

Considerazioni sul percorso di sviluppo di un farmaco. Il “caso” dello spironolattone

Stefania De Feo, Cristina Opasich, Alberto Volpi*, Luigi Tavazzi**

Divisione di Cardiologia, Fondazione S. Maugeri, Clinica del Lavoro e della Riabilitazione, IRCCS, Istituto Scientifico, Pavia, *U.O. di Cardiologia, Ospedale di Giussano, Giussano (MI), **Dipartimento di Cardiologia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Key words:

**Heart failure;
Pathophysiology;
Renin-angiotensin.**

In the progressive understanding of the heart failure syndrome different models have followed. Current pathophysiology model suggests that heart failure is a neurohormonal disorder: an abnormality in cardiac function and a disturbance in myocardial contractile force is the initiating event in heart failure, and the clinical expression and progression of the disease occurs as a result of subsequent extracardiac alterations. Treatment with drugs capable of antagonizing the effects of neuroendocrine activation, such as angiotensin-converting enzyme inhibitors, beta-blockers and antialdosterone agents have induced a significant reduction in morbidity and mortality in heart failure patients. The progressive understanding of the circulating homeostasis mechanisms moved from the systemic to the paracrine aspects of the neurohormonal systems and contributed to the development of new drugs. Moreover, the analysis of a drug's development can be an important step in the medical knowledge advancement. In this sense, aldosterone and spironolactone became an interesting “case”, which is analyzed in this paper, going through the steps that have promoted the spironolactone from a weak diuretic to a neurohormonal drug and, finally, to a “central” drug.

(Ital Heart J Suppl 2002; 3 (2): 178-186)

© 2002 CEPI Srl

Ricevuto il 4 ottobre 2001; accettato il 7 novembre 2001.

Per la corrispondenza:

Dr.ssa Cristina Opasich

Divisione di Cardiologia
Fondazione S. Maugeri, IRCCS
Istituto Scientifico
Via Ferrata, 8
27100 Pavia
E-mail: copasich@fsm.it

L'analisi del percorso di sviluppo di un farmaco può in alcuni casi far meglio comprendere il processo di evoluzione delle conoscenze mediche. Emblematico in questo senso è il caso di un principio attivo quale lo spironolattone, inizialmente sintetizzato come antagonista specifico dei recettori dei mineralcorticoidi e proposto come diuretico risparmiatore di potassio.

La descrizione della fisiopatologia dello scompenso cardiaco cronico (SCC) è stata condizionata dal succedersi di diversi modelli concettuali (prima quello cardiorenale, poi quello vascolare/emodinamico ed infine quello neuroormonale) che hanno portato ad un'interpretazione di questa sindrome clinica non più come espressione di una patologia essenzialmente cardiaca, ma come malattia dei sistemi fondamentali di regolazione biologica. L'approccio terapeutico si è modificato di conseguenza con l'impiego prioritario di farmaci in grado di modificare l'attivazione neuroendocrina (gli ACE-inibitori, i sartanici, gli antialdosteronici), con la promozione di farmaci assolutamente controindicati (i β -bloccanti) a farmaci raccomandati, con la marginalizzazione dell'uso degli inotropi positivi e con l'evoluzione del rationale di impiego dello spironolattone (da mero farmaco diuretico risparmiatore di potassio ad agente

prevalentemente di tipo neuroormonale). Questa evoluzione dei paradigmi fisiopatologici e terapeutici, stimolata da una migliore comprensione dei meccanismi di mantenimento dell'omeostasi circolatoria, ha a sua volta generato nuovi cicli di studi, che hanno evidenziato gli aspetti non solo sistemici, ma anche paracrini dei sistemi neuroormonali. In questo senso gli effetti “cardiaci” degli interventi farmacologici hanno assunto un ruolo centrale nella terapia dello SCC.

