

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CARDIOLOGIA E
CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

**EFEITO DA TERAPIA DIURÉTICA NA CAPACIDADE DE
EXERCÍCIO EM PACIENTES COM ANGINA ESTÁVEL E FUNÇÃO
VENTRICULAR ESQUERDA PRESERVADA**

Helius Carlos Finimundi

Orientador: Dr. Paulo Ricardo Avancini Caramori

Co-Orientador: Dr. John D. Parker

Dissertação de Mestrado apresentada no programa de Pós-
Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, maio de 2004

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida:

A minha esposa Maria Regina pelo estímulo e por estar sempre ao meu lado apoiando nas horas mais difíceis.

Aos meus filhos Bruno e Vitor por compreenderem e saberem dividir o precioso tempo.

Aos meus pais Carlos e Elide por tudo que me ensinaram.

Aos meus sogros Norberto (in memoriam) e Íris pelo exemplo de vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço ao Dr. Paulo Caramori, meu orientador e amigo pelo apoio e dedicação, pela ajuda fundamental na realização desse trabalho e, principalmente por mostrar que a medicina e ciência são inseparáveis.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. John D. Parker, chefe do Serviço de Cardiologia e professor da Universidade de Toronto, Canadá, por aceitar ser co-orientador, prestando inestimável colaboração para realização deste trabalho.

Ao Dr. Jeferson Wollmeister médico cardiologista, ex-residente do Serviço de Cardiologia do HCPA–UFRGS, pela importante participação na análise e interpretação dos testes ergométricos.

Ao Dr. Mario Wagner pelo apoio e ajuda fundamental na interpretação das análises estatísticas do estudo.

A Enf. Melissa Hemesath pela ajuda na elaboração do banco de dados.

A Procor Nordeste por ceder seu laboratório de cardiologia não invasiva para a realização das ecocardiografias e ergometrias.

A Bellafarma responsável pelo preparo das medicações fornecida aos pacientes do estudo.

SUMÁRIO

1. Artigo de Revisão	07
2. Artigo em Português	28
Resumo	29
Introdução	31
Métodos	32
Resultados	35
Discussão	37
Tabelas	41
Referências	45
3. Artigo em Inglês	48
Abstract	49
Introduction	51
Methods	52
Results	55
Discussion	56
Tables	60
References	64

ARTIGO DE REVISÃO

Proteção Miocárdica na Isquemia e Reperusão - Papel da Inibição da Glicoproteína Trocadora de Sódio/Hidrogênio na Lesão de Reperusão

Helius C. Finimundi ¹, Paulo R. A. Caramori ², Waldomiro C. Manfroi ³

¹ Mestrando do Programa de Pós Graduação em Cardiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

² Professor do curso de Pós Graduação em Cardiologia da UFRGS, Doutor em Cardiologia Universidade de Toronto/UFRGS

³ Professor Titular de Cardiologia e Professor do Curso de Pós Graduação em Cardiologia da UFRGS, Doutor em Cardiologia.

Endereço para correspondência:

Dr. Paulo Caramori

Curso de Pós Graduação em Cardiologia.

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, sala 2060.

Porto Alegre, RS.

e-mail: Caramori.p@plugin.com.br

Resumo

As alternativas terapêuticas, atualmente oferecidas para o tratamento da cardiopatia isquêmica, concentram-se na abordagem das propriedades da vasculatura coronariana e seus elementos circulatórios. Dentre essas, incluem-se drogas que inibem o desenvolvimento da aterosclerose, estabilizam as lesões pré-existentes, drogas que reduzem a trombose intracoronária, diminuem o consumo de oxigênio pelo miocárdio e intervenções que restabelecem o fluxo coronariano. No entanto, esse arsenal terapêutico se torna deficiente, em relação aos agentes cardioprotetores diretos, que têm como alvo o metabolismo das células miocárdicas. Novas terapias têm sido propostas, para diminuir a repercussão celular da isquemia, protegendo as células miocárdica das conseqüências prejudiciais do fenômeno da reperfusão, ou lesão de reperfusão, desencadeada principalmente pela ativação da glicoproteína trocadora de Na^+/H^+ (NHE). Essa glicoproteína tem como principal função manter a estabilidade do pH das células miocárdicas durante a isquemia, podendo de forma paradoxal precipitar necrose celular durante a reperfusão, através do acúmulo de cálcio intracelular. Dos agentes cardioprotetores com capacidade de inibir a NHE, a amilorida foi a primeira droga que mostrou essa propriedade. Recentemente, outras mais potentes surgiram, como cariporide, eniporide e zoniporide, atualmente sendo avaliadas através de ensaios clínicos.

Nesta revisão, analisaremos os mecanismos envolvidos na lesão de reperfusão a nível celular e a participação da inibição NHE na proteção

miocárdica. Também, revisaremos os principais estudos clínicos envolvendo os inibidores da NHE-1 e sua aplicabilidade potencial.

Unitermos Inibição Na^+H^+ e Isquemia, Lesão de Reperfusão, Proteção Miocárdica na Reperfusão.

Introdução

A isquemia miocárdica é decorrente da privação de oxigênio a nível celular, acompanhada por uma remoção inadequada dos metabólitos conseqüente à redução da perfusão. Durante a isquemia ocorre um desequilíbrio entre oferta e demanda de oxigênio, sendo variadas as suas manifestações clínicas.¹

As repercussões que ocorrem a nível celular permitem caracterizar variados e complexos mecanismos de respostas, originando fenômenos conhecidos como atordoamento (*stunning*), hibernação e condicionamento isquêmico.

Miocárdio atordoado foi primeiramente descrito por Hendricks em 1975, para caracterizar uma forma prolongada de disfunção mecânica do miocárdio, que ocorre após o alívio de um episódio de isquemia. Essa disfunção persiste apesar da ausência de dano celular irreversível e do retorno da perfusão tissular normal ou próxima do normal.²

O termo miocárdio hibernado, foi descrito por Rahimtoola em 1982, uma forma prolongada de disfunção contrátil do miocárdio, associada ao baixo fluxo coronariano. Embora controvérsia ainda exista, se o fluxo é primariamente lento ou se as reservas coronarianas estão reduzidas como resultado de repetitivos períodos de “atordoamento”. Com o restabelecimento do fluxo coronariano, ocorre uma melhora rápida da função contrátil ventricular, tendo-se a hipótese de que o miocárdio se adapta à reduzida perfusão e à isquemia crônica, diminuindo a contratilidade, economizando sua demanda energética e preservando a viabilidade celular.^{3,4}

O pré-condicionamento isquêmico, descrito por Murry em 1986, vincula a um mecanismo cardioprotetor, onde o coração, quando exposto a curtos e controlados episódios de isquemia-reperfusão subletal, de alguma forma se protege atenuando dano celular causado por prolongados e repetitivos episódios de isquemia.^{5,6}

Em 1985, Landunski descreveu a hipótese da participação NHE nos mecanismos que contribuem para o dano miocárdico e sua disfunção durante condições de isquemia e reperfusão despertando a seguir grande interesse científico.⁷

Em 1988, Karmazyn descreveu a primeira evidência farmacológica do papel da inibição da NHE na proteção miocárdica.⁸ Desde então, grande esforço se concentra, na tentativa de entender os mecanismos responsáveis por esses fenômenos adaptativos. Melhor domínio desse campo contribuirá para o desenvolvimento de novos avanços terapêuticos, quando usados em combinação com a reperfusão, determinando maior salvamento e recuperação funcional do miocárdico isquêmico. Inicialmente, o interesse foi focado no papel das trocas metabólicas, respostas inflamatórias, estresse oxidativo e perturbações iônicas.⁹ Recentemente atenção voltou-se à poderosa resposta adaptativa do miocárdio quando ocasionada por isquemia e pré-condicionamento farmacológico. Apesar de todo esforço das investigações, até o momento nenhuma terapia tem sido proposta clinicamente como fator de cardioproteção do fenômeno isquemia/reperfusão miocárdica.

Fisiologia da NHE

Os componentes conhecidos como NHE, são glicoproteínas localizadas nas membranas celulares e nas mitocôndrias, funcionam através de um sistema eletro-neutro de co-transporte, cuja propriedade é manter a regulação do pH intracelular. A NHE exerce um papel principal na regulação do pH intracelular, removendo prótons intracelulares, no processo de isquemia e também durante condições basais.¹⁰ Até o momento foram identificados sete diferentes subtipos, produtos de genes distintos. NHE-1 a NHE-5 correspondem às proteínas localizadas nas membranas plasmáticas das células dos mamíferos, distribuídas em vários órgãos. NHE-6 e NH-7 estão expressas nas membranas intracelulares. NHE-6 tem o papel de regular o pH intramitocondrial, sendo o mais importante modulador do cálcio nas mitocôndrias, principalmente em condições patológicas.¹⁰ Isoforma NHE-1 é a mais abundante, encontrada em todas as células dos mamíferos, principalmente no músculo cardíaco. Localizada no sarcolema e no sistema tubular transversal dos cardiomiócitos, tanto atrial quanto ventricular, é a responsável direta da regulação do pH intracelular e do volume celular através da troca do íon hidrogênio intracelular por sódio do extracelular na proporção de 1:1. Sua ação é mediada por um mecanismo de transporte passivo mediante gradiente iônico sem consumo energético metabólico. As isoformas NHE-2 a NHE-5 apresentam pouca expressão.¹¹

Fisiopatologia da lesão de reperfusão

A necrose celular envolve muitos mecanismos, incluindo trocas metabólicas, desvios iônicos, ativação do complemento com formação de

substâncias citotóxicas, inflamação, edema tecidual, apoptose e degeneração matricial.¹¹ Alguns desses fenômenos são representados a seguir.

Sem isquemia: Em condições basais, o pH intracelular estabiliza em torno de 7,2. A bomba Na^+/K^+ ATPase utiliza ATP para retirar o sódio intracelular na troca de 3 íons Na^+ para 2 K^+ , contra-gradiente consumindo energia. A trocadora de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (NCX) funciona de forma bidirecional, favorecendo a saída do cálcio intracelular e a entrada do sódio provindo do interstício na proporção de um cálcio para três íons sódio sem consumo energético.^{12,13} (Figura 1)

Nessa situação, a NHE permanece relativamente inativa, o pH intracelular mantém-se estável devido a homeostase iônica, equilibrando o gradiente transmembrana favorecendo o potencial de ação e o mecanismo de contração muscular.

