



ARTIGO DE REVISÃO

## Pré-condicionamento isquémico remoto do miocárdio: dos mecanismos fisiopatológicos à aplicação na prática clínica

José F. Costa<sup>a</sup>, Ricardo Fontes-Carvalho<sup>a,b</sup>, Adelino F. Leite-Moreira<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Fisiologia e Cirurgia Cardiorrástica, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>b</sup> Serviço de Cardiologia, Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia, Vila Nova de Gaia, Portugal

<sup>c</sup> Serviço de Cirurgia Cardiorrástica, Centro Hospitalar São João, EPE, Porto, Portugal

Recebido a 20 de fevereiro de 2013; aceite a 21 de fevereiro de 2013

Disponível na Internet a 11 de outubro de 2013

### PALAVRAS-CHAVE

Pré-condicionamento isquémico do miocárdio;  
Isquemia do miocárdio;  
Lesão de reperfusão no miocárdio;  
Enfarte do miocárdio

**Resumo** Curtos períodos de isquemia do miocárdio seguida de reperfusão induzem um mecanismo de cardioproteção quando este é depois submetido a um período de isquemia prolongada, um fenómeno designado pré-condicionamento isquémico.

Além da sua aplicação local no miocárdio, o pré-condicionamento isquémico também pode ser induzido por breves interrupções da circulação sanguínea em outros órgãos, nomeadamente no músculo esquelético. De uma forma não invasiva, a indução de isquemia transitória através da insuflação de um braçal num dos membros, seguida de reperfusão, leva à diminuição dos danos causados no miocárdio pela interrupção da circulação coronária.

O pré-condicionamento isquémico remoto envolve a ativação de vias humorais e/ou neuronais que, atuando no miocárdio, provocam a abertura de canais de potássio mitocondriais sensíveis ao ATP e o encerramento do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, tornando os cardiomiócitos menos sensíveis à morte celular causada pela isquemia.

Este mecanismo cardioprotetor pode já ser transposto para a prática clínica, havendo resultados positivos em vários estudos clínicos realizados na cirurgia coronária, cirurgia de reparação de aneurismas da aorta abdominal, cirurgia de substituição valvular e intervenção coronária percutânea. Contudo, existem alguns fatores que atenuando os mecanismos subcelulares do pré-condicionamento – idade, comorbilidades, medicação, protocolo anestésico – parecem explicar a heterogeneidade de resultados nalguns estudos.

Finalmente, é de esperar que a compreensão detalhada das vias envolvidas na cardioproteção induzida pelo pré-condicionamento isquémico possam permitir o desenvolvimento de novos fármacos que permitam reduzir as consequências da isquemia prolongada.

© 2013 Sociedade Portuguesa de Cardiologia. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos os direitos reservados.

\* Autor para correspondência.

Correio eletrónico: [amoreira@med.up.pt](mailto:amoreira@med.up.pt) (A.F. Leite-Moreira).

**KEYWORDS**

Myocardial ischemic preconditioning;  
Myocardial ischemia;  
Myocardial reperfusion injury;  
Myocardial infarction

**Myocardial remote ischemic preconditioning: From pathophysiology to clinical application**

**Abstract** Short periods of myocardial ischemia followed by reperfusion induce a cardioprotective mechanism when the myocardium is subsequently subjected to a prolonged period of ischemia, a phenomenon known as ischemic preconditioning.

As well as its application in the myocardium, ischemic preconditioning can also be induced by brief interruptions of blood flow to other organs, particularly skeletal muscle. Transient ischemia induced noninvasively by inflating a cuff on a limb, followed by reperfusion, helps reduce the damage caused to the myocardium by interruption of the coronary circulation.

Remote ischemic preconditioning involves activation of humoral and/or neural pathways that open mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in the myocardium and close mitochondrial permeability transition pores, making cardiomyocytes less vulnerable to ischemia-induced cell death.

This cardioprotective mechanism is now being translated into clinical practice, with positive results in several clinical trials in coronary artery bypass surgery, surgical repair of abdominal aortic aneurysms, valve replacement surgery and percutaneous coronary intervention. However, certain factors weaken the subcellular mechanisms of preconditioning - age, comorbidities, medication, anesthetic protocol - and appear to explain the heterogeneity of results in some studies.

Detailed understanding of the pathways involved in cardioprotection induced by ischemic preconditioning is expected to lead to the development of new drugs to reduce the consequences of prolonged ischemia.

© 2013 Sociedade Portuguesa de Cardiologia. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introdução**

O corpo humano é capaz de recrutar vários mecanismos protetores que permitem manter a homeostasia em resposta a diferentes agressões.

Quando há interrupção da circulação coronária o tamanho do enfarte é proporcional à duração da isquemia<sup>1</sup>. Paradoxalmente, mesmo a revascularização precoce causa lesão tecidual, um fenómeno chamado de lesão de isquemia-reperusão<sup>2</sup>, e que se estima ser responsável por até 30% do tamanho do enfarte<sup>3</sup>. Tal facto levou à procura de mecanismos citoprotectores que possam tornar o miocárdio menos sensível a esta lesão, não só em situações agudas (revascularização no contexto da síndrome coronária aguda), como também após procedimentos cirúrgicos que impliquem a interrupção temporária da circulação coronária, nomeadamente na cirurgia cardíaca com clampagem da aorta ou no transplante cardíaco.

Em 1986, Murry et al.<sup>4</sup> observaram que animais submetidos a curtos episódios de isquemia coronária antes da oclusão prolongada da mesma artéria tinham uma redução da extensão do enfarte em 75%. A equipa colocou a hipótese de que curtos períodos de isquemia não letal do miocárdio, seguidos de reperusão, o poderiam proteger de episódios subsequentes de isquemia prolongada, fenómeno a que chamaram de pré-condicionamento isquémico do miocárdio (PIM).

Posteriormente, a investigação dos mecanismos no pré-condicionamento isquémico permitiu a descrição de dois outros fenómenos: per-condicionamento isquémico<sup>5</sup> e pós-condicionamento isquémico<sup>6</sup>, em que o estímulo

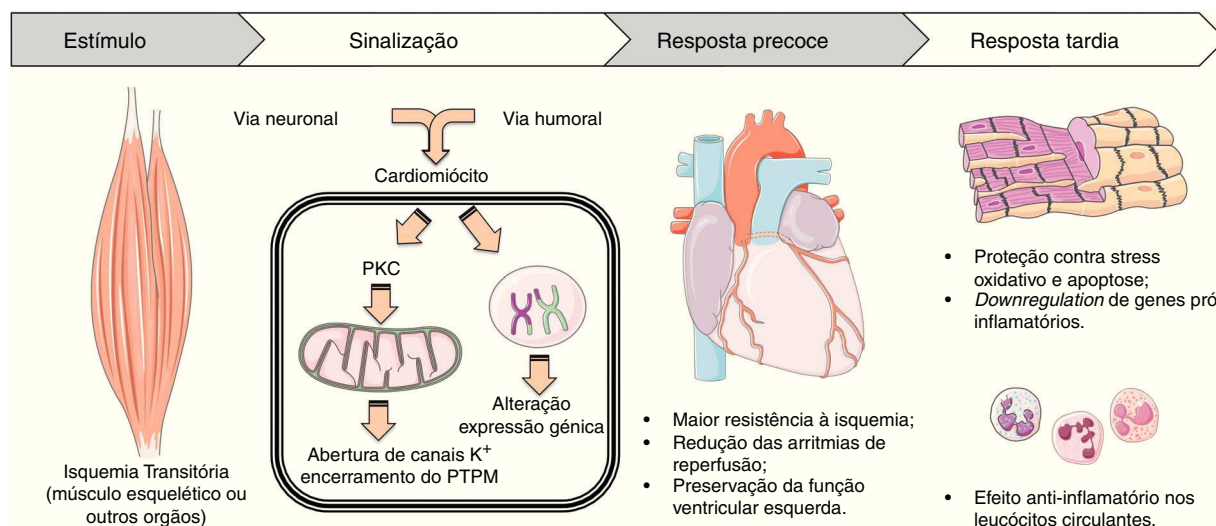
cardioprotetor isquémico é provocado durante ou após a oclusão coronária prolongada, respetivamente.