In questo articolo, alla luce delle acquisizioni relative agli effetti sistemici e paracrini dell'aldosterone nello SCC, verranno ripercorse le tappe fondamentali che hanno portato alla promozione dello spironolattone da diuretico risparmiatore di potassio a farmaco attivo sui sistemi neuroormonali. Particolare attenzione verrà dedicata al rationale fisiopatologico che ha orientato lo sviluppo e l'evoluzione del farmaco, nonché agli studi clinici controllati che ne hanno stabilito il ruolo nella terapia dello SCC.

Dall'aldosterone allo spironolattone

Le date cruciali per la scoperta dell'aldosterone e l'identificazione dei suoi effetti fisiopatologici sono indicate in tabella I.

Tabella I. Cenni storici.

1950	Identificazione nelle urine di soggetti affetti da scompenso cardiaco cronico di una sostanza con attività sodio-ritentive, presente in elevate concentrazioni anche nel plasma. Successivo isolamento e purificazione della sostanza, denominata aldosterone, che si scopre essere secreta dalle ghiandole surrenali.
1955	Prima descrizione di un caso di iperaldosteronismo primitivo dovuto ad adenoma surrenale unilaterale.
1957	Sintesi di un antagonista competitivo dell'aldosterone (spironolattone) dotato di maggior specificità rispetto ad altre molecole steroidee caratterizzate dalla presenza di un gruppo spironolattone in posizione C17 (17-spironolattone).
1962	Sostituzione della prima formulazione disponibile (aldactone) con una nuova (aldactone-A), dotata di maggiore effetto terapeutico (4 volte) dovuto ad una superiore velocità di assorbimento.

Un saluretico risparmiatore di potassio. Razionale. Negli anni '70, nel quadro di un'interpretazione di tipo cardiorenale dello SCC, si riteneva che gli effetti negativi (da contrastare) dell'aldosterone fossero di fatto riconducibili allo sviluppo di una potente azione ormonale di tipo mineralcorticoide. Si sapeva infatti che l'aldosterone, secreto dal surrene, svolge i suoi principali effetti nel tubulo distale del nefrone, dove i suoi recettori migrano nel nucleo per interagire con specifiche sequenze di DNA, stimolando in tal modo la sintesi di RNA messaggero codificante le proteine della pompa Na^+/K^+ ATPasi (a livello della membrana basocellulare delle cellule tubulari). Questa struttura biochimica permette l'ingresso di sodio e acqua dal lume nelle cellule (effetto antidiuretico), al prezzo di un'aumentata escrezione nelle urine di potassio e magnesio, con conseguente ipopotassiemia ed ipomagnesemia (effetto aritmogeno).

Gli studi di efficacia. Il primo studio clinico sul ruolo dello spironolattone nella ritenzione idrosalina secondaria a SCC risale alla fine degli anni '60. Il farmaco fu somministrato in dose iniziale di 600 mg/die (da ridursi poi progressivamente) ad un gruppo di 33 pazienti, che presentavano anche ipokaliemia ed aritmie¹.

Il primo studio di efficacia/sicurezza, randomizzato e in doppio cieco seppur di piccole dimensioni (32 pazienti), è della fine degli anni '70. Il disegno della sperimentazione prevedeva un confronto tra spironolattone/clorotiazide e furosemide (a diverse posologie). Nel corso di 16 settimane non si osservarono differenze tra i due trattamenti, in termini di controllo dei sintomi e di effetti collaterali². La più potente azione saluretica dei diuretici dell'ansa e dei tiazidici, nonché il timore di indurre iperkaliemia, soprattutto in pazienti con insufficienza renale³, ha inizialmente relegato lo spironolattone in un ruolo terapeutico marginale. Successivamente venne valorizzata l'azione preventiva sull'ipokalie-

mia nei pazienti con SCC trattati convenzionalmente con diuretici tiazidici o dell'ansa in associazione con supplementi orali di potassio⁴⁻⁷.