Durante isquemia: Em situações isquêmicas, há uma diminuição do aporte de oxigênio ao nível celular. As células passam a apresentar metabolismo anaeróbico, ocorre um acúmulo intracelular de prótons (H^+), gerados pela produção de lactato e pela degradação do ATP,¹⁴ levando a acidose intracelular, o pH baixa para aproximadamente 6,4. A acidose isquêmica induzida representa o maior estímulo para ativação da NHE-1. Outras vias metabólicas também ativam a NHE-1, como endotelina-1, angiotensina II, agonista adrenérgicos alfa 1, trombina e fatores de crescimento.^{15,16,17} Metabólitos oriundos da cardiotoxicidade isquêmica intracelular, como o peróxido de hidrogênio e a lisofosfatidilcolina, via proteína quinase C igualmente estimulam a NHE-1.^{18,19}

Uma vez ativada, NHE passa a trocar os íons H^+ intracelulares por íons Na^+ do extra na relação de 1:1 através de processo eletroneutro. Como consequência,

um excessivo aumento da concentração de sódio intracelular ocorre, comprometendo a atividade da bomba Na^+/K^+ ATPase, invertendo a NCX e assim proporcionando um influxo excessivo de cálcio, trocado pelo sódio. Como mecanismo de proteção contra o acúmulo progressivo de cálcio intracelular, a manutenção da condição isquêmica, tende a baixar o pH extracelular, desativando a NHE. (Figura 2)

Quando restabelecemos o equilíbrio entre oferta e demanda de oxigênio na área isquêmica de forma abrupta, o pH extracelular aumenta rapidamente em virtude da lavagem (*wash-out*) do extracelular, removendo os íon H^+ . Dessa forma, a NHE não se desativa, permitindo um influxo contínuo de sódio e como resultado cálcio (sobrecarga de cálcio), alterando a homeostase iônica. A sobrecarga de cálcio, através de uma ação direta, ativa várias proteases, causando contração celular, ruptura de membrana celular e das mitocôndrias levando a apoptose celular e arritmias graves, acelerando a morte celular. Esse fenômeno é chamado de “paradoxo do pH ou paradoxo de cálcio” por estabelecer a lesão de reperfusão.²⁰

Inibidores da NHE durante isquemia: A inibição da NHE oferece um efeito cardioprotetor celular inicial durante a isquemia e reperfusão, não permitindo um excessivo acúmulo de íons sódio e cálcio intracelular, a despeito do acúmulo de prótons. (Figura 3)

Implicações Clínicas

Após a descrição inicial de Karmazyn de que o amiloride inibe a NHE-1,⁸ outras drogas foram desenvolvidas, incluindo algumas altamente específicas como o cariporide, eniporide e zoniporide.^{21,22,23} O interesse clínico nessa nova classe de agentes baseia-se na proteção miocárdica, na menor suscetibilidade as arritmias, na diminuição da disfunção contrátil ventricular e na limitação da necrose tecidual, durante a isquemia miocárdica e na reperfusão.²¹ Outros efeitos foram recentemente atribuídos aos inibidores da NHE, assim como diminuição da ativação plaquetária, menor deposição de neutrófilos, atenuação do processo de remodelação ventricular e da insuficiência cardíaca pós-infarto, independente do tamanho da área de necrose.²⁴ O sucesso do uso dos inibidores da NHE em modelos experimentais levou ao surgimento de ensaios clínicos, em pacientes de alto risco com doença arterial coronariana, bem como na vigência do infarto agudo do miocárdio.²⁴

Estudos clínicos com inibidores da NHE-1

Quatro grandes estudos clínicos delineados para testar a eficácia dos inibidores NHE-1 foram concluídos, sendo que, outros estão em andamento. Foram testados os efeitos do cariporide em três estudos e do eniporide em outro.¹¹

Rupprecht et al em estudo desenvolvido na Alemanha, avaliou o efeito do cariporide em pacientes com infarto do miocárdio em parede anterior, com indicação de terapia de reperfusão, por angioplastia primária, dentro de 6h do início dos sintomas. Foram randomizados 100 pacientes para receberem placebo ou 40mg de cariporide endovenoso 10 minutos antes da reperfusão, todos

pacientes tinham mais de 4h do início dos sintomas. Enzimas cardíacas foram dosadas antes e em diversos momentos após a reperfusão. Foi avaliada a função ventricular esquerda global e regional por ventriculografia contrastada antes e após três semanas de seguimento em 46 pacientes, (placebo n=21 e cariporide n=25). O principal achado deste estudo foi a elevação significativa da fração de ejeção no grupo do cariporide após a reperfusão, enquanto que no grupo placebo não houve alteração. A contratilidade regional do ventrículo esquerdo melhorou nos dois grupos, porém no grupo cariporide a resposta foi superior. A liberação cumulativa das enzimas cardíacas foi reduzida no grupo do cariporide. Esses achados sugerem que a inibição da NHE-1 pelo cariporide atenuou a lesão de reperfusão com melhora significativa da disfunção ventricular esquerda pós-infarto do miocárdio.²⁵

Zeymer et al publicaram os resultados do ESCAMI (*Evaluation of the Safety and Cardioprotective effects of eniporide in Acute Myocardial Infarction*), estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, placebo controlado. Esse estudo europeu, incluiu pacientes com infarto do miocárdio em parede anterior e ou inferior, com indicação de terapia de reperfusão por angioplastia ou trombólise, conforme decisão do médico assistente, dentro das 6h iniciais. Amostras de sangue foram coletadas antes e após o início da reperfusão, com objetivo de avaliar marcadores de necrose (*CPK, CK-MB e LDH*). Nesse estudo não foi avaliada, fração de ejeção e alterações de contratilidade segmentar do ventrículo esquerdo. Na fase I, foram randomizados 430 pacientes para receberem placebo (n=88) ou 50mg (n=86), 100mg (n=91), 150mg (n=74) ou 200mg (n=91) de eniporide, infundido 10 minutos antes do início da angioplastia ou dentro de 15 minutos após o início da

trombólise. Os dados dessa fase indicaram redução cumulativa, da liberação enzimática com a dose de 100mg e 150mg de eniporide. Com base nesses achados o estudo foi estendido até a fase II, com mais pacientes randomizados (n=959), para receberem placebo (n=322), 100mg (n=321), 150mg (n=316) de eniporide, administrados da mesma maneira que na fase I. No entanto, os resultados dessa fase quando considerados isoladamente, ou em combinação com os da fase I, não revelaram efeito significativo do eniporide, em relação ao acúmulo de enzimas liberadas. Os resultados desse estudo se opõem a hipótese de que os inibidores da NHE, quando usados como terapia adjunta a reperfusão, possa reduzir a extensão do infarto, por atenuar a lesão de reperfusão.²⁶

Théroux et al publicaram os resultados do GUARDIAN, (*GUARD During Ischemia Against Necrosis*). Estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego placebo controlado. Envolveu 382 centros em 23 países, onde foram arrolados 11.590 pacientes considerados de alto risco para infarto do miocárdio durante a hospitalização. Os pacientes foram divididos em subgrupos: pacientes com angina instável ou infarto sem supradesnível do segmento ST (n=5233), pacientes que seriam submetidos à intervenção coronariana percutânea de alto risco (n=3439) ou pacientes que se submeteriam à cirurgia de revascularização miocárdica (n=2918). O estudo foi delineado com objetivos de avaliar mortalidade geral e infarto do miocárdio não fatal até 36 dias após a randomização, determinar eficácia clínica e dose efetiva de cariporide. Os pacientes foram randomizados para receber placebo (n=2910), ou 20mg (n=2909), 80mg (n=1888), ou 120mg (n=2883) de cariporide, cada 8h EV de 2 a 7 dias após a randomização. Os resultados não indicaram efeito significativo do tratamento ativo em relação ao

desfecho composto de mortalidade ou infarto do miocárdio ao final de 36 dias. Doses de 20mg e 80mg não mostraram efeito; enquanto doses de 120mg de cariporide foram associadas com uma redução significativa da mortalidade no subgrupo que se submeteu à cirurgia de revascularização miocárdica. Nesse subgrupo a mortalidade foi de 16,2% no grupo placebo e 12,1% nos que receberam tratamento ativo, sendo que o benefício se manteve por seis meses. Também o uso 120mg de cariporide, determinou uma tendência de redução da incidência de infarto com onda Q nos outros subgrupos. Já a incidência de infarto sem supradesnível do segmento ST reduziu somente no subgrupo que se submeteu à cirurgia (7,1% versus 3,8%). Em conclusão, o estudo apesar de não demonstrar um benefício significativo do cariporide na prevenção da progressão da isquemia para necrose através de um grande espectro de situações clínicas, documentou segurança da droga e sugere que um alto grau de inibição da NHE pode prevenir necrose celular na presença de isquemia e reperfusão, principalmente, nos pacientes que se submeterem à cirurgia de revascularização miocárdica.^{11,27}

Mais recentemente, Mentzer apresentou na sessão científica da American Heart Association em novembro de 2003, os resultados do EXPEDITION (*Na⁺/H⁺ EXchange inhibition to Prevent coronary Events in acute cardiac conDITIONs*). Estudo multicêntrico, duplo-cego, randomizado, placebo controlado delineado para comparar cariporide versus placebo em pacientes de alto risco, candidatos à cirurgia de revascularização miocárdica. Foram incluídos pacientes com indicação de cirurgia de urgência ou emergência, cirurgias repetidas, pacientes com doença de 2 ou 3 vasos com angina instável e também com um dos seguintes critérios:

idade acima de 65 anos, diabetes, sexo feminino ou fração de ejeção menor de 35%. Pacientes foram randomizados para receber 180mg de cariporide EV em 1h, seguido por infusões de 40mg/h ou 20mg/h, por 24h versus placebo. Inicialmente os pesquisadores planejaram incluir 7.000 pacientes porém o estudo foi interrompido pelo comitê de segurança com 5.761 pacientes. O desfecho primário do estudo foi diminuição da incidência combinada de mortalidade por todas as causas e infarto não fatal no quinto dia. Outros desfechos compunham mortalidade geral e infarto não fatal no trigésimo dia e no sexto mês, redução na incidência da síndrome de baixo débito pós-operatória e outros eventos relatados a disfunção ventricular esquerda. Os resultados mostraram, quando analisados os desfechos combinados, uma significativa redução de mortalidade e infarto não fatal no grupo cariporide nos dias 5, 30 e seis meses. Esse benefício foi inteiramente dirigido pela redução de infartos não fatais. Quando os desfechos foram analisados em separados, a mortalidade aumentou no quinto dia com maior tendência no trigésimo dia, secundária ao aumento significativo da incidência de acidentes vasculares cerebrais no grupo cariporide.²⁸

