

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

**EFEITO DA TERAPIA COM AMILORIDA NA CAPACIDADE DE
EXERCÍCIO E NA PERFUSÃO MIOCÁRDICA NA ANGINA
ESTÁVEL**

Ensaio clínico randomizado cruzado

Helius Carlos Finimundi

Orientador: Dr. Paulo Ricardo Avancini Caramori

Co-Orientador: Dr. John D. Parker

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

Porto Alegre, maio de 2010

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.

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, como co-orientador, prestando inestimável colaboração para realização deste trabalho.

Ao Dr. Luciano Cembrani médico chefe do serviço de Medicina Nuclear da Vero Clínica, pelo empenho e dedicação na realização e supervisão dos exames de medicina nuclear.

Ao Dr. Rodrigo Paiva médico cardiologista, pela importante participação na análise e interpretação dos testes ergométricos.

Ao Dr. Gabriel Grossman e Dr. Eduardo Ludwig, pela importante contribuição na interpretação dos exames de medicina nuclear.

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

A Vero Clínica Medicina Nuclear, na pessoa de seu diretor Dr. Nero Castro, pelo espírito científico e de apoio em prol da pesquisa cedendo suas instalações e equipamentos, foi de fundamental importância na realização desse estudo

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

A Bellafarma farmácia industrial, na pessoa da farmacêutica Flora Beatriz Muratore Toniolli responsável pelo preparo, randomização e certificação das análises das medicações fornecida aos pacientes do estudo.

SUMÁRIO

1. Artigo de Revisão	07
2. Artigo em Português	34
Resumo	35
Introdução	37
Métodos	38
Resultados	46
Discussão	47
Tabelas	51
Referências	55
3. Artigo em Inglês	62
Abstract	63
Introduction	65
Methods	66
Results	73
Discussion	75
Tables	78
References	82

ARTIGO DE REVISÃO

Papel da Glicoproteína Trocadora de Sódio/Hidrogênio como Estratégia na Proteção Miocárdica

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

¹ Doutorando 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 pela 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

Novas terapias têm sido estudadas, a fim de diminuir a repercussão celular durante isquemia e proteger as células miocárdicas das conseqüências prejudiciais do fenômeno de reperfusão, ou lesão de reperfusão, desencadeada principalmente pela ativação da glicoproteína trocadora de sódio/Hidrogênio (NHE). Essa proteína, cuja principal função seria manter a integridade do pH das células miocárdicas durante a isquemia, pode alterar-se de forma paradoxal e precipitar necrose celular na reperfusão, por determinar um acúmulo de cálcio intracelular. Dos agentes com capacidade de inibir a NHE, a amilorida, foi a primeira droga que mostrou essa propriedade. Outros inibidores da NHE mais potentes, como cariporide, eniporide e zoniporide, foram também avaliadas através de ensaios clínicos.

Nesta revisão, analisaremos os mecanismos a nível celular envolvidos no processo de isquemia, as intervenções que preservam ou melhoram a viabilidade miocárdica durante a isquemia e reperfusão, limitando a extensão do infarto do miocárdio, e os resultados dos principais estudos clínicos envolvendo os inibidores da NHE e sua aplicabilidade potencial.

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

Introdução

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, estabilizando lesões pré-existentes, drogas que suprimem a trombose intracoronariana e drogas ou intervenções que restabelecem o fluxo ou reduzem o consumo de oxigênio pelo miocárdio. Os agentes cardioprotetores diretos, que têm como alvo o metabolismo das células miocárdicas são uma alternativa adicional no arsenal terapêutico da cardiopatia isquêmica.¹

No infarto agudo do miocárdio, limitação da área de necrose diminui a mortalidade e apresenta melhor prognóstico tardio.¹ Reperusão coronariana precoce com sucesso também está associada com menor necrose e marcada redução da mortalidade.^{1,2} No entanto, durante o restabelecimento do fluxo coronariano o miocárdio persiste isquêmico. Embora a reperusão melhore a circulação coronariana, paradoxalmente pode causar mais necrose celular.³ Portanto, reperusão epicárdica com sucesso pode estar associada com fenômeno de "no reflow" a nível celular.⁴ Baseado acima, permanece a necessidade de estratégias efetivas de cardioproteção contra a lesão de reperusão. As estratégias podem ser empregadas em três intervalos de tempos distintos, antes do início da isquemia, após o início da isquemia, mas antes da reperusão e após reperusão.⁵

Respostas celulares adaptativas frente à isquemia miocárdica

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.⁶

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

Stunning foi primeiramente descrito por Heyndricks e col. em 1975, para caracterizar uma forma prolongada de disfunção contrátil ou 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.⁷

O termo miocárdio hibernado, foi descrito inicialmente por Rahimtoola e col. em 1982 como sendo uma forma prolongada de disfunção contrátil do miocárdio, associada com 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 stunning. Com o restabelecimento do fluxo coronariano, ocorre uma melhora rápida da função contrátil ventricular, tendo-se a hipótese de que o miocárdio se adapta a reduzida perfusão e à isquemia crônica, diminuindo a contratilidade, economizando sua demanda energética e preservando a viabilidade celular.^{8,9}

O pré-condicionamento isquêmico, primeiramente descrito por Murry e col. em 1986, estaria vinculado a um mecanismo cardioprotetor, onde o coração,

quando exposto a curtos e controlados episódios de isquemia-reperfusão subletal, de alguma forma se protegeria para atenuar dano celular causado por prolongados e repetitivos episódios de isquemia.^{10,11} Duas fases no condicionamento isquêmico são reconhecidas: precoce e tardia, com duração total aproximada de 72 horas. Na fase precoce do condicionamento, substâncias endógenas são liberadas, incluindo adenosina, bradicinina, peptídeos opióides, que se ligam aos miócitos via receptores específicos. Na fase tardia acredita-se que esse efeito cardioprotetor seja modulado através do complexo processo bioquímico enzimático da Kinase, levando a abertura dos canais de potássio ATP sensíveis (K_{ATP}) na membrana das mitocôndrias.^{12,13}

Em 1985, Landunski e col. descreveram a hipótese da participação da glicoproteína trocadora de sódio/hidrogênio (NHE) nos mecanismos que contribuíam no dano miocárdico e sua disfunção durante condições de isquemia e reperfusão, e desde então, esse assunto tem despertado grande interesse científico.¹⁴

NHE e a lesão de reperfusão

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.¹⁵ 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 mitocôndrias. NHE-6 tem o papel de regular o pH intramitocondrial, sendo o mais importante modulador do cálcio, principalmente em condições patológicas.¹⁵ 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.¹⁶

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. Porém o fenômeno de isquemia-reperfusão passa a ter uma importante contribuição na morte celular miocárdica.¹⁷ Os passos desse fenômeno 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.^{18,19} 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. (Figura 1).

-Durante isquemia: Em situações isquêmicas, há uma diminuição do aporte de oxigênio ao nível celular. As células passam a apresentar metabolismo anaeróbico, ocorrendo um acúmulo intracelular de prótons (H^+), gerados pela produção de lactato e pela degradação do ATP,²⁰ levando à 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, agonistas adrenérgicos alfa1, trombina e fatores de crescimento.²¹⁻²³ Metabólitos oriundos da cardiotoxicidade isquêmica intracelular, como o peróxido de hidrogênio e a lisofosfatidilcolina via proteína quinase C igualmente estimulam a NHE-1.^{24,25} 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 conseqüência, 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. 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 (*washout*) do extracelular, removendo 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.²⁶(Figura 2).

-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).

Estratégias de proteção miocárdica a nível celular

Intervenções em vários alvos bioquímicos celulares podem apresentar novas possibilidades terapêuticas em limitar ou retardar a morte celular durante a isquemia e reperfusão. Três estratégias celulares de abordagem têm sido propostas na proteção miocárdica, a via da NHE, do condicionamento e da apoptose.²⁷

A via da NHE, predispondo ao acúmulo de cálcio intracelular, que acarretaria em efeitos deletérios com conseqüente aceleração da morte celular. A inibição da NHE atenuaria este mecanismo de lesão, limitando o tamanho do infarto do miocárdio.

O condicionamento é uma resposta adaptativa dos miócitos. Vários mediadores são liberados durante um processo isquêmico celular incluindo, adenosina, noradrenalina, bradicinina e peptídeos opióides. Estes mediadores atuam via sete receptores transmembrânicos acoplados a proteína G (receptores

de adenosina A1 e A3, receptores δ -opioides e receptores B2 da bradicinina, e iniciam sinalizando a complexa cascata da Kinase que abre os canais de potássio ATP dependente (K_{ATP}) na membrana das mitocôndrias. Esses canais são a via final efetiva do condicionamento, a abertura dos canais de potássio proporciona uma melhor viabilidade dos miócitos durante a isquemia através de um mecanismo que envolve a preservação da integridade mitocondrial e da capacidade geradora ATP. Há várias possibilidades para exploração do condicionamento farmacológico. Em modelos experimentais a ativação farmacológica dos receptores agonistas da adenosina A1 e A3 e dos receptores δ -opioides induziram ao condicionamento isquêmico reduzindo o tamanho do infarto. A produção endógena de bradicinina, potencializada pelos inibidores da enzima de conversão da angiotensina I e pelos inibidores da endopeptidase que reduzem a degradação da bradicinina, promove efeito protetor nos miócitos durante a isquemia.

A característica patológica predominante no infarto do miocárdio é a morte celular. Porém, a apoptose é reconhecida como um mecanismo adicional de morte celular que pode ser ativada, particularmente durante a reperfusão. A regulação da via apoptótica é extremamente complexa e pouco compreendida, mas a inibição do apoptose pode ser uma alternativa terapêutica para salvar miócitos durante a isquemia e reperfusão. Os inibidores da caspase e os fatores de regulação do crescimento como a insulina e fator de crescimento tumoral β_1 (TGF- β_1), mostraram limitar o tamanho do infarto quando administrados na fase precoce da reperfusão.²⁷

Mais recentemente, as estratégias de cardioproteção têm sido classificadas em metabólicas, iônicas e sinalizadoras. Na cardioproteção metabólica a inibição do metabolismo dos ácidos graxos ao nível das mitocôndrias dos miócitos e a estimulação da oxidação da glicose através da inibição da 3-Ketoacetyl-Coa-Tiolase (3-KAT), resultariam numa maior produção de ATP, preservando as funções vitais dos miócitos. Representando esse grupo temos a trimetazidina e a ranolazina. A cardioproteção iônica está vinculada à prevenção do acúmulo de sódio e cálcio intracelular, através da inibição da NHE. A amilorida e seus derivados, cariporide, eniporide e o zoniporide mostraram essa propriedade.