Altri studi hanno sottolineato il potenziamento dell'effetto di altri diuretici da parte dello spironolattone, grazie al sinergismo d'azione su diverse porzioni del tubulo renale^{8,9}, e la riduzione del rischio di ipopotassiemia^{10,11}. La combinazione di un diuretico dell'ansa e dello spironolattone venne quindi proposta come una possibilità terapeutica aggiuntiva in caso di resistenza al diuretico. van Vliet et al.¹² infatti avevano dimostrato che l'aggiunta di 100 mg di spironolattone alla terapia standard determinava ulteriori riduzioni del peso corporeo nella maggioranza (13 su 17) dei pazienti trattati. Il limite di questa opzione terapeutica era però connesso con le alte dosi di farmaco richieste per potenziare l'effetto di altri diuretici ed il rischio quindi di iperkaliemia e di altri effetti collaterali maggiori.

Studi di "dose-finding". Lo spironolattone è stato sempre considerato un diuretico a debole azione saluretica. Per tale motivo l'efficacia del farmaco è stata per lo più valutata in associazione con altri diuretici e non in monoterapia. Schohn e Jahn¹³ hanno dimostrato che all'effetto diuretico di dosi di spironolattone di almeno 100 mg corrispondeva una riduzione della pressione atriale destra.

Un farmaco neurormonale. Razionale. Gli studi degli anni '80 hanno definitivamente chiarito il ruolo di un'inappropriata attivazione neurormonale (sistema adrenergico ed asse renina-angiotensina) nella fisiopatologia dello SCC e nel determinismo della progressione della malattia.

Era noto da tempo che livelli ematici di aldosterone aumentati fino a 20 volte sono riscontrabili in pazienti non trattati affetti da SCC, sia per l'aumentata produzione dell'ormone a livello dei surreni, in risposta agli aumentati livelli di angiotensina, sia per la riduzione (dell'ordine del 30-50%) della sua clearance epatica secondaria al ridotto flusso epatico¹⁴⁻¹⁶.

Tuttavia la rilevanza clinica dell'iperaldosteronismo nello SCC ha potuto essere documentata solo grazie ad analisi degli assetti neurormonali condotte nell'ambito degli studi clinici controllati. I dati del CONSENSUS Study hanno dimostrato una correlazione dell'iperaldosteronismo con la mortalità, indipendentemente dallo stato emodinamico, di pazienti peraltro invariabilmente classificati in classe funzionale NYHA IV¹⁷. Inoltre, il vantaggio prognostico conferito dal trattamento con ACE-inibitori si associava a riduzione dei livelli ematici di aldosterone, angiotensina II e renina^{18,19}. I trial SAVE²⁰ e SOLVD²¹ hanno poi mostrato che un aumento dei livelli plasmatici dell'aldosterone è osservabile anche nei pazienti con SCC meno avanzato.

Parallelamente si sono approfondite le conoscenze sul meccanismo di "fuga" dell'aldosterone. Se alla fine

degli anni '80 si riteneva che i farmaci che interferiscono con il sistema renina-angiotensina, mediante l'inibizione dell'enzima di conversione, fossero già in grado di bloccare la produzione di aldosterone, ulteriori osservazioni evidenziarono che nei pazienti affetti da ipertensione arteriosa e in quelli affetti da SCC la terapia cronica con ACE-inibitori non era in grado di mantenere la riduzione dei livelli ematici di aldosterone a lungo termine²². Inizialmente si pensò che questa "fuga" fosse legata all'impiego di basse dosi di ACE-inibitori. Tale ipotesi fu ben presto smentita da uno studio che mostrò l'effetto non significativo delle alte dosi di ACE-inibitore sui livelli plasmatici di aldosterone e di angiotensina II in pazienti ipertesi trattati per 4-6 mesi²³. È stato altresì dimostrato che la riduzione dei livelli di aldosterone prodotta all'inizio del trattamento con ACE-inibitore termina dopo poche settimane di trattamento²³. Questa "fuga" dell'aldosterone probabilmente consegue all'esistenza di meccanismi di controllo della secrezione di angiotensina II indipendenti dall'enzima di conversione e alla presenza di stimoli alternativi per la sintesi di aldosterone, verosimilmente di tipo elettrolitico e/o ormonale (secrezione di corticotropina a livello del lobo anteriore dell'ipofisi; produzione di endotelina a livello vascolare)^{24,25}.