Przyklenk et al.<sup>7</sup> fizeram evoluir o conceito pré-condicionamento ao provar que a oclusão breve e repetida de uma artéria coronária protege não só o território que diretamente irriga, como sugerido por Murry, mas também o restante miocárdio. A esta proteção intracárdica chamaram pré-condicionamento isquémico regional do miocárdio. Neste seguimento levantou-se a hipótese da citoproteção poder ser induzida por isquemia em órgãos à distância, o que foi confirmado pela descrição do pré-condicionamento isquémico remoto do miocárdio (PIRM) em que o estímulo, inicialmente, era a isquemia renal e mesentérica<sup>8</sup>. Apesar do interesse experimental desta descoberta, os rins e, em menor grau, o intestino são vulneráveis mesmo a curtos períodos de isquemia<sup>9</sup> e não estão acessíveis para aplicação clínica.

O grande avanço na investigação do PIRM deu-se com a utilização de músculo esquelético como território isquémico<sup>10</sup>. O uso de um garrote ou braçal insuflado num dos membros permitiu a aplicação do PIRM sem necessidade de procedimentos invasivos ou de impedir o suprimento sanguíneo a órgãos vitais<sup>11</sup>.

Assim, o pré-condicionamento isquémico remoto do miocárdio é um mecanismo através do qual a isquemia transitória de territórios vasculares à distância aumenta a resistência dos cardiomiócitos a situações de isquemia coronária prolongada e à lesão de isquemia-reperusão.

Este artigo de revisão tem como objetivo descrever os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelo pré-condicionamento isquémico remoto do miocárdio, bem como exemplificar possíveis formas de aplicação na prática



**Figura 1** Representação esquemática das várias fases e respectivos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no pré-condicionamento isquêmico remoto do miocárdio (figura elaborada com recurso ao Servier Medical Art). PKC: proteína cinase C; PTPM: poro de transição de permeabilidade mitocondrial.

clínica, abordando os principais estudos clínicos que testaram a sua eficácia. A utilização dos membros é a alternativa com maior potencial clínico uma vez que o músculo esquelético está facilmente acessível e tem uma resistência prolongada à isquemia<sup>12</sup>. Por estes motivos, nesta revisão bibliográfica será dada especial atenção ao PIRM induzido por isquemia muscular esquelética.

## Materiais e métodos

Foi realizada uma pesquisa *online* na base de dados *PubMed* por artigos científicos publicados desde 1986, data da primeira descrição do pré-condicionamento isquêmico<sup>4</sup>, até dezembro de 2012, que contenham os termos *remote ischemic preconditioning* ou *ischemic preconditioning at a distance*. Esta pesquisa foi complementada por uma procura adicional nas bases de dados *Scopus* e *Cochrane*. Todos os artigos considerados relevantes para a discussão foram incluídos.

## Mecanismos fisiopatológicos envolvidos no pré-condicionamento isquêmico remoto

Tal como no pré-condicionamento local<sup>13</sup>, o pré-condicionamento isquêmico remoto gera duas fases de proteção miocárdica. A fase precoce (ou imediata) que dura cerca de quatro horas, à qual se segue uma fase tardia, com início > 24 horas após a indução da isquemia e que se prolonga por pelo menos 48 horas<sup>14</sup>.

A fase precoce leva a alterações imediatas no miocárdio e na circulação coronária com aumento do fluxo diastólico<sup>15</sup> e vasodilatação das artérias coronárias<sup>16</sup>. Permite desde logo a redução da área de enfarte, do risco de arritmias de reperfusão<sup>11,17</sup> (nomeadamente extrassístolia, fibrilação e taquicardia ventricular<sup>18</sup>) e preservação da função ventricular esquerda<sup>19,20</sup>.

A segunda janela de cardioproteção depende da síntese de proteínas, o que é consistente com a alteração da expressão gênica que se observa nos cardiomiócitos<sup>21</sup> e leucócitos<sup>22</sup> no período que se segue à isquemia miocárdica.

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no PIRM ainda não são totalmente compreendidos, mas podem ser divididos em três fases: i) o efetor (ou efetores) produzidos ou libertados no tecido isquêmico; ii) os mecanismos de comunicação entre o território remoto e o miocárdio; e iii) a indução de uma resposta cardioprotetora (ver [Figura 1](#)).

## A fase precoce do pré-condicionamento isquêmico

A indução de períodos transitórios de isquemia-reperfusão provoca a libertação e/ou produção de várias substâncias pelo tecido isquêmico. Diversos fatores têm sido implicados ([Tabela 1](#)), não havendo ainda consenso quanto à importância relativa de cada um. Dependendo do local onde se origina o estímulo (tecidos renal, mesentérico ou músculo esquelético) podem estar envolvidas substâncias e mecanismos de proteção diferentes, o que impede a extrapolação dos dados obtidos com um determinado protocolo experimental para os restantes<sup>23</sup>. Por exemplo, o hexametônio, um antagonista colinérgico, anula o pré-condicionamento induzido pela isquemia mesentérica<sup>8</sup> mas não altera o

**Tabela 1** Substâncias implicadas no desenvolvimento do pré-condicionamento isquêmico remoto do miocárdio

Isquemia renal	Isquemia mesentérica	Isquemia esquelética
Adenosina <sup>76-79</sup>	Bradicinina <sup>80,81</sup>	Opioides <sup>30,87-89</sup>
	Canabinoides <sup>18</sup>	NO <sup>24,31</sup>
	CGRP <sup>82-84</sup>	Noradrenalina <sup>11</sup>
	Opioides <sup>85,86</sup>	RLO <sup>31,40,88</sup>

CGRP: *calcitonin gene-related peptide*; NO: óxido nítrico; RLO: radicais livres de oxigénio.

pré-condicionamento causado pela isquemia renal<sup>8</sup> ou do músculo esquelético<sup>24</sup>.

Estes mediadores vão induzir cardioproteção por mecanismos neuronais e/ou humorais, existindo evidências científicas para ambos.

A hipótese neuronal considera que substâncias produzidas no território remoto submetido a isquemia atuam localmente em vias neuronais aferentes. Estas ativam várias vias eferentes induzindo cardioproteção. A favor de um envolvimento de vias neuronais está a demonstração de que o membro sujeito a pré-condicionamento tem de ser enervado, uma vez que o corte do nervo femoral anula ou atenua a proteção conferida pela isquemia transitória do membro inferior<sup>25,26</sup>. Também o antagonismo dos recetores nicotínicos e a reserpina (fármaco que inibe a captação de neurotransmissores para as vesículas sinápticas) têm um efeito atenuante sobre o PIRM<sup>11,14</sup>. Os neurónios do núcleo motor dorsal do nervo vago parecem ter um papel fundamental na cardioproteção ao mediar um «reflexo remoto de pré-condicionamento». A ativação deste grupo pré-ganglionar vagal, mesmo sem isquemia muscular, é suficiente para reproduzir o efeito do pré-condicionamento remoto<sup>27</sup>.

A hipótese humoral, por seu lado, defende que o estímulo isquémico leva à produção de várias substâncias que, entrando em circulação, atingem o miocárdio e exercem aí o seu efeito protetor. A apoiar esta hipótese está a necessidade de reperfusão do órgão à distância antes do início da isquemia coronária para haver proteção<sup>8,28</sup>. Este facto sugere a existência de um *washout* de substâncias que têm que atingir o coração através da circulação antes de ocorrer o evento isquémico.

