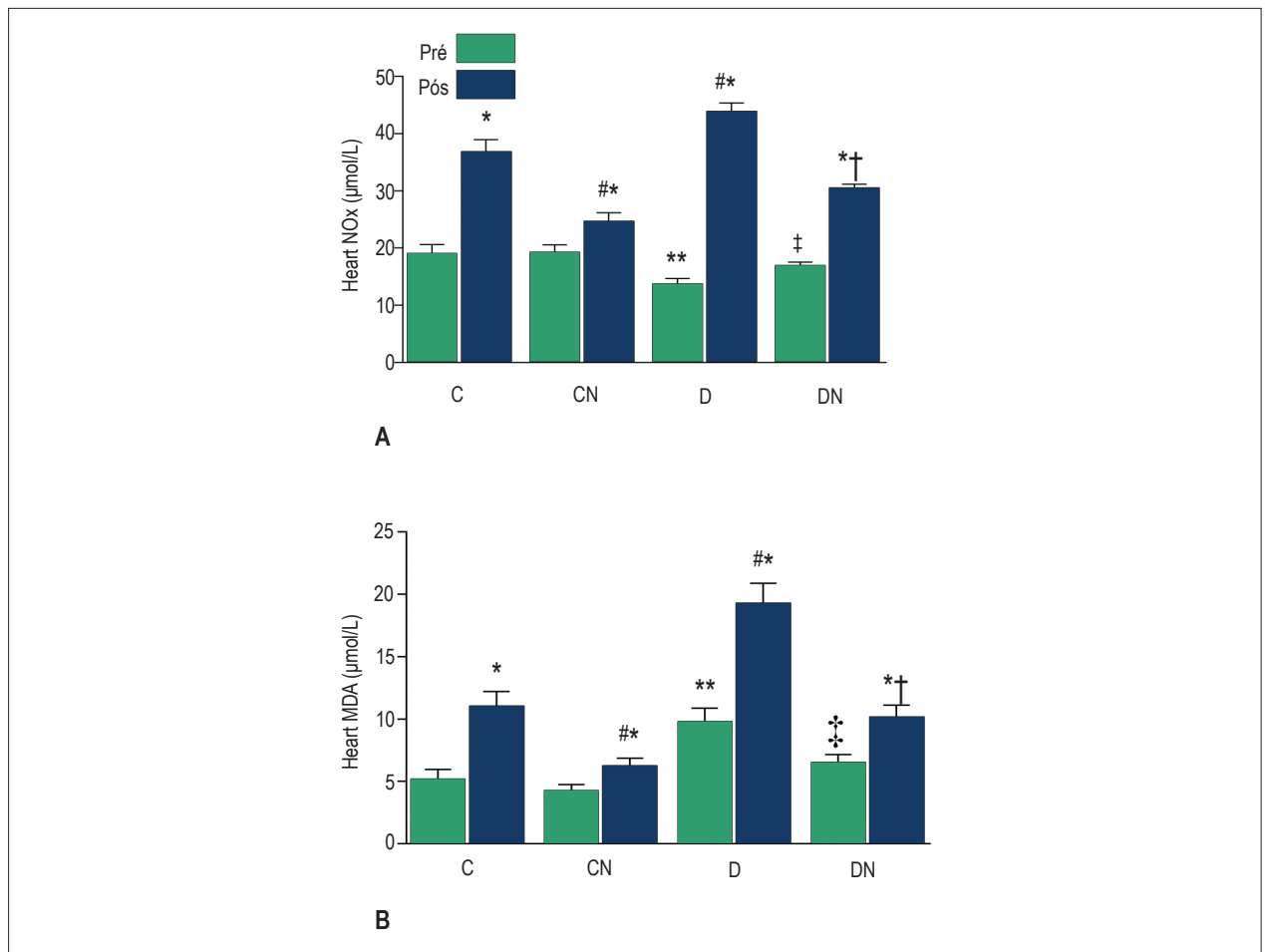
isquemia em comparação aos valores no momento basal. Comparados com controles, os ratos diabéticos apresentaram níveis significativamente mais elevados de MDA, tanto antes quanto após IR ( $p < 0,05$ ). O consumo de nitrato restaurou os níveis elevados de MDA para próximo dos valores normais nos grupos CN e DN em comparação com os níveis nos grupos controle e diabético, respectivamente (Figura 3-B). Em comparação com o grupo controle, os níveis de CK-MB e LDH foram significativamente mais elevados ( $p < 0,05$ ) no grupo diabético ( $p < 0,05$ ). O nitrato dietético reduziu significativamente a liberação de CK-MB e LDH em ratos no FC dos ratos nos grupos CN e DN em relação aos dos grupos controle e diabético, respectivamente (Figura 4).