Conclusão

A proteção direta do miocárdio através da inibição da NHE-1 é uma nova estratégia promissora ainda em fase inicial de avaliação clínica no manejo da cardiopatia isquêmica, especialmente das síndromes coronarianas agudas e em pacientes candidatos a revascularização miocárdica. Até o momento os estudos realizados não demonstram benefício definido. Os achados conflitantes nos estudos clínicos, principalmente de Rupprecht e da fase I em relação à fase II do

ESCAMI, possivelmente sejam devidos ao pequeno tamanho da amostra utilizada. O fato da fase II do ESCAMI não mostrar diminuição na incidência de infartos com o uso do eniporide, pode ser decorrência da administração da droga imediatamente antes da reperfusão e não mais precocemente, no início da isquemia. Já os achados do estudo GUARDIAN, que mostrou segurança e boa tolerabilidade do cariporide, demonstrando diminuição da mortalidade e dos infartos sem supra de ST nos pacientes que se submeteram à cirurgia de revascularização miocárdica, foram comprovados no estudo EXPEDITION, porém associado a indesejável complicação do acidente vascular cerebral. Talvez a solução potencial do problema seja redução da dose do cariporide endovenoso, ou administração de baixas doses diretamente no coração ou em combinação com outras farmacoterapias.

Outros estudos em andamento nos responderão se o uso dos inibidores NHE, em situações específicas, como pacientes em alto risco de eventos cardíacos poderiam obter benefício dessa cardioproteção, durante cirurgias não cardíacas.

Além disso, seria oportuno avaliar se a inibição da NHE por um período mais prolongado apresentaria uma contribuição com benefício funcional ou sintomático em pacientes com angina estável, através de proteção miocárdica direta.

Sem isquemia

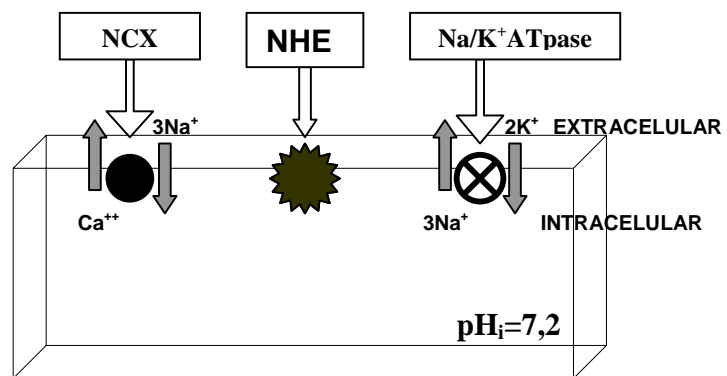


Figura 1. Sem isquemia o pH intracelular em 7,2 a bomba sódio/potássio com consumo de ATP troca 2 íons K^+ por 3 Na^+ . A NCX troca 3 Na^+ por 1 Ca^{++} . A NHE permanece desativada.

Isquemia

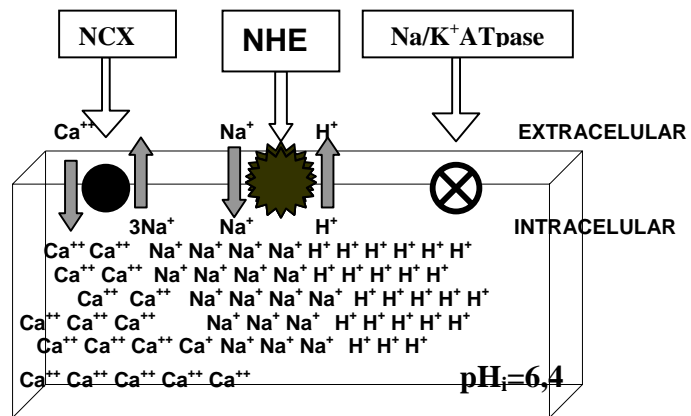


Figura 2. Durante isquemia o pH intracelular baixa para 6,4 a bomba sódio/potássio para de funcionar. A NHE é estimulada e passa eliminar 1H^+ em troca por 1Na^+ sem consumo energético. A NCX elimina 3Na^+ por 1Ca^{++} promovendo “sobrecarga de cálcio” intracelular.

Isquemia + Inibidor da NHE

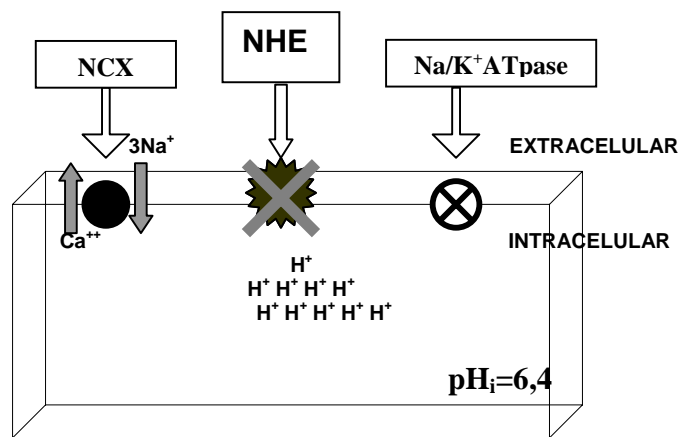


Figura 3. Durante isquemia em vigência de inibidor da NHE o pH intracelular fica em torno de 6,4 a bomba sódio/potássio para de funcionar. A NHE fica inibida e NCX não permite a entrada de Ca^{++} protegendo a célula.

Bibliografia

- 1- Reimer K, Jennings RB et al. Myocardial ischemia, hypoxia and Infarction. In Fozzard HA, Haber E, Jennings RB. The Heart and Cardiovascular System. 2nd Ed. New York, Raven Press 1991; pp 1875-1974.
- 2- Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ et al. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. J Clin Invest. 1975; 56:978–985.
- 3- Rahimtoola SH. Coronary bypass surgery for chronic angina–1981: a perspective. Circulation. 1982; 65:225–241.
- 4- Rahimtoola SH. A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina. Circulation. 1985; 72(suppl V): V-123–V-135.
- 5- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA et al. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation. 1986; 75:1124-1136.
- 6- Kloner RA, Bolli R, Marbam E et al. Medical and cellular implications of stunning, hibernation and preconditioning. An NHLBI Workshop. Circulation, 1998; 97:1848-1867.
- 7- Lazdunski M, Frelin C, Vigne P et al. The sodium/Hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulation internal concentrations of sodium and internal pH. J Mol Cell cardiol. 1985 nov; 17 (11): 1029-42

- 8- Karmazyn M. Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na⁺/H⁺ exchanger. *Am J Physiol.* 1988; 83:10G-18G.
- 9- Hearse DJ. The protection of the ischemic myocardium: surgical success vs. clinical failure. *Prog Cardiovasc dis* 1988; 30:381-402.
- 10-Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA et al. The myocardial Na⁺/H⁺ exchange structure, regulation, and its role in heart disease. *Circulation Research.* 1999; 85:777-786.
- 11-Théroux P. Myocardial cell protection: a challenging time for action and a challenging time for clinical research. *Circulation.* 2001; 101:2874-2876.
- 12-Avkiran M, Marber MS. Na⁺/H⁺ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: Progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(5): 747-53.
- 13-Karmayn M. Mechanisms of protection of de ischemic and reperfused myocardium by sodium-hydrogen exchange inhibition. *J Tromb Trombolysis.* 1999(1): 33-8.
- 14-Tosaki A, Engelman R, Maulik N et al. Mechanisms and consequences of apoptosis in myocardial ischemia reperfusion-induced injury. *Landes Biocience.* 1999 volume 1 issue 1.
- 15-Khandoudi N, Ho J, Karmazyn M at al. Role of sodium/hydrogen exchange in mediating the effects of endothelin-1 on the normal and ischemic and reperfused heart. *Circ Res.* 1994; 75:369–378.
- 16-Woo SH, Lee CO. Effects of endothelin-1 on Ca²⁺ signaling in guinea pig ventricular myocytes: role of protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol.* 1999; 31:631–643.

- 17-Matsui H, Barry WH, Livsey C et al. Angiotensin II stimulates sodium-hydrogen exchange in adult rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 1995; 29:215–221.
- 18-Mattiazi A, Perez NG, Vila-Petrof MG et al. Dissociation between positive inotropic and alkalinizing effects of angiotensin II in feline myocardium. *Am J Physiol.* 1997; 272:H1131–H1136.
- 19-Hoque A, Haist JV, Karmazyn M. Na⁺-H⁺ exchange inhibition protects against mechanical, ultrastructural, and biochemical impairment induced by low concentrations of lysophosphatidylcholine in isolated rat hearts. *Circ Res.* 1997; 80:95–102
- 20-Karmazyn M. The myocardial sodium-hydrogen exchanger (NHE) and its role in mediation ischemic and reperfusion injury. *Keio J Med* 1998 Jun; 47(2): 65-72.
- 21-Avkiran M. Rational basis for use of sodium-hydrogen exchange inhibitors in myocardial ischemia. *Am J Cardiol.* 1999; 83:10G-18G.
- 22-Scholz W, Albus U, Counillon L et al. Protective effects of HOE642, a selective sodium/hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischemia and reperfusion. *Cardiov. Res.* 1995; 29:260-8.
- 23-Gumina RJ, Mizumura T, Beier N et al. A new sodium-hydrogen exchange inhibitor, EMD 85131, limits infarct size in dogs when administered before or after coronary artery occlusion. *J Pharmacol Exp.* 1998;286:175-83
- 24-Karmazyn M, Sostaric JV, Gan XT et al. The myocardial Na⁺/H⁺ exchange: a potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischemic and

- reperfusion injury and attenuation of post infarction heart failure. *Drugs* 2001; 61(3): 375-79.
- 25-Rupprecht HJ, Dahl JV, Terres W et al. Cardioprotective effects of Na⁺/H⁺ exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial Infarction undergoing direct PTCA. *Circulation*. 2000; 101: 2902-2908.
- 26- Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP et al. The Na⁺/H⁺ exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial Infarction. *J. Am Coll Cardiol*. 2001; 38:1644-50i.
- 27-Thérroux P, Chaitman BR, Danchin L et al. Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarctions in high-risk ischemic situations. Main results of the Guardian trial. *Circulation*. 2000; 102:3032-3038.
- 28-Mentzer et al. Late Breaking Clinical Trials Session. Scientific Session of the American Heart Association. November, 2003. New Orleans, USA.

