

GLAUCO FERNANDES SAES

**Pré-condicionamento isquêmico remoto em
portadores de claudicação intermitente de
membros inferiores**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Antonio Eduardo Zerati

**SÃO PAULO
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Saes, Glauco Fernandes

Pré-condicionamento isquêmico remoto em portadores de claudicação intermitente de membros inferiores / Glauco Fernandes Saes. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: Antonio Eduardo Zerati.

Descritores: 1.Claudicação intermitente 2.Precondicionamento isquêmico
3.Doença arterial periférica 4.Aterosclerose 5.Reperusão 6.Hipóxia celular

USP/FM/DBD-462/15

*Aprender é a única coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca
se arrepende.*

Leonardo da Vinci

À minha *mãe*, Maria Elena (*in memoriam*), ser humano exemplar, que dedicou sua vida a ajudar ao próximo.

Ao meu pai, Gabriel, pelo amor e pelo sacrifício, enfim, pela vida que dedicou à criação exemplar de seus filhos.

À minha esposa Leticia, pela paciência e pelo apoio de sempre. Ela que me completa e me torna uma pessoa melhor. Estar ao seu lado é imprescindível à minha vida.

Aos meus amados filhos, Pedro e Giovanna, razão maior da minha vida, fonte de felicidade diária e inesgotável.

Aos meus irmãos Gabriel, Cristiane e Suellen, tão importantes para mim. Meus exemplos de vida.

As pequenas Gabrielle, Maria Fernanda e Bianca, sobrinhas maravilhosas que alegram nossa família.

Aos queridos Attílio e Sandra, pelo apoio e estímulo.

Aos queridos Paulo, Leonardo e Kátia, que completam nossa família.

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pedro Puech-Leão e ao Prof. Dr. Nelson de Luccia, Professores Titulares da Disciplina de Cirurgia Vascular e Endovascular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelos importantes conhecimentos transmitidos continuamente e também pelo apoio e pelas oportunidades oferecidas.

Ao Prof. Dr. Antonio Eduardo Zerati, grande amigo e orientador, companheiro de longa data, a quem tenho eterna gratidão por me ajudar profissionalmente e academicamente.

Ao Prof. Dr. Nelson Wolosker, pela amizade e orientações, cuja brilhante trajetória acadêmica gera diversos frutos e serve como fonte inspiradora para muitos.

Ao Prof. Dr. Erasmo Simão da Silva, pelos importantes aconselhamentos para qualificação deste projeto, além da amizade e ajuda durante minha formação profissional.

Ao Dr. Kenji Nishinari, pela relevante contribuição no aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao Dr. José Augusto Tavares Monteiro, pelos importantes aconselhamentos para qualificação deste projeto.

Ao Dr. Ivan Benaduce Casella, pela sua amizade e por seus importantes aconselhamentos para qualificação deste projeto.

Aos Professores de Educação Física, Dr. Breno Farah Quintella, Dr. Gabriel Cucato e Dr. Raphael Mendes Ritti Dias, pela colaboração na análise dos dados.

Ao Dr. Rubem Miguel Ayzin Rosoky, sem o qual este projeto não teria existido.

Ao Dr. Otávio Henrique Ninomiya, pela amizade, companheirismo e exemplo de competência.

Ao Dr. Celso Higutchi, Dr. Flávio Henrique Duarte, Dra. Luciana Ragazzo, Dra. Priscila Urtiga e Silva e Dr. Rafael Apolloni, pela amizade e pelo estímulo de sempre, possibilitando a conclusão deste projeto.

Aos Cirurgiões Vasculares, Baptista Muraco Netto, Dr. Calógero Presti, Dr. Cid José Sitrângulo Junior, Dr. Júlio César Saucedo Mariño, Dr. Mauro Figueiredo Carvalho Andrade, Dr. Paulo Kauffman, Prof. Dr. Ricardo Aun e Dr. Walter Campos Júnior, pela minha formação profissional.

Aos meus preceptores, Dr. Augusto de Carvalho Sobrinho e Dr. Ronald Fidelis, e amigos de residência, Dr. Celso Ricardo Bregalda Neves, Dr. Marco Antônio Munia e Dra. Roberta Murasaki Cardoso, pelo coleguismo de sempre.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de gráficos	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Pré-Condicionamento Isquêmico.....	2
1.1.1 Pré-condicionamento isquêmico remoto	3
1.1.2 Mecanismos fisiopatológicos envolvidos no pré- condicionamento isquêmico remoto	6
1.1.2.1 Fase precoce do pré-condicionamento isquêmico	7
1.1.2.2 A fase tardia do pré-condicionamento isquêmico	11
1.2 Claudicação intermitente e Doença Arterial Obstrutiva Periférica	12
1.2.1 Fatores de risco da DAOP	13
1.2.2 Epidemiologia.....	14
1.2.2.1 Prevalência e incidência	14
1.2.3 Diagnóstico	15
1.2.3.1 Exames Complementares	16
1.2.4 Tratamento.....	20
1.2.4.1 Controle dos fatores de risco	20
1.2.4.2 Medicamentoso.....	21
1.2.4.3 Treinamento físico.....	22
1.2.4.4 Cirúrgico.....	23
1.3 Relevância do Estudo.....	24
2 OBJETIVOS	25
3 MÉTODOS	27
3.1 Critérios de Inclusão.....	28
3.2 Critérios de Não Inclusão	29
3.3 Critérios de Exclusão.....	29
3.4 Casuística.....	30
3.5 Teste de Esteira	31
3.6 Pré-Condicionamento Isquêmico Remoto	32
3.7 Índice Tornozelo-Braço	33
3.8 Cálculo da amostra.....	34
3.9 Análise Estatística	35
4 RESULTADOS.....	36
5 DISCUSSÃO	46

6	CONCLUSÕES	53
7	ANEXOS	55
8	REFERÊNCIAS.....	61
	APÊNDICE.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	- Análise de variância
ATP	- Adenosina tri fosfato
Ca ²⁺	- Cálcio
CGRP	- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CI	- Claudicação intermitente
DAOP	- Doença arterial obstrutiva periférica
DIC	- Distância de início de claudicação
DM	- Diabetes mellitus
DTC	- Distância total de claudicação
HAS	- Hipertensão arterial sistêmica
HDL	- Lipoproteína de alta densidade
ITB	- Índice tornozelo – braço
LDL	-Lipoproteína de baixa densidade
NF- κ B	- Fator nuclear kappa B
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintetase induzível
PCI	- Pré-condicionamento isquêmico
PCIR	- Pré–condicionamento isquêmico remoto
PKC	- Proteína quinase C
PTPM	- Poro de transição de permeabilidade mitocondrial
RLO	- Radicais livres de oxigênio
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas de ativação do PCIR.....	7
Figura 2 - Mediadores, vias de ativação e sistema efetor	10
Figura 3 - Fluxograma do estudo	31
Figura 4 - Teste de esteira	31
Figura 5 - Pré condicionamento no braço não dominante.....	32
Figura 6 - Índice Tornozelo-Braço.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais dos pacientes com claudicação intermitente	37
Tabela 2 - Efeito do PCI na distância inicial de claudicação nos três grupos experimentais.....	38
Tabela 3 - Efeito do PCI na distância total de claudicação nos três grupos experimentais.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância inicial de claudicação (DIC)	39
Gráfico 2 -	Efeito individual do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância inicial de claudicação (DIC) dos pacientes do grupo A	39
Gráfico 3 -	Efeito individual do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância inicial de claudicação (DIC) dos pacientes do grupo B	40
Gráfico 4 -	Efeito individual do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância inicial de claudicação (DIC) dos pacientes do grupo C	41
Gráfico 5 -	Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância total de claudicação (DTC)	42
Gráfico 6 -	Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância total de claudicação (DTC) dos pacientes do grupo A.....	42
Gráfico 7 -	Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância total de claudicação (DTC) dos pacientes do grupo B.....	43
Gráfico 8-	Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância total de claudicação (DTC) dos pacientes do grupo C	44
Gráfico 9 -	Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) sobre o índice tornozelo-braço (ITB).....	45

RESUMO

Saes GF. *Pré-condicionamento isquêmico remoto em portadores de claudicação intermitente de membros inferiores* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de 2015.

INTRODUÇÃO: Pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) é o fenômeno pelo qual curtos períodos de isquemia sub-letal sobre um órgão ou tecido, intercalados com reperfusão do mesmo, conferem a outros órgãos ou tecidos distantes deste, um aumento na capacidade de resistir a episódios subsequentes de isquemia, a qual os mesmos possam ser expostos. Com base nesse fato, testamos a hipótese de que o pré-condicionamento isquêmico remoto em pacientes portadores de claudicação intermitente de membros inferiores poderia aumentar a capacidade de deambulação desses pacientes, extrapolando o conceito do PCIR de aumento da capacidade de preservação da integridade celular frente à isquemia, para a manutenção da função celular, tornando a célula mais apta ao trabalho em situações de privação de oxigênio, geradas pela restrição do fluxo sanguíneo, como ocorre nos pacientes com claudicação intermitente de membros inferiores, durante o exercício. **OBJETIVOS:** Avaliar se o PCIR aumenta a distância de início de claudicação e/ou a distância total de claudicação em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica. **MÉTODOS:** Foram estudados 52 pacientes ambulatoriais que apresentavam queixa de claudicação intermitente dos membros inferiores, associada a um pulso arterial ausente ou reduzido no membro sintomático e/ou um índice tornozelo-braço <0,90. Estes pacientes foram randomizados em três grupos (A, B e C). Todos os pacientes foram submetidos a dois testes de caminhada em esteira de acordo com o protocolo de Gardner. O grupo A fez o primeiro teste de esteira sem o pré-condicionamento isquêmico remoto e,

após 7 dias, foi submetido a um novo teste de esteira, agora precedido pelo pré-condicionamento isquêmico remoto. O grupo B foi submetido ao pré-condicionamento isquêmico remoto antes do primeiro teste de esteira e, após 7 dias, realizou novo teste de esteira, agora sem o pré-condicionamento isquêmico remoto. Já no Grupo C (grupo controle), ambos os testes de esteira foram realizados sem pré-condicionamento isquêmico remoto, também com 7 dias de intervalo. **RESULTADOS:** Os grupos A e C mostraram um aumento na distância de início de claudicação, no segundo teste, em comparação com o primeiro teste. O grupo A teve um aumento estatisticamente significativo, em relação ao grupo C (grupo controle). Com relação à distância total de claudicação, todos os grupos (A, B e C), mostraram um aumento estatisticamente significativo a favor do segundo teste, porém não foi observada diferença entre os grupos (A, B e C). **CONCLUSÕES:** O pré-condicionamento isquêmico remoto aumentou a distância inicial de claudicação em pacientes com claudicação intermitente, no entanto, ele não afetou a distância total de claudicação dos pacientes portadores de claudicação intermitente de membros inferiores.

Descritores: Claudicação intermitente. Precondicionamento isquêmico. Doença arterial periférica. Aterosclerose. Reperfusão. Hipóxia celular.

ABSTRACT

Saes GF. *Remote ischemic preconditioning in patients with intermittent claudication* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2015.

INTRODUCTION: Remote ischemic preconditioning (RIPC) is a phenomenon in which a short period of sub-lethal ischemia in one organ protects against subsequent bouts of ischemia in another organ. Extrapolating the RIPC concept of increasing the preservation of cell integrity capability against ischemia, for the maintenance of cellular function, making the cell more able to work in oxygen deprivation generated by the restriction of blood flow, as occurs in patients with intermittent claudication of the lower limbs during exercise, we hypothesized that RIPC in patients with intermittent claudication would increase muscle tissue resistance to ischemia, thereby resulting in an increased ability to walk. **OBJECTIVES:** To test this hypothesis, we performed gait tests in patients with claudication with and without prior RIPC and then compared the initial claudication distance (ICD) and the total walking distance (TWD). **METHODS:** In a claudication clinic, 52 ambulatory patients who presented with complaints of intermittent claudication in the lower limbs associated with an absent or reduced arterial pulse in the symptomatic limb and/or an ankle-brachial index < 0.90 were recruited for this study. The patients were randomly divided into three groups (A, B and C). All of the patients underwent two tests on a treadmill according to the Gardener protocol. Group A was tested first without RIPC. Group A was subjected to RIPC prior to the second treadmill test. Group B was subjected to RIPC prior to the first treadmill test and then was subjected to a treadmill test without RIPC. In Group C (control group), both treadmill tests were performed without RIPC. The first and second tests were conducted

seven days apart. Brazilian Clinical Trials: RBR-7TF6TM. **RESULTS:** Group A and C showed an increase in the initial claudication distance in the second test compared to the first test. Group A had a statistically significant increase, compared with C group (control group). With respect to total claudication distance, all the groups (A, B and C) showed a statistically significant increase in favor of the second test, but there was no difference between groups (A, B and C). **CONCLUSIONS:** RIPC increased the initial claudication distance in patients with intermittent claudication; however, RIPC did not affect the total walking distance of the patients.

Descriptors: Intermittent claudication. Ischemic preconditioning. Peripheral arterial disease. Atherosclerosis. Reperfusion. Cell hypoxia.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pré-Condicionamento Isquêmico

O pré-condicionamento isquêmico (PCI) foi inicialmente descrito em 1986 por Murry *et al.*¹ como um aumento da resistência da célula miocárdica à isquemia, quando esta era exposta a breves períodos de isquemia não letal intercalados com reperfusão do mesmo tecido. Utilizando um modelo animal canino, os autores demonstraram uma redução de 25% da área de infarto do miocárdio, quando submetia os animais a quatro ciclos de cinco minutos de oclusão e reperfusão da artéria coronária circunflexa antes de sua ligadura por quarenta minutos.

Posteriormente, outros estudos com modelos animais demonstraram que esse fenômeno de aumento da resistência celular à isquemia ocorria também em outras regiões do órgão submetido a episódios de isquemia subletal, porém não necessariamente supridas pela artéria que foi ocluída de maneira intermitente². Nesse momento surgiu a ideia de um caráter regional de pré-condicionamento isquêmico, intra órgão. Nessa mesma linha de pensamento, comprovou-se mais tarde que esse pré-condicionamento ocorria também em outros órgãos distantes do local que foi submetido a episódios de isquemia subletal, surgindo então o conceito de pré-condicionamento isquêmico remoto.

1.1.1 Pré-condicionamento isquêmico remoto

Em 1993, Przyklenk *et al.*² demonstraram que o aumento da resistência da célula à isquemia ocorria também em outros tecidos que não eram submetidos diretamente a breves períodos de isquemia não letal intercalados com reperfusão, conferindo a esse fenômeno o nome de pré-condicionamento isquêmico remoto ou à distância (PCIR). Utilizando um modelo canino, eles constataram que, após quatro ciclos de cinco minutos de oclusão e reperfusão da artéria coronária circunflexa, uma hora antes de uma oclusão mantida por quarenta minutos da artéria coronária descendente anterior, ocorria uma redução significativa da área de infarto do miocárdio irrigado pela artéria coronária descendente anterior, quando comparado ao grupo controle, onde fora realizada somente a oclusão por quarenta minutos da artéria coronária descendente anterior, sem realização do pré-condicionamento isquêmico remoto na artéria coronária circunflexa (6% de área de infarto para o grupo onde fora realizado o PCIR x 16% de área de infarto no grupo controle).

Logo após, Przyklenk *et al.*³⁻⁹ publicaram uma série de trabalhos, relacionando possíveis mediadores ao efeito do PCIR, em modelos animais.

Dickson *et al.*¹⁰, em 1999, evidenciaram que tal efeito protetor podia ser transferido a ratos não pré-condicionados, os quais receberam transfusão de sangue total de ratos submetidos ao PCIR, sugerindo um componente humoral no mecanismo de PCIR.

Em uma crescente evolução dos conhecimentos, outros trabalhos demonstraram que o efeito protetor às células miocárdicas gerado pelo PCIR

podia ser obtido aplicando ciclos de oclusão/reperfusão nos mais variados locais: artéria femoral, artéria renal e artéria mesentérica superior¹¹⁻¹³. Como mostraram os estudos de McClanahan *et al.*¹⁴ no pré-condicionamento cardíaco através de ciclos de oclusão/reperfusão da artéria renal em coelhos, e os de Gho *et al.*¹⁵, no pré-condicionamento cardíaco através de ciclos de oclusão/reperfusão da artéria mesentérica em ratos.

Além das células do músculo cardíaco, células de outros órgãos também se mostraram sensíveis ao efeito protetor que se seguia à isquemia-reperfusão do próprio tecido ou de tecidos distantes¹⁶⁻¹⁹, como pulmões, rins, fígado e músculo esquelético^{16,20,21}, como demonstrado por Ates *et al.*²², que realizaram o pré-condicionamento renal através de ciclos de oclusão/reperfusão da artéria hepática em ratos.

Em humanos, poucos estudos foram realizados até o momento. No território cardiovascular o PCIR mostrou um papel protetor da função endotelial após agressão por isquemia-reperfusão^{15,23,24} além da proteção às células miocárdicas em pacientes submetidos a operações cardíacas, quando tratados com o PCIR^{24,25}. Na área de cirurgia do aparelho digestivo pacientes submetidos a hepatectomia segmentar, que foram submetidos ao PCIR apresentaram um menor aumento das enzimas hepáticas no pós-operatório imediato em comparação aos pacientes que não foram submetidos a o PCIR, porém não houve repercussão clínica em termos de mortalidade e morbidade²⁶.