## Discussão

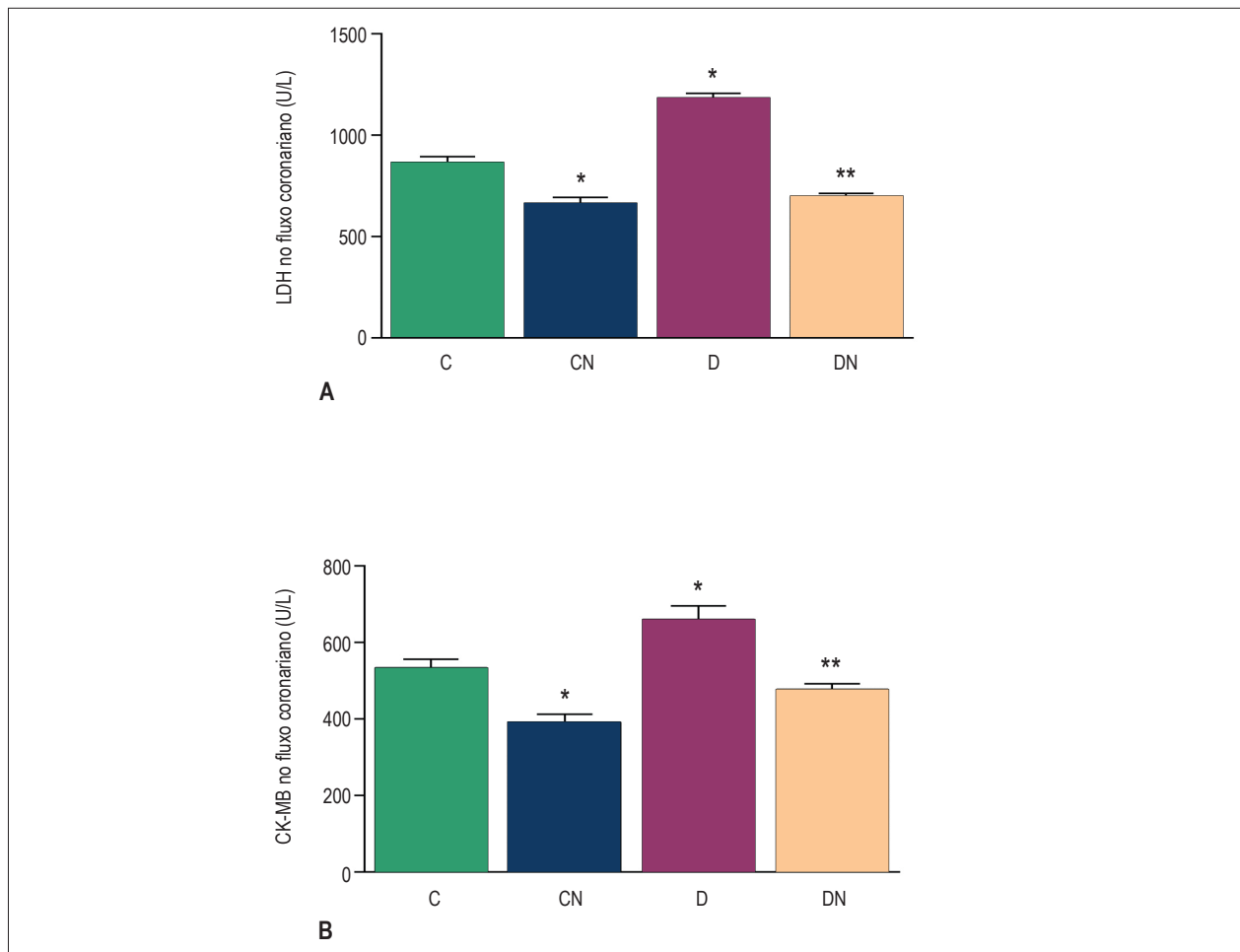
A ingestão de nitrato melhorou a recuperação da função cardíaca após isquemia tanto em ratos normais quanto diabéticos. Este efeito cardioprotetor foi associado com a prevenção do aumento e diminuição da expressão do RNM