Estudos com transplantes cardíacos em modelos animais também apoiam a hipótese humoral. Em porcos submetidos a PIRM antes de receberem um coração de dador a limitação da área de enfarte após enfarte agudo do miocárdio (EAM) mantém-se no miocárdio transplantado<sup>29</sup>. Como, neste caso, o coração não recebe enervação extrínseca, é provável que se mantenha em circulação um fator humoral que atua no coração transplantado. Além disso, em preparações experimentais em que é removido o coração do organismo, se este for perfundido com plasma de coelhos sujeitos a PIRM, observa-se um efeito cardioprotetor com redução significativa da área de enfarte<sup>30</sup>, o que apoia a hipótese de existir uma substância no plasma que causa citoproteção.

Finalmente, independentemente do mecanismo responsável, existe ainda um fenómeno de «memória protetora» no miocárdio uma vez que depois de explantado o coração mantém o efeito do PIRM a que foi sujeito *in vivo*<sup>19</sup>.

## Mecanismos subcelulares envolvidos

Apesar de não estar definido que substância(s) induz(em) cardioproteção, o seu efeito a nível subcelular nos cardiomiócitos está melhor caracterizado. O passo inicial de cardioproteção parece envolver a ativação da proteína cinase c (PKC) do miocárdio<sup>30</sup> (Figura 1).

Os canais de potássio dependentes do ATP ( $K_{ATP}^+$ ) mitocondriais do miocárdio são abertos durante a isquemia transitória do músculo esquelético<sup>19,31</sup>. Estes encontram-se a jusante da PKC no PIRM<sup>32</sup> e são dependentes desta

para a sua ativação<sup>33</sup>. Assim, é provável que agonistas da proteína G iniciem uma cascata de sinalização que leva a cardioproteção via ativação da PKC, com abertura subsequente de canais  $K_{ATP}^+$  mitocondriais.

Fisiopatologicamente, durante a isquemia, com a depleção de ATP, os canais iónicos perdem a sua função e levam à acumulação de  $Ca^{2+}$  intracelular, que por sua vez contribui ainda mais para a diminuição de ATP. A sobrecarga mitocondrial de  $Ca^{2+}$  dá-se principalmente quando à isquemia se segue a reperfusão. Apesar do fornecimento de  $O_2$  permitir novamente a produção de ATP, a lesão isquémica e de reperfusão provoca alterações da cadeia de transporte de eletrões das mitocôndrias, o que leva a que estas produzam radicais livres de oxigénio (RLO). O aumento de RLO, de  $Ca^{2+}$  mitocondrial e a diminuição do potencial transmembranar das mitocôndrias que se seguem à isquemia-reperfusão conduzem à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM)<sup>34</sup>. O PTPM é um canal mitocondrial transmembranar multiproteico que está ausente ou maioritariamente fechado em condições fisiológicas. A abertura do PTPM em resposta à isquemia leva à libertação de proteínas da mitocôndria para o citoplasma, como o citocromo c. Estas provocam a ativação da cascata das caspases o que, juntamente com os baixos níveis de ATP e alterações da homeostasia iónica, causa rotura da membrana plasmática e morte celular<sup>35</sup>.

A abertura dos canais mito  $K_{ATP}^+$ , via ativação da PKC, estará envolvida na cardioproteção ao contrariar estes mecanismos. A sua ativação despolariza as mitocôndrias<sup>36</sup>, logo reduz a captação de  $Ca^{2+}$  e os seus níveis durante a reperfusão, mantendo a integridade dos organelos celulares. Diminui também a atividade dos canais iónicos dependentes de voltagem e conserva ATP durante a isquemia pois reduz a sua hidrólise<sup>37,38</sup>. Durante o pré-condicionamento aumenta a produção de RLO<sup>31</sup> o que, além de possivelmente diminuir a sua concentração durante a isquemia subsequente<sup>39</sup>, aumenta a produção de enzimas antioxidantes que mantêm a função mitocondrial e diminuem a apoptose<sup>40</sup>.

A importância da PKC não se restringe ao seu efeito nos  $K_{ATP}^+$  mitocondriais, atuando também no PMPT. Durante o pré-condicionamento, a PKC forma um complexo com o PTPM e impede a sua abertura, inibindo assim a apoptose dos cardiomiócitos aquando da isquemia-reperfusão<sup>41</sup>.

Esta sequência subcelular, apesar de ser a teoria dominante, é apenas uma das várias que tentam explicar os mecanismos de pré-condicionamento. O grande número de substâncias envolvidas no PIRM dificulta que se descreva uma teoria unificadora. É possível que estas tenham um efeito sinérgico entre si ou que haja redundância nas vias subcelulares envolvidas na cardioproteção, o que dificulta a determinação da importância relativa de cada uma<sup>42</sup>.

## A fase tardia do pré-condicionamento isquémico

Além das alterações imediatas, a janela tardia de proteção é aparentemente desencadeada por modificações da expressão de genes envolvidos na resposta do miocárdio a lesões oxidativas e inflamatórias (Figura 1).

As reações inflamatórias estão aumentadas durante a reperfusão. Acumulam-se polimorfonucleares no miocárdio

que contribuem para o dano cardíaco por libertação de RLO, proteases e leucotrienos<sup>43</sup>. Em humanos, o mecanismo de PIRM leva a alterações genéticas anti-inflamatórias nos leucócitos circulantes (supressão de proteínas envolvidas na quimiotaxia, adesão, migração, exocitose, apoptose e imunidade inata) nos primeiros 15 minutos após o estímulo e, principalmente, depois de 24 horas, aquando da janela tardia de proteção<sup>22</sup>.

Além do seu papel na modulação da função mitocondrial como referido anteriormente, a PKC está também envolvida na regulação da expressão de genes<sup>44</sup> e é possível que seja responsável pelas alterações que ocorrem na janela tardia de proteção.

Quando comparados com cardiomiócitos nos primeiros 15 minutos após PIRM, 24 horas depois observou-se que a expressão de genes envolvidos na citoproteção (gene Hsp73) e proteção contra o stress oxidativo (genes Hdhsc, Prdx4 e Fabbp4) está aumentada, enquanto a de vários genes pró-inflamatórios (genes Egr-1, Dusp 1 e 6) está diminuída<sup>21</sup>.

Li et al.<sup>20</sup> demonstraram o envolvimento do NF- $\kappa$ B no PIRM. O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição redox-sensível que regula vários genes inflamatórios, como a síntese de NO indutível (iNOS) e a ciclooxigenase indutível. Apesar de a ativação do NF- $\kappa$ B durante a lesão de isquemia-reperfusão ter efeitos nefastos por aumentar as moléculas de adesão leucocitárias, a produção de citocinas e quimiocinas e o tamanho do enfarte, a sua ativação após o PIRM leva a uma resposta adaptativa no coração em 24 horas. Isto acontece porque, paralelamente, há um aumento do seu próprio inibidor, o iNF- $\kappa$ B, que atenua a ativação do NF- $\kappa$ B após a reperfusão, levando à diminuição do tamanho do enfarte e à melhoria da função ventricular esquerda. Depois do pré-condicionamento também se observa um aumento gradual do RNAm da iNOS, que atinge o nível máximo em 24 horas. Em ratinhos *knock-out* para os genes do NF- $\kappa$ B e da iNOS não se verificou adaptação à isquemia<sup>45</sup>.