Especificamente na área de cirurgia vascular, Ali *et al.*²⁷ demonstraram que o clampeamento intermitente das artérias ilíacas (dois ciclos de 10 minutos de isquemia/reperfusão), durante a cirurgia aberta de correção de

aneurisma de aorta abdominal, diminuiu o número de eventos cardiovasculares e de disfunção renal, no pós operatório imediato. Li *et al.*²⁸ também encontraram resultados favoráveis com o PCIR na cirurgia de correção aberta de aneurisma de aorta abdominal, realizando três ciclos de cinco minutos de isquemia/reperfusão no membro superior, após a indução anestésica, com diminuição da injúria pulmonar e intestinal. Entretanto, Walsh *et al.*^{29,30} encontraram resultados conflitantes em seus trabalhos, mostrando redução dos biomarcadores de lesão renal, após a correção endovascular de aneurisma de aorta abdominal em 40 pacientes e, em outro trabalho dos mesmos autores, houve ausência de efeito protetor renal do PCIR na cirurgia de correção aberta de aneurisma de aorta abdominal com dois ciclos de dez minutos de isquemia/reperfusão dos membros inferiores, através do clampeamento intermitente das artérias ilíacas antes da abertura do saco aneurismático.

Recentemente o conceito do PCIR vem sendo extrapolado para o ponto de vista funcional e não apenas de preservação de integridade celular, e nesse sentido dois trabalhos recentes mostraram uma melhora no rendimento de nadadores e ciclistas de alta performance, quando submetidos a quatro ciclos de PCIR, respectivamente em membros superiores e membros inferiores, antes do treinamento^{31,32}.

1.1.2 Mecanismos fisiopatológicos envolvidos no pré-condicionamento isquêmico remoto

Apesar do efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto já ter sido bem demonstrado, os mecanismos responsáveis por tal efeito ainda não foram totalmente esclarecidos.

Temporalmente, o PCIR apresenta duas fases: uma fase inicial ou precoce, que é mais curta e se inicia logo após o PCIR, com duração de aproximadamente quatro horas e uma fase tardia ou segunda janela, que é mais longa, com início aproximado após 24 horas do PCIR e duração de 48 horas^{33,34}. A fase precoce leva a alterações imediatas no tecido submetido a isquemia, já a segunda janela de proteção depende da síntese de proteínas³⁵.

Acredita-se que os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no PCIR compreendam três etapas. A primeira etapa ocorreria no tecido diretamente exposto aos ciclos de isquemia/reperfusão, onde após esses estímulos seriam gerados e liberados fatores protetores locais (gatilho). A segunda etapa se referiria aos mecanismos de comunicação entre o território remoto que foi submetido aos ciclos de isquemia/reperfusão e o órgão alvo, o qual poderia ser mediado por mecanismos neuronais, humorais, resposta sistêmica ou uma combinação desses três mecanismos. Finalmente, uma terceira etapa englobaria os eventos que ocorrem no órgão alvo e conferem proteção a esse tecido (Figura 1).

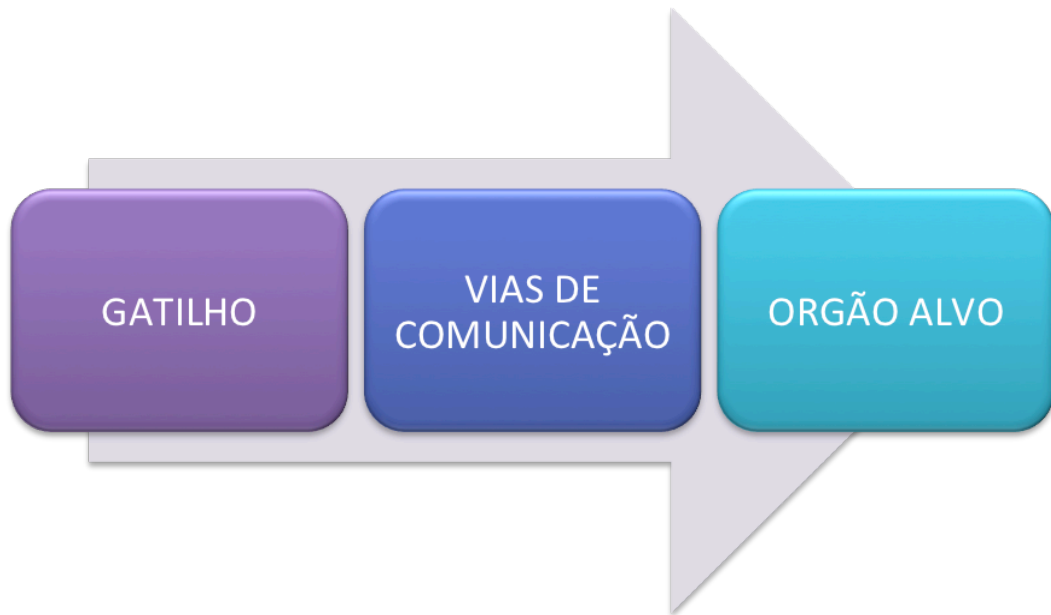


Figura 1 - Etapas de ativação do PCIR

1.1.2.1 Fase precoce do pré-condicionamento isquêmico

Os ciclos de isquemia/reperfusão provocam a liberação e/ou produção de várias substâncias pelo tecido isquêmico. Diversos fatores têm sido implicados (Quadro 1), não havendo ainda consenso quanto à importância relativa de cada um. Sabe-se que dependendo do local onde se origina o estímulo (tecidos renal, mesentérico ou músculo esquelético) diferentes substâncias e mecanismos podem estar envolvidas no processo de proteção celular³⁶.

Quadro 1 - Substâncias implicadas no desenvolvimento do pré-condicionamento isquêmico remoto

ISQUEMIA RENAL	ISQUEMIA MESENTÉRICA	ISQUEMIA ESQUELÉTICA
Adenosina ³⁷⁻⁴⁰	Bradicinina ^{41,42} Canabinoides ⁴³ CGRP ⁴⁴⁻⁴⁶ Opioides ^{15,47}	Opioides ^{48,49-51} NO ^{52,53} Noradrenalina ⁵⁴ RLO ^{50,55,56}

CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; NO: óxido nítrico; RLO: radicais livres de oxigênio.

Nessa fase os mediadores vão induzir a proteção no órgão alvo por mecanismos neuronais e/ou humorais.

A hipótese neuronal considera que substâncias produzidas no território remoto submetido à isquemia atuam localmente em vias neuronais aferentes. Estas ativariam vias neuronais eferentes induzindo proteção celular no órgão alvo. A favor de um envolvimento de vias neuronais está a demonstração de que o membro sujeito ao pré-condicionamento tem de ser enervado, uma vez que o corte do nervo femoral anula ou atenua a proteção conferida por ciclos de isquemia/reperfusão aplicados no membro inferior⁵⁷.

A hipótese humoral, por seu lado, defende que o estímulo isquêmico leva à produção de várias substâncias que, entrando em circulação, atingem o órgão alvo e exercem aí o seu efeito protetor. Um fato que corrobora com esta hipótese é a necessidade de reperfusão do órgão à distância, antes do início da isquemia, para haver proteção⁵⁸.

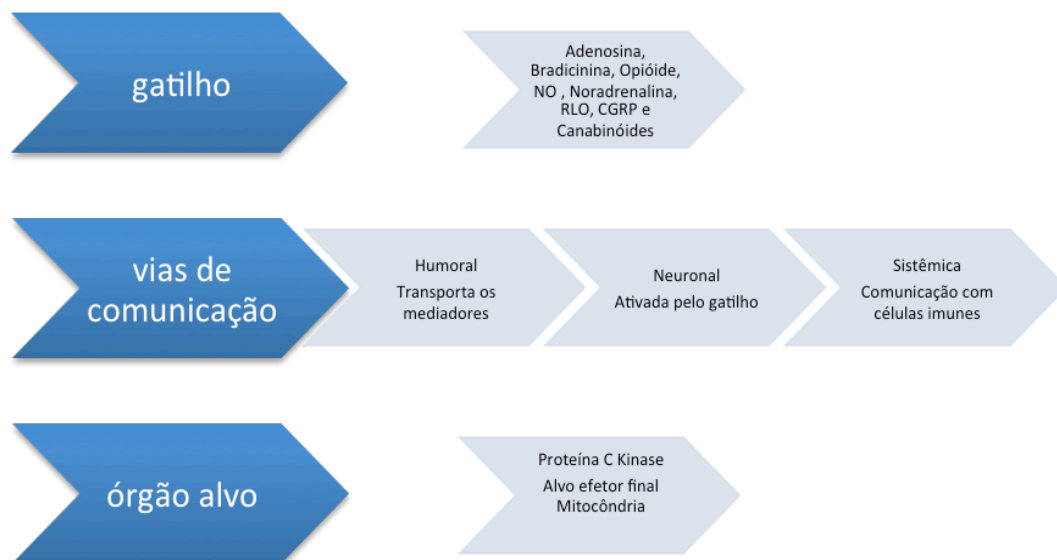
Apesar de não estarem definidas quais substâncias induzem a proteção celular, o seu efeito a nível subcelular está melhor caracterizado. O passo inicial da proteção parece envolver a ativação da proteína quinase C (PKC)⁴⁸.

Fisiologicamente, durante situações de isquemia celular, ocorre depleção do nível de ATP intracelular, com diminuição da atividade dos canais iônicos na membrana celular dependentes de ATP, o que leva a uma entrada e acúmulo de cálcio (Ca^{2+}) no intracelular. Conjuntamente ocorrem alterações na cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, o que leva a um aumento na produção de radicais livres de oxigênio (RLO). Este aumento de RLO, dos níveis de Ca^{2+} mitocondrial e a diminuição do potencial transmembrana das mitocôndrias, que se seguem à isquemia/reperfusão, conduzem à abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM)⁵⁹. Os PTPM são canais mitocondriais transmembrana multiproteicos, que estão ausentes ou fechados em condições fisiológicas, e abertura deles leva à liberação de proteínas da mitocôndria para o citoplasma, entre elas o citocromo C, que provoca a ativação da cascata das caspases (grupo de proteínas baseadas em cisteína essenciais na apoptose celular), o que juntamente com os baixos níveis de ATP e alterações da homeostasia iônica, causa ruptura da membrana plasmática e morte celular⁶⁰.

Quando se realiza o PCIR, via ativação da PKC, ocorre à abertura dos canais mitocondriais de potássio dependentes de ATP, o que leva a despolarização das mitocôndrias⁶¹, reduzindo a captação de Ca^{2+} , diminuindo a atividade dos canais iônicos dependentes de voltagem e conservando o ATP durante a isquemia, através da redução da sua hidrólise^{62,63}. Durante o PCIR também ocorre aumento na produção de RLO⁵⁵ o que, além de possivelmente diminuir a sua concentração durante a

isquemia subsequente, aumenta a produção de enzimas antioxidantes, as quais mantêm a função mitocondrial e diminuem a apoptose celular⁵⁶. A importância da PKC não se restringe só ao seu efeito nos canais mitocondriais de potássio dependentes de ATP, ela também atua no PTPM formando um complexo com o mesmo e impedindo a sua abertura, inibindo assim a apoptose celular⁶⁴.

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 PCIR dificulta que se descreva uma teoria unificadora⁶⁵ (Figura 2).



CGRP: peptídeo relacionado ao gene da calcitonina; NO: óxido nítrico; RLO: radicais livres de oxigênio.

Figura 2 - Mediadores, vias de ativação e sistema efector

1.1.2.2 A fase tardia do pré-condicionamento isquêmico

Além das alterações imediatas que já ocorreram na fase precoce do PCIR, na fase tardia de proteção ocorrem também modificações da expressão de genes envolvidos na resposta celular a isquemia.

Em humanos, o mecanismo de PCIR leva a alterações genéticas anti-inflamatórias nos leucócitos circulantes (supressão de proteínas envolvidas na quimiotaxia, adesão, migração, exocitose, apoptose e imunidade inata)⁶⁶.

Nessa fase, a PKC também está envolvida na regulação da expressão de genes⁶⁷, além do seu papel na modulação da função mitocondrial como referido anteriormente.

Li *et al.*⁶⁸ demonstraram o envolvimento do Fator Nuclear Kappa-B (NF-κB) no PCIR, nesta fase. O NF-κB é um fator de transcrição que regula vários genes inflamatórios. Apesar da ativação do NF-κB durante a lesão de isquemia/reperfusão ter efeitos nefastos por aumentar as moléculas de adesão leucocitárias e a produção de citocinas, paralelamente, há um aumento do seu próprio inibidor, o iNF-κB. Assim, o pré-condicionamento pode diminuir a resposta inflamatória durante a reperfusão porque a indução do NF-κB aumenta o seu próprio inibidor e também leva à transcrição da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), levando a um aumento a produção de óxido nítrico e de efeitos anti-apoptóticos e anti-inflamatórios^{69,70}.

1.2 Claudicação intermitente e Doença Arterial Obstrutiva Periférica

A claudicação intermitente de membros inferiores é uma das manifestações mais frequentes em pacientes portadores da doença aterosclerótica sintomática e geralmente é encontrada nos estágios iniciais da doença arterial obstrutiva periférica. Caracteristicamente o paciente queixa-se de dor nos membros inferiores que surge apenas ao caminhar distâncias constantes. A dor é reprodutível com a realização do mesmo esforço e cede poucos segundos a minutos após a interrupção da marcha. Estes sintomas decorrem de isquemia muscular induzida pelo exercício e, nos membros inferiores, esta isquemia pode acometer diversos grupos musculares, a depender do segmento arterial obstruído, gerando sintomas na panturrilha, coxa e/ou glúteos.

A intensidade da dor, que tem influência na distância percorrida livre de dor e na distância máxima percorrida, assim como no tempo necessário para sua regressão, é dependente da intensidade da isquemia. Esta, por sua vez, varia conforme a extensão e o grau de acometimento arterial do membro, além do desenvolvimento da circulação colateral.

Do ponto de vista fisiológico, a obstrução arterial limita o aporte de sangue arterial oxigenado para a musculatura do membro comprometido. Essa limitação não tem significado clínico quando o paciente está em repouso e sua demanda é baixa e atendida pela oferta. Porém, durante a caminhada, ocorre a elevação da demanda de oxigênio, que não é atendida pela oferta, justamente por conta da limitação causada pela obstrução arterial. Nessa situação, cria-se um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio em determinados

grupos musculares servidos pelas artérias doentes, chamado de isquemia funcional. Esse desequilíbrio vai se intensificando à medida que a caminhada se prolonga, gerando dor naquela musculatura. Quando essa dor se torna máxima, o paciente é obrigado a parar de caminhar. Nesse momento, a demanda se reduz a ponto de voltar a ser atendida pela oferta disponível e a dor cede. Esse ciclo fisiopatológico pode se repetir indefinidamente e explica os sintomas de dor intermitente e reprodutível, já que uma mesma intensidade de exercício reproduz a mesma intensidade de isquemia funcional.

Como a claudicação intermitente nos membros inferiores é um sintoma da doença arterial obstrutiva periférica, vamos discursar sobre a epidemiologia e fatores de risco para DAOP, dedicando especial atenção ao sintoma de claudicação.

1.2.1 Fatores de risco da DAOP

O tabagismo aumenta o risco de DAOP entre duas e seis vezes e o risco de CI entre três e dez vezes. Quase 80% dos pacientes portadores de DAOP de membros inferiores são ou foram fumantes⁷¹.

Pacientes com diabetes mellitus apresentam um risco de DAOP nos membros inferiores de duas a quatro vezes maior que a população geral, e especificamente para claudicação intermitente de membros inferiores esse risco se eleva três vezes e meia para os homens e oito vezes para as mulheres. Vale lembrar que os pacientes diabéticos apresentam um risco sete a quinze vezes maior de amputações em relação aos não diabéticos portadores de doença arterial obstrutiva periférica^{71,72}.

Com relação às dislipidemias associadas ao desenvolvimento da DAOP, a elevação do colesterol total, a elevação de sua fração de baixa densidade (LDL) e níveis baixos da sua fração de alta densidade (HDL), além das hipertrigliceridemias, são os achados mais frequentes⁷¹.

A hipertensão arterial sistêmica aumenta o risco de claudicação intermitente de membros inferiores em duas vezes e meia para os homens e quatro vezes para as mulheres, mantendo uma proporcionalidade com os níveis pressóricos⁷¹.

A hiperhomocisteinemia, por sua vez, aumenta o risco de doença aterosclerótica em duas a três vezes e está presente em 30% a 40% dos pacientes com DAOP⁷¹.

1.2.2 Epidemiologia

1.2.2.1 Prevalência e incidência

Os estudos epidemiológicos mostram uma prevalência de DAOP entre 11% e 16%, em pessoas com idade maior ou igual a 55 anos⁷³, porém esses números variam conforme o método empregado e a população avaliada. Quando utilizados métodos não invasivos, como o cálculo do índice tornozelo-braço (ITB) menor que 0.9, Meijer e *et al.*⁷⁴, estudando 7715 participantes com idade maior ou igual a 55 anos, mostraram uma prevalência de 19,1%, com 6,3% de claudicantes.

No consagrado estudo de Framingham⁷⁵, observou-se uma incidência bienal de DAOP de 7,1/1000 habitantes do sexo masculino e 3,6/1000 habitantes do sexo feminino, entre a população de indivíduos entre 35 e 84

anos. Já a incidência de claudicação intermitente entre indivíduos de 30-44 anos foi de 6/10.000 nos homens e 3/10.000 nas mulheres, subindo para 61/10.000 nos homens e 54/10.000 nas mulheres, quando se analisou a população entre 65 e 74 anos⁷⁵. Essa tendência da DAOP acometer indivíduos mais idosos também foi demonstrada por outros estudos^{76,77}.

Em nosso meio o Projeto Bambuí, analisando uma população de 1.485, encontrou uma incidência de 2,5, nos indivíduos acima dos 60 anos, com predomínio no sexo masculino⁷⁸.

1.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da CI é eminentemente clínico, baseado na anamnese e em um exame físico minucioso.

Como já mencionando anteriormente a queixa de dor nos membros inferiores, que surge apenas ao caminhar distâncias constantes e cede poucos segundos a minutos após a interrupção da marcha, é característica dessa doença.