de iNOS e da eNOS, respectivamente, no tecido cardíaco. Além disso, a ingestão de nitrato restaurou os níveis cardíacos tanto de  $\text{NO}_x$  quanto de MDA para os valores normais.

Neste estudo, nós mostramos pela primeira vez que a ingestão crônica de uma baixa dose de nitrato (100 mg/L por 2 meses) protegeu o coração dos ratos no grupo controle de lesões de IR. Em seres humanos, uma dose semelhante pode ser alcançada através de uma dieta rica em vegetais. A maioria dos estudos que avaliaram os efeitos do nitrato na lesão de IR foi realizada *in vitro*.<sup>21-23</sup> Webb et al.<sup>21</sup> relataram que a infusão de nitrito em ratos (0,7 a 7 mg/L) durante isquemia no sistema de Langendorff reduziu o tamanho do infarto e melhorou a função ventricular esquerda.<sup>21</sup> Uma investigação adicional por Gonzalez et al.<sup>23</sup> documentou uma proteção semelhante em um modelo canino *in vivo*.<sup>23</sup> Duraunski et al.<sup>22</sup> também demonstraram que a administração de nitrito (48 nmoL) durante isquemia em camundongos reduziu o tamanho do infarto e protegeu o coração da lesão de IR.<sup>22</sup> Bryan et al.,<sup>24</sup> em um estudo *in vivo*, avaliaram os efeitos da ingestão a curto prazo de nitrato (1.000 mg/L na água de beber por 7 dias) na lesão de IR e demonstraram uma redução no tamanho do



**Figura 3** – Alterações dos níveis de  $\text{NO}_x$  (A) e MDA (B) em corações de ratos nos diferentes grupos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM; ( $n = 7$  em cada grupo); \* $p < 0,05$  comparando o período pré-IR com o período pós-IR em cada grupo. \*\* $p < 0,05$  comparando o período pré-IR em cada grupo com controles. # $p < 0,05$  comparando o período pós-IR em cada grupo com controles. † $p < 0,05$  comparando o período pré-IR nos grupos DN e D. ‡ $p < 0,05$  comparando o período pós-IR entre os grupos DN e D. Controle (C), controle-nitrato (CN), diabetes (D) e diabetes-nitrato (DN).