Efeito da Terapia Diurética na Capacidade de Exercício em Pacientes com Angina Estável e Função Ventricular Esquerda Preservada

Helius C. Finimundi, Paulo A. Caramori, John D. Parker.

Departamento de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e ciências Cardiovascular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Pesquisa Cardiovascular. Porto Alegre, Brasil e Department of Medicine, University Health Network and Mount Sinai Hospitals, University of Toronto, Toronto, Canada

Endereço para correspondência:
Dr. Paulo A. Caramori
Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Curso de Pós Graduação em Cardiologia.
Rua Ramiro Barcelos 2350, sala 2060.
Porto Alegre, RS. Brasil.
e-mail: Caramori.p@plugin.com.br

Resumo

Introdução: Estudos iniciais indicaram que diuréticos poderiam apresentar propriedades antianginosas através dos seus efeitos no volume intravascular. Amilorida, um inibidor da glicoproteína trocadora de sódio/hidrogênio, mostrou ser cardioprotetor em situações de isquemia, particularmente em modelos de reperfusão. O efeito dos diuréticos na isquemia miocárdica não tem sido completamente investigado. O presente estudo foi delineado para determinar se diuréticos possuem algum efeito antianginoso, aumentando a capacidade de exercício nos pacientes com angina estável.

Métodos: Quarenta pacientes com angina estável e função ventricular esquerda normal, em uso de terapia antianginosa foram incluídos em um ensaio clínico randomizado, duplo-cego e placebo controlado. Pacientes receberam diuréticos (hidroclorotiazida mais amilorida) ou placebo durante 21 dias. Todos os pacientes realizaram teste ergométrico em esteira com protocolo de Bruce standard antes da randomização e no 21º dia. O desfecho primário foi a variação do tempo de esforço em segundos, até o aparecimento de angina moderada.

Resultados: Terapia com diurético foi associada a um aumento no tempo de caminhada na esteira até o aparecimento de angina moderada de 63 ± 74 segundos versus 19 ± 42 segundos no grupo placebo ($P=0.026$). O tratamento ativo aumentou em 25% o tempo de caminhada em 8 pacientes (40%) no grupo diurético contra 1 paciente (5%) no placebo ($P=0.02$) e reduziu a depressão do segmento ST em 0.56 ± 0.7 mm versus 0.04 ± 0.8 mm no placebo ($P=0.03$). Durante

o período do estudo, nenhuma diferença significativa foi observada em relação à frequência cardíaca, pressão arterial sistólica ou diastólica e efeitos adversos.

Conclusão: Os resultados demonstram que a terapia com hidroclorotiazida e amilorida apresenta potente efeito aditivo antianginoso em pacientes com angina estável e função ventricular esquerda normal, em vigência de medicação antianginosa convencional.

Palavras chaves: Diurético. Angina. Teste ergométrico. Isquemia

Introdução

Angina estável é uma condição freqüente, estando associada com significativa morbidade e mortalidade. Para maioria dos pacientes portadores de angina estável o tratamento clínico é inicialmente oferecido. Porém, mesmo com a utilização de terapias adequadas, um número expressivo de pacientes permanece sintomático e menos da metade apresentam qualidade de vida normal.¹ Apesar da disponibilidade de terapias farmacológicas, bem como da revascularização percutânea ou cirúrgica, muitos pacientes continuam apresentando sintomas anginosos. Portanto, continua sendo essencial o desenvolvimento de novos avanços para o tratamento da angina.²

Estudos iniciais mostraram que flebotomia e terapia com diuréticos apresentaram efeitos favoráveis no desenvolvimento de isquemia miocárdica.^{3,4} Em estudo delineado para determinar se terapia diurética poderia prevenir tolerância ao nitrato, foi documentado que a combinação de hidroclorotiazida e amilorida mostrou significativo efeito antianginoso.⁵ Nesse estudo foi aventado de que o efeito antianginoso observado poderia ser resultado de efeitos contínuos do diurético no volume intravascular, e ou efeito único direto da amilorida. Amilorida, composto protótipo da família dos inibidores da proteína trocadora sódio/hidrogênio (NHE), mostrou ter um efeito protetor miocárdio em situações de isquemia aguda.⁶ Naquele estudo, a prevenção da tolerância ao nitrato foi o foco da investigação e terapia com antagonista dos canais de cálcio e betabloqueadores não foi permitida. Assim sendo, a capacidade da terapia

diurética em aumentar o esforço nos pacientes em uso concomitante de medicação antianginosa permanece desconhecida.

Métodos

Pacientes

Total de 40 pacientes (23 homens e 17 mulheres) com angina estável em uso de medicação antianginosa convencional não modificada há 3 meses, foram randomizados para receberem 25mg de hidroclorotiazida mais 5mg de amilorida ou placebo. Os pacientes elegíveis ao estudo apresentavam sintomas típicos de angina desencadeados aos esforços por pelo menos 6 meses, apesar do uso de terapia apropriada. Todos pacientes apresentavam doença arterial coronariana documentada angiograficamente com lesões $\geq 75\%$ em pelo menos uma artéria principal.

Todos pacientes apresentavam teste ergométrico positivo prévio, com dor típica e infradesnivel horizontal ou descendente do segmento ST ≥ 1 -mm quando medido 80ms após o ponto J. Todos apresentavam fração de ejeção do ventrículo esquerdo $\geq 50\%$ avaliada pelo ecocardiograma bidimensional. Critérios específicos de exclusão foram: história de insuficiência cardíaca congestiva, doença valvular cardíaca, miocardiopatia hipertrófica, angina vasoespástica, angina instável ou infarto do miocárdio dentro de 6 meses, procedimento coronariano cirúrgico ou percutâneo dentro de 6 meses, capacidade de exercício limitada por claudicação ou dispnéia de origem não cardíaca, dependência de marcapasso, fibrilação atrial, bloqueio de ramo esquerdo ao eletrocardiograma, anemia ou doença hepática

cl clinicamente significativa, creatinina sérica $\geq 1,3$ mg/dl ou potássio sérico $\geq 5,5$ mEq/l e uso de terapia diurética ou digitálicos.

Protocolo do estudo

Esse é um ensaio clínico randomizado duplo-cego controlado por placebo. Após o consentimento informado ser obtido, amostras de sangue foram coletadas para medidas séricas do potássio e creatinina. A seguir, todos os pacientes foram submetidos a ecocardiograma bidimensional para quantificação da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (método de Simpson).⁷ No dia seguinte, entre as 8 e 10 horas da manhã, os pacientes realizaram teste ergométrico em esteira utilizando protocolo standard de Bruce.

Os pacientes em estudo foram então randomizados para receber diurético (25mg de hidroclorotiazida combinado com 5mg de amilorida) ou placebo, por um período de 21 dias de uma forma duplo-cega. Todos os pacientes foram acompanhados semanalmente para controle dos níveis pressóricos, frequência cardíaca, verificação do peso, avaliação de efeitos adversos, bem como conferir o número de cápsulas utilizadas. Durante a segunda semana, uma nova amostra de sangue foi coletada para dosagem da creatinina e potássio. No 21º dia todos os pacientes novamente foram submetidos a outro teste ergométrico no período da manhã e em jejum. A medicação antianginosa em uso não foi interrompida ou modificada durante todo o período de estudo.

O comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, aprovou o protocolo de estudo.

Teste ergométrico

Todos os testes ergométricos foram executados por um investigador e analisados por outro cegado em relação à ordem dos exames. Para realização dos testes foi utilizado o protocolo standard de Bruce com equipamento informatizado (TEB – APEX 2000 versão 3.01) que permite analisar em tempo real o nível de desvio do segmento ST 80ms após o ponto J. Os exames seguiram as recomendações da ACC/AHA/ACP.⁸

Eletrocardiogramas com 13 derivações (12 convencionais mais CM5) foram registrados na posição supina e ortostática antes do início do exercício, a cada intervalo de 1 minuto durante o esforço e no período de recuperação.⁹ Os pacientes foram instruídos a indicar o início da angina (P1) e continuar o exercício até a angina se tornar moderada (P2), ponto onde normalmente costumam parar com o esforço. A pressão arterial foi verificada sempre com o mesmo aparelho, na posição sentada e ortostática, antes do início do teste, cada 3 minutos durante o esforço, em P1 e P2 e no pós-esforço imediato e tardio. Todos os pacientes foram orientados previamente, sobre a escala dos níveis de angina, apresentada na tabela 1.^{10,11}

O desfecho primário foi considerado o tempo total de caminhada em segundos até o aparecimento de angina moderada (P2) ou infradesnivel horizontal ou descendente do segmento ST ≥ 3 -mm, quando medido 80ms após o ponto J, ou elevação ≥ 1 -mm em derivações sem onda Q (outras que V1 e AvR). O exame também foi interrompido quando quaisquer uns dos critérios a seguir fossem preenchidos: queda da pressão sistólica no esforço em 10mmHg em relação ao

repouso ou elevação $\geq 220\text{mmHg}$, pressão diastólica $\geq 115\text{mmHg}$. O cálculo do duplo produto foi obtido no pico do esforço.

Análise estatística

O cálculo amostral baseado em estudo prévio,⁵ indicou a necessidade da inclusão de 30 pacientes com poder de 90% e 5% de significância estatística para identificar um aumento no tempo de caminhada na esteira em 40 segundos. Visando precaver-se de alguma potencial desistência, 40 pacientes foram selecionados para participar no estudo. Nas variáveis quantitativas com distribuição normal, diferenças entre os dois grupos foram analisadas pelo teste *t* de Student. Nas variáveis qualitativas a comparação entre grupos foi realizada pelo teste do qui-quadrado. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão. O valor *P* bicaudal ≤ 0.05 foi considerado como significância estatística. Para análise dos dados foi utilizado o programa SPSS, versão 11.0.1 (SPSS Inc. Chicago, Illinois).

