

Efeitos do pós-condicionamento isquêmico na função ventricular esquerda de corações isolados de ratos

Effects of ischemic postconditioning on left ventricular function of isolated rat hearts

Bruno Botelho PINHEIRO¹, Alfredo Inácio FIORELLI², Otoni Moreira GOMES³

RBCCV 44205-1048

Resumo

Objetivo: Avaliar os efeitos do pós-condicionamento isquêmico na função ventricular esquerda de corações isolados de ratos.

Métodos: Corações isolados de 24 ratos Wistar foram submetidos a perfusão pelo método de Langendorff modificado e distribuídos em três grupos: Grupo I - controle (n=8); Grupo II - três ciclos de pós-condicionamento de 10/10s (n=8); Grupo III - três ciclos de pós-condicionamento de 30/30s (n=8). Após estabilização de 15min, os corações foram submetidos a 20min de isquemia e subsequentes 20min de reperfusão. A frequência cardíaca (FC), o fluxo coronariano (FCo), a pressão sistólica (PS), a contratilidade (+dP/dt max) e a velocidade de relaxamento (-dP/dt max) miocárdico foram medidas nos tempos 0 (pré-isquemia) e 5, 10, 15 e 20min de reperfusão. Utilizado método estatístico ANOVA com Teste de Tukey para diferenças entre grupos, com significância menor que 0,05 ($P < 0,05$).

Resultados: A FC, em bpm, reduziu em todos os grupos após 20min de reperfusão, sem diferença estatística (GI 232,5 ± 36,8; GII 241,8 ± 46,7; GIII 249,4 ± 40,4; $P > 0,05$). O mesmo ocorreu com a PS, em mmHg, (GI 132,6 ± 49,3; GII 140,8 ± 43,1; GIII 112,6 ± 33,2; $P > 0,05$), FCo, em ml/min, (GI 18,5 ± 4,6; GII 21,4 ± 4,4; GIII 22,1 ± 9,0; $P > 0,05$) e -dP/dt max, em mmHg/s, (GI 1490,6 ± 512,0; GII 1770,4 ± 406,6; GIII 1399,1 ± 327,4, $P > 0,05$). A +dP/dt max, em mmHg/s, reduziu significativamente exceto no Grupo II (GI 1409,0 ± 415,2; GII 1917,3 ± 403,1; GIII 1344,8 ± 355,8), (GII vs. GI, $P = 0,04$) e (GII vs. GIII, $P = 0,02$).

Conclusão: O pós-condicionamento isquêmico com três ciclos de 10/10s de reperfusão/isquemia foi capaz de preservar a contratilidade miocárdica em corações isolados de ratos após 20min de isquemia.

Descritores: Isquemia miocárdica. Reperfusão miocárdica. Parada cardíaca induzida. Fisiologia cardiovascular.

Abstract

Objective: To assess the effects of ischemic postconditioning on left ventricular function in isolated rat hearts.

Methods: Twenty-four Wistar rats were used. These hearts underwent perfusion by modified LANGERDORFF method and distributed into three groups: GI - control (n=8); GII - three cycles of postconditioning of 10/10s (n=8); GIII - three cycles of postconditioning of 30/30s (n=8). After a 15min stabilization period, all hearts underwent 20min of global ischemia following 20min of reperfusion. In the times 0 (control), 5, 10, 15 and 20min of reperfusion, the heart rate (HR), the coronary flow (CoF), the systolic pressure, the (+dP/dt max) contractility and (-dP/dt max) velocity of relaxation were measured. Data were analyzed by ANOVA method followed by Tukey's test for differences between groups and $P < 0.05$ was considered significant.

Results: The HR (bpm) decreased in all groups after 20min of reperfusion without statistical differences among them (GI 232.5±36.8; GII 241.8±46.7; GIII 249.4±40.4; $P > 0.05$). The

1. Membro Titular da SBCCV; Responsável pelo Serviço de Cirurgia Cardiovascular da Equipe Clinicord - Goiânia/GO.
2. Professor Doutor Colaborador do Departamento de Cardiopneumologia da FMUSP; Coordenador da Equipe de Transplante do INCOR-HC-FMUSP.
3. Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFMG; Professor Doutor Orientador de Pós-Graduação em Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular FCSFA/ServCor.