È stato anche dimostrato un effetto adrenergico dell'aldosterone. Somministrato infatti in acuto o in cronico nel seno carotideo di cani era in grado di deprimere la funzione barorecettoriale e tale effetto era annullato dalla preventiva somministrazione di spironolattone²⁶. È stato poi confermato nell'uomo che l'aldosterone annulla la risposta bradicardica ad uno stimolo pressorio, effetto non attribuibile a variazioni dell'attività simpatica né all'angiotensina²⁷.

Inoltre l'aldosterone può interagire con il sistema nervoso autonomo in modo tale da favorire l'insorgenza di aritmie maligne: esso infatti è in grado non solo di potenziare l'effetto delle catecolamine e di bloccare il re-uptake di noradrenalina, ma anche di contribuire alla depressione del sistema nervoso parasimpatico²⁸. Si è anche osservato che l'infusione di aldosterone in cani dopo la legatura di una coronaria produce un aumento di battiti ectopici ventricolari in modo dose-dipendente; la rapidità di insorgenza dell'effetto escluderebbe che esso sia puramente secondario a squilibri elettrolitici (ipomagnesemia e ipopotassiemia)²⁹.

Gli studi di efficacia. L'effetto antipertensivo dello spironolattone fu attribuito inizialmente alla sua azione diuretica e solo successivamente alla sua azione di antagonista neuroormonale. In pazienti anurici, sottoposti a dialisi, è stato dimostrato che l'infusione di dosi crescenti di spironolattone diminuisce con un effetto dose-dipendente la risposta vascolare a stimoli vasocostrittori, quali l'infusione di noradrenalina o angiotensina II, determinando una riduzione della pressione sistolica ed in modo più marcato di quella diastolica³⁰. In pazienti ipertesi si è osservato che lo spironolattone aumenta il

flusso agli arti e diminuisce la risposta alla stimolazione simpatica³¹.

L'azione dello spironolattone sulla bilancia simpato-vagale è stata documentata confrontando l'effetto del farmaco (50-100 mg/die per 8 settimane) con quello del placebo in pazienti con SCC stabile. Nel gruppo assegnato al trattamento attivo si è registrato un aumento della variabilità della frequenza cardiaca ed una riduzione della frequenza cardiaca basale, soprattutto nelle prime ore del mattino³².

Studio di mortalità. Applicando lo schema concettuale, già validato dai trial sugli ACE-inibitori, in base al quale interventi farmacologici in grado di contrastare l'inappropriata attivazione neuroormonale possono tradursi in un aumento della sopravvivenza, il RALES è stato il primo grande studio clinico controllato che ha testato l'ipotesi di riduzione della mortalità da SCC mediante l'uso dello spironolattone. In questo studio internazionale, in doppio cieco, i pazienti sono stati randomizzati a ricevere placebo o dosi di 12.5, 25, 50 o 75 mg/die di spironolattone per 12 settimane³³. Nonostante la durata prevista del follow-up fosse di 3 anni, lo studio è stato chiuso in anticipo dopo un periodo di follow-up medio di 24 mesi, dopo che un'analisi *ad interim* aveva mostrato chiare evidenze di beneficio nei pazienti trattati con lo spironolattone (Tab. II).

I risultati del trial indicano che nella tipologia di pazienti inclusi nello studio gli effetti benefici di un inibitore del recettore dell'aldosterone sono additivi rispetto a quelli degli ACE-inibitori. Nel RALES il beneficio è già evidente con dosi (25 mg/die) che non sembrano essere associate ad un rischio consistente di iperpotassiemia (maggiore frequenza di iperpotassiemia e di aumento dell'azotemia si notava con dosi giornaliere > 50 mg).