Assim, o pré-condicionamento pode diminuir a resposta inflamatória durante a reperfusão porque a indução do NF- $\kappa$ B aumenta o seu próprio inibidor e leva à transcrição da iNOS. A indução da iNOS aumenta o NO produzido. O seu papel na fase tardia não é conhecido, mas provavelmente é dependente de efeitos antiapoptóticos e anti-inflamatórios<sup>46,47</sup>.

### Aplicação à clínica do pré-condicionamento isquêmico remoto

A indução de cardioproteção através de pré-condicionamento isquêmico é uma terapêutica muito promissora, estando atualmente em curso mais de 100 ensaios clínicos registados em *clinicaltrials.gov*.

A confirmar-se a reprodutibilidade dos resultados laboratoriais na prática clínica, o PIRM pode ser feito, por exemplo, através de ciclos de insuflação-desinsuflação de um braçal num dos membros. Este é um método simples, rápido, virtualmente sem custos, não invasivo e não farmacológico que poderia ser aplicado antes de intervenções (percutâneas ou cirúrgicas) em que seja previsível a interrupção do fluxo coronário.

### Pré-condicionamento isquêmico remoto do miocárdio como adjuvante da cirurgia ou da intervenção coronária percutânea

O primeiro ensaio clínico a utilizar o pré-condicionamento isquêmico remoto envolveu crianças submetidas a cirurgia de correção de cardiopatias congénitas<sup>48</sup>. Neste estudo, a indução de quatro ciclos de isquemia no membro inferior, através da insuflação de um braçal durante cinco minutos seguida de cinco minutos de reperfusão, permitiu uma redução dos níveis de troponina I no pós-operatório, uma menor necessidade de agentes inotrópicos e uma menor resistência das vias respiratórias.

Posteriormente, num ensaio clínico randomizado com a aplicação de um protocolo de PIRM semelhante desta vez a 57 indivíduos submetidos a cirurgia de revascularização coronária eletiva, foram obtidos resultados semelhantes, com uma redução dos níveis de troponina T nas primeiras 72 horas do pós-operatório<sup>49</sup>.

Desde então, vários estudos foram efetuados em cirurgia de revascularização coronária (com e sem circulação extracorporal), cirurgia de reparação de aneurismas da aorta abdominal, cirurgia de substituição valvular e intervenção coronária percutânea (resumo dos principais estudos clínicos na Tabela 2). O *endpoint* principal na maioria dos casos foi o nível de libertação de troponina no período pós-operatório, que se associa a pior prognóstico a curto e longo prazo<sup>50,51</sup> e se correlaciona com a área de enfarte<sup>52,53</sup>.

Contudo, os resultados de todos estudos que aplicaram PIRM não são uniformes, o que pode ser explicado pelas diferenças no protocolo utilizado (local escolhido para pré-condicionamento, número de ciclos, tempo de isquemia/reperfusão), a idade do doente, as comorbilidades associadas, a medicação concomitante e o regime anestésico utilizado durante a cirurgia.

As diferenças nos protocolos de pré-condicionamento e nas populações envolvidas nos ensaios clínicos tornam difícil a comparação entre estes, o que impediu a elaboração de um protocolo de pré-condicionamento capaz de induzir cardioproteção máxima. Num dos estudos, envolvendo doentes com angina estável e doença coronária de um vaso submetidos a intervenção coronária percutânea (ICP) eletiva, a indução prévia de isquemia bilateral dos membros superiores até induziu um aumento da libertação de CK-MB e de troponina I, principalmente nos indivíduos não medicados com estatinas<sup>54</sup>. Este facto poderá ter sido devido a um aumento do estado inflamatório após a isquemia esquelética que, na ausência de estatinas, potenciou (em vez de proteger) a lesão de isquemia-reperfusão no miocárdio. Além disso, a utilização de isquemia bilateral simultânea dos membros superiores parece ser um estímulo demasiado intenso, e não benéfico, para o organismo, porque a maioria dos outros estudos têm utilizado como estímulo desencadeador a isquemia de apenas um membro. Também é provável que, dadas as diferentes massas musculares dos membros superiores e inferiores, a potência do estímulo desencadeada por cada um deles seja diferente<sup>55</sup>.

A idade do doente pode ser uma limitação à aplicação desta técnica. Com o envelhecimento, os cardiomiócitos sofrem alterações que resultam na diminuição da função contráctil e perda de mecanismos de cardioproteção<sup>53</sup>. Assim, o tecido cardíaco perde a sensibilidade ao

**Tabela 2** Ensaios clínicos com aplicação do PIRM (duração do tempo de isquemia em minutos)

Ensaio clínico	Procedimento cirúrgico	Estímulo isquêmico	Agentes anestésicos utilizados	Resultados
Cheung (2006) <sup>48</sup>	Reparação de defeitos cardíacos congênitos em crianças, com recurso a CEC	MI 4x (5I + 5R)	Indução com sevoflurano e manutenção com isoflurano + fentanil	Menor nível de troponina I, menor necessidade de agentes inotrópicos às três e seis horas pós-operatórias e menor resistência nas vias aéreas às seis horas
Ali (2007) <sup>90</sup>	Reparação de aneurisma da aorta abdominal em cirurgia aberta	AIC 2x (10I + 10R) 1.º ciclo à direita, 2.º à esquerda	Indução com propofol e remifentanil, manutenção com desflurano	Redução da troponina I e creatinina sérica Menor incidência de EAM e duração do internamento na UCI
Hausenloy (2007) <sup>49</sup>	Cirurgia coronária eletiva com CEC	MS Direito 3x (5I + 5R)	Indução com midazolam, propofol e etomidato ou fentanil, manutenção com propofol	Redução da troponina T às seis, 12, 24 e 48 horas pós-operatórias, diminuição em 43% da ASC
Hoole (2009) <sup>91</sup>	ICP eletiva em adultos com doença coronária	MS 3x (5I + 5R)	Não aplicável	Diminuição da cTnI e alterações do segmento ST. Menor incidência de desconforto torácico pós-operatório e eventos cardíacos/cerebrais aos seis meses
Hong (2010) <sup>55</sup>	Cirurgia coronária eletiva sem CEC	MS 4x (5I + 5R)	Indução com midazolam e sufentanil, manutenção com sevoflurano e remifentanil	Redução não estatisticamente significativa da troponina I
Li (2010) <sup>92</sup>	Substituição valvular por valvulopatia reumática	MI Direito 3x (4I + 4R)	Indução com midazolam, manutenção com fentanil e isoflurano	Redução da cTnI e menor incidência de fibrilação ventricular pós-operatória
Thielmann (2010) <sup>93</sup>	Cirurgia coronária eletiva com CEC em adultos com doença coronária de três vasos	MS Esquerdo 3x (5I + 5R)	Indução com sufentanil e etomidato, manutenção com isoflurano ou propofol	Redução da cTnI (máxima, total e ASC) pós-operatória
Rahman (2010) <sup>94</sup>	Cirurgia coronária eletiva ou urgente com CEC em adultos com doença coronária em mais que um vaso	MS 3x (5I + 5R)	Indução com etomidato e fentanil, manutenção com propofol e alfentanil, suplementada com enflurano ou sevoflurano durante a CEC	Sem diferenças entre os grupos
Kottenberg (2011) <sup>63</sup>	Cirurgia coronária eletiva com CEC em adultos com doença coronária de três vasos	MSE 3x (5I + 5R)	Indução com sufentanil e etomidato, manutenção com isoflurano ou propofol	Diminuição da cTnI (máxima, total e ASC) com isoflurano mas não propofol
Karuppasamy (2011) <sup>95</sup>	Cirurgia coronária eletiva com CEC	MS esquerdo 3x (5I + 5R)	Indução com remifentanil e propofol, manutenção com isoflurano antes da CEC e propofol durante e após este	Sem diferenças na cTnI, BNP, CK-MB, concentração venosa central de citocinas ou fatores de crescimento
Venugopal (2011) <sup>96</sup>	Cirurgia coronária eletiva com CEC	MS Direito 3x (5I + 5R)	Indução com midazolam e etomidato ou propofol, manutenção com propofol ou agentes voláteis	Redução da troponina T total nas 72 horas pós-operatórias