O grupo muscular no qual a dor é referida pode sugerir o segmento anatômico da obstrução arterial. Assim, lesões hemodinamicamente significativas no território fêmoro-poplíteo podem causar dor na musculatura da panturrilha, enquanto lesões no território aorto-ílfaco, além da dor na panturrilha, também podem gerar dor na coxa e região glútea. Já oclusões de artérias tibiais podem ser causa de dor na região plantar. Importante salientar que o grau de circulação colateral presente nesses territórios e a presença de lesões multi-segmentares podem gerar variações nesses padrões⁷⁹.

Ao exame físico pode haver a ausência ou diminuição de pulsos à palpação das artérias distalmente ao território acometido e, mais raramente, frêmito sobre lesões estenosantes das artérias. À ausculta, sopro sistólico pode ser encontrado. Entretanto, alguns pacientes podem ser assintomáticos e sem alterações significativas ao exame físico, por terem doença muito inicial ou estarem clinicamente muito bem compensados⁷³. Nesses casos os exames complementares irão nos ajudar a detectar a DAOP.

1.2.3.1 Exames Complementares

Como a claudicação intermitente é um sintoma associado à presença da doença arterial obstrutiva periférica, os exames complementares visam diagnosticar a DAOP e são de grande valia principalmente para casos assintomáticos ou sub-clínicos, quando mudanças comportamentais, como cessação do tabagismo e mudanças no hábito de vida, podem evitar a progressão da doença.

Entre os principais exames complementares, podemos citar:

- Índice Tornozelo-Braço (ITB)

É a razão da pressão sistólica no tornozelo dividida pela pressão sistólica no braço.

Em indivíduos sem DAOP esse índice varia 0,90 a 1,10. Índices abaixo de 0,9 são indicativos de DAOP^{80,81}. O ITB proporciona um guia geral do grau da perda funcional nas extremidades inferiores. Geralmente ele está entre 0,3 a 0,8 nas claudicações, variando desde claudicações limitantes até claudicação

para longas distâncias, e igual ou menor que 0,3 nas isquêmicas críticas, quando ocorre dor em repouso e / ou aparecimento de lesões tróficas.

Artérias calcificadas podem superestimar o ITB, fato comum entre diabéticos e portadores de insuficiência renal crônica dialítica⁸¹.

Com relação à sobrevida, diversos estudos demonstraram relação inversa entre o valor de ITB e a mortalidade num período de cinco anos^{82,83}.

- ITB associado a teste de esforço

Este teste é realizado com caminhada em esteira a uma velocidade de 3,2 km/h com uma angulação de 12% por cinco minutos ou até que os sintomas de claudicação apareçam e forcem o paciente a parar de andar. As pressões sistólicas no braço e no tornozelo são medidas antes e imediatamente após o exercício e são analisadas tanto a magnitude da diminuição da pressão sistólica no tornozelo, quanto o tempo para recuperação até a pressão de repouso.

Mesmo nas formas mais brandas da doença, estenoses subclínicas se manifestam com uma queda na pressão sistólica do tornozelo imediatamente após o exercício, com tempo de recuperação variável, a depender do grau de circulação colateral do segmento. A manutenção de níveis normais de pressão sistólica do tornozelo após o exercício, ajuda no diagnóstico diferencial de doenças não vasculares que também podem afetar a caminhada, tais como doenças do aparelho musculoesquelético ou cardiopulmonar, já que um indivíduo normal apresenta um discreto aumento ou não-alteração na pressão sistólica do tornozelo após ao exercício na esteira, quando comparada com os valores em repouso.

Se a pressão no tornozelo for diminuída imediatamente após o exercício, o exame será considerado positivo para DAOP, e medidas repetidas serão feitas em intervalos de um a dois minutos, até que a pressão retorne aos níveis pré-exercícios^{84,85}.

Outros estudos não invasivos, que também avaliam as pressões nas extremidades, como o exame de hiperemia reativa e a medida da pressão digital, atualmente estão sendo menos utilizados^{81,86}.

- Ultrassom Color Doppler

Em relação aos exames de imagem, o ultrassom color Doppler é o mais utilizado atualmente. Além de fornecer informações quanto ao grau de obstrução e sua repercussão hemodinâmica, pode mostrar com precisão a localização da lesão. Exame não invasivo e de baixo custo, com 88% de sensibilidade e 95% de especificidade⁸⁷. Tem a desvantagem de ser operador dependente e apresenta maior dificuldade para avaliar lesões multissegmentares.

Atualmente com protocolos para análise da escala de cinza, além das informações sobre o fluxo no vaso estudado, fornece também dados importantes sobre as características constitucionais e morfológicas das placas ateroscleróticas.

O contraste de microbolhas também aumentou a acurácia do exame, principalmente nos vasos de baixo fluxo e em estenoses críticas, que podiam mostrar-se como oclusão total ao exame sem contraste⁸⁸.

- Angiografia por ressonância nuclear magnética

Desenvolvida na década de 1980, é um exame pouco invasivo, que usa o gadolínio como contraste paramagnético para realce dos vasos sanguíneos. Com sensibilidade de 98% e especificidade de 96%, para lesões que ultrapassem os 50%, tende a superestimar o grau de obstrução das lesões⁸⁹.

Capaz de avaliar estruturas adjacentes, o exame é de alto custo e não pode ser utilizado em pacientes com cliques metálicos, marca-passos cardíacos ou qualquer outra estrutura metálica sujeita à ação do campo magnético, o que pode gerar tanto o aquecimento, como o deslocamento do metal. Atualmente muitas próteses estão sendo desenvolvidas com novas ligas, as quais sofrem pouca ou nenhuma ação do campo magnético, reduzindo o número de pacientes que não poder ser submetidos ao exame.

Com relação ao gadolínio trabalhos recentes mostraram que pacientes com insuficiência renal crônica, com clearance de creatinina inferior a 30%, podem desenvolver uma complicação sistêmica e fatal chamada fibrose sistêmica nefrogênica⁹⁰.

- Angiografia por tomografia computadorizada

Exame de alta sensibilidade, variando entre 89% a 100% para lesões acima de 50%, e alta especificidade, variando entre 92% a 100% para lesões acima de 50%^{89,91}. Apresenta a vantagem de mostrar estruturas adjacentes, bem como a localização e o grau de estenose das lesões nos vasos. Contudo necessita da infusão endovenosa de contraste iodado, potencialmente nefrotóxico, além do risco de desencadear reações anafiláticas. Outro ponto importante é exposição à radiação o que impede a sua utilização em gestantes.

- Angiografia digital

Em virtude da maior definição das imagens, é considerada padrão-ouro. Apresenta a desvantagem de necessitar uma punção arterial, expondo o paciente a riscos no local de punção, como a formação de pseudo-aneurismas, hematomas, trombose arterial e dissecções, e à distância, por embolizações distais. Além disso, traz também os inconvenientes de exposição à radiação e da utilização do contraste iodado. Por este motivo, aliado à evolução dos demais exames de imagem pouco ou não invasivos, a angiografia digital raramente é empregada para o diagnóstico de DAOP, sendo utilizada durante procedimentos terapêuticos, especialmente por técnica endovascular⁸⁹.

1.2.4 Tratamento

O tratamento é eminentemente clínico e baseia-se no treinamento físico, controle dos fatores de risco e, em alguns casos, na terapia medicamentosa.

1.2.4.1 Controle dos fatores de risco

Controle adequado da HAS

As diretrizes atuais apontam para a manutenção da pressão arterial sistólica em níveis inferiores a 140 mmHg e diastólica abaixo de 90 mmHg. Pacientes diabéticos ou com insuficiência renal crônica devem ter controles mais rígidos, de forma que a pressão arterial sistólica esteja abaixo dos 130 mmHg e a diastólica não ultrapasse os 80 mmHg⁷³.

Controle do diabetes

O controle rígido do DM mostrou-se mais eficaz para a prevenção de doenças microvasculares, tais como nefropatia e retinopatia⁷³.

Controle dos níveis de colesterol

Os níveis de LDL nos pacientes portadores de DAOP devem ser inferiores a 100 mg/dL. Indivíduos arteriopatas com diabetes, tabagismo ativo ou múltiplos fatores de risco devem ter seus níveis de LDL mantidos abaixo dos 70 mg/dL^{73,92}.

Interrupção do tabagismo

A interrupção do tabagismo mostrou-se importante para a redução dos eventos cardiovasculares e para melhor evolução da CI^{73,93}.

1.2.4.2 Medicamentoso

A prescrição de drogas com ação antiagregante plaquetária diminui o risco de eventos cardiovasculares em pacientes com doença arterial obstrutiva das extremidades⁷³.

As estatinas além do seu efeito na redução dos níveis de colesterol, também apresentam um efeito pleiotrópico, que estabiliza as placas de ateroma já formadas, motivo pelo qual tem sua utilização indicada no paciente claudicante⁷³.

Algumas drogas têm sido estudadas visando melhora dos sintomas resultantes da DAOP. O cilostazol, um inibidor da fosfodiesterase tipo III, tem propriedades vasodilatadora e antiagregante plaquetária, tendo sido

apontado também como inibidor da proliferação de células musculares lisas vasculares. É recomendado pelo American College of Cardiology para o alívio de sintomas de claudicação intermitente na dose de 100 mg duas vezes ao dia⁹².

Outras drogas, entre elas a pentoxifilina, além de suplementos nutricionais, não obtiveram êxito no tratamento de pacientes com claudicação intermitente^{73,92}. Fatores de crescimento angiogênico têm sido testados, mostrando aumento na formação de circulação colateral e no fluxo sanguíneo para membros isquêmicos em modelos experimentais⁹⁴. Seu uso na prática clínica, no entanto, depende de estudos de eficácia e segurança.

1.2.4.3 Treinamento físico

Supervisionado x não supervisionado

O treinamento físico é o alicerce para tratamento clínico dos pacientes portadores de claudicação intermitente de membros inferiores. Baseado em caminhadas, este exercício pode ser supervisionado ou não supervisionado. No primeiro, o exercício é acompanhado por fisioterapeutas ou educadores físicos, enquanto que, no segundo, o indivíduo faz o exercício por conta própria após orientação médica. Os resultados do treinamento supervisionado parecem ser superiores, talvez porque alguns pacientes interrompem o exercício logo após o início da dor quando treinam sozinhos. Na prática clínica, entretanto, em razão dos menores custos, o treinamento físico não supervisionado tem sido mais empregado^{93,95}.

De maneira geral, o tempo de cada sessão e a duração do tratamento não são muito bem estabelecidos. Os melhores resultados são vistos com sessões de treinamento acima de 30 minutos, ao menos três vezes por semana e com duração de, no mínimo, seis meses⁹⁵.

Exercício físico resistido (musculação)

Recentemente demonstrou-se o efeito benéfico do treinamento com carga em pacientes com DAOP. Sabe-se que esses indivíduos têm menor força muscular nos membros inferiores e menor massa muscular na panturrilha em relação aos não portadores de DAOP, o que traz grande prejuízo funcional. O exercício com carga proporcionou uma melhora na qualidade de vida desses pacientes⁹⁶.

1.2.4.4 Cirúrgico

Atualmente tem sua indicação restrita a casos específicos, que apresentam um risco cirúrgico baixo, com lesões anatomicamente favoráveis à correção cirúrgica e claudicação que limita em muito a qualidade de vida do paciente, apesar do tratamento clínico adequado instituído⁹².

1.3 Relevância do Estudo

O pré-condicionamento isquêmico pode ser o mecanismo pelo qual os pacientes portadores de claudicação intermitente dos membros inferiores apresentam melhora aguda com o tratamento clínico, que tem como pilar principal o exercício físico, o qual acaba gerando ciclos funcionais de isquemia e reperfusão.

Do ponto de vista do pré-condicionamento isquêmico remoto, este estudo extrapola o conceito de proteção celular, gerado pelo aumento da capacidade de preservação da integridade celular frente à isquemia, para a manutenção da função celular em situações de privação de oxigênio.

Dessa forma é de suma importância a avaliação do efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto nos pacientes portadores de claudicação intermitente dos membros inferiores, tanto para otimizarmos o tratamento destes pacientes, quanto para aprofundarmos nossas pesquisas nesse grupo de pacientes, a fim de identificarmos os potenciais mediadores desse efeito e os utilizarmos em outras situações clínicas críticas que necessitem de um aumento imediato na capacidade de preservação de integridade celular.

2 OBJETIVOS

Avaliar a influência do pré-condicionamento isquêmico remoto sobre as distâncias inicial e total de claudicação nos pacientes portadores de claudicação intermitente secundária à doença arterial obstrutiva periférica.

3 MÉTODOS

Este estudo prospectivo, aberto, randomizado e controlado foi realizado no ambulatório de Claudicação Intermitente do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, após a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa (FR do Conep n° doc. 1005/07) dessa instituição e recebeu fomentos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP n° doc. 2008/03203-1).

3.1 Critérios de Inclusão

Os pacientes que preencheram os seguintes critérios foram considerados elegíveis para o estudo:

a. Compreensão e capacidade de fornecer o Consentimento Livre e Esclarecido por escrito.

b. Pacientes com história de claudicação intermitente de membros inferiores caracterizada por dor nos mesmos desencadeada apenas após caminhar uma distância reprodutível e constante, que desaparece poucos segundos ou minutos após a interrupção da marcha.

c. Pelo menos um dos dois critérios abaixo descritos:

- Diminuição ou ausência de pulsos arteriais no membro sintomático.

-Índice tornozelo - braquial < 0,90 em repouso no membro sintomático.

3.2 Critérios de Não Inclusão

- a. Obstrução arterial de ambos membros superiores;
- b. Presença de isquemia crítica de membros inferiores, caracterizada por dor isquêmica em repouso ou existência de lesão trófica nos mesmos;
- c. Incapacidade de realizar o teste de esteira por motivo diverso da claudicação intermitente, como alterações reumatológicas, ortopédicas, neurológicas, cardíacas ou respiratórias;
- d. Paciente que já tenha participado de ensaio clínico no último ano.

3.3 Critérios de Exclusão

Foram considerados critérios de exclusão:

- a. Alteração de pulsos em membros inferiores em relação ao estado dos mesmos observado no teste de esteira anterior;
- b. Surgimento de isquemia crítica de membros inferiores, caracterizada por dor isquêmica em repouso ou lesão trófica nos mesmos;
- c. Incapacidade de realizar o segundo teste de esteira;
- d. Opção do paciente em retirar o TCLE.

3.4 Casuística

No período de janeiro de 2009 a maio de 2011, foram incluídos 52 pacientes.

Após sua inclusão, utilizando o programa de randomização* (Urbaniak, G.C & Plous, S. Research Randomizer - Versão 4.0) os pacientes foram divididos em três grupos (A, B e C) e submetidos a dois testes de marcha em esteira.

Os dois testes de marcha em esteira foram feitos com um intervalo de sete dias entre eles, sendo registradas em cada um deles a distância de caminhada livre de dor (distância inicial de claudicação) e a distância máxima percorrida (distância total de claudicação).

Em virtude do efeito do aprendizado (*learning effect*), que pode ocorrer após o paciente andar previamente na esteira, com uma característica individual e não linear, gerando um efeito confusional de aumento nas distâncias no segundo teste de esteira, aplicamos o PCIR em momentos diferentes nos grupos A e B.

O Grupo A realizou o primeiro teste de esteira sem o PCIR e o segundo o teste de esteira com o PCIR. Já no Grupo B foi feito o inverso: os pacientes realizaram o primeiro teste de esteira com o PCIR e o segundo teste de esteira foi realizado sem o PCIR. Por fim, no Grupo C, os pacientes realizaram os dois testes de esteira sem a realização do PCIR (Figura 3).

Para avaliar a perfusão do membro realizamos a medida do Índice Tornozelo-Braço antes da realização de cada teste de esteira.

* Disponível em: <<http://www.randomizer.org>>

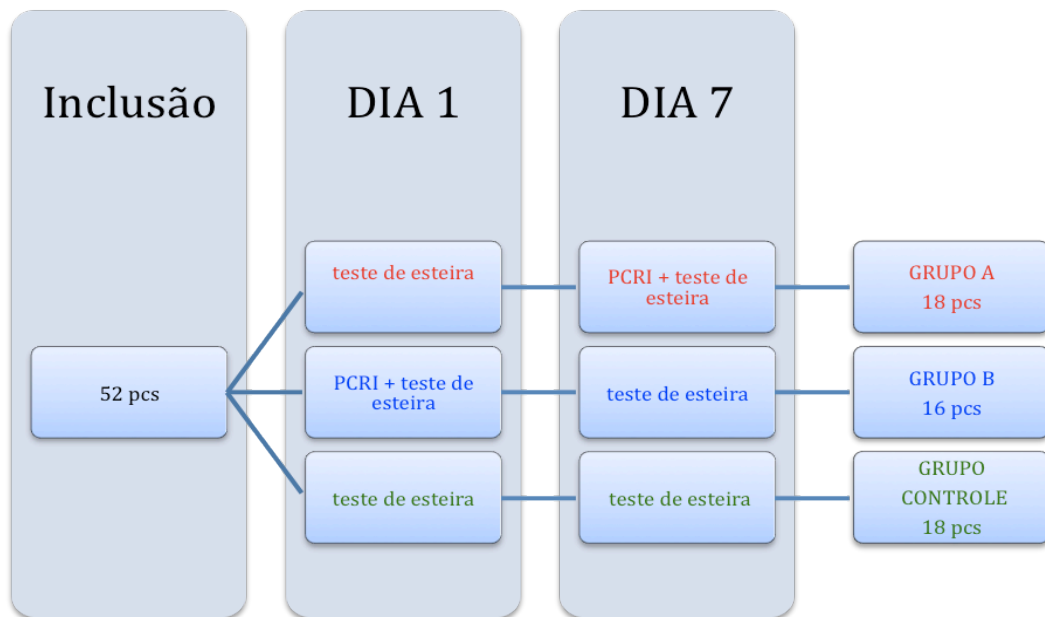


Figura 3 - Fluxograma do estudo

3.5 Teste de Esteira

Os testes de esteira foram realizados em uma esteira ergométrica (Imbrasport, ETL, Rio Grande do Sul, Brasil), utilizando velocidade fixa de 3,2 km/h e carga progressiva (aumento de 2% da inclinação a cada dois minutos), (Figura 4).