Na estratégia sinalizadora, a inibição das vias enzimáticas prejudiciais, durante um processo isquêmico celular, limitaria a apoptose precoce e favoreceria as vias enzimáticas protetoras do condicionamento isquêmico, através da modulação da via da Kinase.²⁸

Estudos clínicos visando a cardioproteção celular

Durante os últimos anos, várias intervenções terapêuticas foram avaliadas visando reduzir à lesão de reperfusão. Porém nenhuma estratégia foi adotada na prática clínica rotineira como uma intervenção de cardioproteção. Exemplos bem conhecidos incluem o tratamento com magnésio no infarto, que foi assunto de dois ensaios clínicos grandes e contraditórios (LIMITE-2 e ISIS-4).^{29,30} No LIMITE-2, estudo com 2316 pacientes, magnésio foi administrado antes da trombólise e mostrou ser protetor. No ISIS-4, estudo com 58050 pacientes, magnésio foi administrado depois da trombólise e não mostrou ser protetor.³¹ Tratamentos com glicose-insulina-potássio (GIK) ou solução polarizante no infarto agudo do

miocárdio foi proposto na década de 70, como substrato metabólico na proteção da viabilidade das células miocárdicas em sofrimento isquêmico. Em 2005 foi publicado o CREATE-ECLA com 20201 pacientes, onde a GIK não evidenciou benefício nos desfechos clínicos avaliados.³² Adenosina foi avaliada recentemente, durante a terapia de reperfusão no infarto, pelo estudo AMISTAD I. Estudo pequeno com 236 pacientes mostrou evidências de limitação no tamanho do infarto anterior, porém no AMISTAD II com 2118 pacientes nenhuma evidência de benefício em relação aos desfechos de morbidade e mortalidade foram demonstrados.³³

Estudos clínicos com inibidores da NHE-1

Após a descrição inicial de Karmazyn e col.¹⁷ de que o amilorida inibe a NHE, outras drogas foram desenvolvidas, incluindo algumas altamente específicas como o cariporide, eniporide e zoniporide.³⁴⁻³⁷ 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. 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 miocárdio³⁸

Quatro grandes estudos clínicos delineados para testar a eficácia dos inibidores NHE-1 foram concluídos.¹⁶

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 inicio 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.³⁹

Zeymer et al publicaram os resultados do ESCAMI (**E**valuation of the **S**afety and **C**ardioprotective effects of eniporide in **A**cute **M**ycocardial **I**nfarction), 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 foram avaliadas 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.⁴⁰

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 à 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.⁴¹

Mentzer et al publicaram os resultados do EXPEDITION (Na⁺/H⁺ **EX**change inhibition to **P**revent coronary **E**vents in acute cardiac con**DITION**s). 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.⁴²

Recentemente Finimundi et al, publicaram estudo indicando que a terapia combinada de hidroclorotiazida e amilorida apresenta potente efeito aditivo antianginoso em pacientes com angina estável e função ventricular esquerda normal, em vigência de medicação antianginosa convencional, através de um significativo aumento do tempo de esforço e redução de evidências

eletrocardiográficas de isquemia miocárdica. Esse estudo, porém não permitiu avaliar o efeito antianginoso individual da amilorida e da hidroclorotiazida.⁴³

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, evidenciando 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 à indesejável complicação do acidente vascular cerebral. Talvez a solução potencial do problema seja a redução da dose do cariporide endovenoso, ou administração de baixas doses diretamente na circulação coronária 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

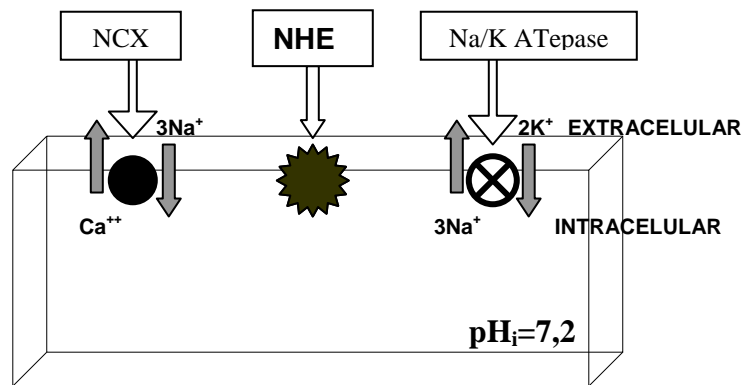


Figura 1. Sem isquemia o pH intracelular em 7,2 a bomba sódio/potássio com consumo de ATP troca 2 íons K^+ por 3 Na^+ . A NCX troca 3 Na^+ por 1 Ca^{++} . A NHE permanece desativada.

Isquemia

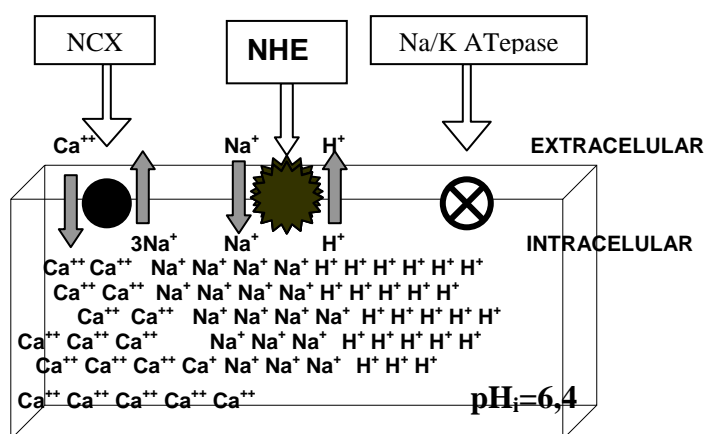


Figura 2. Durante isquemia o pH intracelular baixa para 6,4 a bomba sódio/potássio para de funcionar. A NHE é estimulada e passa eliminar 1H^+ em troca por 1Na^+ sem consumo energético. A NCX elimina 3Na^+ por 1Ca^{++} promovendo “sobrecarga de cálcio” intracelular.

Isquemia + Inibidor da NHE

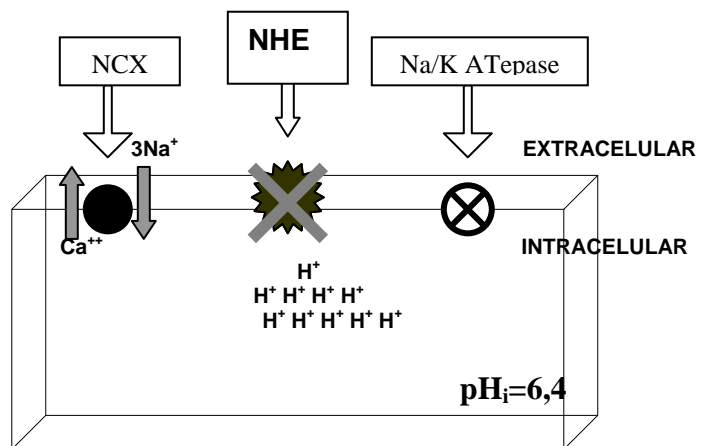


Figura 3. Durante isquemia em vigência de inibidor da NHE o pH intracelular fica em torno de 6,4 a bomba sódio/potássio para de funcionar. A NHE fica inibida e NCX não permite a entrada de Ca^{++} protegendo a célula.

Referências

- 1- GUSTO Angiographic investigators. The effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary-artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1993;329:1615–1622.
- 2- ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) collaborative group. Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet.* 1988;2:349–360.
- 3- Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC. Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation.* 1998;97:795–804.
- 4- de Lemos JA, Antman EM, Gibson CM, et al. Abciximab improves both epicardial flow and myocardial reperfusion in ST-elevation myocardial infarction. Observations from the TIMI-14 trial. *Circulation.* 2000;101:239–243.
- 5- Menown IA, Adgey AA. Cardioprotective therapy and sodium-hydrogen exchange inhibition: current concepts and future goals. *J Am Coll Cardiol.* 2001; 38:1651-1653.
- 6- Reimer K and Jennings R B.: Myocardial ischemia, hypoxia and infarction. In Fozzard H A; Haber E; Jennings R B; et al. *The Heart and Cardiovascular System.* 2nd ed. New York, Raven Press 1991:1875-1974.

- 7- Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner F. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest.* 1975;56:978–985.
- 8- Rahimtoola S. Coronary bypass surgery for chronic angina—1981: a perspective. *Circulation.* 1982;65:225–241.
- 9- 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
- 10-Murry CE, Jennings RB, Reimer KA, Preconditionin with ischemia; a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;75:1124-1136.
- 11-Kloner RA, Bolli R, Marbam E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation and preconditioning. An NHLBI Workshop. *Circulation,* 1998;97:1848-1867.
- 12-Yellon DM, Baxter GF. Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart.* 2000;83:381–387.
- 13-Dana A, Baxter GF, Walker JM, et al. Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A1 receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:1142–1149.
- 14-Lazdunski M Frelin C, Vigne P. 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 nov;17 (11):1029-4.
- 15-Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusomoto K. The myocardial Na⁺/H⁺ exchange structure, regulation, and its role in heart disease. *Circulation Research*. 1999;85:777-786.
- 16-Théroux P. Myocardial cell protection: a challenging time for action and a challenging time for clinical research. *Circulation*. 2001;101:2874-2876.
- 17-Karmazyn M. Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na⁺/H⁺ exchanger. *Am J Physiol*. 1988;83:10G-18G
- 18-Avkiran M, Marber MS. Na⁺/H⁺ exchange inhibitors for cardioprotective therapy: Progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(5):747-5.
- 19-Karmazyn M. Mechanisms of protection of de ischemic and reperfused myocardium by sodium-hydrogen exchange inhibition. *J Tromb Trombolysis*. 1999(1):33-8.
- 20-Tosaki A, Engelman R, Maulik N. Mechanisms and consequences of apoptosis in myocardial ischaemia reperfusion-induced injury. *Landes Biocience*. 1999 volume 1 issue 1.
- 21-Khandoudi N, Ho J, Karmazyn M. 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.
- 22-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.

- 23-Matsui H, Barry WH, Livsey C, Spitzer KW. Angiotensin II stimulates sodium-hydrogen exchange in adult rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 1995;29:215–221.
- 24-Mattiuzzi A, Perez NG, Vila-Petrof MG, Alvarez B, Camillon De Hurtado MC, Cingolani HE. Dissociation between positive inotropic and alkalinizing effects of angiotensin II in feline myocardium. *Am J Physiol.* 1997;272:H1131–H1136.
- 25-Hoque ANE, 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.
- 26-Karmazyn M. The myocardial sodium-hydrogen exchanger (NHE) and its role in mediating ischaemic and reperfusion injury. *Keio J Med* 1998 jun;47(2):65-72.
- 27-Yellon DM, Baxter GF. Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart* 2000;83:381-387.
- 28-Avkiran M. Different strategies for cardiac protection: metabolic, ionic, signaling. *Heart and Metabolism* 2002; 12:3-8
- 29-Woods KL, Fletcher S, Roffe C, et al. Intravenous magnesium sulphate in suspected acute myocardial infarction: results of the second Leicester intravenous magnesium intervention trial (LIMIT-2). *Lancet* 1992;339:1553-1558.

- 30-ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. ISIS-4: a randomized factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58 050 patients with suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1995;345:669-685.
- 31-Horner SM. Efficacy of intravenous magnesium in acute myocardial infarction in reducing arrhythmias and mortality. Meta-analysis of magnesium in acute myocardial infarction. *Circulation* 1992;86:774-79.
- 32-Mehta SR, Yusuf S, Diaz R, Zhu J, et al. Effect of glucose-insulin-potassium infusion on mortality in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction: the CREATE-ECLA randomized controlled trial. *JAMA* 2005;293:437-46.
- 33-Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata NA, et al. Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the acute myocardial infarction study of adenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1711-1720.
- 34-Hearse DJ. The protection of the ischemic myocardium: surgical success vs clinical failure. *Prog Cardiovasc dis* 1988;30:381-402.
- 35-Avkiran M. Rational basis for use of sodium-hydrogen exchange inhibitors in myocardial ischemia. *Am J Cardiol*. 1999;83:10G-18G.
- 36-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.
- 37-Gumina RJ, Mizumura T, Beier N, Schelling JL, Gross GJ. 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.
- 38-Karmazyn M, Sostaric JV, Gan XT. The myocardial Na⁺/H⁺ exchange: a potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischaemic and reperfusion injury and attenuation of post infarction heart failure. *Drugs* 2001;61(3):375-79.
- 39-Rupprecht, HJ, Dahl JV, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, 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.
- 40-Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, et al. The Na⁺/H⁺ exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reoerfusion therapy for acute myocardial infarction. *J. Am Coll Cardiol.* 2001;38:1644-501.
- 41-Thérroux P, Chaitman BR, Danchin L, Erhardt L, Meinertz T 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.
- 42-Mentzer, RM Jr, the EXPEDITION Study Investigators. Effects of Na⁺/H⁺ exchange inhibition by cariporide on death and nonfatal myocardial infarction in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: The EXPEDITION study. *Circulation.* 2003; 108: 3M.