**Figura 4** – Efeito da ingestão de nitrato nos níveis de LDH (A) e CK-MB (B) no fluxo coronariano 5 min após a reperusão. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM; (n = 7 em cada grupo); \*p < 0,05 comparado com o grupo controle. \*\*p < 0,05 comparando o grupo DN com o grupo D. Controle (C), controle-nitrato (CN), diabetes (D) e diabetes-nitrato (DN).

infarto em resposta à lesão de IR miocárdica.<sup>24</sup> No entanto, é ainda questionável se as conclusões de um estudo realizado a curto prazo possam ser estendidas a uma situação de longo prazo.<sup>25</sup> Portanto, nós avaliamos os efeitos do consumo crônico de uma dose baixa de nitrato na lesão de IR em ratos com diabetes induzido por STZ-NA. Este é um modelo adequado para avaliar a eficácia de novos agentes antidiabéticos em potencial e que tem sido relatado como o mais próximo do diabetes tipo 2 em humanos. No entanto, ratos com diabetes induzido por STZ-NA, como modelo para diabetes tipo 2 não ligado à obesidade, não apresentam resistência à insulina, que é a principal característica do diabetes tipo 2.<sup>15,17</sup> No presente estudo, nós utilizamos o ponto de corte de 126 mg/dL para a glicemia na definição do diabetes, pois o modelo de diabetes tipo 2 induzido por STZ-NA está associado com hiperglicemia moderada.<sup>17</sup> Este valor, quando determinado durante jejum, é adotado em estudos em humanos para definir diabetes.<sup>26</sup> Além disso, a ocorrência de um TOTG anormal indica que o diabetes foi induzido com êxito.

Neste estudo, corações de ratos com diabetes induzido por STZ-NA tiveram funções cardíacas inferiores no momento

basal, um dado controverso em diferentes modelos animais de diabetes.<sup>27-29</sup> Em comparação aos animais controles, foi observada uma menor recuperação da função cardíaca em ratos diabéticos após a IR. Os efeitos do diabetes tipo 2 na lesão de IR miocárdica em estudos com animais são uma questão controversa, e tanto uma sensibilidade maior<sup>30</sup> quanto menor<sup>30</sup> à lesão ou mesmo nenhum efeito<sup>31</sup> têm sido relatados. Estes resultados inconsistentes podem ser parcialmente explicados pela gravidade e duração do diabetes tipo 2 e também a mudança nos perfis metabólicos após indução do diabetes.<sup>28,32</sup> Além disso, as diferenças entre os modelos de diabetes tipo 2, o grau de lesão de IR e a espécie do animal podem modificar as funções cardíacas no momento basal em ratos com diabetes tipo 2 e a suscetibilidade à lesão de IR miocárdica.<sup>28</sup>

Nossos resultados demonstram que ratos diabéticos tiveram expressão reduzida de eNOS e aumentada de iNOS tanto no momento basal quanto após IR. O nível cardíaco de NOx foi também inferior antes da IR, mas foi superior após IR, e o nível cardíaco de MDA foi maior tanto antes quanto depois da IR. Estudos prévios demonstraram que embora a formação de NO induzida por iNOS aumente os níveis de NO no diabetes, o

aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), enquanto interagindo simultaneamente com o NO, leva à diminuição da biodisponibilidade do NO no soro e no coração no momento basal. Além disso, o NO pode ser rapidamente removido por radicais livres e produzir peroxinitrito, levando à lesão miocárdica no momento basal.<sup>9,11</sup> Além disso, um aumento importante na produção de ROS e diminuição da capacidade antioxidante em condições hiperglicêmicas levam ao desenvolvimento de estresse oxidativo, peroxidação lipídica e lesão da membrana celular, o que pode causar extravasamento de LDH e CK-MB, sugerindo um aumento do estresse oxidativo e necrose celular no diabetes induzido por STZ-NA.<sup>11</sup>

Até onde sabemos, nenhum estudo até o momento documentou o efeito do consumo de nitrato na lesão de IR em ratos com diabetes induzido por STZ-NA. Embora tenhamos demonstrado anteriormente que o nitrato dietético impede o aumento da pressão arterial sistólica e da glicose sérica, ele melhora a tolerância à glicose e restaura a dislipidemia em ratos com diabetes induzido por STZ-NA.<sup>15</sup> Jiang et al.<sup>33</sup> relataram que o consumo de nitrito dietético (50 mg/L por 4 semanas) por camundongos diabéticos db/db melhora a sinalização da insulina através da translocação de GLUT4 para a membrana.<sup>33</sup> Ohtake et al.<sup>14</sup> também demonstraram que o consumo dietético de nitrito (150 mg/L por 10 semanas) melhora a resistência à insulina em camundongos com diabetes tipo 2.<sup>14</sup>