Resultados

As características demográficas dos pacientes nos grupos diurético e placebo estão apresentadas na tabela 2. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos após a randomização.

A terapia diurética foi associada com um aumento significativo do tempo total de esforço na esteira até o aparecimento de angina moderada (P2) de 63 ± 74

segundos quando comparado 19 ± 42 segundos no grupo placebo (diferença de 44 segundos entre grupos $P=0.026$). Houve um aumento de 25% no tempo de caminhada em 8 pacientes (40%) no grupo de tratamento ativo versus 1 paciente (5%) no placebo ($P= 0.02$). O desfecho primário está representado na figura 1.

Os dados obtidos nos testes ergométrico basal e final estão representados na tabela 3. Considerando as mudanças entre os testes inicial e final, o grupo diurético mostrou redução significativa da depressão do segmento ST de $0.56\pm 0,7$ mm comparado a $0.04\pm 0,8$ mm no grupo placebo (0.52mm de diferença, $P=0.03$) e um aumento na distância percorrida de 80 ± 83 metros versus 22 ± 58 metros no grupo placebo (58 metros de diferença, $P= 0.01$), para desenvolvimento de angina moderada (P_2). Houve uma tendência de aumento dos METs atingidos no pico do esforço no grupo diurético ($P=0.08$). Não houve mudanças significativas no duplo produto no pico do esforço, pressão arterial sistólica, diastólica e frequência cardíaca em repouso, alterações do peso ou variação dos níveis sérico de creatinina e potássio basais e na semana 2, em ambos os grupos.

Todos pacientes randomizados permaneceram estáveis e completaram o estudo. Não relataram piora dos sintomas anginosos ou apresentaram eventos isquêmicos agudos durante todo o experimento. Também, não foi constatada a presença de efeitos adversos em ambos os grupos. Os medicamentos antianginosos usados não foram modificados durante o período de estudo.

Discussão

Poucos estudos existem com relação aos efeitos da terapia diurética na isquemia miocárdica.

Nechwatal et al relataram melhora na angina e aumento na capacidade de exercício em pacientes com doença arterial coronariana estável tratada com furosemida de forma agressiva. Os autores propuseram que as propriedades antianginosas observadas foram devidas à redução das pressões e volume ventricular esquerdo, resultando menor consumo de oxigênio miocárdico. Igualmente, redução da pressão diastólica final ventricular esquerda pode levar a uma melhora no gradiente de fluxo coronariano e aumentar a oferta de oxigênio.⁴

Serro-Azul et al observaram em uma população homogênea de pacientes idosos, hipertensos que apresentavam evidências de isquemia miocárdica induzida e função ventricular esquerda normal, discreto aumento na capacidade de esforço com o uso da clortalidona. Também foi observada na monitorização eletrocardiográfica ambulatorial, redução na evidência de isquemia miocárdica durante a atividade diária.¹²

Parker et al durante investigação para determinar se terapia diurética poderia prevenir o desenvolvimento de tolerância a nitroglicerina, observou que a associação de hidroclorotiazida mais amilorida aumentou a capacidade de exercício em pacientes normotensos e com angina estável. O mecanismo desse efeito antianginoso observado não foi claro. Poderia ter sido secundário a uma sustentada redução do volume vascular, ou alternativamente, uma ação específica

do efeito da amilorida na resposta miocárdica à isquemia. Amilorida tem mostrado ser cardioprotetor em vigência de isquemia, particularmente em modelos de reperfusão. Embora exista substancial documentação desse efeito em modelo animal, não há estudos examinando o impacto da amilorida no miocárdio humano.⁵ Amilorida poderia exercer efeitos antianginosos via inibição das glicoproteínas miocárdicas trocadores de sódio/hidrogênio (NHE). Esse mecanismo iônico de trocas, transporta íons sódio e hidrogênio em direções opostas. Sete subtipos diferentes NHE foram identificados até o momento. NHE-1, mais comum e freqüente das isoformas membrano-plasmáticas, é molecularmente homologa a NHE do sarcolema cardíaco. NHE-1 é especificamente inibida pela amilorida e drogas análogas.¹³ A NHE miocárdica representa um dos principais mecanismos para regulação do pH intracelular em resposta à acidose isquemia-induzida.¹⁴

Karmazyn foi o primeiro investigador a demonstrar que a amilorida aumenta a recuperação pós-isquêmica da função contrátil, reduzindo a liberação de creatininaquinase em corações de ratos submetidos à isquemia global e reperfusão.¹⁵ Estudos extensos usando inibidores da NHE-1 têm consistentemente mostrado efeitos protetores na lesão de isquemia e reperfusão miocárdica em grande variedade de modelos animal.¹⁶

Estudos experimentais também têm indicado que a combinação da inibição da NHE com condicionamento isquêmico oferece maior benefício cardioprotetor, demonstrado pela limitação do tamanho do infarto, do que de forma isolada.^{17,18} Durante episódio isquêmico, a ativação da NHE representa um processo adaptativo importante em resposta a acidose intracelular. No entanto

resulta também numa contribuição paradoxal agravante de lesão tecidual cardíaca, causada por um aumento associado da concentração de cálcio.

Os resultados do presente estudo confirmam que em pacientes com angina de esforço, a terapia com a combinação de hidroclorotiazida e amilorida, significativamente aumentaram o tempo de esforço e reduziram as evidências eletrocardiográficas de isquemia em paciente com angina estável. Embora o duplo produto durante exercício não tenha alterado nesses pacientes, está bem demonstrado que o duplo produto não é um bom indicador da demanda de oxigênio miocárdico porque não responde a mudanças no volume e contratilidade ventricular.⁵

Esta investigação documenta que a combinação de hidroclorotiazida e amilorida é um efetivo antianginoso em pacientes já tratados com outros agentes antianginosos. É importante enfatizar que os pacientes deste estudo possuem função ventricular esquerda normal e não apresentavam sintomas de insuficiência cardíaca. Esse regime de tratamento diurético não causou nenhuma mudança significativa nos níveis séricos de potássio e creatinina e não foi associado com alterações da pressão arterial e frequência cardíaca. Houve uma tendência de aumento da creatinina no grupo diurético, porém a alteração observada, de apenas 0,1 mg/dl, provavelmente não possui implicação clínica relevante. O uso de hidroclorotiazida mais amilorida combinado a drogas antianginosas em pacientes com angina estável, foi bem tolerado e seguro. De forma interessante, o papel da terapia com múltiplas drogas para angina permanece controverso, com poucos dados convincentes que sustentam seu uso.¹⁹ Apesar desta incerteza, os presentes dados obtidos poderiam apoiar um uso terapêutico de diuréticos em

paciente com sintomas de angina, mesmo levando em consideração adequado manejo clínico, quando procedimentos de revascularização não foram possíveis ou não tiveram êxito.

Tabela 1. Escala dos níveis de angina para Teste de Esforço *

Descrição	Nível
Início da angina, discreta mas reconhecida como dor anginosa de esforço usual ou desconforto já familiar.	1
Mesma dor, moderadamente severa e definitivamente inconveniente mas ainda tolerável.	2
Dor anginosa severa a um nível em que desejará parar o exercício	3
Dor anginosa intolerável, a dor mais severa que já experimentou	4

*O critério anginoso para interromper o esforço é o nível 2, correspondendo a (P2)

Tabela 2. Características basais dos pacientes nos grupos diurético e placebo

Características basais	Diurético n=20	Placebo n=20	P
Idade, anos	64±10.4	61±11.8	0.30 [†]
Masculino/Feminino, n	14/6	9/11	0.20
FEVE, %	58±6	60±8	0.45 [†]
DAC 1, 2, 3 vasos, n	10, 7, 3	7, 8, 5	0.62
PA sistólica, mmHg	129±17	128±11	0.83 [†]
PA diastólica, mmHg	80±8	80±3	0.79 [†]
FC, batimentos/min	73±13	69±11	0.33 [†]
Diabetes melitus, n (%)	7 (35)	5 (25)	0.73
Hipertensão, n (%)	14 (70)	16 (80)	0.72
Dislipidemia, n (%)	19 (95)	18 (90)	1.00
Tabagismo, n (%)	1 (5)	5 (25)	0.18
Obesidade, n (%)	4 (20)	2 (10)	0.66
β-Bloqueador, n (%)	15 (75)	12 (60)	0.50
Bloqueadores canais de cálcio, n (%)	10 (50)	8 (40)	0.73
Nitrato ação prolongada, n (%)	14 (70)	10 (50)	0.33
Aspirina, n (%)	20 (100)	19 (95)	1.00
Inibidor da ECA, n (%)	11 (55)	13 (65)	0.74
Estatina, n (%)	12 (60)	12 (60)	1.00
Fibratos, n (%)	5 (25)	2 (10)	0.47

FEVE indica fração de ejeção do ventrículo esquerdo; PA pressão arterial; FC frequência cardíaca; ECA enzima de conversão da angiotensina; β-bloqueador betabloqueador; DAC 1,2,3 vasos corresponde a número de vasos com estenose coronariana ≥ 75%. Dados expressos como média ± desvio padrão, n (%) frequências e percentuais. Análise estatística calculada pelo qui-quadrado e [†] teste t Student.

Tabela 3. Dados grupo diurético e placebo, obtido nos testes de esforço basal e final e cálculo do delta.