43-Finimundi HC, Caramori P, Parker JD. Effect of diuretic therapy on exercise capacity in patients with chronic angina and preserved left ventricular function. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2007;49:275–279.

**Efeito da Terapia com Amilorida na Capacidade de
Exercício e na Perfusão Miocárdica na Angina Estável**
Ensaio clínico randomizado cruzado

Helius C Finimundi, MD,* Paulo Caramori, MD, PhD,*† and John D Parker, MD, FRCP‡

* †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.

‡Department of Medicine, University Health Network and Mount Sinai Hospitals, University of Toronto, Toronto, Canada.

Endereço para correspondência:
Dr. Paulo 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 a combinação da hidroclorotiazida e da amilorida é efetivamente antianginosa. Amilorida, um inibidor da glicoproteína trocadora de sódio/hidrogênio, mostrou-se cardioprotetora em situações de isquemia, particularmente em modelos de reperfusão. O objetivo do presente estudo foi avaliar se a terapia com amilorida, de forma isolada, quando comparada com placebo, possui efeito antianginoso aditivo em pacientes com angina estável, já em uso de medicação antianginosa tradicional.

Métodos: Onze pacientes portadores de angina estável e com função sistólica ventricular esquerda normal foram selecionados para um estudo randomizado, cruzado, duplo-cego, controlado por placebo. Pacientes receberam amilorida 5mg ou placebo por 3 semanas em ambos períodos, intercalados por 2 semanas de wash-out. Ao fim de cada período, todos pacientes foram submetidos a um teste ergométrico em esteira rolante com protocolo de Bruce, associado à cintilografia miocárdica perfusional de estresse e repouso. O desfecho primário foi a variação do tempo de esforço na esteira, em segundos, até o aparecimento de angina moderada.

Resultados: O tempo total de caminhada na esteira, em segundos, até o aparecimento de angina moderada (P2), durante o tratamento com amilorida foi somente 2,2 segundos diferente do que o observado durante o período do tratamento com placebo. (P=0,75; IC 95%= -18 a 27,3). Similarmente o tratamento com amilorida, não apresentou mudanças nos escores de perfusão miocárdica e nos parâmetros funcionais do ventrículo esquerdo obtidos pela cintilografia

miocárdica. Não foram observadas diferenças significativas na frequência cardíaca, pressão arterial sistólica e diastólica ou presença de efeitos adversos durante cada período de tratamento.

Conclusão: Esses achados não suportam a hipótese de que a amilorida, quando comparada com placebo, melhora a capacidade de exercício e a perfusão miocárdica através da cintilografia miocárdica, em pacientes com angina estável.

Palavras chaves: Diurético. Angina. Teste ergométrico. Isquemia

Introdução

A angina é uma manifestação clínica comum da doença isquêmica cardíaca e a forma inicial de apresentação de aproximadamente 50% dos pacientes portadores de cardiopatia isquêmica. Estima-se que nos Estados Unidos 6,4 milhões de pessoas apresentam angina estável crônica, com prejuízo da qualidade de vida e também na redução da expectativa. A incidência da angina estável crônica é esperada aumentar em torno de 50% nas próximas três décadas.¹ Apesar da terapia com agentes farmacológicos convencionais e ou revascularização, muitos pacientes continuam sintomáticos. É sabido que, um ano após revascularização coronariana percutânea ou cirúrgica, 25-60% dos pacientes continuam apresentando angina, necessitando de medicação antianginosa complementar.²⁻⁶

Muitos pacientes necessitam mais que monoterapia para controlar seus sintomas anginosos.⁷ A evidencia de que a múltipla terapia antianginosa é efetiva no manejo da angina de esforço é limitada e somente alguns pequenos estudos tem sugerido que a chamada “tríplice terapia” com nitratos de ação prolongadas, betabloqueadores e antagonistas dos canais de cálcio possam levar a mais efeitos colaterais do que benefício terapêutico.^{3,8} Mais recentemente os primeiros novos agentes para o manejo farmacológico da angina de esforço foram introduzidos, demonstrando eficácia junto a pelo menos 1 agente antianginoso tradicional.^{9,10}

Em um estudo prévio, pacientes não hipertensos com angina estável e função ventricular esquerda preservada em uso concomitante de pelo menos uma medicação antianginosa de ação prolongada, a combinação da hidroclorotiazida e

da amilorida mostrou ter um significativo efeito antianginoso.¹¹ Esse estudo seguiu uma publicação prévia onde a combinação hidroclorotiazida e amilorida em pacientes similares que não estavam em uso de nenhuma medicação antianginosa de ação prolongada também demonstrou que a combinação diurética poupadora de potássio significativamente melhorou os sintomas anginosos e a duração do teste de esforço em esteira, quando comparado com placebo.¹² Nesses estudos foi aventado que as propriedades antianginosas observadas poderiam ser resultantes do efeito sustentado dos diuréticos no volume intravascular^{13,14} e/ou efeito único e direto da amilorida, composto protótipo da família dos inibidores da proteína trocadora sódio/hidrogênio (NHE), que mostrou ter um efeito protetor miocárdio em situações de isquemia aguda.¹⁵⁻¹⁷

O objetivo do presente estudo foi avaliar se a terapia com amilorida, quando comparada com placebo, apresenta efeito antianginoso adicional em pacientes com angina estável, já em tratamento medicamentoso convencional otimizado, e com função ventricular esquerda sistólica preservada, através de um aumento do tempo de caminhada na esteira rolante e também, na melhora adicional nos escores de perfusão miocárdica e função ventricular obtidos pelo gated-SPECT.

Métodos

Pacientes

O estudo incluiu 11 pacientes (6 homens e 5 mulheres) portadores de angina estável crônica e em uso de otimizada medicação antianginosa convencional inalterada nos últimos 3 meses. Todos apresentavam sintomas típicos de angina desencadeados aos esforços, por pelo menos 3 meses, apesar

do uso de terapia apropriada. Todos apresentavam doença arterial coronariana documentada angiograficamente com lesões $\geq 70\%$ em pelo menos uma artéria principal, fração de ejeção do ventrículo esquerdo $\geq 50\%$ pelo ecocardiograma bidimensional; e teste ergométrico positivo prévio, com dor típica e infradesnível horizontal ou descendente do segmento ST e pelo menos 1-mm. 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 ECG, depressão do segmento ST em repouso, anemia ou doença hepática clinicamente significativa, creatinina sérica $\geq 1,3\text{mg/dl}$ ou potássio sérico $\geq 5,5\text{mEq/l}$ e uso de terapia diurética ou digitálicos.

Protocolo do estudo

Esse foi um estudo cruzado randomizado duplo-cego controlado por placebo. Após uma análise de todos os critérios de inclusão e exclusão, o termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido. Os sujeitos do estudo foram randomizados para receberem ou amilorida 5 mg ou placebo por um período de 21 dias, de uma maneira duplamente cega. Todos 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 amostra de sangue foi

coletada para dosagem sérica da creatinina e potássio. No 21^o dia, entre as 8hs e 10hs, todos pacientes foram submetidos ao teste ergométrico em esteira rolante com protocolo de Bruce, associado à cintilografia miocárdica perfusional com technetium-99^m methoxy-isobutyl-isonitrile (MIBI-^{99m}Tc) gated-SPECT, protocolo de esforço e repouso de um dia. Subsequente, após um período de duas semanas de washout, todos os sujeitos cruzaram para outra fase de igual tratamento.^{18,19} A medicação antianginosa em uso não foi interrompia ou modificada durante todo o período de estudo.

Estudo da função ventricular esquerda

Todos pacientes foram submetidos à ecocardiografia transtorácica, de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia.²⁰ Um experiente ecocardiografista, cego aos dados clínicos dos pacientes, realizou todos os exames usando as janelas parasternal e apical para calcular dimensões e avaliar a função contrátil global e segmentar do ventrículo esquerdo. O diâmetro diastólico final e diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo foram obtidos através da janela parasternal longitudinal. O volume diastólico final e o volume sistólico final foram obtidos através da janela apical de quatro e de duas câmaras. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi calculada pela fórmula de Simpson.

Teste ergométrico

Todos os testes ergométricos obedeceram as recomendações das diretrizes de 2002 do American College of Cardiology (ACC) da American Heart Association (AHA) para realização de testes ergométricos²¹ e foram executados por um investigador cegado em relação aos tratamentos do estudo. Para realização dos testes foi utilizado o protocolo standard de Bruce.

Eletrocardiogramas com 13 derivações (12 convencionais mais CM5) foram registrados na posição sentada e ortostática antes do início do exercício, ao final de cada estágio, imediatamente após o término do esforço e durante o período de recuperação. Os pacientes foram instruídos a indicar o início da angina (P1) e continuar o exercício até a angina se tornar moderada (P2), onde normalmente costumam interromper o esforço devido a dor. A pressão arterial foi verificada sempre com o mesmo esfigmomanômetro, na posição sentada e ortostática, antes do início do teste, durante os 30 segundos restantes de cada estágio, em P1 e P2 e no pós-esforço imediato e tardio. O esforço foi continuado até o aparecimento de angina moderada (P2) ou 1 dos seguintes sinais: infradesnível horizontal ou descendente do segmento ST ≥ 3 -mm, elevação da pressão sistólica acima de 220 mmHg ou queda superior a 10 mmHg.

Análise do segmento ST

O traçado eletrocardiográfico de 13 derivações foi continuamente monitorado durante o teste ergométrico com vistas à análise do ritmo, frequência cardíaca, arritmias e alterações do segmento ST. O desvio do segmento ST foi medido 80 ms após o ponto J, utilizando o fim do segmento P-R como referência. Um investigador, cegado à ordem dos tratamentos do estudo, interpretou todos os testes. As alterações do segmento ST foram medidas na derivação que apresentasse a maior alteração de variação do segmento ST, em ambos os testes ergométricos de cada paciente.

Cintilografia miocárdica perfusional – Instrumentação e protocolo

Todos os exames foram executados de acordo com as recomendações da ACC/AHA/ASNC, referente à utilização para uso clínico de exames de imagens com radioisótopos.²² Utilizou-se o protocolo padrão de esforço-reposo de um dia com radiofármaco único, foi administrado uma injeção endovenosa de 12mCi de MIBI-^{99m}Tc no pico do esforço e mantido por 1 minuto adicional. Para a fase de repouso, 3 horas após, 36mCi de MIBI-^{99m}Tc foi injetado. O tempo de aquisição das imagens para ambas as fases (estresse e repouso) foi de 30-60 minutos pós MIBI-^{99m}Tc. Imagens foram adquiridas através de gama-câmara de cristal único (Siemens, Berlin, Alemanha) equipada com colimador de baixa energia e alta resolução (LEHR) com varredura orbital de 180° e conexão para ECG. Não foram utilizadas correções para dispersão e ou atenuação. As imagens transaxiais foram orientadas no eixo menor, eixo maior vertical e horizontal.

Análise visual das imagens de perfusão Gated- SPECT

Dois médicos experientes em cardiologia nuclear, neutros no estudo, e cegado aos dados do paciente, realizaram a interpretação visual dos exames, através da observação das imagens projetadas no monitor do computador, as quais foram permitidas a revisão em ambos os formatos contínuos de cores, escala de níveis de cinza e escalas coloridas (como arco-íris ou metal quente). Para análise da perfusão ventricular foi utilizada a escala visual semiquantitativa para sistemas de escores, que considerou a soma dos escores de estresse (SSS) que representa os defeitos de captação da perfusão no esforço, a soma das diferenças dos escores (SDS) que representa o grau de reversibilidade dos defeitos de captação, sendo essa originada da diferença do SSS e da soma dos

escores de repouso (SRS) e o déficit total de perfusão (TPD) que representa a percentagem dos defeitos de perfusão do miocárdio expressados em magnitude de extensão e severidade. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) pós-estresse foi considerada como medida da função ventricular esquerda global.