A ingestão de nitrato no presente estudo também ofereceu cardioproteção através da diminuição dos níveis de marcadores de lesão miocárdica no FC e níveis de peroxidação lipídica em corações de ratos diabéticos após IR, um efeito que pode estar relacionado às propriedades antioxidantes da ingestão de nitrato que protege a membrana das células cardíacas através da inibição da peroxidação lipídica, resultando em diminuição do extravasamento de enzimas citossólicas.<sup>11</sup> Nós também mostramos anteriormente que o tratamento crônico com uma baixa dose de nitrato atenua o estresse oxidativo em ratos com diabetes induzido por STZ-NA através de um aumento na capacidade antioxidante total sérica e catalase.<sup>15</sup>

No presente estudo, observamos que o consumo de nitrato protegeu o coração da lesão de IR através da restauração da expressão de iNOS e eNOS para valores normais e, posteriormente, diminuição do acúmulo de NO após IR. Estudos anteriores relataram que a ingestão de nitrito melhora a sinalização de insulina<sup>34</sup> e aumenta a sua secreção em ratos.<sup>13</sup> A insulina ativa a Akt e aumenta a atividade da eNOS através da via PI3K-Akt-eNOS,<sup>34, 35</sup> que por sua vez ativa a eNOS através da fosforilação da serina 1177<sup>35</sup> e aumenta a produção de NO. Além disso, a insulina diminui a produção de NO induzida por iNOS e reduz a formação de peroxinitrito induzida por IR.<sup>36</sup> O aumento na expressão de eNOS e redução da expressão de iNOS pela insulina são ambos cardioprotetores. Isso nos oferece um embasamento para levantar a hipótese de que o consumo de nitrato protege o coração por aumentar a expressão de eNOS e diminuir a expressão de iNOS através de uma redução do estresse oxidativo e aumento na secreção de insulina.

Nossos resultados mostram que o consumo de nitrato foi insuficiente para restaurar a função hemodinâmica basal para valores próximos dos normais em ratos diabéticos, pois no estado diabético, o NO é inativado pelos ROS antes da sua ação. Evidências mostram que a eNOS pode ser desacoplada no

diabetes devido a uma diminuição na tetrahydrobiopterina, um cofator da NOS que aumenta a formação de ânion superóxido e prejudica a função da eNOS no coração. Além disso, a iNOS pode ter efeitos crônicos deletérios importantes, *i.e.*, comprometimento irreversível da função contrátil basal mediada pelo peroxinitrito que não pode ser prontamente revertida pela ingestão de nitrato; portanto, outros tratamentos, tais como removedores de radicais, parecem ser essenciais.<sup>37</sup>

Algumas limitações deste estudo devem ser consideradas na interpretação de seus resultados. Primeiro, nós não medimos os níveis das proteínas eNOS e iNOS. Embora mudanças no RNAm não reflitam necessariamente mudanças proteicas, a expressão do RNAm ainda é informativa.<sup>38</sup> Segundo, nós não utilizamos uma abordagem farmacológica para confirmar os nossos resultados em relação à diminuição da expressão da iNOS e aumento da expressão da eNOS após ingestão de nitrato, já que tem sido demonstrado que tanto a deleção do gene iNOS quanto a inibição da iNOS pode fornecer cardioproteção em animais diabéticos.<sup>39</sup>

## Conclusão

O consumo de nitrato restaurou a função cardíaca após IR para níveis próximos aos pré-isquêmicos em ratos diabéticos através de um bloqueio do aumento e da diminuição patológica da expressão de iNOS e eNOS, respectivamente. O nitrato também restaurou os níveis cardíacos de NOx e MDA a valores normais tanto antes quanto depois da isquemia.