Tabela 2 (Continuação)

Ensaio clínico	Procedimento cirúrgico	Estímulo isquêmico	Agentes anestésicos utilizados	Resultados
Ghaemian (2012) <sup>97</sup>	ICP electiva em adultos com doença coronária	MI 2x (5I + 5R)	Não aplicável	Redução da dor torácica e desvio do segmento ST intra-operatórios, diminuição da troponina T nas 24 horas após a intervenção
Prasad (2012) <sup>98</sup>	ICP eletiva em adultos com doença coronária	MS 3x (3I + 3R)	Não aplicável	Sem diferenças na cTnI, hsCPR ou CPE
Lomivorotov (2012) <sup>99</sup>	Cirurgia coronária eletiva com CEC	MS 3x (5I + 5R)	Indução com fentanil e propofol, manutenção com isoflurano e fentanil	Redução da pressão arterial média e da resistência vascular, aumento do volume de ejeção. Sem diferenças nos marcadores de necrose cardíaca
Young (2012) <sup>100</sup>	Cirurgia coronária eletiva com CEC em doentes de alto risco	MS 3x (5I + 5R)	Indução com midazolam e fentanil, manutenção com propofol e isoflurano	Sem diferenças na cTnI, marcadores de lesão renal aguda ou medidas de suporte no internamento

AIC: artéria iliaca comum; ASC: área sob a curva; BNP: *brain natriuretic peptide*; CEC: circulação extracorporeal; CK-MB: *creatine kinase MB*; CPE: células progenitoras endoteliais; cTnI: troponina I cardíaca; cTnT: troponina T cardíaca; EAM: enfarte agudo do miocárdio; hsCPR: proteína C reativa de alta sensibilidade; I: isquemia; ICP: intervenção coronária percutânea; MI: membro inferior; MS: membro superior; R: reperfusão; UCI: unidade de cuidados intensivos.

pré-condicionamento<sup>56,57</sup>, o que poderá vir a limitar a sua aplicabilidade aos doentes com mais de 65 anos<sup>58</sup>.

Também as *comorbilidades* dos doentes podem influenciar a eficácia do pré-condicionamento. Por exemplo, num doente com angina estável os períodos transitórios de isquemia despoletados pelo esforço desencadeiam um mecanismo de pré-condicionamento «natural» a nível cardíaco. De facto, é interessante verificar que dados de vários estudos demonstraram que doentes com angina nas 48 horas que antecedem o enfarte têm melhor prognóstico que os restantes<sup>58,59</sup>. Desta forma, em teoria, nos doentes com angina estável a indução adicional de pré-condicionamento remoto pode não trazer benefícios adicionais. O mesmo será verdade para indivíduos com doença arterial periférica, patologia que simula o pré-condicionamento remoto.

A *diabetes mellitus tipo 2* induz um estado crónico basal de resistência à lesão de isquemia-reperfusão. Este fenómeno deve-se ao aumento de proteínas glicosiladas que modulam, entre outras, a função mitocondrial. Uma das consequências é a supressão do PTPM o que, como referido anteriormente, é também um efeito do PIRM. Como contrapartida a cardioproteção adicional induzida pelo pré-condicionamento é atenuada pois envolve os mesmos mecanismos subcelulares. Assim, em doentes diabéticos, o PIRM parece não induzir cardioproteção adicional<sup>59</sup>.

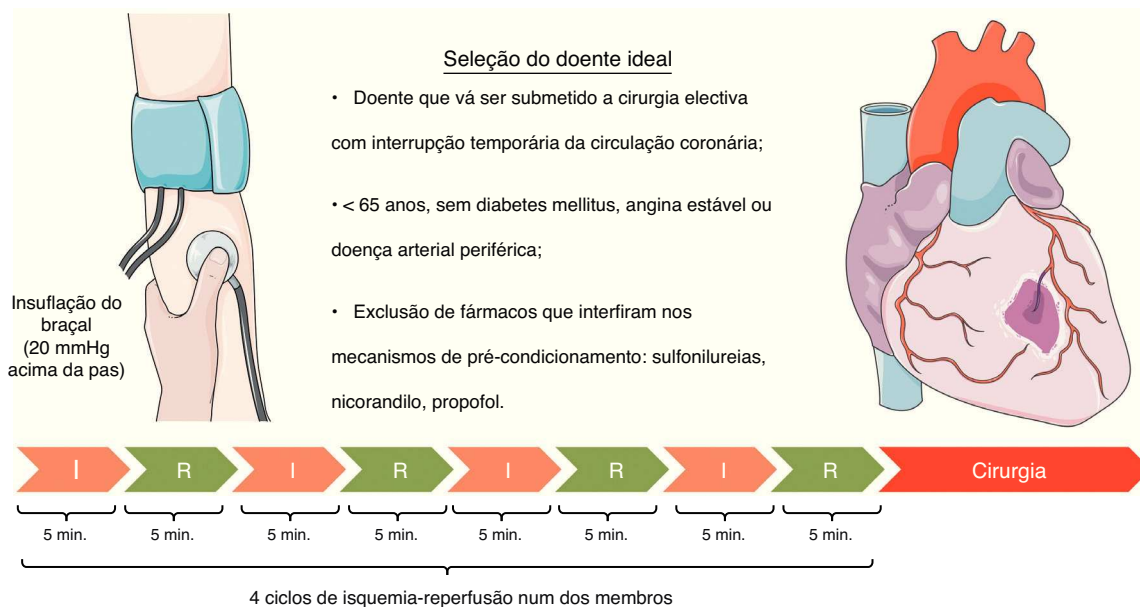
Os *fármacos* utilizados pelos doentes também influenciam o efeito do PIRM. As sulfonilureias, por exemplo, são antidiabéticos orais que atuam por inibição dos canais  $K_{ATP}^+$  mitocondriais. O uso destes fármacos está associado a maior mortalidade após EAM<sup>60</sup>, o que pode ser decorrente da interrupção do efeito do pré-condicionamento nos cardiomiócitos<sup>61</sup> pois, como referido anteriormente,

envolve a abertura dos mesmos canais. A exposição crónica a estes agentes hipoglicemiantes torna o miocárdio insensível ao pré-condicionamento<sup>61</sup>. As novas sulfonilureias, como a gliclazida, mais específicas para as células  $\beta$  pancreáticas, parecem não causar alterações da mortalidade cardiovascular<sup>62</sup>.

O *regime anestésico* utilizado durante a cirurgia também pode influenciar a indução de PIRM. Kottenberg et al.<sup>63</sup> compararam grupos de doentes sujeitos a PIRM com diferentes regimes anestésicos durante cirurgia coronária com circulação extracorporeal. Não encontraram diferenças quando o agente anestésico utilizado para manutenção era propofol, mas quando era aplicado o isoflurano observou-se uma redução dos valores de troponina I. Esta observação é consistente com os dados que sugerem que os agentes anestésicos voláteis têm efeitos pré-condicionantes intrínsecos<sup>64</sup>. Assim, é possível que a cardioproteção só se torne evidente após um efeito aditivo/sinérgico entre a isquemia esquelética e a anestesia utilizada ou então que seja anulada pelo propofol.