As imagens de perfusão miocárdica foram interpretados usando o método validado e padronizado de análise visual semiquantitativa utilizando tomogramas de imagens do eixo menor, eixo maior vertical e horizontal e divididas em 17 segmentos e modelo de 5 pontos para o ventrículo esquerdo. (0= captação normal, 1= captação discretamente reduzida, 2= captação moderadamente reduzida, 3= captação acentuadamente reduzida, 4= captação ausente). O SSS, SRS foram calculados diretamente através da adição de escores dos 17 segmentos no estresse e no repouso respectivamente e o SDS (diferença do SSS-SRS). Um segmento foi considerado isquêmico se observada presença de reversibilidade entre o esforço e repouso.²³⁻²⁵ Mapas polares de reconstrução bidimensional da perfusão ventricular esquerda foram gerados e avaliados.

Análise quantitativa do gated-SPECT

A FEVE pós-estresse foi avaliada através do eixo menor e calculada utilizando software de processamento automático de dados obtidos da sincronização do ciclo cardíaco pelo ECG (quantitative gated-SPECT [QGS], versão 2; Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA) capaz de gerar imagens dinâmicas 3-D do ventrículo esquerdo, bem como, valores numéricos de volumes e da fração de ejeção. Esse software foi previamente descrito e validado.²⁶⁻²⁹

Desfecho primário

O desfecho primário do estudo foi a capacidade de exercício representada pela variação do tempo de esforço (TE), em segundos, até o aparecimento de angina moderada (P2).

Considerações éticas

O estudo cumpre com a Declaração de Helsinki. O comitê de ética médica e pesquisa do Hospital Pompéia, Caxias do Sul, Brasil, aprovou o protocolo do estudo e todos pacientes deram o consentimento livre e esclarecido por escrito.

Cálculo do tamanho amostral

De acordo com resultado de estudo prévio, que demonstrou que a terapia diurética foi associada com um aumento significativo no tempo de caminhada na esteira até o aparecimento de angina moderada 63 ± 17 segundos comparado com 19 ± 9 segundo no grupo placebo.¹¹ O cálculo amostral indicou a necessidade de incluir nove sujeitos para demonstrar um aumento no tempo de esforço de 44 segundos, assumindo que o desvio padrão se aproximasse de 40 segundos com poder de 90% e 5% de significância. No entanto, visando precaver-se de alguma potencial desistência, onze sujeitos foram selecionados a participar e randomizados para amilorida 5mg e placebo em ambas as fases do estudo cruzado.

Randomização

Onze sujeitos foram randomizados para estudo cruzado de 2 períodos considerando uma sequência de tratamentos (A e B). As medicações do estudo foram encapsuladas para permitir adequado cegamento. Um farmacêutico não envolvido no protocolo do estudo e sem contato com os pacientes preparou as

medicações. Cápsulas contendo placebo ou amilorida foram acondicionadas em frascos selados e rotulados para tratamento A e B, respectivamente. Baseado no desenho do estudo cruzado, à ordem dos tratamentos foi randomizada. Ambas sequências de tratamentos e as respectivas senhas de randomização foram mantidas pelo farmacêutico responsável.

Análise estatística

O método de Hills e Armitage³⁰ para análise de estudo cruzado de dois períodos foi usado para determinar o efeito de tratamento (amilorida versus placebo) nos dados dos testes ergométricos: como tempo de esforço, distância percorrida, duplo-produto e METs alcançados, e também nos dados da cintilografia miocárdica: como SSS, SDS, TPD e FEVE pós-estresse. A análise avaliou para presença de interações entre os dois braços de tratamento. Considerando que uma interação pode ser observada quando um dos períodos do tratamento duplo-cego apresentar um significativo efeito sobre o período de tratamento seguinte. Também foi avaliada possível presença de efeito de período. Esse é detectado quando o resultado observado parece depender da ordem dos tratamentos. De acordo com esse protocolo, as análises foram simplificadas, calculando para cada sujeito a diferença e a média dos dados observados nos dois períodos. Assim sendo, Altman³¹ sugere a utilização de três testes T de 2 amostras (variáveis paramétricas) para identificar efeito de período, interação e efeito de tratamento, respectivamente. A análise dos dados não encontrou nenhuma presença de interação ou efeito de período entre os grupos de tratamentos. As variáveis contínuas foram expressas como médias \pm desvio padrão da média. Um valor P bicaudal menor que 0,05 foi considerado como

indicativo de significância estatística. Todos os cálculos foram processados pelo software do pacote estatístico SPSS versão 15 (SPSS Inc. Chicago, Illinois).

Resultados

As características demográficas basais dos pacientes do estudo estão apresentadas na Tabela 1. Onze pacientes foram randomizados (6 homens e 5 mulheres). A idade média foi de 63 ± 2 anos; o índice de massa corporal foi de $27 \pm 0,8$. A média da FEVE basal pela ecocardiografia foi aproximadamente de $60 \pm 2\%$ (variando de 51% a 72%). Todos pacientes apresentavam doença arterial coronariana, 4 com lesões 3 vasos, 5 com lesões de 2 vasos e 2 tinham lesão de 1 vaso. As medicações antianginosas basal em uso eram 64% de betabloqueador, 46% antagonistas dos canais de cálcio, 46% nitrato de ação prolongada e todos pacientes estavam em uso também de estatinas e aspirina. A pressão arterial sistólica e diastólica basal em repouso eram 121 ± 2 mmHg e 76 ± 1 mmHg, respectivamente.

Não houve mudanças no peso corpóreo, pressão arterial sistólica e diastólica e na frequência cardíaca durante ambos os períodos de seguimento dos pacientes. Similarmente não ocorreram mudanças significativas na creatinina e no potássio sérico em nenhum momento durante o protocolo de estudo, apesar de ter sido observada uma tendência de aumento do potássio de 0,36 mEq/l a favor da amilorida. (Tabela 2).

Considerando que os dois grupos de tratamento não eram do mesmo tamanho, os resultados do efeito de tratamento foram apresentados como efeito-médio nos dois períodos.³¹ Os resultados do testes ergométricos estão

apresentados na Tabela 2. O tempo total de caminhada na esteira até o início de angina moderada (P2) foi aproximadamente idêntico ao observado durante o período de tratamento com placebo (-2.2 segundos com intervalo de confiança de 95% de -18.1 a 27.3 segundos). O desfecho primário e o desempenho de caminhada na esteira durante os períodos de tratamento estão apresentadas na Figura 1. A amilorida também não demonstrou efeito significativo na depressão do segmento ST no pico do exercício, no duplo produto bem como na distância percorrida quando comparada com placebo. A pressão arterial sistólica no pico do exercício foi similar em ambos os tratamentos; amilorida foi 163 ± 4.5 mmHg e placebo 165 ± 6.2 mmHg ($P=0,77$).

Os resultados dos exames cintilográficos perfusionais estão apresentados na Tabela 3. Novamente, a amilorida não teve efeito significativo nas mudanças dos escores de perfusão coronariana esforço-induzido e nas mudanças da fração de ejeção pela cintilografia miocárdica perfusional gated-SPECT.

Todos pacientes randomizados permaneceram estáveis e completaram o estudo. Não houve relato de piora dos sintomas anginosos ou a presença de eventos isquêmicos agudos durante todo o experimento. Também, não foi constatada a presença de efeitos adversos em ambos os grupos de tratamento.

Discussão

Os achados do presente estudo indicam que em pacientes com angina pectoris de esforço, terapia com diurético amilorida, não melhora o tempo de caminhada na esteira, até o aparecimento de angina, nem eventos eletrocardiográficos de isquemia, bem como melhora nos escores miocárdico

perfusionais ou funcionais através da fração de ejeção pós stress quando obtida através de imagens geradas pela cintilografia miocárdica perfusional com ^{99m}Tc-MIBI.

Limitado número de estudos tem avaliado os efeitos da terapia diurética no miocárdio isquêmico. Nechwatal et al,¹³ relataram melhora na angina e aumento na capacidade de exercício em pacientes com doença arterial coronariana estável tratada com furosemida de forma aguda. Serro-Azul et al,³² em um estudo cruzado, duplo-cego controlado por placebo desenhado para avaliar o efeito da clortalidona, em uma população de 15 pacientes idosos e hipertensos, que apresentavam evidências de isquemia miocárdica induzida e função ventricular esquerda normal. Relataram uma melhora na tolerância ao esforço e redução da isquemia miocárdica durante as atividades da vida diária pela monitorização eletrocardiográfica ambulatorial de 24 horas. Parker et al,¹² durante investigação para determinar se terapia diurética poderia prevenir o desenvolvimento de tolerância à nitroglicerina, observou que a terapia diurética com a associação de hidroclorotiazida mais amilorida aumentou a capacidade de exercício em pacientes normotensos portadores de angina estável. Finimundi et al,¹¹ em um estudo paralelo randomizado, confirmou que a associação hidroclorotiazida mais amilorida significativamente aumentou o tempo de caminhada na esteira em pacientes com angina estável tratados ao menos com uma droga antianginosa de ação prolongada, quando comparada ao placebo.

Apesar dos mecanismos antianginosos dos diuréticos não estarem ainda bem definidos, a amilorida mostrou-se ser cardioprotetora em vigência de isquemia, particularmente em modelos de reperfusão.³³ A amilorida poderia

exercer efeitos antianginosos via inibição das glicoproteínas miocárdicas trocadoras de sódio/hidrogênio (NHE). Esse mecanismo iônico de trocas transporta íons sódio e hidrogênio em direções opostas. Por sua ação ao bloquear a NHE, evitando a troca do hidrogênio intracelular pelo sódio extracelular, os inibidores da NHE têm sido propostos como agentes benéficos principalmente em situações de isquemia miocárdica seguidos de reperfusão, por prevenir o acúmulo de cálcio intracelular e os subseqüentes efeitos deletérios na função celular. Sete subtipos diferentes NHE foram identificados até o momento. NHE-1, mais comum e freqüente das isoformas membrano-plasmáticas, é molecularmente homóloga a NHE do sarcolema cardíaco. NHE-1 é especificamente inibida pela amilorida e um número subseqüentes de drogas análogas que foram desenvolvidas.³⁴ A NHE miocárdica representa um dos principais mecanismos para regulação do pH intracelular em resposta à acidose isquemia-induzida.³⁵ Vários estudos usando inibidores da NHE-1 têm consistentemente mostrado efeitos protetores na lesão de isquemia e reperfusão miocárdica em grande variedade de trabalhos em modelos animal.³⁶ Karmazyn foi o primeiro investigador a demonstrar que a amilorida aumentou a recuperação pós-isquêmica da função contrátil e reduziu o tamanho do infarto em corações de ratos submetidos à isquemia global e reperfusão.³⁷ Embora exista substancial documentação desse efeito em modelo animal, e alguma evidencia que drogas análogas a amilorida são protetoras em modelos humanos de isquemia e lesão de reperfusão,³⁸⁻⁴² não há estudos examinando o impacto direto da amilorida na resposta do miocárdio humano tanto na isquemia de demanda como na isquemia da lesão de reperfusão .

Nosso estudo foi desenhado para avaliar o efeito antianginoso individual da amilorida. Nossos achados não mostraram evidencia de um efeito benéfico significativo em prevenir sintomas e nem respostas miocárdicas perfusionais frente a um aumento do consumo de oxigênio induzido pelo teste de esforço. Apesar do pequeno tamanho amostral esse estudo cruzado teve poder significativo para excluir erro do tipo II com 90% de certeza.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer ao Dr. Luciano Cembrani pela sua assistência e dedicação aos exames de medicina nuclear. Ao Dr. Rodrigo Paiva pelas interpretações dos testes ergométricos e aos Drs. Gabriel Grossman e Eduardo Ludwig pelas análises dos exames de cintilografia miocárdica

TABELA 1. Características demográficas clínicas, hemodinâmicas, laboratoriais e terapêuticas dos pacientes.