Figura 4 - Teste de esteira

3.6 Pré-Condicionamento Isquêmico Remoto

O PCIR seguiu o protocolo já descrito²¹ e detalhado a seguir: noventa minutos antes do exercício na esteira, o indivíduo tinha um manguito (Aparelho de Pressão Durashock DS44 Tycos - Welch Allyn, Welch Allyn Beaverton Development and Technology Center 9525 SW Gemini Drive Beaverton, OR 97008, USA) posicionado no membro superior não dominante, que era mantido insuflado a 200 mmHg durante cinco minutos, por três vezes. Entre cada período de insuflação, o manguito permanecia desinsuflado também por cinco minutos (Figura 5).



Figura 5 - Pré condicionamento no braço não dominante

Os pacientes foram orientados a não ingerir duas horas antes do teste as seguintes drogas: cilostazol, sildenafil, dipiridamol, glibenclamida, aminofilina, nicorandil, fenilefrina, inibidor de enzima conversora de angiotensina, bloqueador de receptor de angiotensina II, estatinas e corticoides, além de cafeína e bebidas alcoólicas. Tais substâncias poderiam interferir no processo de PCIR e/ou sensibilidade à dor.

3.7 Índice Tornozelo-Braço

O Índice Tornozelo-Braço foi realizado no membro inferior no qual o paciente apresentava queixa de dor para deambular e quando essa era bilateral levou-se em consideração o membro com menor ITB. Esse teste foi realizado imediatamente antes de cada teste de esteira.

Com um manguito posicionado na perna, o mesmo era insuflado até cessar o sinal sonoro do aparelho de Doppler Vascular DV 610 B (MEDMEGA, Franca, São Paulo, Brasil), o qual estava com seu transdutor insonando a artéria tibial posterior e/ou dorsal do pé. Dessa forma, era aferida a pressão sistólica na artéria tibial posterior e na artéria dorsal do pé. Nos membros superiores, procedimento semelhante foi realizado. Com manguito posicionado no braço e insuflado até cessar o sinal sonoro do Doppler, o qual estava com seu transdutor insonando a artéria braquial, aferiu-se a pressão sistólica da artéria braquial. Dividindo o valor da maior pressão sistólica aferida com o Doppler no tornozelo pelo valor da maior pressão sistólica aferida com Doppler nos braços foi obtido o Índice Tornozelo-Braço (Figura 6).

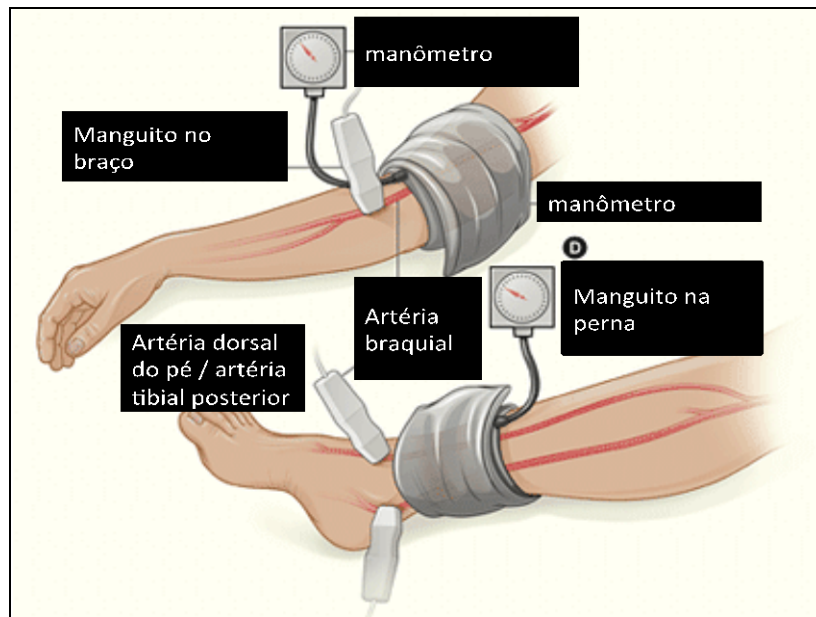


Figura 6 - Índice Tornozelo-Braço

3.8 Cálculo da amostra

Como esse foi o primeiro estudo realizado sobre o efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto em pacientes com claudicação intermitente de membros inferiores, não existia um valor prévio esperado sobre o efeito do PCRI em pacientes claudicantes, o que impossibilitou o cálculo do tamanho da amostra⁹⁷. Dessa forma estipulamos de forma empírica que essa amostra seria composta por 52 pacientes.

3.9 Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à sua normalidade e homogeneidade de variância através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente.

Para a comparação das características gerais dos três grupos experimentais, foi utilizada uma análise de variância (ANOVA) de um fator para as variáveis contínuas e o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher's para as variáveis categóricas. Já para comparar as respostas da distância inicial de claudicação e a distância final de claudicação, entre os três grupos experimentais foi utilizada uma ANOVA de dois fatores para medidas repetidas, utilizando-se como fator independente o grupo (A, B e C) e como fator repetido o momento (primeiro e segundo testes de esteira). Quando verificado efeito significativo foi utilizado o teste *post-hoc* de Duncan's para verificar onde ocorreram as diferenças.

Os dados são apresentados em frequência relativa, média e desvio-padrão e para todas as análises, adotou-se como significativo um $p \leq 0,05$.

Para todas as análises foi utilizado o programa STATISTIC 5.1.

4 RESULTADOS

Foram estudados 52 pacientes com idades entre 57 e 73 anos, 38 indivíduos eram do sexo masculino. Quanto à raça, 39 eram brancos e 13 negros.

Não houve diferença entre os grupos quanto à idade, gênero, raça, DM, HAS e histórico de fumo ($p > 0,05$). Por outro lado, observou-se que o Grupo C apresentava maior prevalência de dislipidemia, em comparação aos demais grupos ($p \leq 0,05$), como demonstrado na tabela de características gerais dos pacientes (Tabela 1).

Tabela 1 - Características gerais dos pacientes com claudicação intermitente

Variáveis	Grupo A (n=18)	Grupo B (n=16)	Grupo C (n=18)	p
Idade (anos)	65,8 ± 7,9	60,5 ± 9,5	64,0 ± 9,9	0,145
Gênero (% homens)	72,2	68,8	77,8	0,835
Cor da pele (% brancos)	72,2	75,0	77,8	0,929
Fatores de risco				
Diabetes mellitus (%)	23,5	37,5	44,4	0,422
Hipertensão (%)	77,8	62,5	94,4	0,074
Dislipidemia (%)	38,9	25,0	72,2	<u>0,017</u>
Histórico de tabagismo	94,4	93,8	83,3	0,456

Valores = média ± desvio padrão

Em relação ao efeito do PCIR na capacidade de caminhada dos pacientes com claudicação intermitente, observou-se que, em relação à distância de início de claudicação, tanto o Grupo A quanto o Grupo C apresentaram maiores valores no segundo momento, comparado ao primeiro momento ($p \leq 0,05$). Por outro lado, no Grupo B não houve diferença entre as distâncias de início de claudicação no primeiro e segundo momentos ($p > 0,05$). Além disso, verificou-se que o aumento na distância de início de claudicação observado no segundo teste, foi maior no grupo A que no grupo C ($p \leq 0,05$) (Tabela 2 e Gráfico 1).

Tabela 2 - Efeito do PCI na distância inicial de claudicação nos três grupos experimentais

	1º Momento (1º teste)	2º Momento (2º teste)	Efeito do Grupo (**)	Efeito do Momento (***)	Efeito da Interação (****)
Distância de início de claudicação (m)			0,518	<u>0,039</u>	<u>0,045</u>
Grupo A (n=18)	164 ± 79	197 ± 85*†			
Grupo B (n=16)	147 ± 112	134 ± 91			
Grupo C (n=18)	143 ± 114	173 ± 135*			

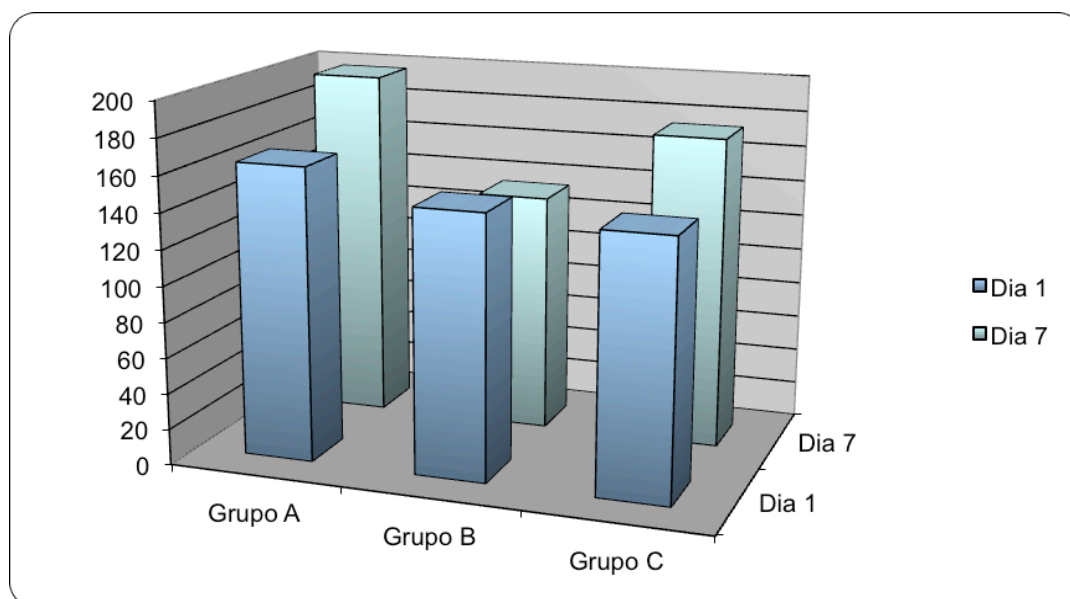
Valores = média ± desvio padrão

(**) - Diferença ente os grupos A, B e C; (***) Diferença entre o 1º teste e o 2º teste e (****) Diferença entre os grupos e entre os testes

*Diferença significante comparado os momentos (1º teste e 2º teste).

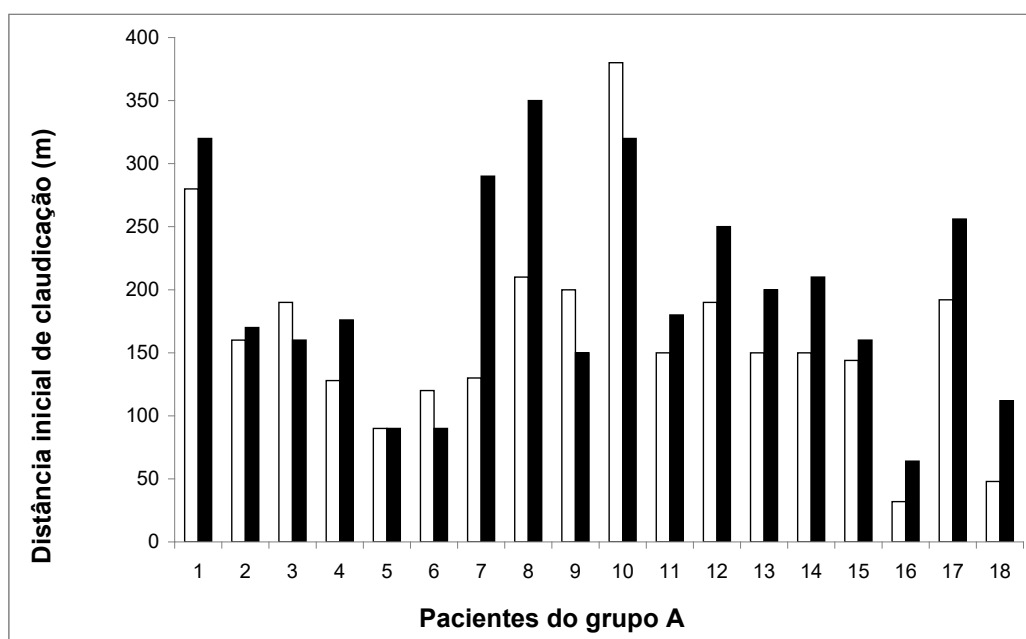
† Diferença signficante comparado os grupos e os momentos (efeito da interação). ($p \leq 0,05$)

Gráfico1 - Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância inicial de claudicação (DIC)



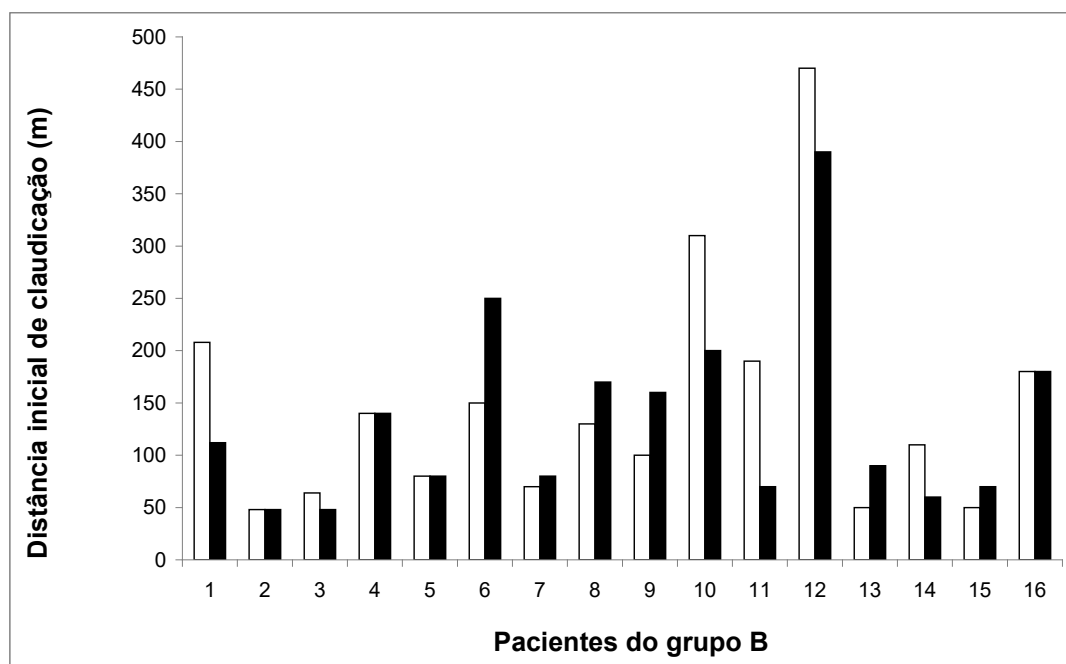
No grupo A, houve aumento na distância inicial de claudicação no segundo momento (após o PCIR) (Tabela 2). No Gráfico 2 estão os dados individualizados do grupo.

Gráfico 2 - Efeito individual do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância inicial de claudicação (DIC) dos pacientes do grupo A



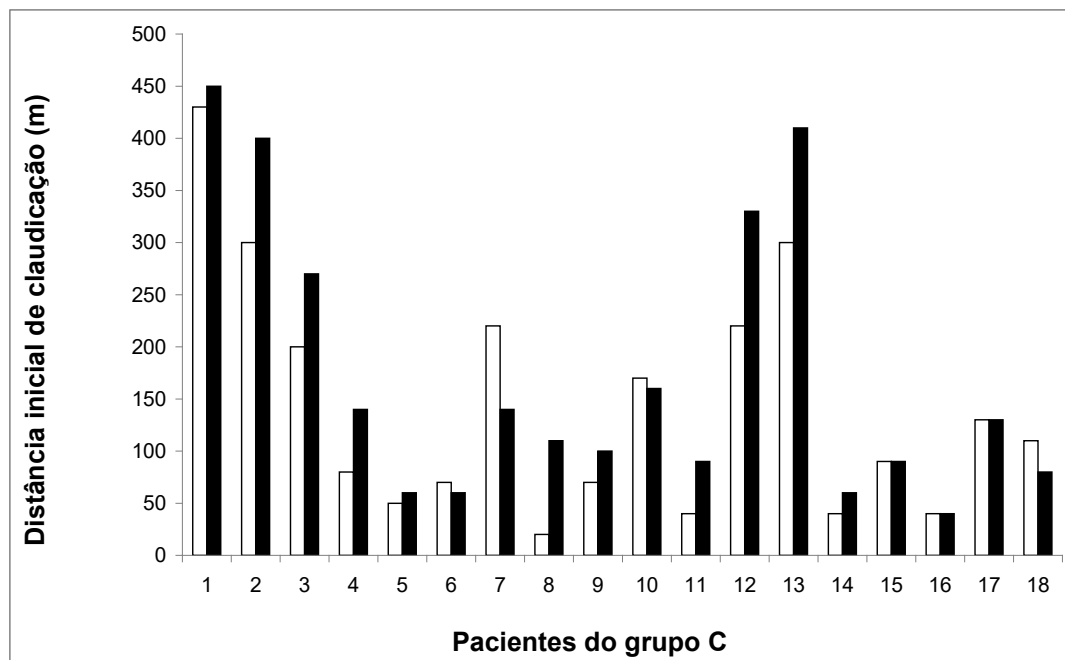
No grupo B, houve manutenção da distância inicial de claudicação no segundo momento (sem o PCIR) (Tabela 2). No Gráfico 3 estão os dados individualizados do grupo.

Gráfico 3 - Efeito individual do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância inicial de claudicação (DIC) dos pacientes do grupo B



No grupo C (grupo controle), houve aumento na distância inicial de claudicação no segundo momento (Tabela 2). No Gráfico 4 estão os dados individualizados do grupo.