Uma meta-análise recente sobre a aplicação do PIRM na cirurgia cardíaca confirmou uma redução dos níveis de troponina no pós-operatório, embora com uma elevada heterogeneidade, que também pode ser explicada pelo grau de ocultação. Nos estudos com dupla ocultação, esta redução dos marcadores de necrose cardíaca no pós-operatório não foi tão marcada<sup>65</sup>. Uma outra meta-análise englobando nove ensaios clínicos e 704 doentes, mostrou uma redução estatisticamente significativa da libertação de troponina, mesmo após excluídos fatores de confundimento como o uso de agentes anestésicos voláteis<sup>66</sup>.

Para estudos futuros é necessário esclarecer vários aspetos do PIRM, nomeadamente o protocolo de



**Figura 2** Exemplo de um protocolo para aplicação de pré-condicionamento isquêmico remoto (figura elaborada com recurso ao Servier Medical Art). I: isquemia; PAS: pressão arterial sistólica; R: reperfusão.

pré-condicionamento recomendado (duração, número de ciclos e local do estímulo isquêmico a utilizar). Além disso, até ao momento só foram testados os benefícios da resposta imediata e não da resposta tardia.

Com base na análise dos vários estudos clínicos realizados, na **Figura 2** propomos um modelo de indução de PIRM que pode ser aplicado a indivíduos que irão ser submetidos a cirurgia cardíaca.

Para se esclarecer definitivamente os benefícios clínicos do pré-condicionamento isquêmico está atualmente em curso um ensaio clínico multicêntrico, randomizado, com dupla ocultação (estudo RIPHeart<sup>67</sup>), que pretende incluir cerca de 2000 doentes submetidos a cirurgia cardíaca tendo como *endpoint* primário determinar se o PIRM pode reduzir a mortalidade total.

#### Indução de pré-condicionamento isquêmico farmacológico

O conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no PIRM pode levar ao desenvolvimento de fármacos que possam reproduzir o seu efeito e, desta forma, criar uma nova estratégia terapêutica para preservar o tecido cardíaco submetido a isquemia. Um dos fármacos alvo de investigação é o *diazóxido*, um ativador dos canais  $K_{ATP}^+$  mitocondriais que mostrou, em modelos laboratoriais, reduzir o tamanho de enfarte do miocárdio uma vez que a sua administração antes de um episódio de isquemia atrasa a morte dos cardiomiócitos<sup>68</sup>. A aplicação deste fármaco em ensaios clínicos, no contexto de pré-condicionamento, ainda é limitada uma vez que existe apenas um ensaio clínico publicado, que mostrou que a administração de diazóxido, aquando da cardioplegia na cirurgia coronária, é segura e melhora a função mitocondrial<sup>69</sup>.

Contudo, existem já no mercado fármacos que, em parte, devem o seu efeito à ativação dos mecanismos subcelulares do pré-condicionamento isquêmico. Um exemplo é o

*nicorandilo*, utilizado na prática clínica como antianginoso. O nicorandilo apresenta um mecanismo de ação duplo: por um lado é um dador de NO, induzindo a vasodilatação das artérias coronárias epicárdicas, por outro abre os canais  $K_{ATP}^+$  mitocondriais, dilatando os vasos coronários de resistência. No estudo IONA, o tratamento da angina estável com nicorandilo permitiu uma redução do *endpoint* combinado de mortalidade cardiovascular, enfarte do miocárdio e hospitalização<sup>70</sup>, o que não parece ser explicado simplesmente pelo seu efeito vasodilatador. É provável que o nicorandilo, através da abertura dos canais  $K_{ATP}^+$  mitocondriais, faça pré-condicionamento do miocárdio e reduza a lesão de isquemia-reperfusão<sup>71</sup>.

#### Aplicação do pré-condicionamento isquêmico à transplantação de órgãos

Uma área aliciente para o uso de PIRM é a transplantação cardíaca. Antes de ser transplantado, o órgão é sujeito a períodos variáveis de isquemia ocorrendo também lesão de isquemia-reperfusão no recetor<sup>72</sup>. Ensaio pré-clínicos demonstram que, mesmo que o pré-condicionamento seja realizado no recetor antes do transplante, a cardioproteção é transferida para o órgão<sup>29</sup>.

Apesar dos mecanismos fisiopatológicos conhecidos sugerirem que, teoricamente, o PIRM será uma técnica viável a utilizar antes do transplante, não existem ainda ensaios clínicos a analisar esta questão.

#### Aplicação à clínica de outras formas de condicionamento isquêmico remoto

Na última década foram descritos dois novos fenómenos de condicionamento isquêmico: o per-condicionamento isquêmico e o pós-condicionamento isquêmico remoto do miocárdio.



O pós-condicionamento isquêmico remoto envolve a aplicação dos ciclos de isquemia-reperusão num dos membros após a reperusão do miocárdio. Aplica-se, por exemplo, imediatamente após intervenção coronária percutânea (ICP) primária de doentes com síndrome coronária aguda com supradesnívelamento ST. Nos estudos pré-clínicos até agora realizados parece ter um efeito citoprotetor semelhante ao pré-condicionamento isquêmico remoto<sup>6</sup>.

O per-condicionamento isquêmico remoto consiste na imposição do estímulo isquêmico durante a isquemia do miocárdio, ainda antes da terapêutica de reperusão<sup>5</sup>. Apresenta implicações clínicas aliciantes porque, dada a impossibilidade de prever os eventos isquêmicos, possibilita a sua aplicação em situações agudas, como no EAM. Um ensaio clínico publicado em 2010, na *Lancet*<sup>73</sup>, avaliou 330 doentes com síndrome coronária aguda com supra ST, submetidos a ICP primária. Estes foram aleatorizados durante o transporte pré-hospitalar em dois grupos: terapêutica *standard versus* um grupo em que se aplicou PIRM através da insuflação de um braçal no membro superior com quatro ciclos de cinco minutos de isquemia e cinco minutos de reperusão, antes da ICP primária. Trinta dias após o evento, o volume de miocárdio viável, quando comparado com a área em risco de necrose, estava aumentado no grupo submetido a per-condicionamento isquêmico remoto.

Finalmente, a proteção da lesão de isquemia-reperusão pelo pré-condicionamento não se limita ao miocárdio. Os últimos anos têm visto um crescimento exponencial na investigação deste fenómeno e, atualmente, estão descritos o pré-condicionamento hepático por isquemia muscular esquelética<sup>74</sup> e pulmonar por isquemia intestinal transitória<sup>75</sup>.

## Conclusão

O pré-condicionamento isquêmico remoto do miocárdio parece fazer parte de uma complexa rede de interações intra e inter-órgãos através da qual o organismo gera estímulos citoprotetores que aumentam a sua resistência à isquemia.

Num futuro próximo espera-se que a aplicação deste conceito em vários contextos clínicos (antes da cirurgia cardíaca, após terapêutica de reperusão, transplantação cardíaca) permita reduzir a lesão de isquemia-reperusão e reduzir a área de enfarte.

## Responsabilidades éticas

**Proteção de pessoas e animais.** Os autores declaram que para esta investigação não se realizaram experiências em seres humanos e/ou animais.

**Confidencialidade dos dados.** Os autores declaram que não aparecem dados de pacientes neste artigo.

**Direito à privacidade e consentimento escrito.** Os autores declaram que não aparecem dados de pacientes neste artigo.

## Financiamento

Trabalho financiado pela Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (Projetos, PEst-C/SAU/UI0051/2011 e EXCL/BIM-MEC/0055/2012) através da Unidade de I&D Cardiovascular e pela European Commission Grant FP7-Health-2010 (MEDIA-261409).

## Conflito de interesses

Trabalho financiado pela Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (Projetos, PEst-C/SAU/UI0051/2011 e EXCL/BIM-MEC/0055/2012) através da Unidade de I&D Cardiovascular e pela European Commission Grant FP7-Health-2010 (MEDIA-261409).