Profilo di sicurezza del farmaco. L'incidenza dei più frequenti effetti collaterali dello spironolattone, già descritti negli anni '60 e '70, è stata rivalutata nella popolazione di pazienti con SCC arruolati nel RALES (Tab. III)³⁴⁻³⁷.

Spironolattone come farmaco antifibrotico. *Razionale.* Agli inizi degli anni '90 è stato documentato come la cronica somministrazione di aldosterone nel ratto sia in grado di aumentare la deposizione di collagene nel cuore ed in altri organi, tra cui rene e pancreas³⁸; tale effetto è già evidente dopo 4 settimane di trattamento³⁹. In particolare, l'aldosterone stimola la trascrizione di RNA messaggero delle isoforme del collagene di tipo I e III, indipendentemente da stimoli emodinamici⁴⁰.

Questi dati furono confermati dall'osservazione che nel ratto, pur mantenendo la pressione arteriosa entro valori di normalità, si ha sviluppo di ipertrofia ventricolare sinistra con infusione di aldosterone^{41,42}. Il complesso aldosterone-recettore, inducendo il gene del recettore dell'angiotensina I a produrre un aumento del

Tabella II. Principali risultati dello studio RALES³³.

	Gruppo placebo	Gruppo spironolattone	Riduzione del rischio
N. pazienti	841	822	
Sesso (M/F)	614/227	603/219	
Classe NYHA			
II	3 (0.4%)	4 (0.5%)	
III	581 (69%)	592 (72%)	
IV	257 (31%)	226 (27%)	
Frazione di eiezione (%)	25.2 ± 6.8	25.6 ± 6.7	
Terapia			
Diuretici dell'ansa	100%	100%	
ACE-inibitore	94%	95%	
Digitale	72%	75%	
Aspirina	37%	36%	
β-bloccanti	10%	11%	
Supplementi di potassio	27%	29%	
Endpoint primario			
Morte per ogni causa	386	284	-30%, p < 0.001, RR 0.7
Endpoint secondari			
Morte per causa cardiaca	314	226	-31%, p < 0.001, RR 0.69
Ospedalizzazione per causa cardiaca	336/753	260/515	-30%, p < 0.001, RR 0.7
Modificazioni classe NYHA	Migliorata nel 33% Invariata nel 18% Peggiorata nel 48%	Migliorata nel 41% Invariata nel 21% Peggiorata nel 38%	p < 0.001
Endpoint combinato			
Morte od ospedalizzazione per causa cardiaca			-32%, p < 0.001, RR 0.68

RR = rischio relativo.

Tabella III. Dagli studi di sicurezza, i più significativi effetti collaterali dello spironolattone.

Ginecomastia nell'uomo Disturbi mestruali nella donna	Dovuti all'attività antiandrogena (riduzione della sintesi e antagonismo degli effetti periferici del testosterone; incremento della sintesi di progesterone, ormone luteinizzante e follicolo-stimolante). La prima osservazione di disturbi mestruali risale al 1970 ³⁴ . Nessun caso di disturbi mestruali nel RALES (arruolate 446 donne). La prima osservazione della ginecomastia risale al 1962 ³⁵ . Effetto dose-dipendente: < 10% con < 50 mg/die e ≥ 50% con > 150 mg/die. Incidenza di ginecomastia nel RALES (arruolati 1217 uomini): 10% nel gruppo con spironolattone, 1% nel gruppo placebo (p < 0.001).
Iperpotassiemia	Nel 1966 fu riportato il caso di un paziente con edema refrattario e insufficienza renale severa che sviluppò paralisi muscolare attribuita a iperkaliemia ³⁶ . Più frequente se in associazione ad ACE-inibitori. Incidenza di potassiemia > 5.5 mmol/l nel RALES: 5% con 12.5 mg; 13% con 25 mg; 24% con 75 mg; 5% nel gruppo placebo. Concentrazione media plasmatica del potassio +0.30 mmol/l con spironolattone (p < 0.001).
Effetti gastrointestinali	La prima osservazione fu su 45 pazienti con iperaldosteronismo trattati con spironolattone, il farmaco fu sospeso in 4 pazienti per insorgenza di anoressia severa, nausea, vomito e sintomi gastrici ³⁷ . Incidenza nel RALES identica nel gruppo trattato con placebo e in quello trattato con spironolattone (29%).