	Teste basal			Teste final			Delta		
	Diurético	Placebo	<i>P</i>	Diurético	Placebo	<i>P</i>	Diurético	Placebo	<i>P</i>
	n=20	n=20		n=20	n=20		n=20	n=20	
Tempo caminhada, s	275±110	320±130	0.23	338±110	340±140	0.97	63±74	19.4±42	0.02
Distância, m	264±120	315±170	0.28	344±160	337±190	0.90	80±83	22±58	0.01
Depressão ST, mm	-1.05±1.6	-1.36±1.3	0.52	-0.49±1.7	-1.32±1.6	0,11	0.56±0.7	0.04±0.8	0.03
METs atingidos	5.7±1.1	6.1±1.6	0.33	6.5±1.3	6.4±1.5	0.98	0.8±0.9	0.3±0.6	0.08
Duplo produto x 10 ³	18.0±3.9	19.1±5.5	0.47	18.4±5.0	19.4±5.0	0.54	0.42±4.2	0.29±3.1	0.91
Creatinina, mg% †	0.96±0.17	0.98±0.19	0.75	1.07±0.22	1.00±0.19	0.28	0.11±0.17	0.02±0.14	0.07
Potássio, mEq/l †	4.3±0.4	4.4±0.4	0.38	4.4±0.3	4.5±0.4	0.38	0.1±0.5	0.1±0.3	1.00
PAS repouso, mmHg	132±17	131±15	0.84	130±19	129±22	0.87	-2±10	-2±22	1.00
PAD repouso, mmHg	81±7	84±9	0.28	78±11	82±9	0.22	-3±9	-2±6	0.68
FC repouso, bpm	72±16	70±13	0.76	72±14	69±12	0.36	0±12	-1.7±7	0.57
Peso, kg	75.8±19	73.9±12	0.70	75.3±19	73.7±12	0.75	-0.5±1.3	-0.2±1.0	0.41

PAS indica pressão arterial sistólica; PAD pressão arterial diastólica; FC frequência cardíaca; bpm batimentos por minuto; METs equivalente metabólico (1 MET = consumo oxigênio de 3,5 ml/Kg/min); Duplo produto (PAS x FC). Dados expressos como média ±desvio padrão. †Amostras de sangue coletadas basal e semana 2. *P* calculado pelo Teste *t* Student bilateral.

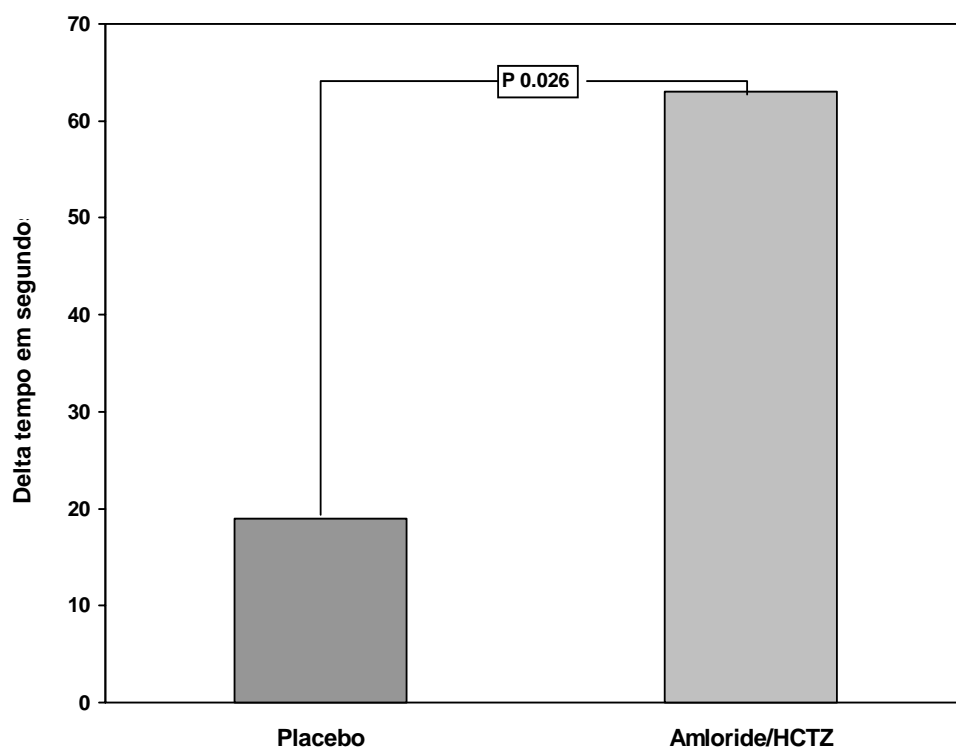


Figura 1. Gráfico mostra diferença no tempo de caminhada em segundos até o aparecimento de angina moderada (P2) obtido entre os grupos. Dados estão representados pela média. Delta P calculado pelo teste t de Student.

Referências

1. Staniforth AD. Contemporary management of chronic stable angina. *Drugs Aging*. 2001; 18(2): 109-121.
2. Berger P. Ranolazine and Other Antianginal Therapies in the Era of the Drug-Eluting Stent *JAMA*, Jan 2004; 291: 365 - 367.
3. Parker JO, Case RB, Khaja F, Ledwich JR, et al. The influence of changes in blood volume on angina pectoris: a study of the effect of phlebotomy. *Circulation*. 1970; 41: 593-604.
4. Nechwatal W, König E, Greding H et al. Hemodynamic and electrocardiographic effects of furosemide during supine exercise patients with angina pectoris. *Br Heart J*. 1980; 44: 67-74.
5. Parker JD, Parker AB, Farrel B, Parker JO. Effects of diuretics therapy on the development of tolerance to nitroglycerin an exercise capacity in patients with chronic stable angina. *Circulation*. 1996; 93: 691-6.
6. Karmazyn M, Ray M, Haist JV. Comparative effects of Na⁺/H⁺ exchange inhibitors against cardiac injury induced by ischemia/reperfusion, hypoxia/reoxygenation, and calcium paradox. *J Cardiovascular Pharmacol*. 1993; 21: 172-78.
7. Schiller NB, Shah PM, Crawford M. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantification of Two-Dimensional Echocardiograms. Recommendations for quantification of the

- left ventricle by two-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 1989; 2:358-67.
8. Fletcher FG et al. Exercise Standards goes Testing and Training: Statement goes Healthcare Professionals from the American Heart Association. *Circulation.* 2001; 104: 1694.
 9. Gianni C, Pavesi PC, Medda M, et al. Long-term prognosis of painless exercise-induced ischemia in stable patients with previous myocardial infarction. *Am Heart J.* 1998; 136(5): 894-904.
 10. Allred EN, Bleecker ER, Chaitman BR, et al. Effects of carbon monoxide on myocardial ischemia. *Environ Health Perspect.* 1991; 91: 89-132.
 11. Allred EN, Bleecker ER, Chaitman BR, et al. Short-term effect of carbon monoxide exposure on the exercise performance of subjects with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 1989; 321:1426-32.
 12. Serro-Azul JB, Paula RS, Grupi C. et al. Effects of chlorthalidone and diltiazem on myocardial ischemia in elderly patients with hypertension and coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol.* 2001; 76(4): 268-72.
 13. Avkiran M. "New Approaches to Myocardial Protection" symposium held at the Hilton Anaheim in Anaheim, California on November 10, 2001.
 14. Lazdunski M et al. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol.* 1985; 17: 1029-42.
 15. Karmazyn M. Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na/H exchange. *Am J Physiol.* 1988; 255: H608-H616.

16. Karmazyn M. The myocardial sodium-hydrogen exchanger (NHE) and its role in mediating ischemic and reperfusion injury. *Keio J Med.* 1998 Jun; 47(2): 65-72.
17. Gumina RJ, Buerger E, Eickmeier C. et al. Inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger confers greater cardioprotection against 90 minutes of myocardial ischemia than ischemic preconditioning in dogs. *Circulation.* 1999; 98: 2519–2526.
18. Avkiran M. Protection of the Myocardium during Ischemia and Reperfusion Na⁺/H⁺ Exchange Inhibition versus Ischemic Preconditioning. *Circulation.* 1999; 100: 2469.
19. Packer M. Drug therapy: combined beta-adrenergic and calcium-entry blockade in angina pectoris. *N Engl J Med.* 1989; 320: 709-18.

Effect of Diuretic Therapy on Exercise Capacity in Patients with Chronic Angina and Preserved Left Ventricular Function

Helius C Finimundi MD; Paulo Caramori MD, PhD, FACC; John D Parker MD, FACC

From the Department of Cardiology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Post-graduation Course of Cardiology and Cardiovascular Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul and The Center for Cardiovascular Research, Porto Alegre, Brazil and the Department of Medicine, University Health Network and Mount Sinai Hospitals, University of Toronto, Toronto, Canada.

Correspondence to: Paulo Caramori MD
Post Graduation Course of Cardiology
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos 2350, sala 2060
Porto Alegre, RS, Brazil.
e-mail: caramori.p@plug-in.com.br

Abstract

Background: Early studies indicated that diuretics might have antianginal properties through their effects on intravascular volume. Amiloride, a sodium/hydrogen exchange inhibitor, has shown to have cardioprotective effects in the setting of ischemia, particularly in models of reperfusion. The effect of diuretics on myocardial ischemia has not been fully investigated. The present study was designed to determine whether diuretic has antianginal effect, increasing exercise capacity in patients with stable angina.

Methods: Forty patients with chronic stable angina and normal left ventricular function, in use of antianginal therapy were randomized in a double-blind, placebo controlled study. Patients received diuretic (hydrochlorothiazide plus amiloride) or placebo for 21 days. All patients performed standard Bruce protocol treadmill stress test before randomization and at day 21. The primary end point was the change in treadmill walking time until moderated angina.

Results: Therapy with diuretic was associated with an increase in treadmill walking time to development of moderate angina of 63 ± 74 seconds vs. 19 ± 42 seconds in the placebo group ($P=0.026$). The active treatment increased 25% in walking time in 8 patients (40%) vs. 1 patient (5%) in the placebo group ($P=0.02$), and reduced ST-segment depression by 0.56 ± 0.7 mm vs. 0.04 ± 0.8 mm ($P=0.03$). During the 3-week study period, no significant differences in heart rate, systolic and diastolic blood pressure, and adverse effects were observed.

Conclusion: These results demonstrate that therapy with hydrochlorothiazide plus amiloride has potent additive antianginal effects in patients with stable angina and preserved left ventricular function under treatment with standard antianginal therapy.