Trabalho realizado na Fundação Cardiovascular São Francisco de Assis - Hospital ServCor - Belo Horizonte, MG, Brasil.

Endereço para correspondência: Bruno Botelho Pinheiro
Al. Dom Emanuel Gomes, 47 - Setor Marista - Goiânia, GO, Brasil -
CEP: 74175-040. Tel/Fax: (62) 3541-6756.
E-mail: bruno.pinheiro@sbccv.org.br

Artigo recebido em 4 de julho de 2008
Artigo aprovado em 15 de dezembro de 2008

same occurred with the systolic pressure (mmHg) (GI 132.6+49.3; GII 140.8+43.1; GIII 112.6+33.2; $P>0.05$), coronary blood flow (GI 18.5+4.6; GII 21.4+4.4; GIII 22.1+9.0; $P>0.05$) and $-dP/dt$ max (mmHg) (GI 1490.6+512.0; GII 1770.4+406.6; GIII 1399.1+327.4; $P>0.05$). The $+dP/dt$ max (mmHg) decreased significantly in all groups except in group II (GI 1409.0+415.2, GII 1917.3+403.1, GIII 1344.8+355.8) (GII vs GI, $P=0.04$; GII vs GIII, $P=0.02$).

Conclusion: The ischemic postconditioning by three cycles of reperfusion/ischemia of 10/10s demonstrated to be effective for preservation of the myocardial contractility in isolated rat hearts which had undergone 20min of ischemia.

Descriptors: Myocardial ischemia. Myocardial reperfusion. Heart arrest, induced. Cardiovascular physiology.

INTRODUÇÃO

No infarto agudo do miocárdio, o restabelecimento do fluxo coronariano, seja pela trombólise ou angioplastia primária, é essencial para preservar o miocárdio viável. O tamanho da área de infarto é fator determinante da extensão do remodelamento ventricular e prognóstico dos pacientes [1,2]. A reperfusão precoce é o tratamento definitivo para reduzir a área de infarto, a disfunção contrátil do ventrículo esquerdo e a apoptose. Entretanto, a reperfusão carrega *per se* o risco potencial de exacerbar a injúria tecidual presente no final da isquemia - fenômeno conhecido como lesão de reperfusão [3,4].

Em 2003, um fenômeno denominado pós-condicionamento isquêmico foi descrito por Zhao et al. [5]. Tratava-se de breves e repetidos episódios de reperfusão e isquemia imediatamente após um período de isquemia sustentada, produzindo menor injúria miocárdica. Em seu estudo inicial, utilizando coração de cães *in situ*, os autores realizaram a ligadura da artéria interventricular anterior por 60 minutos (min), seguida de 3 horas (h) de reperfusão (controle). Três ciclos de reperfusão e isquemia, ambas com igual duração de 30 segundos (s), imediatamente antes da reperfusão de 3h, foram empregados no grupo de pós-condicionamento, resultando numa redução de 44% da área com infarto em relação ao grupo controle [5].

As características temporais do pós-condicionamento são de extrema importância. No coração isolado de rato, o algoritmo de reperfusão e isquemia, ambas com igual duração de 30s, não diminui a área com infarto [6,7]. Não foi encontrada na literatura indexada (Medline/Pubmed) avaliação funcional de coração isolado de ratos submetidos a algoritmos diferentes de pós-condicionamento isquêmico.

O objetivo da presente investigação foi avaliar os efeitos do pós-condicionamento isquêmico na função ventricular esquerda de corações isolados de ratos, submetidos a dois algoritmos temporais diferentes de reperfusão e isquemia.

MÉTODOS

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética da Fundação Cardiovascular São Francisco de Assis Hospital,

sendo os animais tratados conforme os princípios éticos na Experimentação Animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) [8].