numero dei recettori, determina una reciproca stimolazione tra aldosterone e angiotensina II e amplifica quindi le risposte proliferative e fibrotiche^{43,44}. Si aggiunga inoltre il fatto che i livelli plasmatici di aldosterone sono risultati significativamente correlati con la massa ventricolare sinistra in pazienti ipertesi⁴⁵.

La dimostrazione di effetti dell'angiotensina II e dell'aldosterone sul cuore e sui vasi sistemici, favorenti il rimodellamento cardiaco e vascolare, è stata cruciale per gli studi fisiopatologici (essendo eventi biolo-

gici quali l'ipertrofia cellulare, la fibrosi interstiziale, l'apoptosi, l'infiammazione e la trombosi coinvolti nella progressione dell'aterosclerosi) e sul piano clinico-terapeutico ha promosso lo studio delle manipolazioni farmacologiche del sistema renina-angiotensina-aldosterone²⁵.

Studi di efficacia. Numerosi lavori sperimentali dimostrano che lo spironolattone è in grado di attenuare i processi del rimodellamento cardiaco (riduzione della

deposizione di collagene nelle zone non infartuate) e vascolare (inibizione dell'iperplasia fibrointimale) in modelli di infarto e di ipertensione arteriosa⁴⁶⁻⁵⁰. Nella fase precedente la pubblicazione dei dati del RALES per l'uomo erano disponibili soltanto osservazioni cliniche relative a soggetti ipertesi. I dati di un primo studio, condotto in pazienti con ipertensione arteriosa lieve e moderata, avevano mostrato riduzioni significative dello spessore della parete posteriore del ventricolo sinistro e del setto interventricolare dopo 6 mesi di terapia con 25 mg di spironolattone e 15 mg di altiazide⁵¹. Successivamente è stata documentata una più spiccata riduzione dell'indice della massa del ventricolo sinistro nei pazienti trattati con l'associazione ACE-inibitore/spironolattone rispetto ai controlli assegnati al solo trattamento con ACE-inibitore, nonostante il controllo dei valori pressori fosse sovrapponibile nei due gruppi⁵².

Studi di "dose-finding". Nei pazienti con ipertensione arteriosa essenziale l'effetto di riduzione della massa ventricolare sinistra è risultato già evidente con dosi di 25 mg⁵². Nei pazienti arruolati nel RALES dosi di 12.5-25 mg/die hanno determinato una riduzione dei livelli plasmatici di un marker del turnover del collagene (III N peptide aminoterminale)⁵³.

Dallo spironolattone all'aldosterone

Lo studio RALES, per quanto progettato sulla base di solide premesse concettuali, fu, di fatto, portato a termine in un periodo in cui le evidenze cliniche sull'efficacia dello spironolattone erano ancora scarse. Non è quindi sorprendente il fatto che la pubblicazione del trial abbia promosso ricerche miranti a chiarire i meccanismi attraverso i quali lo spironolattone riduce la mortalità dei pazienti con SCC grave e pertanto a generare interpretazioni fisiopatologiche, biologicamente plausibili, di questo beneficio⁵⁴ (Tab. IV).