Parâmetros basais	Valores:
	Médias \pm SEM n (%)
Idade, anos	63 \pm 2
Homens/mulheres, n	6/5
Índice Massa Corporal	27 \pm 0.8
Fração ejeção VE, %	60 \pm 3
Estenose coronária > 70%, n (%)	
1 vaso	2 (18)
2 vasos	5 (46)
3 vasos	4 (36)
Pressão arterial sistólica repouso, mmHg	121 \pm 2
Pressão arterial diastólica repouso, mmHg	76 \pm 1
Frequência cardíaca em repouso, bpm	72 \pm 3
Fatores de risco DAC, n(%)	
Diabetes mellitus	2 (18)
Hipertensão arterial sistêmica	10 (91)
Dislipidemia	11 (100)
Tabagismo	2 (18)
Obesidade	3 (27)
Medicação concomitante, n(%)	
Betabloqueador	7 (64)
Antagonista do cálcio	5 (46)
Nitrito de ação prolongada	5 (46)
Ácido acetil salicílico	11 (100)
Inibidor ECA ou bloqueador AII	7 (64)
Estatinas	11 (100)
Fibratos	0 (0)
Metformina	2 (18)
Creatinina sérica basal, mg%	1.0 \pm 0.05
Potássio sérico basal, mEq/l	4.6 \pm 0.07

DAC, doença arterial coronária; ECA, enzima da conversão da angiotensina; AII, angiotensina II; bpm, batimentos por minuto.

TABELA 2. Resultado dos Testes Ergométricos e Exames Laboratoriais.

	Diferenças nos 2 períodos		Estimativa (média) do efeito da amilorida		Significância Estatística P ⁽¹⁾
	A-P (n=5)	P-A (n=6)	A-P	IC 95%	
Tempo esforço, s	9.2 ± 8.8	13.6 ± 10.4	-2.20	-18.1 – 27.3	0.75
Segmento-ST, mm	0.1 ± 0.3	-0.2 ± 0.2	0.18	-0.29 – 0.64	0.41
Duplo Produto x10 ³	-0.4 ± 0.8	1.6 ± 1.3	-1.07	-2.95 – 0.80	0.22
METs Alcançados	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	-0.04	-0.29 – 0.21	0.74
Distância, m	19.0 ± 15.3	23.3 ± 14.5	-2.15	-26.2 – 21.8	0.84
Creatinina, mg%*	0.10 ± 0.06	-0.01 ± 0.12	0.06	-0.11 – 0.23	0.45
Potássio, mEq/l*	0.40 ± 0.24	-0.31 ± 0.25	0.36	-0.04 – 0.76	0.07

Valores em médias ± SEM; METs, equivalente metabólico (1 MET= consumo de oxigênio de 3.5 mL/Kg/min).

A-P: Período (Amilorida - Placebo); P-A: Período (Placebo - Amilorida).

⁽¹⁾ Significância estatística obtida segundo protocolo de Altman para análise de estudo randomizado cruzado de 2 períodos.

^(*) Amostras de sangue coletadas na segunda semana de cada período de tratamento.

TABELA 3. Resultados da Cintilografia Miocárdica Perfusional

	Diferenças nos 2 períodos		Estimativa (média) do efeito da amilorida		Significância Estatística P ⁽¹⁾
	A-P (n=5)	P-A (n=6)	A-P	IC 95%	
Escore somado de estresse (SSS)	-0.4 ± 1.2	-0.1 ± 0.4	-0.15	-1.53 – 1.29	0.85
Escore somado das diferenças (SDS)	-0.2 ± 1.0	0.5 ± 0.6	-0.35	-1.73 – 1.03	0.57
Defeito de perfusão total (TPD), %	0.2 ± 0.9	0.5 ± 0.2	-0.15	-1.18– 0.88	0.74
Fração de ejeção pós estresse (FEVE), %	-2.0 ± 0.9	1.0 ± 0.8	-1.50	-3.55 – -0.29	0.13

Valores expressos em médias ± SEM; A-P: Período (Amilorida - Placebo); P-A: Período (Placebo – Amilorida).

⁽¹⁾ Significância estatística obtida segundo protocolo de Altman para análise de estudo randomizado cruzado de 2 períodos.

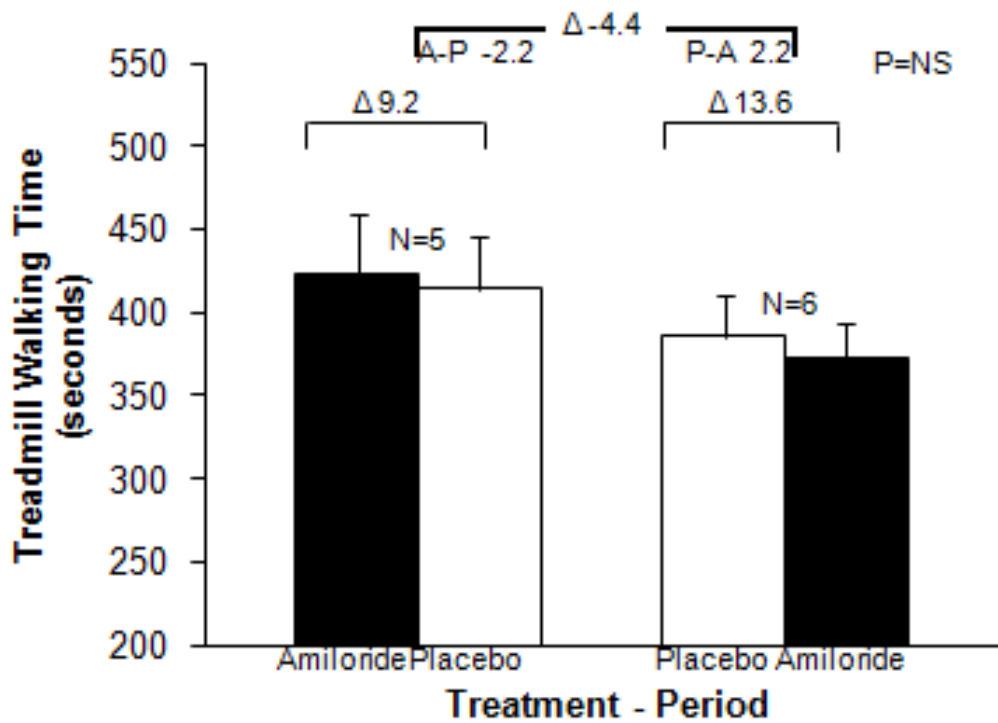


FIGURA 1. Gráfico mostrando o desempenho da caminhada na esteira (em segundos) em ambos os períodos de tratamento (média \pm DPM), as diferenças (Δ) em cada período, a diferença total entre os dois tratamentos (-4.4 segundos). O efeito médio da terapia com amilorida comparada com placebo (A-P) até o aparecimento de angina moderada foi (-2.2 segundos).

Referências

1. Holubkov R, Laskey WK, Haviland A, et al. Angina 1 year after percutaneous coronary intervention: a report from the NHLBI Dynamic Registry. *Am Heart J* 2002;144:826-833.
2. Serruys PW, Unger F, Sousa JE, et al. Comparison of coronary-artery bypass surgery and stenting for the treatment of multivessel disease. *N Engl J Med* 2001;344:1117-1124.
3. Gibbons RJ, Abrams J, Chatterjee K, et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with chronic stable angina — summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (Committee on the Management of Patients with Chronic Stable Angina). *J Am Coll Cardiol* 2003;41(1):159–168.
4. Thadani U. Current medical management of chronic stable angina. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2004;suppl 1:S11-29.
5. Hueb W, Soares PR, Gersh BJ, et al. The medicine, angioplasty, or surgery study (MASS-II): a randomized, controlled clinical trial of three therapeutic strategies for multivessel coronary artery disease: one-year results. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(10):1743-1751.
6. Simoons ML. Chronic stable artery disease; drugs vs revascularization. *Eur Heart J* 2010;31(5):530-541.

7. Crawford MH. The role of triple therapy in patients with chronic stable angina pectoris. *Circulation* 1987;75(6 Pt 2):122-127.
8. Kok WEM, Visser FC, Visser CA. Combination and triple therapy in patients with stable angina pectoris not adequately controlled by optimal B-blocker therapy. *Neth Heart J* 2002;10(11):455-461.
9. Chaitman BR, Pepine CJ, Parker JO, et al. Effects of ranolazine with atenolol, amlodipine, or diltiazem on exercise tolerance and angina frequency in patients with severe chronic angina: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291(3):309-316.
10. Deedwania PC, Carbajal EV, Bobba VR. Trials and tribulations associated with angina and traditional therapeutic approaches. *Clin Cardiol* 2007;30 (2 Suppl 1):116-24.
11. Finimundi HC, Caramori P, Parker JD. Effect of diuretic therapy on exercise capacity in patients with chronic angina and preserved left ventricular function. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;49:275–279.
12. Parker JD, Parker AB, Farrel B, et al. Effects of diuretics therapy on the development of tolerance to nitroglycerin an exercise capacity in patients with chronic stable angina. *Circulation* 1996;93:6
13. Nechwatal W, Konig E, Isbary J, et al. Haemodynamic and electrocardiographic effects of furosemide during supine exercise in patients with angina pectoris. *Br Heart J*. 1980;44:67-7491-696.
14. Leth A. Changes in plasma and extracellular fluid volumes in patients with essential hypertension during long-term treatment with hydrochlorothiazide. *Circulation*. 1970;42:479-485.

15. 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 Cardiovasc Pharmacol.* 1993;21:172–178.
16. Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, et al. The myocardial Na⁺/H⁺ exchange structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res.* 1999;85:777–786.
17. Karmazyn M, Sostaric JV, Gan XT. 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;61:375–379.
18. Farquharson CAJ, Struthers AD. Increasing plasma potassium with amiloride shortens the QT interval and reduces ventricular extrasystoles but does not change endothelial function or heart rate variability in chronic heart failure. *Heart* 2002;88:475–480.
19. Ferrara LA, Strazzullo P, Scillitani A, et al. Cross-Over Study of Muzolimine and Hydrochlorothiazide-Amiloride in Hypertensive Patients. *Eur J Clin Pharmacol* 1985; 28:241-244.
20. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, et al. American Society of Echocardiography Committee of Standards, Subcommittee on Quantification of Two-Dimensional Echocardiograms. Recommendations for quantification of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 1989;2:358-367.

21. Gibbons RJ, Abrams J, Chatterjee K, et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with chronic stable angina — summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (Committee to Update de 1997 Exercise Testing Guidelines). *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:1531-1540.
22. Klocke FJ, Baird MG, Lorell BH, et al. ACC/AHA/ASNC guidelines for the clinical use of radionuclide imaging-executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASNC) Committee to Revise the 1995 Guide. *Circulation*, Sep 16 2003;108(11):1404-1418.
23. Hachamovitch R, Berman DS, Sha LJ, et al. Incremental Prognostic Value of Myocardial Perfusion Single Photon Emission Computed Tomography for the Prediction of Cardiac Death. Differential Stratification for Risk of Cardiac Death and Myocardial Infarction. *Circulation*. 1998;97:535-543.
24. Hachamovitch R, Berman DS, Kiat H, et al. Exercise myocardial perfusion SPECT in patients without known coronary artery disease: incremental prognostic value and use in risk stratification. *Circulation*. 1996;93:905-914.
25. Hachamovitch R, Berman DS, Kiat H, et al. Gender-related differences in clinical management after exercise nuclear testing. *J Am Coll Cardiol* 1995;26: 1457-64.