Gráfico 4 - Efeito individual do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância inicial de claudicação (DIC) dos pacientes do grupo C



Em relação à distância total de claudicação, verificou-se que em todos os grupos (A, B e C) a aferida no primeiro momento foi inferior à do segundo momento ($p \leq 0,05$). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos A, B e C ($p > 0,05$) (Tabela 3 e Gráfico 5).

Tabela 3 - Efeito do PCI na distância total de claudicação nos três grupos experimentais

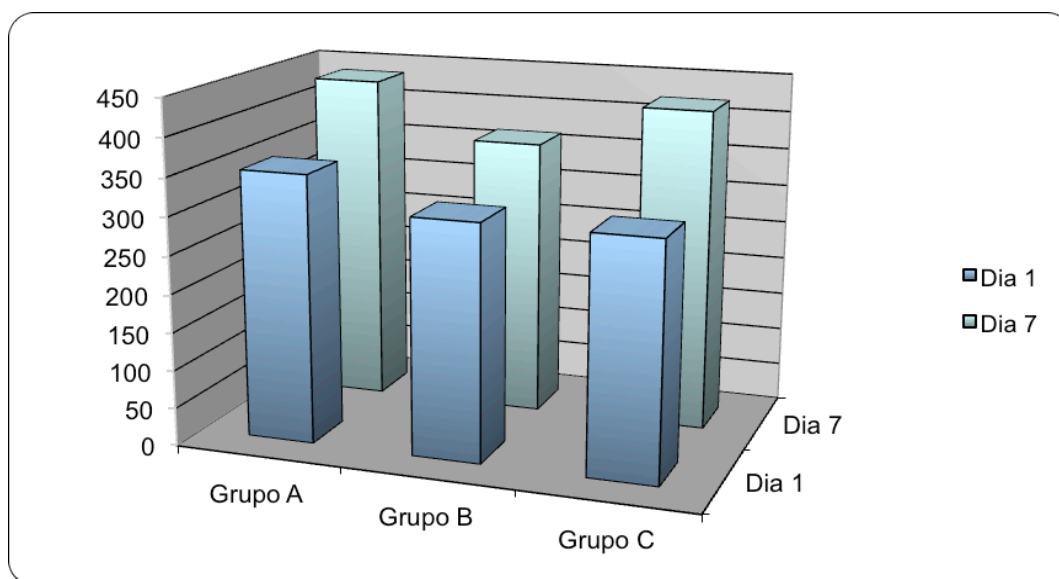
	1º Momento (1º teste)	2º Momento (2º teste)	Efeito do grupo (**)	Efeito do momento (***)	Efeito da interação (****)
Distância total de claudicação (m)			0,692	<u><0,001</u>	0,595
Grupo A (n=18)	352 ± 173	435 ± 182*			
Grupo B (n=16)	309 ± 168	364 ± 218*			
Grupo C (n=18)	308 ± 214	421 ± 279*			

Valores = média ± desvio padrão

(**) - Diferença entre os grupos A, B e C; (***) Diferença entre o 1º teste e o 2º teste e (****) Diferença entre os grupos e entre os testes

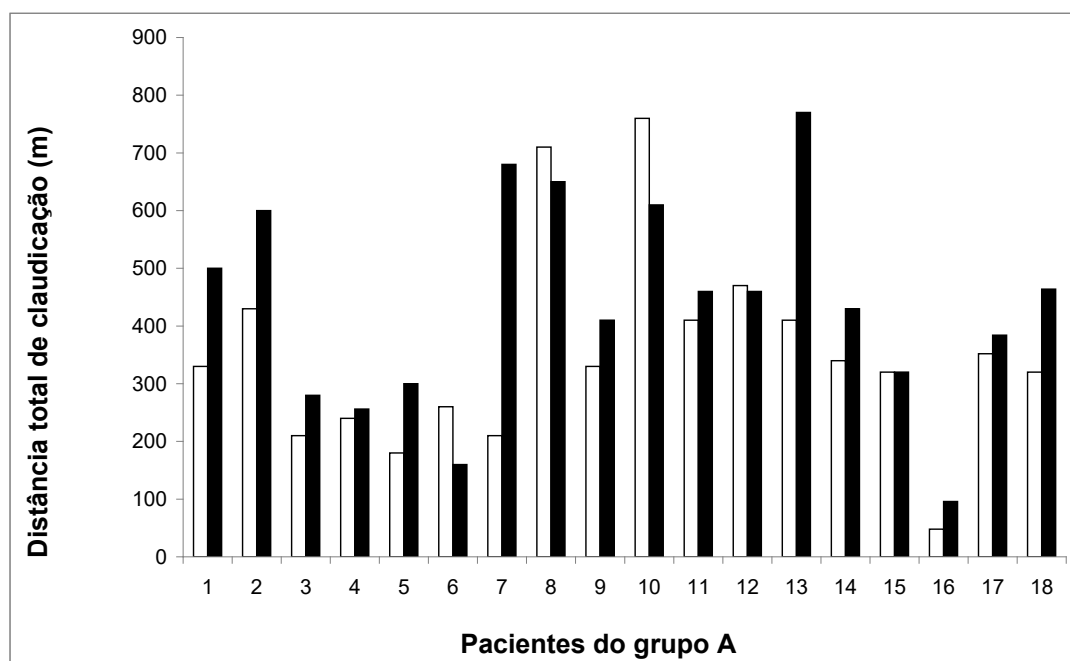
*Diferença significativa comparado os momentos (1º teste e 2º teste).

Gráfico 5 - Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância total de claudicação (DTC)



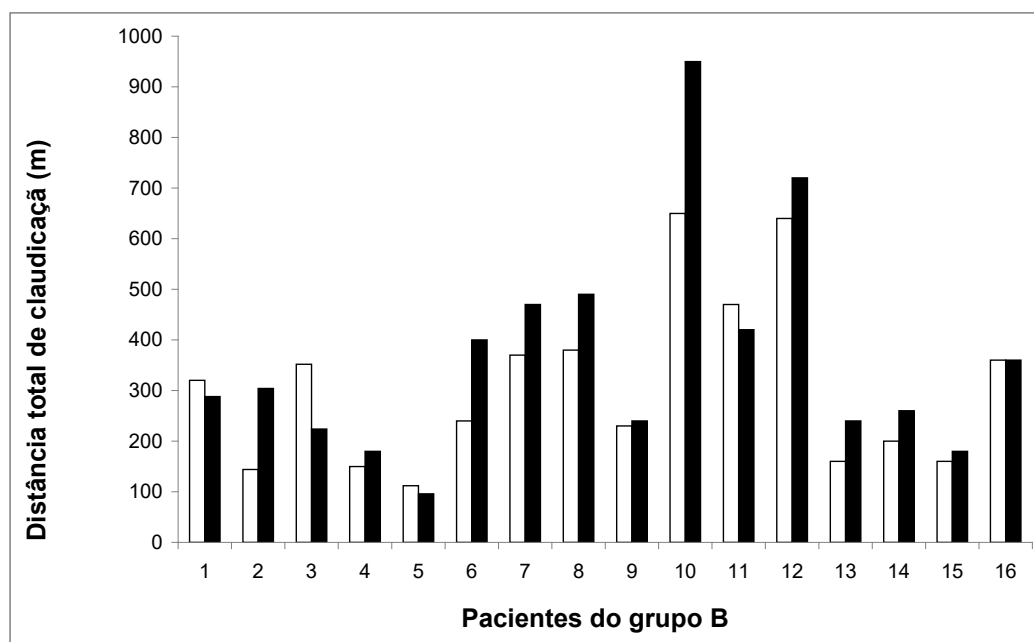
No grupo A, houve aumento na distância total de claudicação no segundo momento (após o PCIR) (Tabela 3). No Gráfico 6 estão os dados individualizados do grupo.

Gráfico 6 - Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância total de claudicação (DTC) dos pacientes do grupo A



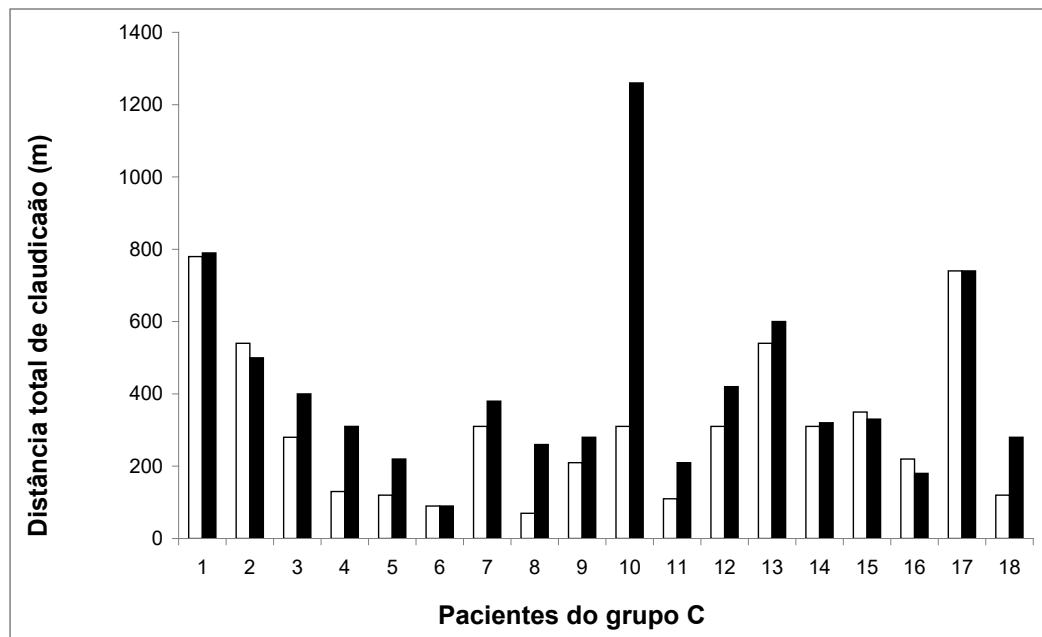
No grupo B também houve aumento na distância total de claudicação no segundo momento (sem o PCIR) (Tabela 3). No Gráfico 7 estão os dados individualizados do grupo.

Gráfico 7 - Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância total de claudicação (DTC) dos pacientes do grupo B



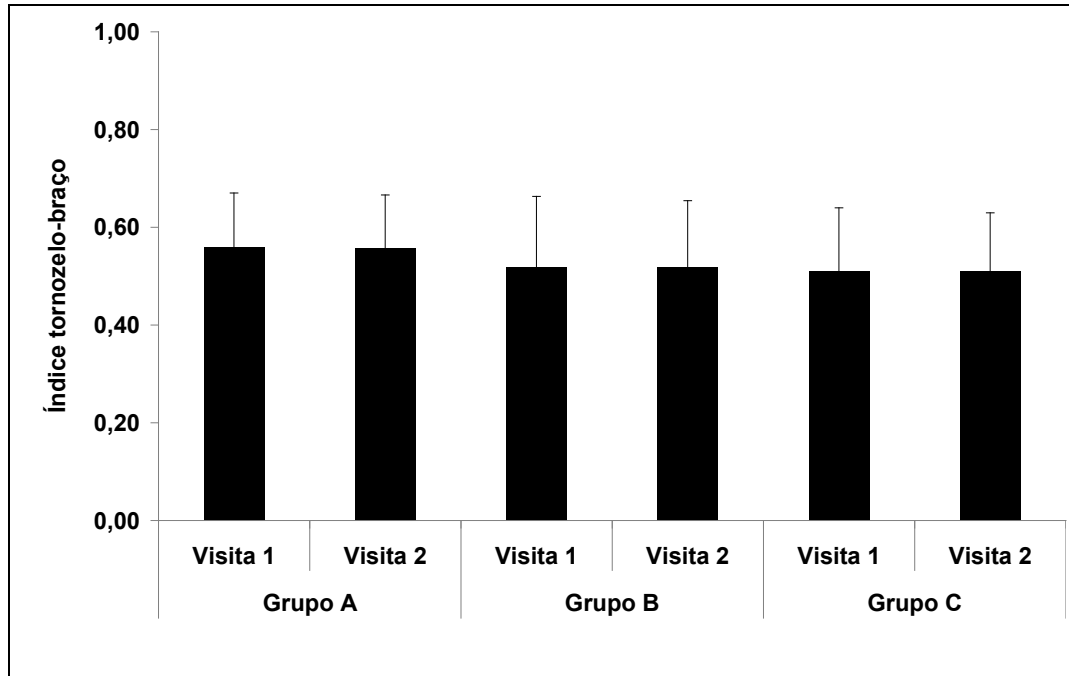
No grupo C (grupo controle), da mesma forma, observou-se aumento na distância total de claudicação no segundo momento (Tabela 3). No Gráfico 8 estão os dados individualizados do grupo.

Gráfico 8- Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) na distância total de claudicação (DTC) dos pacientes do grupo C



Com relação ao efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto sobre o índice tornozelo-braço (ITB), não houve diferença estatisticamente significativa entre o ITB mensurado no primeiro e no segundo teste de esteira, em nenhum grupo (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Efeito do pré-condicionamento isquêmico remoto (PCIR) sobre o índice tornozelo-braço (ITB)



5 DISCUSSÃO

O conceito de pré-condicionamento isquêmico remoto traz consigo aspectos interessantes quando associado à doença arterial obstrutiva periférica, em especial à claudicação intermitente. Em primeiro lugar, esta teoria poderia explicar, ao menos em parte, o sucesso do treinamento físico no tratamento dos claudicantes. O mecanismo pelo qual o exercício físico melhora os sintomas de claudicação intermitente de causa vascular ainda não é bem esclarecido. O conceito inicial de que a atividade física promove aumento da circulação colateral por estimular a neoangiogênese não tem comprovação definitiva¹⁹. Teorias mais atuais procuram associar a melhora aguda na distância de marcha a alterações no metabolismo muscular provocadas pelo exercício físico³³. Os seguidos surtos de isquemia e reperfusão que o treinamento físico provoca seriam o estímulo para adaptações bioquímicas intracelulares, levando a um aproveitamento mais eficaz do oxigênio pelo músculo e uma melhora na função endotelial. Esta teoria é baseada no conceito de PCI³³.

Outro ponto de interesse da associação PCI-claudicação intermitente consiste no fato de que, identificando-se os agentes bioquímicos que participariam deste processo, dar-se-ia o primeiro passo para que tais moléculas pudessem ser sintetizadas e administradas aos claudicantes, trazendo alívio dos sintomas. Para isso, é fundamental que seja demonstrado o efeito do PCI nesses indivíduos, o que motivou este estudo.

Apesar de haver inúmeros estudos demonstrando tanto o PCI como o PCIR em modelos animais, são bem menos numerosos os estudos em humanos, realizados principalmente em pacientes cirúrgicos. A investigação do PCIR nos indivíduos com doença arterial obstrutiva periférica é inédita.

Na população de claudicantes, um dos principais objetivos do tratamento é a melhora da qualidade de vida através do aumento nas distâncias de início de claudicação e na distância total de claudicação, de maneira que foram estes os parâmetros que utilizamos para avaliar a resposta ao PCIR, fazendo de cada paciente o seu próprio controle. Para isso, comparamos as distâncias de marcha quantificadas pelo teste de esteira com e sem o PCIR. O teste de esteira nos pareceu mais adequado, uma vez que, por ser feito com velocidade controlada, as condições do exame são mais reprodutíveis em relação ao teste de marcha, no qual o paciente pode alterar a velocidade de caminhada conforme surjam os sintomas, prejudicando a comparação entre dois testes realizados em momentos diferentes. Por outro lado, grande parte dos pacientes com claudicação intermitente é formada por idosos, geralmente pouco habituados a caminhar em esteira ergométrica, de maneira que poderia haver influência do efeito de aprendizado, fazendo com que o paciente andasse uma maior distância no segundo teste. Com a finalidade de minimizar esse fator de confusão, dividimos os pacientes em dois grupos, promovendo a intervenção (PCIR) no primeiro teste de esteira num grupo e, no outro grupo, no segundo teste. Uma outra decisão foi criar um grupo controle que, além de parâmetro para comparação com os grupos nos quais foi feita a intervenção, serviria para demonstrar a existência desse efeito de aprendizado. Os três grupos

mostraram-se homogêneos em relação à faixa etária, gênero e fatores de risco para aterosclerose. A exceção ficou por uma frequência maior de dislipidemia nos indivíduos do grupo C, que não trouxe prejuízo para a análise comparativa objeto do estudo.

Analisando a distância de início de claudicação, observamos que houve aumento estatisticamente significativo nos grupos A e C, no segundo teste de esteira, sendo o aumento observado no grupo A estatisticamente maior que o ocorrido no grupo C. O aumento da distância de início de claudicação no grupo controle demonstrou a existência do efeito de aprendizado. O ganho mais acentuado no grupo A, no qual o PCIR foi feito no segundo teste de esteira, em relação ao grupo C, pode ser explicado pela somatória dos efeitos do PCIR e do aprendizado no grupo A, suplantando o efeito isolado do aprendizado no grupo C. Esse raciocínio também serve como base para justificar o fato de, no grupo B, as distâncias iniciais de claudicação terem sido semelhantes em ambos os testes, já que o efeito benéfico do PCIR no primeiro teste de esteira foi mimetizado pelo efeito benéfico do aprendizado no segundo teste.

O estudo da distância total de claudicação, por sua vez, revelou um ganho estatisticamente significativo no segundo teste em relação ao primeiro em todos os três grupos. A interpretação possível para esse acontecimento é a de que, ao contrário da distância inicial de claudicação, apenas o efeito do aprendizado contribuiu para um melhor desempenho da marcha. O PCIR teve pouco ou nenhum efeito, já que a distância total foi superior no segundo teste mesmo no grupo B, no qual o PCIR foi realizado no primeiro teste. Além disso, o ganho na distância final no segundo teste de esteira foi similar nos três grupos.