Foram utilizados corações isolados de 24 ratos albinos da raça Wistar, sem distinção de sexo, com peso variando entre 280g e 315g, média de $296,5 \pm 4,3g$. Após anestesia inalatória com éter etílico, administração de 500UI de heparina sistêmica e toracotomia, seus corações foram isolados e imediatamente colocados em perfusão com solução de Krebs-Henseleit [9], equilibrada com 95% de O_2 e 5% de CO_2 , e mantida em condições controladas de temperatura e pressão de perfusão, em equipamento descartável [10] (Modelo Comex Ind. & Com. Ltda - MG) baseado no utilizado pioneiramente por Langendorff [11]. Os registros pressóricos e da frequência cardíaca foram processados por biomonitor (BESE/ Bioengenharia Ltda.- MG, Modelo DH 073) e impressos para análise e estudo comparativo em impressora matricial (Epson LQ- 1070). O fluxo coronariano foi aferido pelo volume minuto efluente das cavidades cardíacas e recolhido em frasco de vidro graduado.

Os corações foram distribuídos em três grupos: GI - Controle (n=8) - isquemia por 20 min, feita pela interrupção da perfusão coronariana, e reperfusão por 20 min; GII - pós-condicionamento 10/10s (n=8) - isquemia por 20min, seguida de três ciclos de reperfusão e isquemia, ambas com igual duração de 10s, e reperfusão por 20min; GIII - pós-condicionamento 30/30s (n=8) - isquemia por 20min, seguida de três ciclos de reperfusão e isquemia, ambas com igual duração de 30s, e reperfusão por 20min (Figura 1).

Depois de instalados na câmara de perfusão e antes de qualquer outro procedimento, todos os corações foram mantidos por 15min para que suas funções se estabilizassem. Todos os corações sofreram inicialmente o mesmo tempo de 20min de isquemia antes da reperfusão. Para fins de análise das variáveis estudadas, considerou-se o tempo controle (t_0) como aquele imediatamente antes do período de isquemia. Após o período de isquemia, as variáveis foram registradas com 5min (t_5), 10min (t_{10}), 15min (t_{15}) e 20min (t_{20}) de reperfusão, respectivamente.

Registrou-se a frequência cardíaca (FC), o fluxo coronariano (FCo), as pressões sistólica (PS) e diastólica

(PD). A pressão diastólica foi ajustada e mantida em 5 ± 2 mmHg, exceto durante os períodos de isquemia induzida, quando foi mantida em zero. Os efeitos sobre a contratilidade miocárdica e relaxamento do ventrículo esquerdo foram mensurados calculando-se a primeira derivada temporal positiva ($+dP/dt_{max}$) [12] e negativa ($-dP/dt_{max}$) [13] da pressão ventricular esquerda, a partir de medidas obtidas nas curvas de pressão ventricular, segundo descrição do método feita por Gottschall [14].

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, subsequentemente, à análise paramétrica pelo método da ANOVA unidirecional combinada com o Teste de Tukey. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão e considerados ao nível de significância menor que 5% ($P < 0,05$). Utilizou-se o programa de cálculos estatísticos StatsDirect versão 2.6.5.

RESULTADOS

Os corações pesaram entre 1,1g e 1,6g, com média de $1,3 \pm 0,02$ g. Não foram observadas diferenças significantes entre os pesos dos corações nos diferentes grupos ($P=0,68$).

A FC reduziu em todos os grupos após 20min de reperfusão, sem diferença estatística entre eles (GI $232,5 \pm 36,8$; GII $241,8 \pm 46,7$; GIII $249,4 \pm 40,4$; $P>0,05$) (Tabela 1). O mesmo ocorreu com o FCo (GI $18,5 \pm 4,6$; GII $21,4 \pm 4,4$; GIII $22,1 \pm 9,0$; $P>0,05$), com a PS (GI $132,6 \pm 49,3$; GII $140,8 \pm 43,1$; GIII $112,6 \pm 33,2$; $P>0,05$), e com a $-dP/dt_{max}$ (GI $1490,6 \pm 512,0$; GII $1770,4 \pm 406,6$; GIII $1399,1 \pm 327,4$, $P>0,05$) (Tabelas 2, 3 e 4).