26. Germano G, Kiat H, Kavanagh PB, et al. Automatic quantification of ejection fraction from gated myocardial perfusion SPECT. *J Nucl Med.* 1995; 36: 2138–2147.
27. Germano G, Erel J, Lewin H, et al. Automatic quantitation of regional myocardial wall motion and thickening from gated technetium-99m sestamibi myocardial perfusion single-photon emission computed tomography. *J Am Coll Cardiol.* 1997; 30: 1360–1367.
28. Germano G, Kavanagh PB, Kavanagh JT, et al. Repeatability of automatic left ventricular cavity volume measurements from myocardial perfusion SPECT. *J Nucl Cardiol.* 1998; 5: 477–483.
29. Junichi T, Takahiro H, Kenichi N, et al. Electrocardiographic Gated ^{99m}Tc-MIBI SPECT for Functional Assessment of Patients After Coronary Artery Bypass Surgery: Comparison of Wall Thickening and Wall Motion Analysis. *J Nucl Med.* 2002; 43: 589-595.
30. Hills M, Armitage P. The two-period cross-over clinical trial. *Br J Pharmacol.* 1979;8:7-20.
31. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research.* 1st ed. London, U.K.: Chapman & Hall, 1991.
32. 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: 263–267.

33. Levitsky J, Gurell D, Frishman WH. Sodium ion/hydrogen ion exchange inhibition: a new pharmacologic approach to myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Pharmacol.* 1998;38:887–897.
34. Masereel B, Pochet L, Laeckmann D. An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger. *Eur J Med Chem.* 2003;38:547–554.
35. Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. 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;17:1029–1042.
36. Karmazyn M. The myocardial sodium-hydrogen exchanger (NHE) and its role in mediating ischemic and reperfusion injury. *Keio J Med.* 1998;47: 65–72.
37. Karmazyn M. Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na/H exchange. *Am J Physiol.* 1988;255:H608– H616.
38. Baxter GF, Ebrahim Z. Role of bradykinin in preconditioning and protection of the ischaemic myocardium. *Br J Pharmacol.* 2002;135(4):843-854.
39. Rupprecht HJ, vom DJ, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, Schultheis HP, Buerke M, Sheehan FH, Drexler H. Cardioprotective effects of the Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation.* 2000;101(25):2902-2908.
40. Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, Linssen G, Tebbe U, Schroder R, Tiemann R, Machnig T, Neuhaus KL.

The Na(+)/H(+) exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(6):1644-1650.

41. Boyce SW, Bartels C, Bolli R, Chaitman B, Chen JC, Chi E, Jessel A, Kereiakes D, Knight J, Thulin L, Theroux P. Impact of sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide on death or myocardial infarction in high-risk CABG surgery patients: results of the CABG surgery cohort of the GUARDIAN study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126(2):420-427.

42. Mentzer RM, Jr., Bartels C, Bolli R, Boyce S, Buckberg GD, Chaitman B, Haverich A, Knight J, Menasche P, Myers ML, Nicolau J, Simoons M, Thulin L, Weisel RD. Sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide to reduce the risk of ischemic cardiac events in patients undergoing coronary artery bypass grafting: results of the EXPEDITION study. *Ann Thorac Surg.* 2008;85(4):1261-1270.

Effects of Amiloride Therapy on Exercise Capacity and Myocardial Perfusion in Chronic Stable Angina

A Randomized Two-Period Crossover Study

Helius C Finimundi MD,* Paulo Caramori MD, PhD,*† and John D Parker MD, FRCP‡

From the *Post-Graduate Course in Cardiovascular Disease, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; †The Centre for Cardiovascular Research, Porto Alegre, Brazil; and ‡Department of Medicine, University Health Network and Mount Sinai Hospitals, University of Toronto, Toronto, Canada.

Correspondence to:

Paulo Caramori, MD, PhD,
The Centre for Cardiovascular Research,
Catholic University of Rio Grande do Sul Av. Ipiranga 6690, sala 300, Porto Alegre, RS 90610-000,
Brazil
E-mail: Caramori.P@plugin.com.br

Abstract

Background: Prior studies have indicated that the combination of hydrochlorothiazide and amiloride is an effective anti-anginal. Amiloride, a sodium/hydrogen exchange inhibitor, has shown to have cardioprotective effects in the setting of ischemia, particularly in models of reperfusion. The aim of the present study was to evaluate whether therapy with amiloride alone, as compared to placebo, is an effective anti-anginal in patients with stable angina who are already treated with a traditional anti-anginal regimen.

Methods: Eleven patients with chronic stable angina and normal left ventricular systolic function were enrolled in a randomized, double blind, placebo-controlled, two-period crossover study. Patients received amiloride 5mg or placebo, for 3 weeks in both crossover periods, with 2 weeks washout between them. At the end of both treatment periods, all patients underwent a standard Bruce protocol treadmill exercise test in combination with stress and resting nuclear myocardial perfusion imaging. The primary end point was the change in treadmill walking time until moderate angina.

Results: The total treadmill walking time change, in seconds, to moderate angina (P2), during therapy with amiloride treatment was only 2.2 seconds different from that observed during the placebo treatment period. (P=0.75; CI 95%= -18,1 to 27,3). Similarly therapy with amiloride did not change myocardial perfusion scores and ventricular functional parameters obtained by gated SPECT imaging. No significant changes in heart rate or blood pressure were observed during either treatment period and there were no adverse events.

Conclusion: These findings do not support the hypothesis that amiloride, when compared to placebo, improves exercise performance or evidence of ischemia via perfusion imaging in patients with stable angina.

Key Words: diuretics • angina • stress test • ischemia

Introduction

Angina is a common clinical manifestation of ischemic heart disease and is the initial clinical presentation in approximately 50%. An estimated 6.4 million people in the United States have chronic angina that greatly impairs quality of life and decreases life expectancy. The incidence of chronic stable angina is expected to increase by 50% over the next three decades.¹ Despite treatment with conventional agents and/or revascularization many patients remain symptomatic. It has been documented that one year after coronary artery bypass grafting or percutaneous coronary intervention, 25-60% of patients continue to have angina and require anti-anginal medication.²⁻⁶

Many patients require more than monotherapy to control their symptoms of angina.⁷ The evidence that multiple anti-anginal are effective in the management of exertional angina is limited and some small studies have suggested that 'triple therapy' with long-acting nitrates, beta-blockers and calcium antagonists can lead to more side effects than therapeutic benefit.^{3,8} In recent years the first new agents for the pharmacologic management of exertional angina have been introduced, demonstrating efficacy on top of at least 1 traditional anti-anginal agent.^{9,10}

In a previous study of nonhypertensive patients with stable angina and preserved left ventricular function taking at least one long-acting anti-anginal, the combination of hydrochlorothiazide and amiloride was found to have significant anti-anginal effects.¹¹ This study followed a previous publication where the combination of hydrochlorothiazide and amiloride in a similar patient population

who were not taking any long-acting anti-anginal drugs also demonstrated that the potassium sparing diuretic significantly improved symptoms and treadmill exercise test duration as compared to placebo.¹² In these reports it was hypothesized that the observed anti-anginal properties might result from sustained effects of the diuretic on intravascular volume¹³⁻¹⁴ and/or the unique effects of amiloride, the prototypical compound of a family of sodium/hydrogen exchange inhibitor, that has been shown to have potent myocardial protective effects in the setting of acute ischemia.¹⁵⁻¹⁷

The aim of the present study was to evaluate whether therapy with amiloride, when compared to placebo, has anti-anginal effects in patients with stable angina under optimal anti-anginal medical therapy and preserved left ventricular function, thought of a increase in walking-time performance on treadmill exercise test and additional improve changes in myocardial perfusion and left ventricular functional parameters obtained by single photon emission computerized tomography (SPECT) imaging scanning.

Methods

Patient Population

The study included 11 patients (6 men and 5 women) with chronic stable angina on optimal medical therapy. Eligible patients had stable angina for at least 3 months, despite use of standard anti-anginal therapy and had typical anginal symptoms during exercise. Background medical therapy of angina had to be unchanged for the last 3 months. All had documented coronary artery disease, with

angiographic evidence of $\geq 70\%$ stenosis of at least one major coronary artery; left ventricular ejection fraction $\geq 50\%$ by two-dimensional echocardiography; and a previous positive treadmill stress test with chest pain and at least 1-mm horizontal or down sloping ST-segment depression. Exclusion criteria were patients with history of congestive heart failure, significant 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, resting ST depression, clinically significant anemia or hepatic disease, serum creatinine ≥ 1.3 mg/dl or potassium ≥ 5.5 mEq/L, and current use of digoxin or diuretic therapy.

Protocol Design

The study was randomized, double blinded, and placebo controlled two-period crossover design. After a baseline evaluation of all inclusion and exclusion criteria, informed consent was obtained. Study subjects were then randomized to receive either amiloride 5 mg or matching placebo for a period of 21 days in a double-blind fashion. All patients were followed weekly to verify blood pressure, heart rate, weight, and adverse events, as well as to document study medication compliance. During week two, a blood sample for serum potassium and creatinine was obtained from all patients. At day 21 between 8 and 10 AM, subjects performed a treadmill stress testing using the standard Bruce protocol, attending the same-day stress-rest nuclear myocardial perfusion-scanning protocol with

technetium-99^m methoxy-isobutyl-isonitrile (^{99m}Tc-MIBI) gated SPECT image. Subsequently, after two weeks of washout period, subjects crossed over, for the other treatment phase.^{18,19} Baseline cardiovascular medications remained unchanged throughout the study.

Assessment of left ventricular function

All patients underwent transthoracic echocardiography and the following measurements according to the guidelines of the American Society of Echocardiography.²⁰ An experienced echocardiographer, blinded to clinical data, performed the exams using the parasternal and the apical views to calculate dimensions and evaluate global and regional left ventricular function. Left ventricular end-diastolic and end-systolic diameters were obtained from the parasternal long-axis view. Left ventricular end-diastolic volume and end-systolic volumes were obtained from the apical 4- and 2-chamber views using a modified Simpson's rule.

Exercise Testing

All tests were performed according to recommendations of the American College of Cardiology (ACC) and American Heart Association (AHA) 2002 guidelines for exercise testing²¹ and executed by 1 investigator who was blinded to study treatment. Treadmill exercise testing was carried out using the standard Bruce protocol. A 13-lead electrocardiogram (12 conventional leads plus CM5) was recorded in the sitting and standing positions before exercise, during each work stage, immediately after the end of exercise, and during the recovery period.

Patients were instructed to indicate the onset of angina (P1) and were encouraged to continue exercise to moderate angina (P2), the point at which they would normally discontinue activity because of angina. Blood pressure was measured by same sphygmomanometer in the sitting and standing positions before exercise testing, during the last 30 seconds of each work stage, at both P1 and P2, and during recovery. Exercise was continued until moderate angina (P2) or until 1 of the following was observed: horizontal or down-sloping ST-segment depression of ≥ 3 mm, systolic blood pressure higher than 220 mm Hg, or a decrease in systolic blood pressure of ≥ 10 mm Hg.

ST-segment analysis

The 13-lead electrocardiogram was continuously monitored throughout the test for rhythm, rate, and ST-segment changes. The ST-segment shift was measured 80 ms after the J point using the end of the P-R segment as reference. An investigator blinded to study treatment allocation interpreted all tests. The ST changes were measured from the lead exhibiting the greatest ST-segment change in both treadmill exercise test.

Myocardial perfusion imaging – Instrumentation protocol

All exams were executed according the recommendation of the ACC/AHA/ASNC guidelines for the clinical use of cardiac radionuclide imaging.²² Same-day stress-rest single-radiopharmaceutical protocol was performed by using an injection of 12mCi ^{99m}Tc -MIBI at peak stress and continuing for an additional 1

minute. For the rest, 3 hours later, IV 36mCi ^{99m}Tc -MIBI was injected. The imaging time for both stress and rest was 30-60 minutes post-MIBI injection. Imaging was acquired using a single-head Sigma gamma camera (Siemens, Berlin, Germany) fitted with an all-purpose low energy high resolution applying a step and shoot method and ECG connection. No scatter and no attenuation correction were performed. The transaxial images were oriented into short-axis, vertical and horizontal long-axis images.