A melhora de performance provocada pelo PCIR demonstrada apenas para a distância inicial de claudicação nos leva a crer que a limitação para a distância total de marcha pode não ser causada exclusivamente pela dor, sendo possível que a isquemia mantida pelo ato de caminhar leve também a um prejuízo funcional do tecido muscular.

Sabemos que o processo de contração muscular tem o envolvimento direto da molécula de ATP, que uma vez ligada à miosina permite o seu desacoplamento da actina e possibilita um novo ciclo de contração/relaxamento muscular. Entretanto, quando isso não ocorre, o músculo permanece em seu estado contraído, levando a um déficit funcional do músculo envolvido. Nos pacientes com claudicação intermitente, durante o exercício, ocorre um desbalanço entre a oferta e a demanda de oxigênio, caracterizado por um aumento na demanda sem a possibilidade de aumento na oferta. Nesse momento, os mecanismos de geração de ATP dependentes de oxigênio, como a via da respiração celular aeróbica, altamente eficiente, onde uma molécula de glicose gera 38 ATPs, ficam comprometidos. Com essa restrição, a fonte de energia para contração muscular fica limitada à glicólise, com uma produção de apenas 2 ATPs para cada molécula de glicose ou a conversão de creatinino fosfato + ADP em ATP + creatinina (reserva muscular limitada de energia). Dessa forma, atribuímos o não aumento na distância total de marcha nos pacientes do nosso estudo ao déficit energético que se estabelece ao longo do exercício e altera a dinâmica de contração muscular⁹⁸.

Com relação ao aumento na distância de início de claudicação ou distância livre de dor, uma possível explicação para esse achado seria o

envolvimento dos opióides como mediadores do PCIR, e que sabidamente têm ação na redução da excitabilidade neuronal, resultando em diminuição da neurotransmissão de impulsos nociceptivos⁴⁷.

As medidas do ITB mantiveram-se semelhantes em ambas as visitas, permitindo concluir que o PCIR não tem efeito direto sobre a perfusão tecidual.

Este estudo tem limitações, como o fato de o PCIR ter sido feito sobre um grupo muscular pequeno. A insuflação do manguito sobre o braço gerou isquemia somente no antebraço, de pouca massa muscular. Optamos por esse método, já que consideramos de maior risco interromper temporariamente o fluxo de sangue nos grupos musculares mais volumosos como os do membro inferior contralateral ao sintomático, onde a doença aterosclerótica costuma ser mais evidente do que no membro superior.

Outro fator limitante é que os pacientes incluídos no estudo, por fazerem parte do ambulatório de claudicação intermitente, já estavam na vigência de tratamento. O membro claudicante, assim, já estaria com algum grau de PCI provocado pela atividade física de rotina. Talvez o efeito do PCIR fosse mais facilmente demonstrado em pacientes ainda não tratados.

Também em relação ao PCIR, em nosso estudo optamos pela realização de três ciclos de cinco minutos de isquemia, seguidos de cinco minutos de reperfusão; entretando ainda não existe uma padronização na literatura com relação ao melhor método, com estudos em humanos que realizaram PCIR com dois, três e quatro ciclos, cuja duração da isquemia também variou de três a dez minutos de duração²⁶.

Com relação ao tempo de janela terapêutica, realizamos o teste de esteira 90 minutos após o início do PCIR, porém sabemos que o seu efeito na fase precoce se estende por quatro horas e os trabalhos avaliam momentos diferentes do efeito protetor do PCIR²⁶.

A aplicabilidade do PCIR à nível de isquemia funcional, como avaliada em nosso trabalho, ainda apresenta resultados conflitantes, até mesmo pela escassez de trabalhos nesse sentido, com melhora dos resultados de ciclistas e nadadores de alta performance e o encontrado em nosso trabalho, onde não houve aumento da distância total de claudicação^{31,32}.

A ausência de biomarcadores de lesão celular em nosso trabalho deve-se ao fato de a isquemia funcional gerada durante a claudicação não levar à destruição celular.

Esses aspectos em relação ao PCIR, como qual o número e tempo ideais de ciclos de isquemia/reperfusão, o melhor local para aplicar tais ciclos (membro inferior versus membro superior, um membro versus dois membros), o tempo de janela terapêutica e o efeito que o PCIR teria não somente sobre a isquemia letal, mas também sobre a isquemia funcional, continuam sendo pontos de fragilidade nos trabalhos atuais, que tendem a se uniformizar com o aumento do número de trabalhos e os resultados oriundos desses trabalhos⁹.

De qualquer forma, novos estudos são necessários para esclarecer tanto o efeito do PCIR, como o mecanismo pelo qual ele atua em diversos tecidos.

6 CONCLUSÕES

- a. O PCIR aumenta a distância de início de claudicação.
- b. O PCIR não tem efeito sobre a distância total de claudicação.

7 ANEXOS

Anexo A - Ficha clínica

Ficha Clínica - PCIRC
 Ambulatório de Claudicação Intermitente
 Disciplina de Cirurgia Vascular - FMUSP

GRUPO A**I DADOS DE IDENTIFICAÇÃO**

Nome: _____
 RGHC: _____
 Idade: ____ anos Nascimento: ____ __ Sexo: ____ M ____ F ____ Raça: _____
 Telefone contato: _____

II ANAMNESE

Claudicação:

distância máxima: ____ metros Membro acometido: ____ D ____ E ____ Ambos

Pulsos	Fe	Po	Ped	Tp
D				
E				

III TESTE DE ESTEIRA

Visita 0 (V0) - semana 0 - dia 0

Data: ____ __ __

Pressão arterial: _____ Pulso: _____ ITB _____

Medicamentos em uso (suspensos 2h antes do teste): _____

Tempo até início da dor: _____ Distância até início da dor: _____

Tempo máximo tolerado: _____ Distância máxima tolerada: _____

Visita 1 (V1) - semana 1 - dia 7 _____ **Data:** ____ __ __

Pressão arterial: _____ Pulso: _____ ITB _____

Medicamentos em uso (suspensos 2h antes do teste): _____

Após 90 minutos (com PCI em membro superior ____ D ____ E)

Tempo até início da dor: _____ Distância até início da dor: _____

Tempo máximo tolerado: _____ Distância máxima tolerada: _____

Ficha Clínica - PCIRC
 Ambulatório de Claudicação Intermitente
 Disciplina de Cirurgia Vascular - FMUSP

GRUPO B

I DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
 RGHC: _____
 Idade: ____ anos Nascimento: ____ Sexo: ___ M ___ F ___ Raça: _____
 Telefone contato: _____

II ANAMNESE

Claudicação:
 distância máxima: _____ metros Membro acometido: ___ D ___ E ___ Ambos

Pulsos	Fe	Po	Ped	Tp
D				
E				

III TESTE DE ESTEIRA

Visita 0 (V0) - semana 0 - dia 0

Data: ____ ____ ____

Pressão arterial: _____ Pulso: _____ ITB _____
 Medicamentos em uso (suspensos 2h antes do teste): _____

Tempo até início da dor: _____ Distância até início da dor: _____
 Tempo máximo tolerado: _____ Distância máxima tolerada: _____

Visita 1 (V1) - semana 1 - dia 7

Data: ____ ____ ____

Pressão arterial: _____ Pulso: _____ ITB _____
 Medicamentos em uso (suspensos 2h antes do teste): _____

Após 90 minutos (com PCI em membro superior ___ D ___ E)

Tempo até início da dor: _____ Distância até início da dor: _____
 Tempo máximo tolerado: _____ Distância máxima tolerada: _____

Anexo B - Tabela geral de dados dos pacientes

PACIENTE	IDADE	SEXO	COR	HAS	DM	DLP	TABAGISMO	1_DC	2_DC	DELTA=2-1 (DC)	1_DTM	2_DTM	DELTA=2-1 (DTM)
A B.G.	75	1	0	1	0	1	1	280	320	40	330	500	170
A J.B.M.	65	1	0	1	0	0	0	160	170	10	430	600	170
A S.R.B.	68	0	1	0	0	0	1	190	160	-30	210	280	70
A A.S.M.	58	0	0	1	0	0	1	128	176	48	240	256	16
A F.J.J.	68	1	0	0	0	1	1	90	90	0	180	300	120
A J.G.S.	61	1	0	1	1	0	1	120	90	-30	260	160	-100
A J.A.	69	1	0	1	1	0	1	130	290	160	210	680	470
A E.A.S.D.	71	1	0	1	0	0	1	210	350	140	710	650	-60
A J.S.M.	70	0	1	1	1	1	1	200	150	-50	330	410	80
A J.E.S.	74	0	1	1	0	0	1	380	320	-60	760	610	-150
A A.E.S.	76	1	0	0	0	0	1	150	180	30	410	460	50
A L.C.L.	54	1	1	1	0	0	1	190	250	60	470	460	-10
A A.D.G.M.	64	1	0	1	0	0	1	150	200	50	410	770	360
A A.S.	75	1	0	1	0	1	1	150	210	60	340	430	90
A G.A.R.	59	1	0	1	1	1	1	144	160	16	320	320	0
A O.T.	67	1	0	1	0	1	1	32	64	32	48	96	48
A G.A.S.	65	1	1	1	1	0	1	192	256	64	352	384	32
A S.I.S.	46	0	0	0	0	1	1	48	112	64	320	464	144
MEDIA	65,83							163,56	197,11	33,56	351,67	435,00	83,33
DP	7,94							79,49	85,06	57,86	172,84	182,14	149,53

Continua

Continuação

PACIENTE	IDADE	SEXO	COR	HAS	DM	DLP	TABAGISMO	1_DC	2_DC	DELTA=2-1 (DC)	1_DTM	2_DTM	DELTA=2-1 (DTM)
B	M.B.	66	1	0	0	1	1	208	112	-96	320	288	-32
B	S.S.C.	67	0	1	0	1	1	48	48	0	144	304	160
B	M.L.A.C.	46	0	1	1	0	1	64	48	-16	352	224	-128
B	N.S.	69	1	0	0	0	1	140	140	0	150	180	30
B	W.C.	66	0	1	1	0	1	80	80	0	112	96	-16
B	M.B.S.	61	1	1	1	0	1	150	250	100	240	400	160
B	A.B.S.	57	1	0	1	0	1	70	80	10	370	470	100
B	J.S.S.	55	1	0	1	0	1	130	170	40	380	490	110
B	J.B.A.	75	1	0	0	0	1	100	160	60	230	240	10
B	R.F.S.M.	65	1	0	1	0	0	310	200	-110	650	950	300
B	J.R.L.S.	42	1	0	0	0	1	190	70	-120	470	420	-50
B	S.P.	64	0	1	1	1	1	470	390	-80	640	720	80
B	M.H.S.N.L.	49	0	1	0	0	1	50	90	40	160	240	80
B	A.P.B.	53	1	0	0	0	1	110	60	-50	200	260	60
B	A.J.S.	73	1	0	1	1	1	50	70	20	160	180	20
B	J.G.S.	60	1	0	0	0	1	180	180	0	360	360	0
MEDIA	60,50							146,88	134,25	-12,63	308,63	363,88	55,25
DP	9,51							111,78	90,99	63,05	168,07	217,83	100,80

Continua

Conclusão

PACIENTE	IDADE	SEXO	COR	HAS	DM	DLP	TABAGISMO	1_DC	2_DC	DELTA=2-1 (DC)	1_DTM	2_DTM	DELTA=2-1 (DTM)
C	J.C.R.	62	1	0	1	1	1	430	450	20	780	790	10
C	J.L.C.	58	1	1	1	1	0	300	400	100	540	500	-40
C	S.J.O.	60	1	0	0	0	0	200	270	70	280	400	120
C	O.E.L.	80	1	0	1	1	1	80	140	60	130	310	180
C	R.J.B.	49	1	0	0	0	1	50	60	10	120	220	100
C	G.M.J.	67	1	1	0	1	1	70	60	-10	90	90	0
C	M.A.	62	1	1	1	1	1	220	140	-80	310	380	70
C	D.G.B.	69	0	1	1	1	0	20	110	90	70	260	190
C	M.J.M.O.	54	0	1	0	1	1	70	100	30	210	280	70
C	J.J.C.	75	1	0	1	1	1	170	160	-10	310	1260	950
C	G.D.G.	82	1	0	1	0	1	40	90	50	110	210	100
C	J.R.G.	76	1	0	1	0	1	220	330	110	310	420	110
C	N.S.J.	52	1	0	0	0	1	300	410	110	540	600	60
C	E.A.	69	0	1	1	1	1	40	60	20	310	320	10
C	S.M.P.	54	0	1	1	1	1	90	90	0	350	330	-20
C	L.C.M.	53	1	1	0	1	1	40	40	0	220	180	-40
C	J.C.	65	1	1	1	1	1	130	130	0	740	740	0
C	M.J.S.	65	1	1	1	1	1	110	80	-30	120	280	160
MEDIA	64,00							143,33	173,33	30,00	307,78	420,56	112,78
DP	9,87							114,22	135,13	52,24	214,57	279,84	221,14

8 REFERÊNCIAS

1. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74(5):1124-36.
2. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993; 87(3):893-9.
3. Przyklenk K. Efficacy of cardioprotective 'conditioning' strategies in aging and diabetic cohorts: the co-morbidity conundrum. *Drugs Aging*. 2011; 28(5):331-43.
4. Przyklenk K, Darling CE, Dickson EW, Whittaker P. Cardioprotection 'outside the box'--the evolving paradigm of remote preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2003; 98(3):149-57.
5. Przyklenk K, Heusch G. Late preconditioning against myocardial stunning. Does aspirin close the "second window" of endogenous cardioprotection? *J Am Coll Cardiol*. 2003; 41(7):1195-7.
6. Przyklenk K, Li G, Simkhovich BZ, Kloner RA. Mechanisms of myocardial ischemic preconditioning are age related: PKC-epsilon does not play a requisite role in old rabbits. *J Appl Physiol*. 2003; 95(6):2563-9.

7. Przyklenk K, Maynard M, Darling CE, Whittaker P. Pretreatment with D-myo-inositol trisphosphate reduces infarct size in rabbit hearts: role of inositol trisphosphate receptors and gap junctions in triggering protection. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005; 314(3):1386-92.
8. Przyklenk K, Whittaker P. Cardioprotection with adenosine: 'a riddle wrapped in a mystery'. *Br J Pharmacol.* 2005; 145(6):699-700.
9. Przyklenk K, Whittaker P. Cardioprotection via adaptation to hypoxia: expanding the timeline and targets? *Basic Res Cardiol.* 2011; 106(3):325-8.
10. Dickson EW, Reinhardt CP, Renzi FP, Becker RC, Porcaro WA, Heard SO. Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence. *J Thromb Thrombolysis.* 1999; 8(2):123-9.
11. McClanahan TB, Nao BS, Wolke LJ, Martin BJ, Mezt TE. Brief renal occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits. *FASEB J.* 1993; 7:A18.
12. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation.* 1996; 94(9):2193-200.

13. 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(5):1641-6.
14. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, Inubushi T, Kinoshita M. 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(2):556-64.
15. Patel HH, Moore J, Hsu AK, Gross GJ. Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *J Mol Cell Cardiol*. 2002; 34(10):1317-23.
16. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschtitzky JA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*. 2002; 106(23):2881-3.
17. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine. *Br J Surg*. 2005; 92(9):1169-76.
18. Gurusamy KS, Gonzalez HD, Davidson BR. Current protective strategies in liver surgery. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(48):6098-6103.

19. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review. *J Surg Res*. 2008; 150(2):304-30.
20. Harkin DW, Barros D'Sa AA, McCallion K, Hoper M, Campbell FC. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia-reperfusion protects against acute lung injury. *J Vasc Surg*. 2002; 35(6):1264-73.
21. Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, Moses M, Forrest Cr, Pang CY. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285(4):H1435-43.
22. Ates E, Genc E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, Emre S, Kiper H. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation*. 2002; 74(9):1247-51.
23. Venugopal V, Hausenloy DJ, Ludman A, Di Salvo C, Kolvekar S, Yap J, Lawrence D, Bognolo J, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery with cold-blood cardioplegia: a randomised controlled trial. *Heart*. 2009; 95(19):1567-71.
24. Thielmann M, Kottenberg E, Boengler K, Raffelsieper C, Neuhaeuser M, Peters J, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial injury after coronary artery bypass surgery with crystalloid cardioplegic arrest. *Basic Res Cardiol*. 2010; 105(5):657-64.

25. Gurusamy KS, Kumar Y, Pamecha V, Sharma D, Davidson BR. Ischaemic pre-conditioning for elective liver resections performed under vascular occlusion. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; (1):CD007629.
26. Kanoria S, Jalan R, Seifalian AM, Williams R, Davidson BR. Protocols and mechanisms for remote ischemic preconditioning: a novel method for reducing ischemia reperfusion injury. *Transplantation.* 2007a; 84:445-58.
27. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraci SA, Akthar AM. Remote ischemic preconditioning reduces Myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trail. *Circulation.* 2007; 116: I98-I105.
28. Li C, Li YS, Xu M, Wen SH, Yao X, Wu Y. Limb remote ischemic preconditioning for intestinal and pulmonary protection during elective open infrarenal abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trail. *Anesthesiology.* 2013; 118:842-52.
29. Walsh SR, Boyle JR, Tang TY, Sadat U, Cooper DG, Lapsley M. Remote ischemic preconditioning for renal and cardiac protection during endovascular aneurysm repair: a randomized controlled trial. *J. Endovasc. Ther.* 2009; 16:680-9.