Key Words: diuretics • angina • stress test • ischemia

Introduction

Chronic stable angina is a common condition associated with significant morbidity and mortality. Most patients with chronic stable angina are initially offered medical treatment. However, even under adequate medical therapy, a significant number of patients remain with symptoms with fewer than half having a normal quality of life.¹ Despite the availability of traditional pharmacologic approaches, as well as surgical and percutaneous revascularization, many patients continue to have symptoms of angina. Therefore, there continues to be a need for the development of novel approaches to the therapy of angina.²

Early studies suggested that both phlebotomy and therapy with diuretics had favorable effects on the development of myocardial ischemia.^{3,4} In a study designed to determine if diuretic therapy could prevent nitrate tolerance, the combination of hydrochlorothiazide and amiloride was documented to have significant antianginal effects.⁵ In this report it was hypothesized that the observed antianginal effect might have resulted from sustained effects of the diuretic on intravascular volume and/or the unique effects of amiloride. Amiloride, the prototypical compound of a family of sodium/hydrogen exchange inhibitor, has been shown to have protective effect on myocardium in the setting of acute ischemia.⁶ Prevention of nitrate tolerance was the focus of this investigation, therapy with calcium channel antagonists and beta-blockers was not permitted during the study. Therefore, the ability of diuretic therapy to improve exercise capacity in patients treated with other antianginal therapy remains unknown.

Methods

Patient Population

A total of 40 patients (23 men and 17 women) with chronic stable angina under usual medical therapy, were randomized to receive 25mg hydrochlorothiazide combined with 5mg amiloride or placebo. Eligible patients had stable exertional angina for at least 6 months, despite use of standard antianginal therapy and had typical anginal symptoms during exercise. Medical therapy had to be unchanged for the last 3 months. All had documented coronary artery disease, with angiographic evidence of $\geq 75\%$ stenosis of at least one major coronary.

All patients had a previous positive treadmill stress test with chest pain and at least ≥ 1 -mm horizontal or down sloping ST-segment depression when measured 80ms after the J-point. All had a left ventricular ejection fraction of $\geq 50\%$ by two-dimensional echocardiography. Specific exclusion criteria were: patients with history of congestive heart failure, cardiac valvular disease, hypertrophic cardiomyopathy, vasospastic angina, unstable angina or myocardial infarction within 6 months, surgical or percutaneous revascularization within 6 months, exercise capacity limited by either claudication or noncardiac dyspnea, pacemaker dependency, atrial fibrillation, left branch block, clinically significant anemia or hepatic disease, serum creatinine $\geq 1,3$ mg/dl or potassium $\geq 5,5$ mEq/l, and current use of digoxin or diuretic therapy.

Protocol Design

This was a double-blinded placebo-controlled trial. After informed consent was obtained, sample blood was collected for serum potassium and creatinine measurements. Following, all patients underwent a two-dimensional echocardiogram to quantify left ventricle ejection fraction (Simpson method).⁷ The following day, between 8 and 10 AM, subjects performed a treadmill exercise test using the standard Bruce protocol.

Study subjects were then randomized to receive either diuretic (25mg hydrochlorothiazide combined with 5mg amiloride) or matching placebo for a period of 21 days in a double-blind manner. All patients were followed weekly to verify blood pressure, heart rate, weight, adverse effect and check the number of taken capsules. During week 2, a second blood sample for serum potassium and creatinine was obtained. At day 21 all patients underwent a repeat treadmill exercise test, in the morning in the fasting state. The antianginal therapy used by the patients was not interrupted or modified during the study period.

The ethics committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil approved the study protocol.

Exercise Testing

All treadmill stress tests were executed by one investigator and analyzed by another one, who was blinded to the order of the exercise tests. Treadmill exercise testing was executed using the standard Bruce protocol and computerized system (TEB – APEX 2000 software version 3.01) and according the guidelines of the

ACC/AHA/ACP.⁸ The software package analyses the signal-average ECG and produces a graphical display of the level of the ST segment 80 ms after J point versus time, allowing to analyze the shift of ST segment in real time.

A 13-lead EKG (12 conventional leads plus CM5) was recorded in the supine and standing positions before exercise and at 1-minute intervals throughout the exercise test and recovery period.⁹ Patients were instructed to indicate the onset of angina (P1) and to continue exercise to moderate angina (P2), the point at which they would normally discontinue activity. Blood pressure was recorded with the same sphygmomanometer in the sitting and standing positions before exercise testing, every 3 minutes during exercise, at both P1 and P2, and after exercise. All patients were well informed about level angina scale for exercise tolerance test (Table 1).^{10,11}

The primary end point was the total treadmill walking time in seconds to moderated angina (P2), or ≥ 3 -mm horizontal or down sloping ST-segment depression when measured 80 ms after the J-point, or ≥ 1 -mm ST-segment elevation in leads without Q wave (another that V1 and aVr). The exercise test was terminated when any of these criteria were fulfilled. Rate-pressure product was obtained at this point. The test also was to be interrupted, if the effort systolic pressure decreases 10mmHg in relation to the rest, or if the systolic pressure during the effort was ≥ 220 mmHg or diastolic ≥ 115 mmHg.

Statistical analysis

Sample size calculations indicated that 30 patients would be needed to demonstrate with 90% power and 5% significance an improvement in treadmill walking time of 40 seconds. To account for any potential dropouts, 40 patients were selected to participate on this study. Between-groups differences at a single time point were examined by 2-tailed Student's *t* test in variables with normal distribution. Qualitative variables were compared with Pearson Chi-Square.

Unless otherwise stated, data are expressed as mean value \pm standard deviation. A two-sided *P* value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance. Statistical tests were performed with the software SPSS, version 11.0.1 (SPSS Inc. Chicago, Illinois).

Results

Baseline demographic characteristics of the patients in diuretic and placebo-treated groups are presented in table 2. There were no significant differences between the 2 groups after randomization.

Diuretic therapy was associated with a significant increase on total treadmill walking time to moderate angina (P2) of 63 ± 74 seconds as compared to 19 ± 42 seconds in the placebo group (44 seconds of difference between groups, $P=0.026$). There was a 25% increment in walking time in 8 patients (40%) in the combined hydrochlorothiazide and amiloride therapy group versus 1 patient (5%) in the placebo group ($P=0.02$). Figure 1 presents the primary end point of the study.

The results of treadmill stress tests are presented in table 3. Considering the change between baseline and final stress testing, the diuretic group showed significant reduction in the ST-segment depression of 0.56 ± 0.7 mm as compared to 0.04 ± 0.8 mm in the placebo group (0.52mm difference, $P=0.03$), and an increase in treadmill walking distance to the development of moderate angina of 80 ± 83 meters versus 22 ± 58 meters in the placebo group (difference 58 meters, $P=0.01$). There was a trend to increase METs reached in peak of the testing in the active treatment group ($P=0.08$). There were no significant changes in rate-pressure product at exercise peak, systolic or diastolic blood pressure or heart rate at rest, weight or serum creatinine and potassium at baseline and week 2, in both groups.

All patients randomized remained stable and completed the study. No patient developed unstable ischemic syndrome or reported an increase in angina symptoms during the study period. No adverse effect was reported in both groups. All concurrent medications were not modified during the study period.

Discussion

Few studies about the effects of diuretic therapy on myocardial ischemia exist. Nechwatal et al reported improvement in angina and an increase in exercise performance in patients with stable coronary artery disease with treated with acute use of furosemide. The authors propose that antianginal properties are due to a reduction of left ventricular volumes and pressures resulting in myocardial oxygen consumption. Moreover, reduction of left ventricular end-diastolic pressure could

lead to an improvement in the coronary flow gradient leading to an increased oxygen supply.⁴

Serro-Azul et al founded a borderline increase in exercise performance with use of chlorthalidone and a reduction in evidence of myocardial ischemia during activities of daily living in a homogeneous population of elderly hypertensive patients with evidence of inducible myocardial ischemia and normal left ventricular function.¹²

Parker et al during an investigation to determine whether diuretic therapy could prevent the development of tolerance to nitroglycerin observed that diuretic therapy with hydrochlorothiazide plus amiloride improved exercise capacity in normotensive patients with stable angina. The mechanism of this antianginal effect was not clear. It might have been secondary to a sustained reduction in vascular volume, or, alternatively, a specific effect of amiloride on the myocardial response to ischemia. Amiloride has been show to be a cardioprotective in the setting of ischemia, particularly in model of reperfusion. Despite substantial documentation of this effect in animal models there have been no studies examining the impact of amiloride on human myocardium.⁵ Amiloride could exert antianginal effects via inhibition of myocardial Na⁺/H⁺ exchangers (NHE). This ion exchange mechanism transports Na⁺ ions and H⁺ ions in opposite directions. Seven different isoforms of the exchanger that have been identified to date. NHE-1, the ubiquitous plasma-membrane isoform is the molecular homologue of the cardiac sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger. NHE-1 is specifically targeted by amiloride and drugs analogs.¹³ The myocardial NHE represents one of the main mechanisms for intracellular pH regulation in response to ischemia-induced acidosis.¹⁴ Karmazyn was the first

investigator to show that amiloride enhanced the postischemic recovery of contractile function and reduced creatine kinase leakage in rat hearts subjected to global ischemia and reperfusion.¹⁵ Extensive studies using NHE-1 inhibitors, have consistently shown protective effects against ischemia and reperfusion injury in a variety of animal models.¹⁶

Experimental studies have also indicated that, the combination of NHE inhibition and ischemic preconditioning affords greater cardioprotective benefit, as defined by limitation of infarct size, than either intervention alone.^{17,18} In the setting of ischemia, NHE activation represents an important adaptive process in response to intracellular acidosis, however it results in a paradoxical contribution to cardiac tissue injury caused by the associated increase in intracellular calcium concentration.

The results of the present study confirm that patients with exertional angina, therapy with the combination of hydrochlorothiazide and amiloride, significantly increased treadmill walking time and reduced electrocardiographic evidence of ischemia in patients with exertional angina. Although the rate-pressure product at exercise peak did not change in these patients, it is well known that rate-pressure product is not the only determinant of oxygen demand because it does not account for changes in ventricular volume and contractility.

This investigation documents that the combination of hydrochlorothiazide and amiloride is an effective anti-anginal in patients already treated with other antianginal agents. It is important to emphasize that these patients had normal left ventricular function and did not suffer from symptoms of heart failure. This diuretic treatment regimen caused no significant change in the serum levels of potassium

and creatinine, and was not associated with alterations of the blood pressure or heart rate. Although there was a trend to increase creatinine in the diuretic group, the observed change was only 0.1mg/dl, which has probably no relevant clinical implications. The use of hydrochlorothiazide plus amiloride with concomitant antianginal drugs in patients with stable angina was well tolerated and safe. Interestingly, the role of multiple drug therapy for angina remains controversial, with few convincing data supporting the use of multiple drugs.¹⁹ Despite this uncertainty, the present data would support a therapeutic use of diuretics in the patient with angina symptoms in spite optimal medical management when revascularization procedures are not feasible or have not been successful.