Visual analysis of perfusion Images SPECT

Two experienced physicians in nuclear cardiology who were blinded to patient status in the study performed visual interpretation by viewing the images as displayed on the computer monitor, which allows reviewed in both a continuous color format, such as gray scale or hot body, and in a color scale, such as spectrum or hot metal. For assessment of ventricular perfusion were analyzed the semiquantitative global indices of hypoperfusion, as summed stress score (SSS) that represents stress perfusion uptake defects, summed difference score (SDS) represents the degree of reversibility of the uptake defect and it was derived from the difference between SSS and summed rest score (SRS) and total perfusion deficit (TPD) expressing percent magnitude defects in extension and severity of myocardial perfusion. The post-stress left ventricular ejection fraction (LVEF) was considered for assessment of global ventricular function.

Perfusion images were interpreted using a standardized and validated visual scored semi-quantitative method using short-axis and vertical-horizontal long-axis tomograms divided into 17 segments, 5-point model for the left ventricle. (0 =

normal uptake, 1= mildly reduced uptake, 2 = moderately reduced uptake, 3 = severely reduced uptake, and 4 = no uptake). The SSS, SRS were calculated by adding the scores of 17 segments in the stress and rest images and respectively the SDS (difference of SSS-SRS). A segment was considered ischemic if reversibility was observed between the exercise and rest images.²³⁻²⁵ Polar maps of regional myocardial perfusion were generated and evaluated.

Quantitative analysis of gated ^{99m}Tc-MIBI SPECT

The post-stress LVEF was analyzed from short-axis images and calculated using commercially available automatic-processing software for gated perfusion SPECT (quantitative gated SPECT [QGS], version 2; Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA) yielding a dynamic 3-D image of the left ventricle as well as numerical values of volumes and LVEF. This software was previously described and validated.²⁶⁻²⁹

Study Endpoint

The primary end point of the study was the exercise capacity represented by the change in total treadmill walking time (TWT) in seconds to moderate angina (P2).

Ethical considerations

The study complies with the Declaration of Helsinki. The Ethics Committee of Hospital Pompeia, Caxias do Sul, Brazil, approved the protocol and all patients gave written informed consent.

Sample size calculation

Based on the results of a previous report, that demonstrated diuretic therapy was associated with a significant increase on total treadmill walking time to moderate angina of 63 ± 17 seconds as compared with 19 ± 9 seconds in the placebo group¹¹. Sample size calculations indicated that 9 subjects would be needed to demonstrate improvement in treadmill walking time of 44 seconds, assuming that the standard deviation approaches 40 seconds with 90% power and 5% significance. Therefore to account for potential dropouts, 11 subjects were selected to participate and randomized to amiloride (5 mg) and placebo in both crossover phases in random order for the two treatment regimens.

Randomization

Eleven subjects were randomized for two-period crossover design, concerning a sequence of treatments (A and B). Study medication was encapsulated to allow blinding. A pharmacist not involved in the study protocol who had no patient contact did this preparation. Placebo or amiloride were supplied in bottles labeled treatment A or B, respectively. Based on the crossover design, the order of treatment was randomized with both the order and blinding procedures were maintained by the pharmacist.

Statistical analysis

The method of Hills and Armitage³⁰ for analysis of a two-period crossover trial was used to determine whether there was a treatment effect (amiloride versus

placebo) on treadmill stress test: as walking time, distance, rate-pressure product, METs reached, and on myocardial perfusion data: as SSS, SDS, TPD and post stress LVEF, were also tested. The analysis examined the data for the presence of an interaction between the two treatment arms. Such an interaction may be observed if one double-blind treatment period has significant effects on the subsequent treatment period. The analysis also examined for the presence of a period effect. A period effect is found when the observed result appears to be dependent on the order of treatment. According with this protocol, the analyses were simplified by calculating for each subject the difference and average of the observations in the two periods. Therefore, three 2-samples T tests (parametric variables) were used to evaluate period effect, interaction and treatment effect, respectively as suggested by Altaman.³¹ The analysis didn't find any period effect or interaction between the two treatment arms. Continuous variables were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). A 2-sided P value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance. All calculations were performed using the SPSS 15.0 software package (SPSS Inc. Chicago, Illinois).

Results

Baseline characteristics of study patients are presented in Table 1. Eleven patients were randomized (6 men, 5 women). The mean age of the patients was 63 ± 2 years; their body mass index was 27 ± 0.8 . Their mean LVEF at baseline by echocardiography was $60 \pm 2\%$ (range 51% – 72%). All patients have coronary artery disease, 4 had 3-vessel disease, 5 had 2-vessel and 2 had 1-vessel

disease. The concomitant antianginal medications used were, 64% beta-blocker, 46% calcium channel blocker, 46% long action nitrate and all patients were with statins and aspirin. The baseline systolic and diastolic blood pressures at rest were 121 ± 2 mmHg and 76 ± 1 mmHg.

There were no changes in body weight, systolic and diastolic blood pressure and heart rate during both follow-up periods. Similarly there were no significant changes in serum creatinine, or potassium at any point during the study protocol, whereas a trend in potassium increase (0.36 mEq/l, $P=0.07$) was observed in amiloride treatment, Table 2.

Since the two crossover groups were not the same size, the treatment effect results were presented as average-effect in the two periods.³¹ Results of the treadmill exercise testing are presented in Table 2. The total treadmill walking time to the onset of moderate angina (P2) was nearly identical to that observed during the placebo treatment period (-2.2 seconds with a 95% confidence interval of -18.1 to 27.3 seconds). The primary endpoint and treadmill walking time performance during the treatment periods are presented in Figure 1. Amiloride also had no significant effect on ST-segment depression at peak exercise or on the rate-pressure product or total walking distance when compared with placebo. Systolic blood pressure at peak exercise was similar in both treatments; amiloride was 163 ± 4.5 mmHg versus 165 ± 6.2 mmHg in placebo ($P = 0.77$).

The results of myocardial perfusion images are presented in Table 3. Once again, amiloride had no significant effect on exercise-induced changes in coronary perfusion scoring or in changes in LVEF by gated scanning.

All randomized patients remained stable and completed the study. No patient developed an unstable ischemic syndrome or reported an increase in angina symptoms during the study period. No serious adverse events occurred.

Discussion

The findings of the present study indicate that in patients with exertional angina, therapy amiloride does not improve treadmill walking time to moderate angina, neither electrocardiographic events as well as measures of ischemia as assessed by myocardial perfusion scores using ^{99m}Tc -MIBI, or stress measures of left ventricular functional parameters as obtained by gated SPECT imaging.

A limited number of studies have assessed the effects of diuretic therapy on myocardial ischemia. Nechwatal et al,¹³ reported improvement in angina and an increase in exercise performance in patients with stable coronary artery disease treated with acute use of furosemide. Serro-Azul et al,³² in a double blind, placebo-controlled, crossover study, assessed the effects of chlorthalidone in 15 elderly patients with hypertension, documented coronary artery disease, and evidence of inducible myocardial ischemia and normal left ventricular function. They reported an increase in exercise tolerance with exercise testing and a reduction in myocardial ischemia during day-life activities as assessed by Holter monitoring. Parker et al,¹² 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. Finimundi et al,¹¹ in a parallel design

study, confirmed that hydrochlorothiazide and amiloride significantly improved treadmill walking time in patients with stable angina treated with at least one long acting anti-anginal as compared to placebo.

Although the mechanism behind the anti-anginal effect of diuretic therapy has not been clearly defined, amiloride alone has been shown to be cardioprotective in the setting of ischemia, particularly in the setting of ischemia followed by reperfusion.³³ Amiloride could exert anti-anginal effects via inhibition of myocardial Na^+/H^+ exchangers (NHE). This ion-exchange transport mechanism exchanges intracellular H^+ ions with extracellular Na^+ . By blocking the exchange of intracellular hydrogen for incoming sodium, the NHE inhibitors have been proposed as beneficial agents in the setting of ischemia and ischemia reperfusion injury by preventing accumulation of intracellular Ca^{2+} and subsequent deleterious effects on cellular function. Seven different isoforms of the exchanger 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 a number of subsequent analogues that have been developed.³⁴ The myocardial NHE represents an important mechanism for intracellular pH regulation in response to ischemia-induced acidosis.³⁵ Extensive studies using NHE-1 inhibitors have consistently shown protective effects against ischemia and reperfusion injury in a variety of animal models.³⁶ Karmazyn was the first investigator to show that amiloride enhanced the post-ischemic recovery of contractile function and reduced infarct size in rat hearts subjected to global ischemia and reperfusion.³⁷ Despite substantial documentation of this effect in animal models and some evidence that analogues of amiloride are protective in

human models of ischemia reperfusion injury³⁸⁻⁴² there have been no studies examining the impact of amiloride on the response of human myocardium to either demand ischemia or ischemia reperfusion injury human.

Our study was designed for evaluating the individual anti-anginal effects of amiloride. Our findings provided no evidence of significant beneficial effect in preventing the symptomatic and myocardial perfusion responses to the increase in myocardial oxygen demand induced by exercise stress. Despite its small size this crossover design study had significant power to rule out a type II error with 90 percent certainty.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Luciano Cembrani for his assistance and dedication to this research, Dr. Rodrigo Paiva for interpretation of the electrocardiograph findings during the exercise tests, Dr. Gabriel Grossman and Dr. Eduardo Ludwig for the analysis of nuclear images.

TABLE 1. Baseline demographic, hemodynamic, laboratorial and treatment characteristics of patients.

Baseline parameters	Value:
	Mean \pm SEM n (%)
Age, years	63 \pm 2
Men/women, n	6/5
Body mass index	27 \pm 0.8
LVEF, %	60 \pm 3
Coronary vessel stenosis > 70%, n	
1 vessel-disease	2 (18)
2 vessel-disease	5 (45)
3 vessel-disease	4 (36)
Systolic blood pressure at rest, mmHg	121 \pm 2
Diastolic blood pressure at rest, mmHg	76 \pm 1
Heart rate at rest, bpm	72 \pm 3
Traditional CAD risk factors, n (%)	
Diabetes mellitus	2 (18)
Hypertension	10 (91)
Dyslipidemia	11 (100)
Current smoker	2 (18)
Obesity	3 (27)
Concomitant medication, n(%)	
Beta blocker	7 (63)
Calcium channel blocker	5 (45)
Long-acting nitrate	5 (45)
Aspirin	11 (100)
ACE inhibitor or AII blocker	7 (63)
Statins	11 (100)
Fibric acid derivatives	0
Metformin	2 (18)
Serum creatinine, mg%	1.0 \pm 0.05
Serum potassium, mEq/l	4.6 \pm 0.07

LVEF, left ventricular ejection fraction; CAD, coronary artery disease; ACE, angiotensin-converting enzyme; AII, angiotensin II; bpm, beats per minute. n (%), number and percent.

TABLE 2. Exercise Test Results and Blood Tests in the two treatment periods

	Difference in the two periods		Average-effect		Statistical significance
	A - P (n=5)	P - A (n=6)	A - P	IC 95%	P ⁽¹⁾
Walking time, s	9.2 ± 8.8	13.6 ± 10.4	-2.20	-18.1 – 27.3	0.75
ST-segment, mm	0.1 ± 0.3	-0.25 ± 0.2	0.18	-0.29 – 0.64	0.41
RPP x10 ³	-0.4 ± 0.8	1.6 ± 1.3	-1.0	-2.95 – 0.80	0.22
METs reached	0.14 ± 0.1	0.21 ± 0.1	-0.04	-0.29 – 0.21	0.74
Distance, m	19.0 ± 15.3	23.3 ± 14.5	-2.15	-2.2 – 21.8	0.84
Creatinine, mg%*	0.10 ± 0.06	-0.01 ± 0.12	0.06	-0.11 – 0.23	0.45
Potassium, mEq/l*	0.40 ± 0.24	-0.31 ± 0.25	0.36	-0.04 – 0.76	0.07

Values are mean ± SEM; MET, metabolic equivalents (1 MET, oxygen consumption of 3.5 mL/Kg/min); RPP, rate-pressure product. A-P, Amiloride – Placebo treatment period; P-A, Placebo – Amiloride treatment period.