30. Walsh SR, Boyle JR, Tang TY, Sadat U, Norden AG, Lapsley M. Remote ischemic preconditioning for renal protection during elective open infrarenal abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Vasc. Endovasc. Surg.* 2010b; 44:334-40.
31. Jean-St-Michel E, Manthiot C, Li J, Tropak M, Michelsen MM, Schmidt MR, McCrindle BW, Wells GD, Redington AN. Remote preconditioning improves performance in highly trained athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 43:1280-6.
32. De Groot PC, Thijssen DH, Sanchez M, EllenKamp R, Hopman MT. Ischemic preconditioning improves maximal performance in humans. *Eur J Appl Physiol.* 2010; 108:141-6.
33. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, Donald A, Deanfield JE, MacAllister RJ. 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(3):450-6.
34. Loukogeorgakis SP, Williams R, Panagiotidou AT, Kolvekar SK, Donald A, Cole TJ, Yellon DM, Deanfield JE, MacAllister RJ. Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism. *Circulation.* 2007; 116(12):1386-95.

35. 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.
36. Liem DA, te Lintel Hekkert M, Manintveld OC, Boomsma F, Verdouw PD, Duncker DJ. 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.
37. Verdouw PD, Gho BC, Koning MM, Schoemaker RG, Duncker DJ. Cardioprotection by ischemic and nonischemic myocardial stress and ischemia in remote organs. Implications for the concept of ischemic preconditioning. *Ann N Y Acad Sci*. 1996; 793:27-42.
38. Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, Drew GM. Renal ischemia preconditions myocardium: Role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *Am J Physiol*. 1998; 275(5 Pt 2):H1542-7.
39. Liem DA, Verdouw PD, Ploeg H, Kazim S, Duncker DJ. Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283:H29-37.
40. 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.

41. Schoemaker RG, van Heijningen CL. Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278:H1571-6.
42. Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M, Nienstedt J, Dominiak P, Dendorfer A. Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKCepsilon-isoform. *Cardiovasc Res.* 2002; 55:583-9.
43. Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Ghasemi M, Jabejdar-Maralani P, Sadeghipour H, Ebrahimi F, Dehpour AR. Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB2 receptors in the rat heart. *Eur J Pharmacol.* 2008; 579:246-52.
44. Wolfrum S, Nienstedt J, Heidbreder M, Schneider k, Dominiak P, Dendorfer A. Calcitonin gene related peptide mediates cardioprotection by remote preconditioning. *Regul Pept.* 2005; 127:217-24.
45. Xiao L, Lu R, Hu CP, Deng HW, Li YJ. Delayed cardioprotection by intestinal preconditioning is mediated by calcitonin gene-related peptide. *Eur J Pharmacol.* 2001; 427:131-5.
46. Tang ZL, Dai W, Li YJ, Deng HW. Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999; 359:243-7.

47. Dickson EW, Tubbs RJ, Porcaro WA, Lee WJ, Blehar DJ, Carraway RE, Darling CE, Przyklenk K. Myocardial preconditioning factors evoke mesenteric ischemic tolerance via opioid receptors and K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 283:H22-8.
48. Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ, Suto F, Surendra H, Kuzmin E, Li J, Gross G, Wilson GJ, Callahan J, Redington AN. 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.
49. Zhang SZ, Wang NF, Xu J, Gao Q, Lin GH, Bruce IC, Xia Q. Kappa-opioid receptors mediate cardioprotection by remote preconditioning. *Anesthesiology*. 2006; 105:550-6.
50. Weinbrenner C, Schulze F, Sárváry L, Strasser RH. 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.
51. Wong GT, Lu Y, Mei B, Xia Z, Irwin MG. Cardioprotection from remote preconditioning involves spinal opioid receptor activation. *Life Sci*. 2012; 91:860-5.
52. Chen XG, Wu BY, Wang JK, Bai T. Mechanism of the protective effects of noninvasive limbs preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Chin Med J (Engl)*. 2005; 118:1723-7.

-
53. Kanoria S, Jalan R, Davies NA, Seifalian AM, Williams R, Davidson BR. Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 2006; 93(6):762-8.
 54. Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol*. 1997; 273(4 Pt 2):H1707-12.
 55. Shahid M, Tauseef M, Sharma KK, Fahim M. Brief femoral artery ischaemia provides protection against myocardial ischaemia-reperfusion injury in rats: The possible mechanisms. *Exp Physiol*. 2008; 93:954-68.
 56. Chen YS, Chien CT, Ma MC, Tseng YZ, Lin FY, Wang SS, Chen CF. Protection "outside the box" (skeletal remote preconditioning) in rat model is triggered by free radical pathway. *J Surg Res*. 2005; 126:92-101.
 57. Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2010; 105:651-5.
 58. Weinbrenner C, Nelles M, Herzog N, Sárváry L, Strasser RH. 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.

-
59. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev.* 2008; 88:581-609.
 60. 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.
 61. Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marbán E. 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.
 62. Dos Santos P, Kowaltowski AJ, Laclau MN, Seetharaman S, Paucek P, Boudina S, Tambo JB, Tariosse L, Garlid KD. Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel protects the ischemic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 283:H284-95.
 63. Vander Heide RS, Hill ML, Reimer KA, Jennings RB. Effect of reversible ischemia on the activity of the mitochondrial ATPase: Relationship to ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol.* 1996; 28:103-12.
 64. Baines CP, Song CX, Zheng YT, Wang GW, Zhang J, Wang OL, Guo Y, Bolli R, Cardwell EM, Ping P. Protein kinase Cε interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ Res.* 2003; 92:873-80.

-
65. Ruiz-Meana M. Ischaemic preconditioning and mitochondrial permeability transition: A long-lasting relationship. *Cardiovasc Res.* 2012; 96:157-9.
 66. Konstantinov IE, Arab S, Kharbanda RK, Li J, Cheung MM, Cherepanov V, Downey GP, Liu PP, Cukerman E, Coles JG, Redington AN. The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans. *Physiol Genomics.* 2004; 19:143-50.
 67. Kawata H, Yoshida K, Kawamoto A, Kurioka H, Takase E, Sasaki Y, Hatanaka K, Kobayashi M, Ueyama T, Hashimoto T, Dohi K. 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.
 68. Li G, Labruto F, Sirsjö A, Chen F, Vaage J, Valen G. 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.
 69. Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Biliar TR. 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.

70. Kim YM, Talanian RV, Li J, Billiar TR. 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.
71. Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): A collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing committee to develop guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease). *J Am Coll Cardiol.* 2006; 47:1239-312.
72. Kannel WB, McGee DL. Update on some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham Study. *J Am Geriatr Soc.* 1985; 33:13-8.
73. Salameh MJ, Ratchford EV. Update on peripheral arterial disease and claudication rehabilitation. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2009; 20:627-56.
74. Meijer WT, Hoes AW, Rutgers D, Bots ML, Hofman A, Grobbee DE. Peripheral arterial disease in the elderly: The Rotterdam Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:185-92.

75. Kannel WB, Skinner JJ, Schwartz MJ, Shurtleff D. Intermittent claudication. Incidence in the Framingham Study. *Circulation*. 1970; 41:875-83.
76. Widmer LK, Greensher A, Kannel WB. Occlusion of peripheral arteries. A study of 6.400 working subjects. *Circulation*. 1964; 30:836-42.
77. Ramos S, Quesada M, Solanas P, Subirana I, Sala J, Vila J, Masiá R, Cerezo C, Elosua R, Grau M, Cerdón F, Juvinyà D, Fitó M, Isabel Covas M, Clarà A, Angel Muñoz M, Marrugat J; REGICOR Investigators. Prevalence of symptomatic and asymptomatic peripheral arterial disease and the value of the ankle-brachial index to stratify cardiovascular risk. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2009; 38:305-11.
78. Passos VMA, Barreto SM, Guerra HL, Firmino JOA, Vidigal PG, Lima-Costa MF. Projeto Bambuí: Prevalência e fatores Associados à Claudicação Intermitente na População Idosa Residente na Comunidade. *Arq. Bras. Cardiol*. 2001; 77:453-7.
79. Fowkes FGR. Epidemiology of atherosclerotic arterial disease in the lower limbs. *Eur J Vasc Surg*. 1988; 2:283-91.
80. Strandness DE, Sumner DS: *Hemodynamics for surgeons*. New York: Grune & Stratton, 1975, p 29.
81. Carter SA, Lezack JD: Digital systolic pressures in the lower limbs in arterial disease. *Circulation*. 1971; 43:905-14.

82. McKenna M, Wolfson S, Kuller L. The ratio of ankle and arm arterial pressure as an independent predictor of mortality. *Atherosclerosis*. 1991; 87:119-28.
83. Sikkink CJ, van Asten WN, van't Hof MA, van Langen H, van der Vliet JA. Decreased ankle- brachial indices in relation to morbidity and mortality in patients with peripheral arterial diseases. *Vasc Med*. 1997; 2:169-73.
84. Yao JST: Hemodynamic studies in peripheral arterial disease. *Br J Surg*. 1970; 57:761-6.
85. Regender JG, Gardner A, Hiatt WR. Exercise testing and exercise rehabilitation for patients with peripheral arterial disease: status in 1997. *Vasc Med*. 1997; 2:147-55.
86. Fronck A, Johanson K, Dilley RB, et al. Ultrasonically monitored postocclusive reactive hyperemia in the diagnosis of peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*. 1973; 48:149-52.
87. Strandness DE, Schultz RD, Sumner DS, Rushmer RF. Ultrasonic flow detection: A useful technique in the evaluation of peripheral vascular disease. *Am J Surg*. 1967; 113:311-20.
88. Qin S, Caskey CF, Ferrara KW. Ultrasound contrast microbubbles in imaging and therapy: physical principles and engineering. *Phys Med Biol*. 2009; 54(6):R27.

89. Collins R, Burch J, Cranny G, Aguiar-Ibáñez R, Craig D, Wright K, Berry E, Gough M, Kleijnen J, Westwood M. Duplex ultrasonography, magnetic resonance angiography, and computed tomography angiography for diagnosis and assessment of symptomatic, lower limb peripheral arterial disease: systematic review. *BMJ*. 2007; 334:1257-61.
90. Reiter T, Ritter O, Prince MR, Nordbeck P, Wanner C, Nagel E, Bauer WR. Minimizing Risk of Nephrogenic systemic fibrosis in Cardiovascular Magnetic Resonance. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2012; 14(1):31.
91. Met R, Bipat S, Legemate DA, Reekers JA, Koelemay MJW. Diagnostic performance of computed tomography angiography in peripheral arterial disease. A systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009; 301:415-24.
92. Anderson JL, Halperin JL, Albert NM, Bozkurt B, Brindis RG, Curtis LH, DeMets D, Guyton RA, Hochman JS, Kovacs RJ, Ohman EM, Pressler SJ, Sellk FW, Shen WK. Management of patients with peripheral arterial disease (compilation of 2005 and 2011 ACCF/AHA Guideline Recommendations): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2013; 127:1-20.
93. Wolosker N, Nakano L, Rosoky RA, Puech-Leão P. Evaluation of walking capacity over time in 500 patients with intermittent claudication who underwent clinical treatment. *Arch Intern Med*. 2003; 163:2296-300.

94. Yang HT, Deschenes MR, Ogilvie RW, Terjung RL. Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in rats with femoral arterial ligation. *Circ Res.* 1996; 79:62-9.
95. Gardner AW, Poehlman ET. Exercise rehabilitation programs for the treatment of claudication pain: a meta-analysis. *JAMA.* 1995; 274:975-80.
96. McDermott MM, Ades P, Guralnik JM, Dyer A, Ferrucci L, Liu K, Nelson M, Lloyd-Jones D, Van Horn L, Garside D, Kibbe M, Domanchuk K, Stein JH, Liao Y, Tao H, Green D, Pearce WH, Schneider JR, McPherson D, Laing ST, McCarthy WJ, Shroff A, Criqui MH. Treadmill exercise and resistance training in patients with peripheral arterial disease with and without intermittent claudication. *JAMA.* 2009; 301(2):165-74.
97. Eng J. Sample size estimation: how many individuals should be studied? *Radiology.* 2003; 227(2):309-13.
98. Huxley AF. Muscular contraction. *J Physiology.* 1974; 243.1:1-43.

APÊNDICE

Apêndice A - Artigo



CLINICAL SCIENCE

Remote ischemic preconditioning in patients with intermittent claudication

Glauco Fernandes Saes, Antonio Eduardo Zerati, Nelson Wolosker, Luciana Ragazzo, Ruben Miguel Ayzin Rosoky, Raphael Mendes Ritti-Dias, Gabriel Grizzo Cucato, Marcelo Chehuen, Breno Quintella Farah, Pedro Puech-Leão

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Disciplina de Cirurgia Vascular, Ambulatório de Claudicação, São Paulo/SP, Brasil.

OBJECTIVE: Remote ischemic preconditioning (RIPC) is a phenomenon in which a short period of sub-lethal ischemia in one organ protects against subsequent bouts of ischemia in another organ. We hypothesized that RIPC in patients with intermittent claudication would increase muscle tissue resistance to ischemia, thereby resulting in an increased ability to walk.

METHODS: In a claudication clinic, 52 ambulatory patients who presented with complaints of intermittent claudication in the lower limbs associated with an absent or reduced arterial pulse in the symptomatic limb and/or an ankle-brachial index <0.90 were recruited for this study. The patients were randomly divided into three groups (A, B and C). All of the patients underwent two tests on a treadmill according to the Gardener protocol. Group A was tested first without RIPC. Group A was subjected to RIPC prior to the second treadmill test. Group B was subjected to RIPC prior to the first treadmill test and then was subjected to a treadmill test without RIPC. In Group C (control group), both treadmill tests were performed without RIPC. The first and second tests were conducted seven days apart. Brazilian Clinical Trials: RBR-7TF6TM.

RESULTS: Group A showed a significant increase in the initial claudication distance in the second test compared to the first test.

CONCLUSION: RIPC increased the initial claudication distance in patients with intermittent claudication; however, RIPC did not affect the total walking distance of the patients.

KEYWORDS: Intermittent Claudication; Ischemic Preconditioning; Peripheral Arterial Disease.

Saes GF, Zerati AE, Wolosker N, Ragazzo L, Rosoky RM, Ritti-Dias RM, et al. Remote ischemic preconditioning in patients with intermittent claudication. *Clinics*. 2013;68(4):495-499.

Received for publication on October 25, 2012; First review completed on November 21, 2012; Accepted for publication on December 19, 2012

E-mail: glauco.saes@terra.com.br

Tel.: 55 11 98111-2860

■ INTRODUCTION

Ischemic preconditioning (IPC) was first described in 1986 by Murry et al. (1) as an increase in cellular resistance to myocardial ischemia when the heart is exposed to periods of brief non-lethal ischemia interspersed with reperfusion. In 1993, Przyklenk et al. (2) demonstrated that an increase in cell resistance to ischemia also occurred in other tissues that were not directly subjected to ischemia. This phenomenon was named remote ischemic preconditioning (RIPC) (3-18). Although some authors question whether RIPC actually occurs (19), many studies have demonstrated the beneficial

effects on myocardial cells after transient ischemia is encountered by other tissue (20-22). Cells in organs other than the heart are sensitive to the protective effects that follow ischemia-reperfusion injury of the myocardial tissue or other distant tissues (23-26). Based on evidence of RIPC occurring in other tissues, we predicted that RIPC could occur in patients with intermittent claudication (IC), thereby making the muscles more resistant to ischemia and increasing the ability of these individuals to walk. To test this hypothesis, we performed gait tests in patients with claudication with and without prior RIPC and then compared the initial claudication distance (ICD) and the total walking distance (TWD).

■ METHODS

This study was performed at the Intermittent Claudication Clinic of the Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina at the Universidade de São Paulo after receiving approval from the local ethics committee. All of the participants signed informed consent forms prior to

Copyright © 2013 CLINICS - This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

No potential conflict of interest was reported.

DOI: 10.6061/clinics/2013(04)10



their enrollment. This study was registered as a clinical trial in the Brazilian Clinical Trials Registry (trial RBR-7TF6TM).

Between January 2009 and May 2011, 52 consecutive ambulatory patients complaining of typical intermittent claudication (IC) in one or both lower limbs that was associated with an absent or reduced arterial pulse in the symptomatic limb and/or an ankle-brachial index <0.90 were recruited for this study. Physical examinations of the upper limbs revealed normal physiology in all the study participants.

The patients were randomly divided into three groups (A, B and C) and underwent two treadmill tests according to the Gardener protocol. Group A was first tested on a treadmill without undergoing RIPC, and then Group A was tested on a treadmill after undergoing RIPC. Group B was first tested on a treadmill after receiving RIPC, and then Group B was tested on a treadmill without receiving RIPC. In Group C (control group), both treadmill tests were conducted without the patient receiving RIPC. The treadmill tests were conducted seven days apart.

The tests were conducted on a treadmill running at a fixed speed of 3.2 km/h, and the required effort was progressively increased (2% increase in the incline every 2 minutes). The initial claudication distance (ICD), which describes the maximum distance a patient can walk without experiencing leg pain, and the total walking distance (TWD), which refers to the distance walked before the patient could not continue walking, were recorded in each test.

RIPC was implemented according to a previously described protocol (22), which is detailed below.

Ninety minutes before exercising on the treadmill, an inflated cuff was positioned on the non-dominant upper limb of the participant three times for five minutes each time. Between each period of inflation, the cuff was deflated for five minutes.

The participants were advised to avoid consuming the following substances, which have been suggested to interfere with the process of ischemic preconditioning (RIPC), within two hours of the test: cilostazol, sildenafil, dipyridamole, glibenclamide, aminophylline, nicorandil, phenylephrine, angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin receptor blocker II, statins and steroids, caffeine and alcohol.

Considering the experimental nature of this study, the number of subjects included in each group was calculated based on sample power, as proposed by J. Eng (41).

Statistical analysis

The statistical analyses were conducted using the Statistic 5.1 software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). The data were

first tested for normality and homogeneity of variance using the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively.

To compare the general characteristics of the three experimental groups, we used an analysis of variance (ANOVA) of one factor for continuous variables and the chi-squared or Fisher's exact test for categorical variables. To compare ICD and TWD between the three experimental groups, a two factorial ANOVA for repeated measurements was used considering the group (A, B and C) as an independent factor and the time (first or second test) as the repeated factor. When significant effects were observed, the post-hoc Duncan's test was used to verify differences.