Table 1. Level Angina Scale for Exercise Tolerance Testing^{*}

Description	Level
Onset of angina, mild but recognized as the usual angina-of-effort pain or discomfort with which the subject is familiar	1
Same pain, moderately and definitely uncomfortable but still tolerable	2
Severe angina pain at a level that the subject will wish to stop exercising	3
Unbearable chest pain; the most severe pain the subject has felt	4

^{*}Angina criteria for stopping a symptom-limited exercise test level 2, corresponding to (P2)

Table 2. Baseline characteristics of the patients in diuretic and placebo groups.

Baseline Characteristics	Diuretic n=20	Placebo n=20	P
Age, years	64±10.4	61±11.8	0.30 [†]
Men/Women, n	14/6	9/11	0.20
LVEF, %	58±6	60±8	0.45 [†]
1, 2, 3 vessels disease, n	10, 7, 3	7, 8, 5	0.62
Systolic BP, mmHg	129±17	128±11	0.83 [†]
Diastolic BP, mmHg	80±8	80±3	0.79 [†]
Heart rate, bpm	73±13	69±11	0.33 [†]
Diabetes mellitus, n (%)	7 (35)	5 (25)	0.73
Hypertension, n (%)	14 (70)	16 (80)	0.72
Dislipidemia, n (%)	19 (95)	18 (90)	1.00
Current smoker, n (%)	1 (5)	5 (25)	0.18
Obesity, n (%)	4 (20)	2 (10)	0.66
β-Blocker, n (%)	15 (75)	12 (60)	0.50
Calcium channel blocker, n (%)	10 (50)	8 (40)	0.73
Long-acting nitrate, n (%)	14 (70)	10 (50)	0.33
Aspirin, n (%)	20 (100)	19 (95)	1.00
ACE inhibitor, n (%)	11 (55)	13 (65)	0.74
Statin, n (%)	12 (60)	12 (60)	1.00
Fibric acid derivatives, n (%)	5 (25)	2 (10)	0.47

LVEF indicates left ventricular ejection fraction; BP blood pressure; bpm beats per minute: 1,2,3 vessels disease correspond ≥75% coronary stenosis; ACE angiotensin converting enzyme; a ECA enzima de conversão da angiotensina. Data expressed as mean ± standard deviation, n (%) frequencies and percent. Statistical analyses calculated with Pearson Chi-Square. [†] 2-tailed Student's *t* test.

Table 3. Data analyzed from treadmill stress tests in diuretic and placebo groups at initial and final testing with delta between the tests.

	Testing day 1			Testing day 21			Delta		
	Diuretic	Placebo	<i>P</i>	Diuretic	Placebo	<i>P</i>	Diuretic	Placebo	<i>P</i>
	n=20	n=20		n=20	n=20		n=20	n=20	
Walking time, s	275±110	320±130	0.23	338±110	340±140	0.97	63±74	19.4±42	0.02
Distance, m	264±120	315±170	0.28	344±160	337±190	0.90	80±83	22±58	0.01
ST-segment, mm	-1.05±1.6	-1.36±1.3	0.52	-0.49±1.7	-1.32±1.6	0.11	0.56±0.7	0.04±0.8	0.03
METs reached	5.7±1.1	6.1±1.6	0.33	6.5±1.3	6.4±1.5	0.98	0.8±0.9	0.3±0.6	0.08
RPP x 10 ³	18.0±3.9	19.1±5.5	0.47	18.4±5.0	19.4±5.0	0.54	0.42±4.2	0.29±3.1	0.91
Creatinine, mg% †	0.96±0.17	0.98±0.19	0.75	1.07±0.22	1.00±0.19	0.28	0.11±0.17	0.02±0.14	0.07
Potassium, mEq/l †	4.3±0.4	4.4±0.4	0.38	4.4±0.3	4.5±0.4	0.38	0.1±0.5	0.1±0.3	1.00
SBP at rest, mmHg	132±17	131±15	0.84	130±19	129±22	0.87	-2±10	-2±22	1.00
DBP at rest, mmHg	81±7	84±9	0.28	78±11	82±9	0.22	-3±9	-2±6	0.68
HR at rest, bpm	72±16	70±13	0.76	72±14	69±12	0.36	0±12	-1.7±7	0.57
Weight, kg	75.8±19	73.9±12	0.70	75.3±19	73.7±12	0.75	-0.5±1.3	-0.2±1.0	0.41

SBP indicates systolic blood pressure; DBP diastolic blood pressure; HR heart rate; bpm beats per minute; METs metabolic equivalents (1 MET = oxygen consumption of 3.5 ml/Kg/min). RPP rate pressure product. Data expressed as mean ± standard deviation. †Samples blood collected at baseline and week 2. *P* calculated with 2-tailed Student's *t* test.

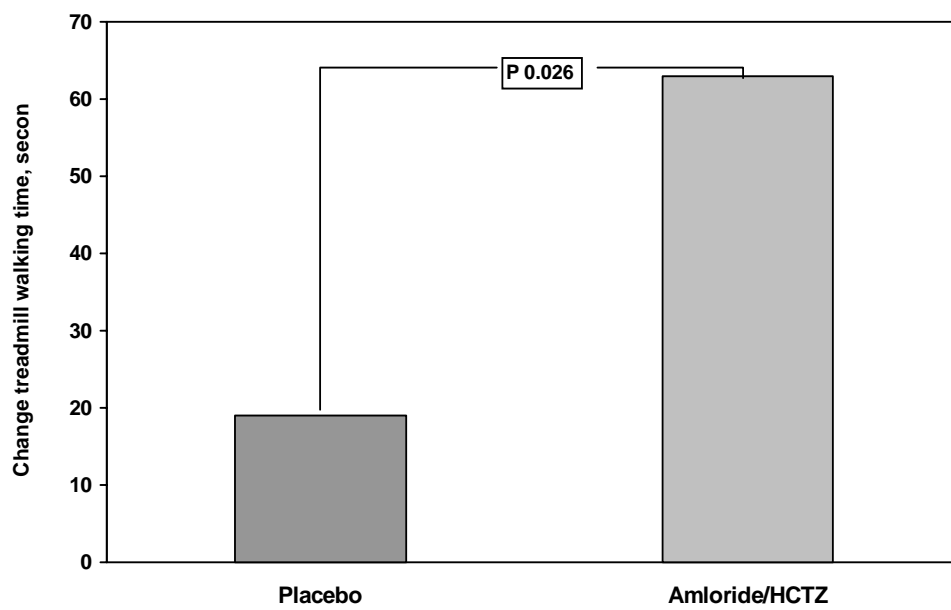


Figure 1. Graph showing the change in treadmill-walking time in seconds to development of moderate angina (P2) between groups. Data represented as mean. Delta *P* calculated with 2-tailed Student's *t* test.

References

01. Staniforth AD. Contemporary management of chronic stable angina. *Drugs Aging*. 2001; 18(2): 109-121.
02. Berger P. Ranolazine and Other Antianginal Therapies in the Era of the Drug-Eluting Stent *JAMA*, Jan 2004; 291: 365 - 367.
03. Parker JO, Case RB, Khaja F, Ledwich JR, et al. The influence of changes in blood volume on angina pectoris: a study of the effect of phlebotomy. *Circulation*. 1970; 41: 593-604.
04. Nechwatal W, Konig E, Greding H et al. Hemodynamic and electrocardiographic effects of furosemide during supine exercise patients with angina pectoris. *Br Heart J*. 1980; 44: 67-74.
05. Parker JD, Parker AB, Farrel B, Parker JO. Effects of diuretics therapy on the development of tolerance to nitroglycerin an exercise capacity in patients with chronic stable angina. *Circulation*. 1996; 93: 691-6.
06. Karmazyn M, Ray M, Haist JV. Comparative effects of Na⁺/H⁺ exchange inhibitors against cardiac injury induced by ischemia/reperfusion, hypoxia/reoxygenation, and calcium paradox. *J Cardiovascular Pharmacol*. 1993; 21: 172-78.
07. Schiller NB, Shah PM, Crawford M. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantification of Two-Dimensional Echocardiograms. Recommendations for quantification of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 1989; 2:358-67.

08. Fletcher FG et al. Exercise Standards goes Testing and Training: Statement goes Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation*. 2001; 104: 1694.
09. Gianni C, Pavesi PC, Medda M, et al. Long-term prognosis of painless exercise-induced ischemia in stable patients with previous myocardial infarction. *Am Heart J*. 1998; 136(5): 894-904.
10. Allred EN, Bleecker ER, Chaitman BR, et al. Effects of carbon monoxide on myocardial ischemia. *Environ Health Perspect*. 1991; 91: 89-132.
11. Allred EN, Bleecker ER, Chaitman BR, et al. Short-term effect of carbon monoxide exposure on the exercise performance of subjects with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1989; 321:1426-32.
12. Serro-Azul JB, Paula RS, Grupi C. et al. Effects of chlorthalidone and diltiazem on myocardial ischemia in elderly patients with hypertension and coronary artery disease. *Arq Bras Cardiol*. 2001; 76(4): 268-72.
13. Avkiran M. "New Approaches to Myocardial Protection" symposium held at the Hilton Anaheim in Anaheim, California on November 10, 2001.
14. Lazdunski M et al. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol*. 1985; 17: 1029-42.
15. Karmazyn M. Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na/H exchange. *Am J Physiol*. 1988; 255: H608-H616.

16. Karmazyn M. The myocardial sodium-hydrogen exchanger (NHE) and its role in mediating ischemic and reperfusion injury. *Keio J Med.* 1998 Jun; 47(2): 65-72.
17. Gumina RJ, Buerger E, Eickmeier C. et al. Inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger confers greater cardioprotection against 90 minutes of myocardial ischemia than ischemic preconditioning in dogs. *Circulation.* 1999; 98: 2519–2526.
18. Avkiran M. Protection of the Myocardium During Ischemia and Reperfusion Na⁺/H⁺ Exchange Inhibition Versus Ischemic Preconditioning. *Circulation.* 1999;100: 2469.
19. Packer M. Drug therapy: combined beta-adrenergic and calcium-entry blockade in angina pectoris. *N Engl J Med.* 1989; 320: 709-18.