## Bibliografia

1. de Luca G, Suryapranata H, Ottervanger JP, et al. Time delay to treatment and mortality in primary angioplasty for acute myocardial infarction: Every minute of delay counts. *Circulation*. 2004;109:1223-5.
2. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190:255-66.
3. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357:1121-35.
4. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74:1124-36.
5. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, et al. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: First demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H1883-90.
6. Andreka G, Vertesaljai M, Szantho G, et al. Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart*. 2007;93:749-52.
7. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, et al. Regional ischemic 'reconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993;87:893-9.
8. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, et al. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996;94:2193-200.
9. Walsh SR, Tang T, Sadat U, et al. Cardioprotection by remote ischaemic preconditioning. *Br J Anaesth*. 2007;99:611-6.
10. Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA. Ischemic preconditioning at a distance: Reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation*. 1997;96:1641-6.
11. Oxman T, Arad M, Klein R, et al. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol*. 1997;273 4 Pt 2:H1707-12.
12. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: A review. *Cardiovasc Surg*. 2002;10:620-30.
13. Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: Timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol*. 1997;92:159-67.
14. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, et al. Remote ischemic preconditioning provides early and late protection against endothelial ischemia-reperfusion injury in

- humans: Role of the autonomic nervous system. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:450–6.
15. Zhou K, Yang B, Zhou XM, et al. Effects of remote ischemic preconditioning on the flow pattern of the left anterior descending coronary artery in normal subjects. *Int J Cardiol*. 2007;122:250–1.
  16. Shimizu M, Konstantinov IE, Kharbanda RK, et al. Effects of intermittent lower limb ischaemia on coronary blood flow and coronary resistance in pigs. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007;190:103–9.
  17. Dow J, Bhandari A, Simkhovich BZ, et al. The effect of acute versus delayed remote ischemic preconditioning on reperfusion induced ventricular arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2012.
  18. Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Ghasemi M, et al. Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2 receptors in the rat heart. *Eur J Pharmacol*. 2008;579:246–52.
  19. Kristiansen SB, Henning O, Kharbanda RK, et al. Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted heart by a KATP channel-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1252–6.
  20. Li G, Labruto F, Sirsjo A, et al. Myocardial protection by remote preconditioning: The role of nuclear factor kappa-B p105 and inducible nitric oxide synthase. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;26:968–73.
  21. Konstantinov IE, Arab S, Li J, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130:1326–32.
  22. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, et al. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics*. 2004;19:143–50.
  23. Liem DA, te Lintel Hekkert M, Manintveld OC, et al. Myocardium tolerant to an adenosine-dependent ischemic preconditioning stimulus can still be protected by stimuli that employ alternative signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1165–72.
  24. Chen XG, Wu BY, Wang JK, et al. Mechanism of the protective effects of noninvasive limbs preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Chin Med J (Engl)*. 2005;118:1723–7.
  25. Dong JH, Liu YX, Ji ES, et al. Limb ischemic preconditioning reduces infarct size following myocardial ischemia-reperfusion in rats. *Sheng Li Xue Bao*. 2004;56:41–6.
  26. Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2010;105:651–5.
  27. Mastitskaya S, Marina N, Gourine A, et al. Cardioprotection evoked by remote ischaemic preconditioning is critically dependent on the activity of vagal pre-ganglionic neurones. *Cardiovasc Res*. 2012;95:487–94.
  28. Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, et al. Remote preconditioning by infrarenal occlusion of the aorta protects the heart from infarction: A newly identified non-neuronal but PKC-dependent pathway. *Cardiovasc Res*. 2002;55:590–601.
  29. Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, et al. Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation*. 2005;79:1691–5.
  30. Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, et al. Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: Evidence suggesting cross-species protection. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117:191–200.
  31. Shahid M, Tauseef M, Sharma KK, et al. Brief femoral artery ischaemia provides protection against myocardial ischaemia-reperfusion injury in rats: The possible mechanisms. *Exp Physiol*. 2008;93:954–68.
  32. Ohnuma Y, Miura T, Miki T, et al. Opening of mitochondrial K(ATP) channel occurs downstream of PKC-epsilon activation in the mechanism of preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H440–7.
  33. Wang Y, Takashi E, Xu M, et al. Downregulation of protein kinase C inhibits activation of mitochondrial K(ATP) channels by diazoxide. *Circulation*. 2001;104:85–90.
  34. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev*. 2008;88:581–609.
  35. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: The Holy Grail of cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2010;105:151–4.
  36. Murata M, Akao M, O'Rourke B, et al. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*. 2001;89:891–8.
  37. dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, et al. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H284–95.
  38. Vander Heide RS, Hill ML, Reimer KA, et al. Effect of reversible ischemia on the activity of the mitochondrial ATPase: Relationship to ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:103–12.
  39. Ardehali H, O'Rourke B. Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39:7–16.
  40. Chen YS, Chien CT, Ma MC, et al. Protection "outside the box" (skeletal remote preconditioning) in rat model is triggered by free radical pathway. *J Surg Res*. 2005;126:92–101.
  41. Baines CP, Song CX, Zheng YT, et al. Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ Res*. 2003;92:873–80.
  42. Ruiz-Meana M. Ischaemic preconditioning and mitochondrial permeability transition: A long-lasting relationship. *Cardiovasc Res*. 2012;96:157–9, discussion 60–4.
  43. Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1995;91:1872–85.
  44. Kawata H, Yoshida K, Kawamoto A, et al. Ischemic preconditioning upregulates vascular endothelial growth factor mRNA expression and neovascularization via nuclear translocation of protein kinase C epsilon in the rat ischemic myocardium. *Circ Res*. 2001;88:696–704.
  45. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res*. 2008;58:88–111.
  46. Kim YM, Kim TH, Seol DW, et al. Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome c release. *J Biol Chem*. 1998;273:31437–41.
  47. Kim YM, Talanian RV, Li J, et al. Nitric oxide prevents IL-1beta and IFN-gamma-inducing factor (IL-18) release from macrophages by inhibiting caspase-1 (IL-1beta-converting enzyme). *J Immunol*. 1998;161:4122–8.
  48. Cheung MM, Kharbanda RK, Konstantinov IE, et al. Randomized controlled trial of the effects of remote ischemic preconditioning on children undergoing cardiac surgery: First clinical application in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:2277–82.
  49. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: A randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;370:575–9.
  50. Fellahi JL, Gue X, Richomme X, et al. Short- and long-term prognostic value of postoperative cardiac troponin I concentration in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Anesthesiology*. 2003;99:270–4.
  51. Kathiresan S, Servoss SJ, Newell JB, et al. Cardiac troponin T elevation after coronary artery bypass grafting is