Data are presented as relative frequencies, means and standard deviations. For all of the analyses, a significance level of *p*<0.05 was assumed.

RESULTS

A total of 52 patients were analyzed in this study, which included 38 males and 14 females. General patient characteristics are shown in Table 1. No differences were observed between the groups regarding age, race, gender, diabetes prevalence, hypertension prevalence and smoking history. However, Group C had a higher prevalence of dyslipidemia relative to the other groups (*p*=0.017).

Table 2 shows the effect of RIPC on the walking capacity of the IC patients. Group A and Group C patients had higher initial claudication distances (ICDs) in the second test relative to the first test. However, no differences were found in Group B. Furthermore, the ICD was greater in Group A patients when compared with the other groups. Table 2 also shows that the total walking distance (TWD) was lower in the first test than in the second test for Group A and Group B. However, there were no significant differences between the groups (see Figures 1 and 2).

DISCUSSION

Initial studies analyzing RIPC used animal models in an attempt to show the effects of RIPC by comparing the area of injury in tissues exposed and not exposed to periods of ischemia-reperfusion induced by ligating the arterial feeder vessel. Pryzklenk et al. were the first to demonstrate that small cycles of coronary artery occlusions in dogs protected the myocardial cells from longer periods of ischemia (2). Later, the protective effect induced by ischemia could be transferred to non-preconditioned rabbits that received whole blood transfusions from rabbits that were subjected to RIPC (29). Other studies have shown reductions in the area of myocardial infarction in animals subjected to RIPC induced by the intermittent occlusion of the femoral, renal

Table 1 - General characteristics of patients with intermittent claudication.

Variables	Group A (n=18)	Group B (n=16)	Group C (n=18)	p-value
Age (years)	65.8 ± 7.9	60.5 ± 9.5	64.0 ± 9.9	0.145
Gender (% males)	72.2	69.8	77.8	0.835
Skin color (% whites)	72.2	75.0	77.8	0.929
Risk factors				
Diabetes mellitus (%)	23.5	37.5	44.4	0.422
Hypertension (%)	77.8	62.5	94.4	0.074
Dyslipidemia (%)	38.9	25.0	72.2	0.017
History of smoking	94.4	93.8	83.3	0.456

Values are expressed as the mean ± standard deviation.



Table 2 - Effect of remote ischemic preconditioning (RIPC) on initial claudication distance (ICD) and total walking distance (TWD) in the three experimental groups.

	First test	Second test	Group effect	Moment effect	Interaction effect
ICD (m)					
Group A (n = 18)	164 ± 79	197 ± 85*	0.518	0.039	0.045
Group B (n = 16)	147 ± 112	134 ± 91 [†]			
Group C (n = 18)	143 ± 114	173 ± 135* [†]			
TWD (m)					
Group A (n = 18)	352 ± 173	435 ± 182*	0.692	<0.001	0.595
Group B (n = 16)	309 ± 168	364 ± 218*			
Group C (n = 18)	308 ± 214	421 ± 279*			

Values are expressed as the mean ± standard deviation. *Significant difference compared with the first test; [†]Different from Group A ($p < 0.05$). Group effect indicates whether a statistically significant difference exists between the groups (A, B and C). Moment effect indicates whether a statistically significant intra-patient difference exists between the results from the first and second treadmill tests (days 1 and 7). The interaction effect indicates whether a statistically significant difference exists in both the group and moment effects.

and mesenteric arteries (30-32). In addition to the cardiac muscle, other organs and tissues have been shown to respond to the protective effect of RIPC, including the lungs, kidneys, liver and skeletal muscle (23,33-35).

Of the few RIPC studies that have been conducted in human subjects, some have shown that RIPC protects endothelial function after ischemia-reperfusion injury (22,36,37), and other studies have shown the protection of myocardial cells in patients undergoing cardiac operations (38,39). For patients undergoing segmental hepatectomy, RIPC before the operation led to reduced liver enzymes during the immediate postoperative period compared with patients in whom RIPC was not performed, but no differences in mortality and morbidity were observed (40). RIPC may be mediated by humoral factors and/or through the neurogenic pathway consisting of an early phase that begins after the completion of preconditioning and persists for upwards of 24 hours, and a late phase that begins approximately 24 hours after RIPC and persists for nearly 48 hours. Several humoral factors appear to be involved in mediating RIPC, including opioids, nitric oxide, adenosine, catecholamines, bradykinin, heat shock proteins, heme oxygenase, tumor necrosis factor-alpha, free radicals, prostaglandins and angiotensin. Organs subjected to ischemia have been shown to activate the protein kinase C

intracellular pathway resulting in the nuclear translocation of nuclear factor kappa beta and the subsequent activation of nitric oxide synthesis. Common mechanisms involved in target organs in the early and late stages of RIPC remain unclear; however, some studies have suggested roles for mitochondrial K_{ATP} channels and neutrophils.

RIPC is of particular interest with respect to peripheral arterial disease such as intermittent claudication (IC). RIPC could explain, at least partially, the success of physical training in treating patients with IC. The mechanism by which exercise improves the symptoms of vascular-mediated IC remains poorly understood. Furthermore, the initial concept that physical activity promotes increased collateral circulation by stimulating neovascularization lacks definitive evidence (27). Current theories have sought to associate the improvement in walking distance to changes in muscle metabolism induced by exercise (28). Repeated ischemia-reperfusion events caused by physical training could be the stimulus for intracellular biochemical changes leading to a more effective use of oxygen by the muscle and an improvement in endothelial function. This theory is based on the concept of RIPC.

In patients with claudication, a major goal of treatment is to improve the quality of life by increasing the ICD and TWD. Therefore, these parameters were used in our study

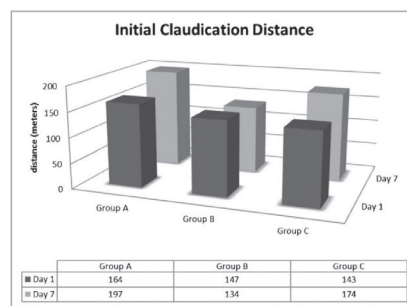


Figure 1 - Effect of remote ischemic preconditioning (RIPC) on the initial claudication distance (ICD).

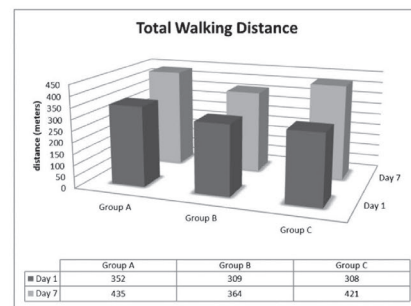


Figure 2 - Effect of remote ischemic preconditioning (RIPC) on the total walking distance (TWD).



to evaluate patient responses to RIPC treatment using each patient as his/her own control. We compared the distances walked in each treadmill test with and without RIPC. Because many patients were not used to walking on a treadmill, some patients may have been able to walk a greater distance in the second test after becoming more familiar with walking on the treadmill relative to the first test. Therefore, we divided the patients into two groups that differed in RIPC administration and a control group.

In this study, a significant increase in the ICD was observed in the second treadmill test for Group A and Group C, and this increase was greater in Group A compared to Group C. All of the groups showed a statistically significant increase in the second treadmill test for the TWD regardless of RIPC treatment. These findings suggested that two factors contributed to an increase in walking distance: RIPC and an increase in patient familiarity with treadmill use. Thus, Group A averaged a significantly higher ICD in the second week when compared to the first week. However, in Group B, the factors responsible for increasing the distance walked (RIPC and treadmill familiarization) appeared to antagonize the effect of each other because of the timing of the treadmill test. If RIPC had no beneficial effect on treadmill performance, then the distance walked in the second test should increase regardless of whether RIPC was administered prior to the first test or the second test; however, this was not the case in our study.

The fact that the TWD did not change upon RIPC treatment is most likely caused by ischemic conditioning, which is expected in claudication patients, as ischemia is the cause of the symptoms of claudication. However, as RIPC activates several signaling pathways, we believe that pathways that are not activated or that are partially activated may become fully activated after RIPC, such as the opioid pathway. We suspect that the activation of other signaling pathways by RIPC could explain why the ICD increased, as opioids may increase tolerance to pain.

Future studies should attempt to identify the biochemical agents responsible for the benefits of RIPC in claudication patients, which could allow for the exogenous administration of these factors to claudication patients bringing relief of symptoms. However, prior to the developing therapeutics for claudication patients, evidence confirming the benefits of RIPC in these individuals is necessary, which was the main objective of our study.

Because RIPC did not change the TWD, RIPC did not appear to be useful for claudication treatment, and conventional treatments involving exercise training (walking and/or exercise with load), risk factor control, smoking cessation and drug therapy with aspirin and simvastatin remain the best therapeutic option. However, as patients with claudication are constantly exposed to ischemic conditioning in the lower limbs and because the lower limbs account for a large proportion of the skeletal muscle, claudication patients are an ideal model to research signaling pathways involved with the RIPC effect as well as the triggers of RIPC. RIPC research can lead to the development of therapeutics that could increase cellular resistance to ischemia in patients subjected to acute ischemia, such as trauma patients or major surgery patients.

Additional studies are needed to clarify the effects of RIPC and the mechanism of action through which tissues

that are not directly subjected to ischemia benefit upon subsequent ischemic insults.

RIPC increases the initial claudication distance in patients with intermittent claudication. However, RIPC does not affect the total walking distance of claudication patients.

ACKNOWLEDGMENTS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp); grant numbers: 2008/03203-1.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Saes GF and Zerati AE were responsible for the study concept and design, patient recruitment, data collection and manuscript writing. Wolosker N was responsible for the study concept and design, patient recruitment and writing of the manuscript. Ragazzo L was responsible for patient recruitment, data collection and final approval. Rosoky RM was responsible for the study concept and design, and manuscript writing. Ritti-Dias RM, Cucato GG and Chehuen M were responsible for cardiovascular screening and final approval. Farah B was responsible for statistical expertise and final approval. Puech-Leão P provided medical support during the study and approved the final version of the manuscript.

REFERENCES

- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.74.5.1124>.
- Przyklenk K, Bauer B, Ozive M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993;87(3):893-9. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.87.3.893>.
- Przyklenk K. Efficacy of cardioprotective 'conditioning' strategies in aging and diabetic cohorts: the co-morbidity conundrum. *Drugs Aging*. 2011;28(5):331-43. <http://dx.doi.org/10.2165/11587190-000000004-00000>.
- Przyklenk K, Darling CE, Dickson EW, Whittaker P. Cardioprotection 'outside the box'—the evolving paradigm of remote preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2003;98(3):149-57.
- Przyklenk K, Frelinger AL 3rd, Linden MD, Whittaker P, Li Y, Barnard MR, Adams J, Morgan M, Al-Shamma H, Michelson AD. Targeted inhibition of the serotonin 5HT_{2A} receptor improves coronary patency in an in vivo model of recurrent thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2010;8(2):331-40. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03693.x>.
- Przyklenk K, Heusch G. Late preconditioning against myocardial stunning. Does aspirin close the "second window" of endogenous cardioprotection? *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(7):1195-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00087-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00087-1).
- Przyklenk K, Li G, Simkhovich BZ, Kloner RA. Mechanisms of myocardial ischemic preconditioning are age related: PKC-epsilon does not play a requisite role in old rabbits. *J Appl Physiol*. 2003;95(6):2563-9.
- Przyklenk K, Li G, Whittaker P. No loss in the in vivo efficacy of ischemic preconditioning in middle-aged and old rabbits. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(6):1741-7. [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01603-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01603-5).
- Przyklenk K, Maynard M, Darling CE, Whittaker P. Pretreatment with D-myo-inositol trisphosphate reduces infarct size in rabbit hearts: role of inositol trisphosphate receptors and gap junctions in triggering protection. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;314(3):1386-92. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.105.087742>.
- Przyklenk K, Maynard M, Darling CE, Whittaker P. Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(14):1393-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2007.11.070>.
- Przyklenk K, Maynard M, Greiner DL, Whittaker P. Cardioprotection with postconditioning: loss of efficacy in murine models of type-2 and type-1 diabetes. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(5):781-90. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3343>.
- Przyklenk K, Maynard M, Whittaker P. First molecular evidence that inositol trisphosphate signaling contributes to infarct size reduction with preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(4):H2008-12. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00313.2006>.
- Przyklenk K, Maynard M, Whittaker P. Reduction of infarct size with D-myo-inositol trisphosphate: role of PI3-kinase and mitochondrial K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(2):H830-6.
- Przyklenk K, Undyala VV, Wider J, Sala-Mercado JA, Gottlieb RA, Mentzer RM Jr. Acute induction of autophagy as a novel strategy for cardioprotection: getting to the heart of the matter. *Autophagy*. 2011;7(4):432-3. <http://dx.doi.org/10.4161/aut.7.4.14395>.



15. Przyklenk K, Whittaker P. In vitro platelet responsiveness to adenosine-mediated "preconditioning" is age-dependent. *J Thromb Thrombolysis*. 2005;19(1):5-10.
16. Przyklenk K, Whittaker P. Cardioprotection with adenosine: 'a riddle wrapped in a mystery'. *Br J Pharmacol*. 2005;145(6):699-700.
17. Przyklenk K, Whittaker P. Adaptation of a photochemical method to initiate recurrent platelet-mediated thrombosis in small animals. *Lasers Med Sci*. 2007;22(1):42-5. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-006-0410-1>.
18. Przyklenk K, Whittaker P. Cardioprotection via adaptation to hypoxia: expanding the timeline and targets? *Basic Res Cardiol*. 2011;106(3):325-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-011-0169-9>.
19. Nakano A, Heusch G, Cohen MV, Downey JM. Preconditioning one myocardial region does not necessarily precondition the whole rabbit heart. *Basic Res Cardiol*. 2002;97(1):35-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s395-002-8385-3>.
20. McClanahan TB, Nao BS, Wolke LJ, Martin BJ, Mezt TE. Brief renal occlusion and reperfusion reduces myocardial infarct size in rabbits. *FASEB J*. 1993;7:A18.
21. Cho BC, Schoemaker RC, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation*. 1996;94(9):2193-200. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.94.9.2193>.
22. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, Kristiansen SB, Schmidt MR, Hoschitzky JA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation*. 2002;106(23):2881-3. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.000043806.51912.9B>.
23. Ateş E, Genç E, Erkasap N, Erkasap S, Akman S, Firat P, et al. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation*. 2002;74(9):1247-51. <http://dx.doi.org/10.1097/00007890-200211150-00009>.
24. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine. *Br J Surg*. 2005;92(9):1169-76.
25. Gurusamy KS, Gonzalez HD, Davidson BR. Current protective strategies in liver surgery. *World J Gastroenterol*. 2010;16(48):6098-6103.
26. Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury—a review. *J Surg Res*. 2008;150(2):304-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2007.12.747>.
27. Stewart KJ, Haatt WR, Regensteiner JG, Hirsch AT. Exercise training for claudication. *N Engl J Med*. 2002;347(24):1941-51.
28. Wolosker N, Nakano L, Rossky RA, Puech-Leao P. Evaluation of walking capacity over time in 500 patients with intermittent claudication who underwent clinical treatment. *Arch Intern Med*. 2003;163(19):2296-300. <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.163.19.2296>.
29. Dickson EW, Reinhardt CP, Renzi FP, Becker RC, Porcaro WA, Heard SO. Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence. *J Thromb Thrombolysis*. 1999; 8(2):123-9. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008911101951>.
30. 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(5):1641-6. <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.96.5.1641>.
31. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, Yabe T, Morikawa S, Inubushi T, 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(2):556-64. [http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(98\)00559-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(98)00559-2).
32. Patel HH, Moore J, Hsu AK, Gross GJ. Cardioprotection at a distance: mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(10):1317-23. <http://dx.doi.org/10.1006/jmcc.2002.2072>.
33. Harkin DW, Barros D'Sa AA, McCallion K, Hoper M, Campbell FC. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia-reperfusion protects against acute lung injury. *J Vasc Surg*. 2002;35(6):1264-73. <http://dx.doi.org/10.1067/mva.2002.121981>.
34. Lai IR, Chang KJ, Chen CF, Tsai HW. Transient limb ischemia induces remote preconditioning in liver among rats: the protective role of heme oxygenase-1. *Transplantation*. 2006;81(9):1311-7. <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000203555.14546.63>.
35. Addison PD, Neligan PC, Ashrafpour H, Khan A, Zhong A, Moses M, et al. Noninvasive remote ischemic preconditioning for global protection of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(4):H1435-43.
36. Loukogeorgakis SP, Panagiotidou AT, Broadhead MW, Donald A, Deanfield JE, MacAllister RJ. 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(3):450-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2005.04.044>.
37. Loukogeorgakis SP, Williams R, Panagiotidou AT, Kolvekar SK, Donald A, Cole TJ, et al. Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism. *Circulation*. 2007;116(12):1386-95. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.653782>.
38. Venugopal V, Hausenloy DJ, Ludman A, Di Salvo C, Kolvekar S, Yap J, et al. Remote ischaemic preconditioning reduces myocardial injury in patients undergoing cardiac surgery with cold-blood cardioplegia: a randomised controlled trial. *Heart*. 2009;95(19):1567-71. <http://dx.doi.org/10.1136/hrt.2008.155770>.
39. Thielmann M, Kottenberg E, Boengler K, Raffelsieper C, Neuhauser M, Peters J, et al. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial injury after coronary artery bypass surgery with crystalloid cardioplegic arrest. *Basic Res Cardiol*. 2010;105(5):657-64. <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-010-0104-5>.
40. Gurusamy KS, Kumar Y, Pamecha V, Sharma D, Davidson BR. Ischaemic pre-conditioning for elective liver resections performed under vascular occlusion. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(1):CD007629.
41. Eng J. Sample size estimation: how many individuals should be studied? *Radiology*. 2003;227(2):309-13. <http://dx.doi.org/10.1148/radiol.2272012051>.