A contratilidade miocárdica reduziu progressivamente no GI até 20min de reperfusão ($t_0 = 1947,9 \pm 311,3$; $t_5 = 1659,8 \pm 421,3$; $t_{10} = 1599,5 \pm 447,1$; $t_{15} = 1526 \pm 424,9$; $t_{20} = 1409 \pm 415,2$). No grupo de pós-condicionamento 10/10s (GII), houve queda da $+dP/dt_{max}$ até t_5 e posterior recuperação ($t_0 = 1994,1 \pm 460,7$; $t_5 = 1606,5 \pm 310,8$; $t_{10} = 1780,1 \pm 401,9$; $t_{15} = 1815,4 \pm 521,5$; $t_{20} = 1917,3 \pm 403,1$). No GIII, a redução

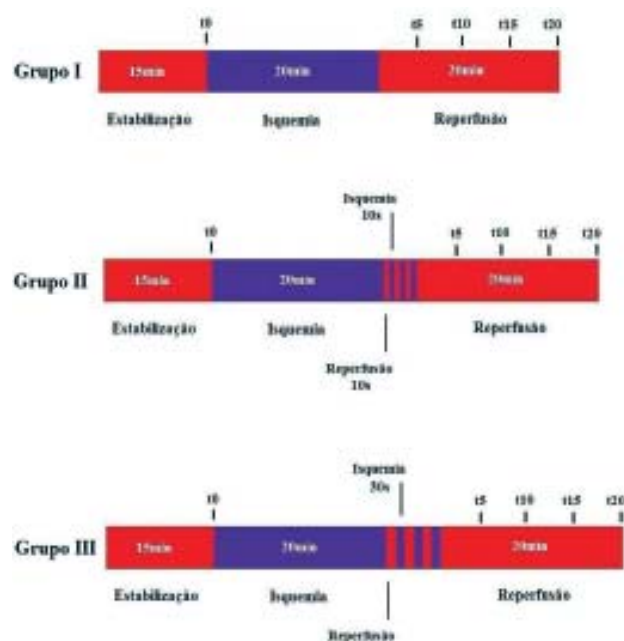


Fig. 1 - Algoritmo dos diferentes grupos estudados. I, grupo controle; II, pós-condicionamento 10/10s; III, pós-condicionamento 30/30s. t_0 , tempo imediatamente antes do período de isquemia; t_5 , t_{10} , t_{15} , t_{20} , correspondendo a 5min, 10min, 15min e 20min de reperfusão, respectivamente

da $+dP/dt_{max}$ ocorreu em t_5 com manutenção estável do prejuízo até t_{20} ($t_0 = 1673,6 \pm 250$; $t_5 = 1439,1 \pm 395,8$; $t_{10} = 1521,9 \pm 435,5$; $t_{15} = 1492,1 \pm 437,6$; $t_{20} = 1344,8 \pm 355,8$). Na comparação entre os grupos, as variações observadas na contratilidade miocárdica apresentaram diferenças significativas no tempo t_{20} (GI $1409,0 \pm 415,2$; GII $1917,3 \pm 403,1$; GIII $1344,8 \pm 355,8$) (GII vs. GI, $P=0,04$; GII vs GIII, $P=0,02$), evidenciando recuperação contrátil no grupo de pós-condicionamento 10/10s (Tabela 5 e Figura 2).

Tabela 1. Variação média da frequência cardíaca (bpm) nos Grupos I, II e III

Grupos	Períodos de estudo				
	t_0	t_5	t_{10}	t_{15}	t_{20}
I	259,0 \pm 47,0	273,0 \pm 61,6	261,9 \pm 43,0	244,8 \pm 39,6	232,5 \pm 36,8
II	243,4 \pm 32,9	255,3 \pm 45,3	245,0 \pm 38,7	246,5 \pm 35,3	241,8 \pm 46,7
III	263,3 \pm 44,5	265,9 \pm 33,0	258,1 \pm 39,4	255,1 \pm 44,5	249,4 \pm 40,4

Grupo I - Grupo com isquemia (grupo controle); Grupo II - Grupo pós-condicionamento 10/10s; Grupo III - Grupo pós-condicionamento 30/30s; t_0 - Tempo imediatamente antes do período de isquemia e t_5 , t_{10} , t_{15} e t_{20} correspondem a 5, 10, 15 e 20 minutos de reperfusão, respectivamente; bpm - batimentos por minuto; P = não significante entre os grupos.