- associated with increased one-year mortality. *Am J Cardiol.* 2004;94:879–81.
52. Steen H, Giannitsis E, Futterer S, et al. Cardiac troponin T at 96 hours after acute myocardial infarction correlates with infarct size and cardiac function. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:2192–4.
53. Vasile VC, Babuin L, Giannitsis E, et al. Relationship of MRI-determined infarct size and cTnI measurements in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Clin Chem.* 2008;54:617–9.
54. Iliodromitis EK, Kyrzopoulos S, Paraskevaidis IA, et al. Increased C reactive protein and cardiac enzyme levels after coronary stent implantation. Is there protection by remote ischaemic preconditioning? *Heart.* 2006;92:1821–6.
55. Hong DM, Mint JJ, Kim JH, et al. The effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery. *Anaesth Intensive Care.* 2010;38:924–9.
56. Boengler K, Schulz R, Heusch G. Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovasc Res.* 2009;83:247–61.
57. Hausenloy DJ, Baxter G, Bell R, et al. Translating novel strategies for cardioprotection: The Hatter Workshop Recommendations. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:677–86.
58. Lee TM, Su SF, Chou TF, et al. Loss of preconditioning by attenuated activation of myocardial ATP-sensitive potassium channels in elderly patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation.* 2002;105:334–40.
59. Jensen RV, Zachara NE, Nielsen PH, et al. Impact of O-GlcNAc on cardioprotection by remote ischaemic preconditioning in non-diabetic and diabetic patients. *Cardiovasc Res.* 2012.
60. Malmberg K. Prospective randomised study of intensive insulin treatment on long term survival after acute myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. DIGAMI (Diabetes Mellitus, Insulin Glucose Infusion in Acute Myocardial Infarction) Study Group. *BMJ.* 1997;314:1512–5.
61. Cleveland Jr JC, Meldrum DR, Cain BS, et al. Oral sulfonylurea hypoglycemic agents prevent ischemic preconditioning in human myocardium. *Circulation.* 1997;96:29–32.
62. Loubani M, Fowler A, Standen NB, et al. The effect of gliclazide and glibenclamide on preconditioning of the human myocardium. *Eur J Pharmacol.* 2005;515:142–9.
63. Kottenberg E, Thielmann M, Bergmann L, et al. Protection by remote ischemic preconditioning during coronary artery bypass graft surgery with isoflurane but not propofol - a clinical trial. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2012;56:30–8.
64. Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, et al. Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology.* 1999;91:1437–46.
65. Pilcher JM, Young P, Weatherall M, et al. A systematic review and meta-analysis of the cardioprotective effects of remote ischaemic preconditioning in open cardiac surgery. *J R Soc Med.* 2012;105:436–45.
66. d'Ascenzo F, Cavallero E, Moretti C, et al. Remote ischaemic preconditioning in coronary artery bypass surgery: A meta-analysis. *Heart.* 2012;98:1267–71.
67. Meybohm P, Zacharowski K, Cremer J, et al. Remote ischaemic preconditioning for heart surgery. The study design for a multicenter randomized double-blinded controlled clinical trial-the RIPHeart-Study. *Eur Heart J.* 2012;33:1423–6.
68. Deja MA, Golba KS, Malinowski M, et al. Diazoxide provides maximal KATP channels independent protection if present throughout hypoxia. *Ann Thorac Surg.* 2006;81:1408–16.
69. Deja MA, Malinowski M, Golba KS, et al. Diazoxide protects myocardial mitochondria, metabolism, and function during cardiac surgery: A double-blind randomized feasibility study of diazoxide-supplemented cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;137:997–1004, e1–2.
70. IONA Study Group. Effect of nicorandil on coronary events in patients with stable angina: The Impact Of Nicorandil in Angina (IONA) randomised trial. *Lancet.* 2002;359:1269–75.
71. Horinaka S. Use of nicorandil in cardiovascular disease and its optimization. *Drugs.* 2011;71:1105–19.
72. Wood KJ, Goto R. Mechanisms of rejection: Current perspectives. *Transplantation.* 2012;93:1–10.
73. Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, et al. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: A randomised trial. *Lancet.* 2010;375:727–34.
74. Abu-Amara M, Yang SY, Quaglia A, et al. Nitric oxide is an essential mediator of the protective effects of remote ischaemic preconditioning in a mouse model of liver ischaemia/reperfusion injury. *Clin Sci (Lond).* 2011;121:257–66.
75. Avgerinos ED, Kostopanagiotou G, Costopanagiotou C, et al. Intestinal preconditioning ameliorates ischemia-reperfusion induced acute lung injury in rats: An experimental study. *J Surg Res.* 2010;160:294–301.
76. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, et al. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via adenosine receptors in rabbits: Effects of "remote preconditioning". *J Am Coll Cardiol.* 1999;33:556–64.
77. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, et al. Renal ischemia preconditions myocardium: Role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol.* 1998;275 Pt 2:H1542–7.
78. Liem DA, Verdouw PD, Ploeg H, et al. Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H29–37.
79. Ding YF, Zhang MM, He RR. Role of renal nerve in cardioprotection provided by renal ischemic preconditioning in anesthetized rabbits. *Sheng Li Xue Bao.* 2001;53:7–12.
80. Schoemaker RG, van Heijningen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1571–6.
81. Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, et al. Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKC $\epsilon$ -isoform. *Cardiovasc Res.* 2002;55:583–9.
82. Wolfrum S, Nienstedt J, Heidbreder M, et al. Calcitonin gene related peptide mediates cardioprotection by remote preconditioning. *Regul Pept.* 2005;127:217–24.
83. Xiao L, Lu R, Hu CP, et al. Delayed cardioprotection by intestinal preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol.* 2001;427:131–5.
84. Tang ZL, Dai W, Li YJ, et al. Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1999;359:243–7.
85. Dickson EW, Tubbs RJ, Porcaro WA, et al. Myocardial preconditioning factors evoke mesenteric ischemic tolerance via opioid receptors and K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H22–8.
86. Patel HH, Moore J, Hsu AK, et al. Cardioprotection at a distance: Mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34:1317–23.
87. Zhang SZ, Wang NF, Xu J, et al. Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning. *Anesthesiology.* 2006;105:550–6.
88. Weinbrenner C, Schulze F, Sarvary L, et al. Remote preconditioning by infrarenal aortic occlusion is operative via delta1-opioid receptors and free radicals in vivo in the rat heart. *Cardiovasc Res.* 2004;61:591–9.

89. Wong GT, Lu Y, Mei B, et al. Cardioprotection from remote preconditioning involves spinal opioid receptor activation. *Life Sci.* 2012;91:860–5.
90. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: A randomized controlled trial. *Circulation.* 2007;116 11 Suppl: I98–105.
91. Hoole SP, Heck PM, Sharples L, et al. Cardiac Remote Ischemic Preconditioning in Coronary Stenting (CRISP Stent) Study: A prospective, randomized control trial. *Circulation.* 2009;119:820–7.
92. Li L, Luo W, Huang L, et al. Remote preconditioning reduces myocardial injury in adult valve replacement: A randomized controlled trial. *J Surg Res.* 2010;164:e21–6.
93. Thielmann M, Kottenberg E, Boengler K, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial injury after coronary artery bypass surgery with crystalloid cardioplegic arrest. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:657–64.
94. Rahman IA, Mascaro JG, Steeds RP, et al. Remote ischemic preconditioning in human coronary artery bypass surgery: From promise to disappointment? *Circulation.* 2010;122 11 Suppl:S53–9.
95. Karuppasamy P, Chaubey S, Dew T, et al. Remote intermittent ischemia before coronary artery bypass graft surgery: A strategy to reduce injury and inflammation? *Basic Res Cardiol.* 2011;106:511–9.
96. Venugopal V, Hausenloy DJ, Ludman A, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery with cold-blood cardioplegia: A randomised controlled trial. *Heart.* 2009;95:1567–71.
97. Ghaemian A, Nouraei SM, Abdollahian F, et al. Remote ischemic preconditioning in percutaneous coronary revascularization: A double-blind randomized controlled clinical trial. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2012;20:548–54.
98. Prasad A, Gossl M, Hoyt J, et al. Remote ischemic preconditioning immediately before percutaneous coronary intervention does not impact myocardial necrosis, inflammatory response, and circulating endothelial progenitor cell counts: A single center randomized sham controlled trial. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2013;81:930–6.
99. Lomivorotov VV, Shmyrev VA, Nepomnyaschih VA, et al. Remote ischaemic preconditioning does not protect the heart in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2012;15:18–22.
100. Young PJ, Dalley P, Garden A, et al. A pilot study investigating the effects of remote ischemic preconditioning in high-risk cardiac surgery using a randomised controlled double-blind protocol. *Basic Res Cardiol.* 2012;107:256.