⁽¹⁾ Statistical significance obtained Altman.³¹

^(*) Samples blood collected at week 2 in each period-treatment.

TABLE 3. Myocardial Perfusion SPECT Scintigraphy Results

	Difference in the two periods		Average-effect		Statistical significance
	A - P (n=5)	P - A (n=6)	A - P	IC 95%	P ⁽¹⁾
SSS	-0.4 ± 1.2	-0.1 ± 0.4	-0.15	-1.53 – 1.29	0.85
SDS	-0.2 ± 1.0	0.5 ± 0.6	-0.35	-1.73 – 1.03	0.57
TPD, %	0.2 ± 0.9	0.5 ± 0.2	-0.15	-1.18– 0.88	0.74
Poststress LVEF, %	-2.0 ± 0.9	1.0 ± 0.8	-1.50	-3.55 – -0.19	0.13

Values are mean ± SEM; SSS, summed stress score; SDS, summed difference score; TPD, total perfusion deficit; LVEF, left ventricular ejection fraction; A-P, Amiloride – Placebo treatment period; P-A, Placebo – Amiloride treatment period.

⁽¹⁾ Statistical significance obtained Altman. ³¹

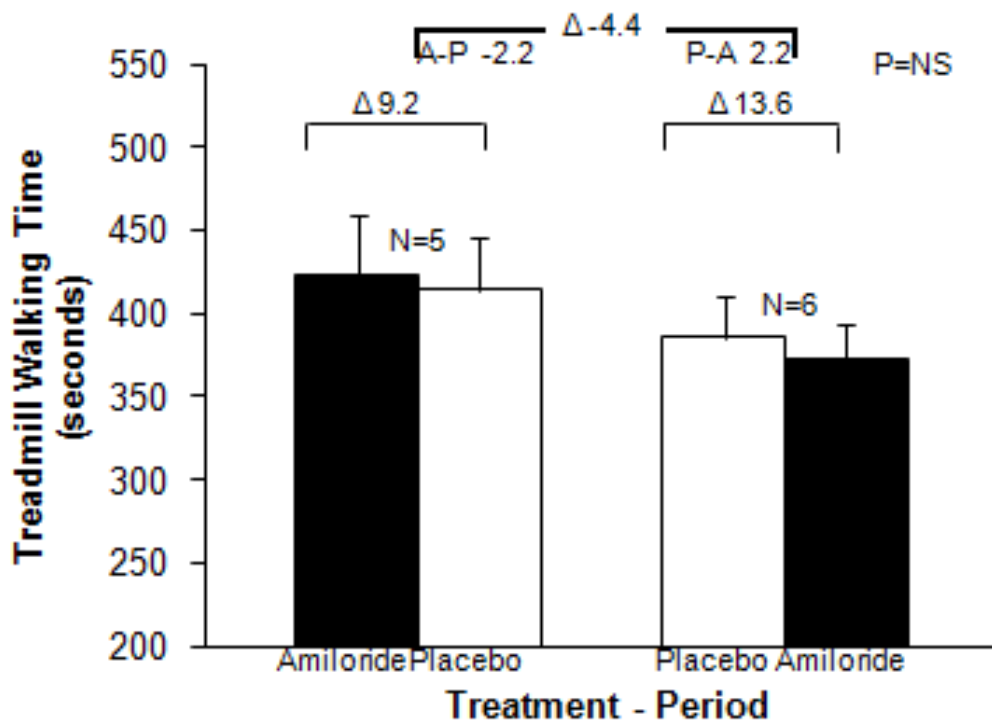


FIGURE 1. Graph showing treadmill walking time performance in seconds in both treatment periods (mean \pm SEM), the difference (Δ) in each period, total difference between the two treatments (-4.4 seconds). The average effect of amiloride therapy compared to placebo (A-P) to development of moderate angina was (-2.2 seconds).

References

1. Holubkov R, Laskey WK, Haviland A, et al. Angina 1 year after percutaneous coronary intervention: a report from the NHLBI Dynamic Registry. *Am Heart J* 2002;144:826-833.
2. Serruys PW, Unger F, Sousa JE, et al. Comparison of coronary-artery bypass surgery and stenting for the treatment of multivessel disease. *N Engl J Med* 2001;344:1117-1124.
3. Gibbons RJ, Abrams J, Chatterjee K, et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with chronic stable angina — summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (Committee on the Management of Patients with Chronic Stable Angina). *J Am Coll Cardiol* 2003;41(1):159–168.
4. Thadani U. Current medical management of chronic stable angina. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2004;suppl 1:S11-29.
5. Hueb W, Soares PR, Gersh BJ, et al. The medicine, angioplasty, or surgery study (MASS-II): a randomized, controlled clinical trial of three therapeutic strategies for multivessel coronary artery disease: one-year results. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(10):1743-1751.
6. Simoons ML. Chronic stable artery disease; drugs vs revascularization. *Eur Heart J* 2010;31(5):530-541.

7. Crawford MH. The role of triple therapy in patients with chronic stable angina pectoris. *Circulation* 1987;75(6 Pt 2):122-127.
8. Kok WEM, Visser FC, Visser CA. Combination and triple therapy in patients with stable angina pectoris not adequately controlled by optimal B-blocker therapy. *Neth Heart J* 2002;10(11):455-461.
9. Chaitman BR, Pepine CJ, Parker JO, et al. Effects of ranolazine with atenolol, amlodipine, or diltiazem on exercise tolerance and angina frequency in patients with severe chronic angina: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004;291(3):309-316.
10. Deedwania PC, Carbajal EV, Bobba VR. Trials and tribulations associated with angina and traditional therapeutic approaches. *Clin Cardiol* 2007;30 (2 Suppl 1):116-24.
11. Finimundi HC, Caramori P, Parker JD. Effect of diuretic therapy on exercise capacity in patients with chronic angina and preserved left ventricular function. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;49:275–279.
12. Parker JD, Parker AB, Farrel B, et al. Effects of diuretics therapy on the development of tolerance to nitroglycerin an exercise capacity in patients with chronic stable angina. *Circulation* 1996;93:6
13. Nechwatal W, Konig E, Isbary J, et al. Haemodynamic and electrocardiographic effects of furosemide during supine exercise in patients with angina pectoris. *Br Heart J*. 1980;44:67-7491-696.
14. Leth A. Changes in plasma and extracellular fluid volumes in patients with essential hypertension during long-term treatment with hydrochlorothiazide. *Circulation*. 1970;42:479-485.

15. 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 Cardiovasc Pharmacol.* 1993;21:172–178.
16. Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, et al. The myocardial Na⁺/H⁺ exchange structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res.* 1999;85:777–786.
17. Karmazyn M, Sostaric JV, Gan XT. 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;61:375–379.
18. Farquharson CAJ, Struthers AD. Increasing plasma potassium with amiloride shortens the QT interval and reduces ventricular extrasystoles but does not change endothelial function or heart rate variability in chronic heart failure. *Heart* 2002;88:475–480.
19. Ferrara LA, Strazzullo P, Scillitani A, et al. Cross-Over Study of Muzolimine and Hydrochlorothiazide-Amiloride in Hypertensive Patients. *Eur J Clin Pharmacol* 1985; 28:241-244.
20. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, et al. American Society of Echocardiography Committee of Standards, Subcommittee on Quantification of Two-Dimensional Echocardiograms. Recommendations for quantification of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr.* 1989;2:358-367.

21. Gibbons RJ, Abrams J, Chatterjee K, et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with chronic stable angina — summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (Committee to Update de 1997 Exercise Testing Guidelines). *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:1531-1540.
22. Klocke FJ, Baird MG, Lorell BH, et al. ACC/AHA/ASNC guidelines for the clinical use of radionuclide imaging-executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASNC) Committee to Revise the 1995 Guide. *Circulation*, Sep 16 2003;108(11):1404-1418.
23. Hachamovitch R, Berman DS, Sha LJ, et al. Incremental Prognostic Value of Myocardial Perfusion Single Photon Emission Computed Tomography for the Prediction of Cardiac Death. Differential Stratification for Risk of Cardiac Death and Myocardial Infarction. *Circulation*. 1998;97:535-543.
24. Hachamovitch R, Berman DS, Kiat H, et al. Exercise myocardial perfusion SPECT in patients without known coronary artery disease: incremental prognostic value and use in risk stratification. *Circulation*. 1996;93:905-914.
25. Hachamovitch R, Berman DS, Kiat H, et al. Gender-related differences in clinical management after exercise nuclear testing. *J Am Coll Cardiol* 1995;26: 1457-64.

26. Germano G, Kiat H, Kavanagh PB, et al. Automatic quantification of ejection fraction from gated myocardial perfusion SPECT. *J Nucl Med.* 1995; 36: 2138–2147.
27. Germano G, Erel J, Lewin H, et al. Automatic quantitation of regional myocardial wall motion and thickening from gated technetium-99m sestamibi myocardial perfusion single-photon emission computed tomography. *J Am Coll Cardiol.* 1997; 30: 1360–1367.
28. Germano G, Kavanagh PB, Kavanagh JT, et al. Repeatability of automatic left ventricular cavity volume measurements from myocardial perfusion SPECT. *J Nucl Cardiol.* 1998; 5: 477–483.
29. Junichi T, Takahiro H, Kenichi N, et al. Electrocardiographic Gated ^{99m}Tc-MIBI SPECT for Functional Assessment of Patients After Coronary Artery Bypass Surgery: Comparison of Wall Thickening and Wall Motion Analysis. *J Nucl Med.* 2002; 43: 589-595.
30. Hills M, Armitage P. The two-period cross-over clinical trial. *Br J Pharmacol.* 1979;8:7-20.
31. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research.* 1st ed. London, U.K.: Chapman & Hall, 1991.
32. 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: 263–267.

33. Levitsky J, Gurell D, Frishman WH. Sodium ion/hydrogen ion exchange inhibition: a new pharmacologic approach to myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Pharmacol.* 1998;38:887–897.
34. Masereel B, Pochet L, Laeckmann D. An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger. *Eur J Med Chem.* 2003;38:547–554.
35. **Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. 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;17:1029–1042.
36. Karmazyn M. The myocardial sodium-hydrogen exchanger (NHE) and its role in mediating ischemic and reperfusion injury. *Keio J Med.* 1998;47: 65–72.
37. Karmazyn M. Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na/H exchange. *Am J Physiol.* 1988;255:H608– H616.
38. Baxter GF, Ebrahim Z. Role of bradykinin in preconditioning and protection of the ischaemic myocardium. *Br J Pharmacol.* 2002;135(4):843-854.
39. Rupprecht HJ, vom DJ, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, Schultheis HP, Buerke M, Sheehan FH, Drexler H. Cardioprotective effects of the Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation.* 2000;101(25):2902-2908.
40. Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G, Linssen G, Tebbe U, Schroder R, Tiemann R, Machnig T, Neuhaus KL.

The Na(+)/H(+) exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38(6):1644-1650.

41. Boyce SW, Bartels C, Bolli R, Chaitman B, Chen JC, Chi E, Jessel A, Kereiakes D, Knight J, Thulin L, Theroux P. Impact of sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide on death or myocardial infarction in high-risk CABG surgery patients: results of the CABG surgery cohort of the GUARDIAN study. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;126(2):420-427.

42. Mentzer RM, Jr., Bartels C, Bolli R, Boyce S, Buckberg GD, Chaitman B, Haverich A, Knight J, Menasche P, Myers ML, Nicolau J, Simoons M, Thulin L, Weisel RD. Sodium-hydrogen exchange inhibition by cariporide to reduce the risk of ischemic cardiac events in patients undergoing coronary artery bypass grafting: results of the EXPEDITION study. *Ann Thorac Surg.* 2008;85(4):1261-1270.