Tabela 2. Variação média do fluxo coronariano (ml/min) nos Grupos I, II e III

Grupos	Períodos de estudo				
	t ₀	t ₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₂₀
I	20,9±3,5	20,6±3,4	20,9±3,5	18,9±3,9	18,5±4,6
II	22,4±3,5	23,3±3,8	23,1±4,3	20,5±3,5	21,4±4,4
II	23,5±8,1	23,1±7,5	22,6±8,4	21,8±8,6	22,1±9,0

Grupo I - Grupo com isquemia (grupo controle); Grupo II - Grupo pós-condicionamento 10/10s; Grupo III - Grupo pós-condicionamento 30/30s; t₀ - Tempo imediatamente antes do período de isquemia e t₅, t₁₀, t₁₅, e t₂₀ correspondem a 5, 10, 15 e 20 minutos de reperfusão, respectivamente; ml/min, mililitros por minuto; P = não significante entre os grupos.

Tabela 3. Variação da média da pressão sistólica (mm Hg) nos Grupos I, II e III

Grupos	Períodos de estudo				
	t ₀	t ₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₂₀
I	142,9±37,8	131,6±43,6	133,8±48,8	136,1±50,4	132,6±49,3
II	147,0±37,8	127,6±32,5	134,4±37,1	139,1±45,2	140,8±43,1
II	123,3±18,6	111,3±24,4	117,5±29,5	120,0±36,4	112,6±33,2

Grupo I - Grupo com isquemia (grupo controle); Grupo II - Grupo pós-condicionamento 10/10s; Grupo III - Grupo pós-condicionamento 30/30s; t₀ - Tempo imediatamente antes do período de isquemia e t₅, t₁₀, t₁₅, e t₂₀ correspondem a 5, 10, 15 e 20 minutos de reperfusão, respectivamente; mm Hg - milímetros de mercúrio; P - Não significante entre os grupos

Tabela 4. Variação da média da -dP/dt max (mm Hg/s) nos Grupos I, II e III

Grupos	Períodos de estudo				
	t ₀	t ₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₂₀
I	1745,3±354,0	1605,1±437,2	1611,3±518,3	1631,4±574,5	1490,6±512,0
II	1805,5±401,4	1586,8±309,8	1683,9±312,0	1775,8±434,5	1770,4±406,6
II	1620,4±251,0	1404,9±373,0	1516,1±359,0	1488,9±363,3	1399,1±327,4

Grupo I - Grupo com isquemia (grupo controle); Grupo II - Grupo pós-condicionamento 10/10s; Grupo III - Grupo pós-condicionamento 30/30s; t₀ - Tempo imediatamente antes do período de isquemia e t₅, t₁₀, t₁₅, e t₂₀ correspondem a 5, 10, 15 e 20 minutos de reperfusão, respectivamente; mm Hg/s - milímetros de mercúrio por segundo; P - Não significante entre os grupos; -dP/dt max - primeira derivada temporal negativa

Tabela 5. Variação da média da +dP/dt max (mm Hg/s) nos Grupos I, II e III

Grupos	Períodos de estudo				
	t ₀	t ₅	t ₁₀	t ₁₅	t ₂₀
I	1947,9±311,3	1659,8±421,3	1599,5±447,1	1526,0±424,9	1409,0±415,2
II	1994,1±460,7	1606,5±310,8	1780,1±401,9	1815,4±521,5	1917,3±403,1* ⁸
II	1673,6±250,0	1439,1±395,8	1521,9±435,5	1492,1±437,6	1344,8±355,8

Grupo I - grupo com isquemia (grupo controle); Grupo II - grupo pós-condicionamento 10/10s; Grupo III - grupo pós-condicionamento 30/30s; t₀ - tempo imediatamente antes do período de isquemia e t₅, t₁₀, t₁₅, t₂₀ correspondem a 5, 10, 15 e 20min de reperfusão, respectivamente; mmHg/s - milímetros de mercúrio por segundo; * P = 0,02 GII em relação a GIII; P = 0,04 GII em relação a GI.; +dP/dt Max - primeira derivada temporal positiva

capaz de preservar a função contrátil no coração isolado de ratos submetidos a 20 min de isquemia e subseqüentes 20 min de reperfusão.