## Agradecimentos

Este estudo recebeu financiamento (N0.711) do *Endocrine Physiology Research Center, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences*. Os autores gostariam de agradecer a sra. N. Shiva pela edição crítica do manuscrito em inglês em relação à gramática e sintaxe.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Jeddi S, Ghasemi A; Obtenção de dados: Jeddi S, Khalifi S, Ghanbari M, Bageripour F; Análise e interpretação dos dados e Análise estatística: Jeddi S, Khalifi S, Ghanbari M, Bageripour F, Ghasemi A; Obtenção de financiamento: Ghasemi A; Redação do manuscrito: Jeddi S, Ghanbari M, Bageripour F; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Khalifi S, Ghasemi A.

## Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado por Endocrine Research Centre, Research Institute for Endocrine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran Iran.

## Vinculação acadêmica

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



## Referências

1. Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103(2):137-49.
2. Chiariello M, Indolfi C. Silent myocardial ischemia in patients with diabetes mellitus. *Circulation.* 1996;93(12):2089-91.
3. Ghasemi A, Zahediasl S. Potential therapeutic effects of nitrate/nitrite and type 2 diabetes mellitus. *Int J Endocrinol Metab.* 2013;11(2):63-4.
4. Lundberg JO, Carlstrom M, Larsen FJ, Weitzberg E. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. *Cardiovasc Res.* 2011;89(3):525-32.
5. Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med.* 1995;1(8):804-9.
6. Lundberg JO. Cardiovascular prevention by dietary nitrate and nitrite. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;26(5):H1221-3.
7. Kapil V, Weitzberg E, Lundberg JO, Ahluwalia A. Clinical evidence demonstrating the utility of inorganic nitrate in cardiovascular health. *Nitric Oxide.* 2014;38:45-57.
8. Jeddi S, Zaman J, Ghasemi A. Effects of ischemic postconditioning on the hemodynamic parameters and heart nitric oxide levels of hypothyroid rats. *Arq Bras Cardiol.* 2015;104(2):136-43.
9. Gonzalez C, Herradon E, Abalo R, Vera G, Perez-Nieves BG, Leza JC, et al. Cannabinoid/agonist WIN 55,212-2 reduces cardiac ischaemia-reperfusion injury in Zucker diabetic fatty rats: role of CB2 receptors and iNOS/eNOS. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011;2(4):331-40.
10. Zaman J, Jeddi S, Ghasemi A. The Effects of ischemic postconditioning on myocardial function and nitric oxide metabolites following ischemia-reperfusion in hyperthyroid rats. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014;18(6):481-7.
11. Xu X, Xiao H, Zhao J, Zhao T. Cardioprotective effect of sodium ferulate in diabetic rats. *Int J Med Sci.* 2012;9(4):291-300.
12. Webb AJ, Patel N, Loukogeorgakis S, Okorie M, Aboud Z, Misra S, et al. Acute blood pressure lowering, vasoprotective, and antiplatelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. *Hypertension.* 2008;51(3):784-90.
13. Nystrom T, Ortsater H, Huang Z, Zhang F, Larsen FJ, Weitzberg E, et al. Inorganic nitrite stimulates pancreatic islet blood flow and insulin secretion. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(5):1017-23.
14. Ohtake K, Nakano C, Ehara N, Sonoda K, Ito J, Uchida H, et al. Dietary nitrite supplementation improves insulin resistance in type 2 diabetic KKA(y) mice. *Nitric Oxide.* 2015;44:31-8.
15. Khalifi S, Rahimpour A, Jeddi S, Ghanbari M, Kazerooni F, Ghasemi A. Dietary nitrate improves glucose tolerance and lipid profile in an animal model of hyperglycemia. *Nitric Oxide.* 2015;44:24-30.
16. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(2):156-67.
17. Ghasemi A, Khalifi S, Jeddi S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review). *Acta Physiol Hung.* 2014;101(4):408-20.
18. Kabay S, Ozden H, Guven G, Burukoglu D, Ustuner MC, Topal F, et al. Protective effects of the nuclear factor kappa B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate on experimental testicular torsion and detorsion injury. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014;18(4):321-6.
19. Zaman J, Jeddi S, Daneshpour MS, Zarkesh M, Daneshian Z, Ghasemi A. Ischemic postconditioning provides cardioprotective and antiapoptotic effects against ischemia-reperfusion injury through iNOS inhibition in hyperthyroid rats. *Gene.* 2015;570(2):185-90.
20. Ghasemi A, Zahediasl S. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. *Int J Endocrinol Metab.* 2012;10(2):486-9.
21. Webb A, Bond R, McLean P, Uppal R, Benjamin N, Ahluwalia A. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(37):3683-8.
22. Duranski MR, Greer JJ, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, et al. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1232-40.
23. Gonzalez FM, Shiva S, Vincent PS, Ringwood LA, Hsu LY, Hon YY, et al. Nitrite anion provides potent cytoprotective and antiapoptotic effects as adjunctive therapy to reperfusion for acute myocardial infarction. *Circulation.* 2008;117(23):2986-94.
24. Bryan NS, Calvert JW, Elrod JW, Gundewar S, Ji SY, Lefer DJ. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(48):19144-9.
25. Kruszelnicka O. Nitric oxide vs insulin secretion, action and clearance. *Diabetologia.* 2014;57(1):257-8.
26. American Diabetes Association. Introduction: diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2015;38(Suppl. 1):S1-S2.
27. Badalzadeh R, Mohammadi M, Najafi M, Ahmadiasl N, Farajnia S, Ebrahimi H. The additive effects of ischemic postconditioning and cyclosporine-A on nitric oxide activity and functions of diabetic myocardium injured by ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2012;17(2):181-9.
28. Koka S, Das A, Salloum FN, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil attenuates oxidative stress and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in type 2 diabetic mice. *Free Radic Biol Med.* 2013;60:80-8.
29. Wang T, Mao X, Li H, Qiao S, Xu A, Wang J, et al. N-Acetylcysteine and allopurinol up-regulated the Jak/STAT3 and PI3K/Akt pathways via adiponectin and attenuated myocardial postischemic injury in diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2013;63:291-303.
30. Povlsen JA, Lofgren B, Dalgas C, Birkler RI, Johannsen M, Stottrup NB, et al. Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury at onset of type 2 diabetes in Zucker diabetic fatty rats is associated with altered glucose oxidation. *PLoS One.* 2013;8(5):e64093.
31. Kravchuk E, Grineva E, Bairamov A, Galagudza M, Vlasov T. The effect of metformin on the myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in the rat model of diabetes mellitus type II. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:907496.
32. Miki T, Itoh T, Sunaga D, Miura T. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:67.
33. Jiang H, Torregrossa AC, Potts A, Pierini D, Aranke M, Garg HK, et al. Dietary nitrite improves insulin signaling through GLUT4 translocation. *Free Radic Biol Med.* 2013;67:51-7.
34. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-37.
35. Kobayashi J. Nitric oxide and insulin resistance. *Immunoendocrinology.* 2015;2:e657.
36. Yu Q, Gao F, Ma XL. Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2010;89(3):516-24.
37. Khanna S, Singh GB, Khullar M. Nitric oxide synthases and diabetic cardiomyopathy. *Nitric Oxide.* 2014;43:29-34.
38. Guo Y, Xiao P, Lei S, Deng F, Xiao GG, Liu Y, et al. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008;40(5):426-36.
39. Nagareddy PR, McNeill JH, MacLeod KM. Chronic inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cardiovascular abnormalities in streptozotocin diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2009;611(1-3):53-9.