REFERÊNCIAS

1. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1991;260(5 Pt 2):H1406-14.
2. St John Sutton M, Pfeffer MA, Moye L, Plappert T, Rouleau JL, Lamas G, et al. Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: baseline predictors and impact of long-term use of captopril: information from the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) trial. *Circulation*. 1997;96(10):3294-9.
3. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68-78.
4. Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest*. 1985;76(5):1713-9.
5. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(2):H579-88.
6. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F. Postconditioning: a new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2005;100(4):295-310.
7. Tsang A, Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial postconditioning: reperfusion injury revisited. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(1):H2-7.
8. Princípios Éticos na Experimentação Animal. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA.
9. Krebs HA, Henseleit K. Untersuchungen über die harnstoffbildung im tierkörper. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1932;210:33-66. Apud in: Doring HJ, Dehnert H. *Methods in experimental physiology and pharmacology*. Reprint of the IST. English Edition, 1987.
10. Gomes OM, Gomes ES, Neves HJ, Guimarães MAC, Pitchon M. Modificação da técnica de Langendorff para estudo de coração isolado com utilização de sistema descartável. VIII Congresso da Sociedade Mineira de Cardiologia, Belo Horizonte, 3 a 5 de Julho de 1997.
11. Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden sangerthierherzen. *Arch Ges Physiol*. 1985;61:291. Apud in: Doring HJ, Dehnert H. *Methods in experimental physiology and pharmacology*. Reprint of the IST. English Edition, 1987.
12. Gleason WL, Braunwald E. Studies on the first derivative of the ventricular pressure pulse in man. *J Clin Invest*. 1962;41:80-91.
13. Weisfeldt ML, Scully HE, Frederiksen J, Rubenstein JJ, Pohost GM, Beierholm E, et al. Hemodynamic determinants of maximum negative dP-dt and periods of diastole. *Am J Physiol*. 1974;227(3):613-21.
14. Gottschall C. Determinantes do desempenho cardíaco. In: Gottschall C, editor. *Função cardíaca: da normalidade à insuficiência*. São Paulo:Fundo Editorial BYK;1995. p.61-72.
15. Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, Valen G, Vaage J. Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004;25(6):1006-10.
16. Hori M, Kitakaze M, Sato H, Takashima S, Iwakura K, Inoue M, et al. Staged reperfusion attenuates myocardial stunning in dogs. Role of transient acidosis during early reperfusion. *Circulation*. 1991;84(5):2135-45.
17. Bopassa JC, Michel P, Gateau-Roesch O, Ovize M, Ferrera R. Low-pressure reperfusion alters mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(6):H2750-5.
18. Buckberg GD. When is cardiac muscle damaged irreversibly? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1986;92(3 Pt 2):483-7.
19. Acar C, Partington MT, Buckberg GD. Studies of controlled reperfusion after ischemia. XVIII. Reperfusion conditions: attenuation of the regional ischemic effect by temporary total vented bypass before controlled reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1990;100(5):737-44.
20. Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J. Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1986;92(3 Pt 2):613-20.
21. Peng CF, Murphy ML, Colwell K, Straub KD. Controlled versus hyperemic flow during reperfusion of jeopardized ischemic myocardium. *Am Heart J*. 1989;117(3):515-22.
22. Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(5):1103-10.

23. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2004;62(1):74-85.
24. Yang XM, Philipp S, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol.* 2005;100(1):57-63.
25. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res.* 2004;95(3):230-2.
26. Heusch G, Büchert A, Feldhaus S, Schulz R. No loss of cardioprotection by postconditioning in connexin 43-deficient mice. *Basic Res Cardiol.* 2006;101(4):354-6.
27. Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, Wang NP, Kin H, Payne CS, et al. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg.* 2004;78(3):961-9.