Lo studio del farmaco ha così prodotto una migliore comprensione delle azioni dell'aldosterone ed in particolare del ruolo che esso svolge nello SCC. Se ad esempio da tempo era nota una produzione di renina ed angiotensina in diversi organi non dipendente dal sistema renina-angiotensina circolante⁵⁵, solo in epoca post-RALES è stata identificata nel ratto una produzio-

ne di aldosterone (indotta dall'angiotensina II) direttamente a livello vascolare e cardiaco. L'ormone, sintetizzato dai miofibroblasti, raggiunge nel cuore concentrazioni 17 volte maggiori di quelle del plasma⁵⁶. Sempre nel cuore di ratto è stata dimostrata dopo infarto del miocardio un'aumentata produzione di aldosterone (stimolata dall'angiotensina II) ed una maggiore concentrazione di RNA messaggero specifico per l'aldosterone⁴⁴. Recentemente anche nell'uomo è stata dimostrata la produzione di aldosterone nel cuore ipertrofico e nel cuore scompensato con la documentazione di concentrazioni di aldosterone crescenti tra aorta e seno coronarico⁵⁷. La sintesi di aldosterone a livello cardiaco sarebbe resa possibile dalla produzione locale di angiotensina I e II, come suggerito dal riscontro di un gradiente di concentrazione dell'enzima di conversione tra aorta e seno coronarico⁵⁰. La produzione a livello cardiaco viene inibita dal losartan (1.6 volte) e dallo spironolattone (2.5 volte)⁵⁰. Confrontando le concentrazioni dell'aldosterone a livello aortico e nel seno coronarico, in soggetti normali e in pazienti affetti da SCC trattati con spironolattone, si è visto che in presenza di SCC anche l'estrazione cardiaca di aldosterone plasmatico viene inibita dal farmaco⁵⁸.

Queste ricerche segnalano l'affermarsi di nuovi schemi analitici tali per cui il cuore non è più considerato puro organo bersaglio, ma anche sede di estrazione e produzione di aldosterone; l'aldosterone svolge dunque un'azione non solo sistemica, ma anche paracrina.

Gli studi più recenti hanno evidenziato l'utilità di diversi approcci metodologici di indagine ed hanno suggerito l'uso di nuovi marker di potenziale interesse clinico. Valga ad esempio il caso del procollagene di tipo III (PIIINP) il cui livello plasmatico può essere considerato un indicatore del turnover del collagene, essendo la sua concentrazione correlata alla concentrazione di collagene di tipo III nelle biopsie miocardiche di pazienti affetti da SCC⁵⁹.

Non è perciò irrealistica l'ipotesi di un dosaggio di questo marker per valutare il turnover del collagene nell'uomo. In pazienti affetti da ipertensione arteriosa essenziale si è osservata una riduzione della concentrazione plasmatica di PIIINP, che procede parallelamente alla riduzione del grado di ipertrofia ventricolare sinistra, dopo 24 settimane di trattamento con 50 mg di spironolattone e ACE-inibitore, mentre l'effetto non è

Tabella IV. Azioni dell'aldosterone nello scompenso cardiaco.

Attiva la pompa membranale Na/K-Mg → accumulo di Na → deplezione di K-Mg	Effetto antidiuretico e di riduzione della compliance vascolare
Attiva la produzione di collagene I e III	Effetto aritmogeno
Inibisce il re-uptake cardiaco della noradrenalina	Effetto fibrotico
Aumenta la disfunzione endoteliale	Effetto adrenergico
Accentua l'inibizione dell'attivazione del plasminogeno	Effetto demodulante i flussi regionali
	Effetto antifibrinolitico

dimostrabile nei pazienti trattati con solo ACE-inibitore⁶⁰. In pazienti con SCC è stata dimostrata una correlazione tra gradiente transcordico di aldosterone e livelli ematici di PIIINP⁵⁸. La somministrazione di spironolattone induce una riduzione dei livelli ematici del PIIINP a 6 mesi, effetto già osservabile dopo 8 settimane di trattamento³², come dimostrato in un sottogruppo di 261 pazienti arruolati nel RALES⁵³. In pazienti con SCC ad eziologia non ischemica dopo 4 mesi di trattamento con 25 mg/die di spironolattone è stata documentata, oltre alla riduzione del PIIINP, anche una riduzione della massa e dei volumi ventricolari, nonché del livello plasmatico di peptide natriuretico cerebrale (verosimilmente mediata da una riduzione delle pressioni di riempimento e/o attenuazione dei processi di rimodellamento), in assenza di variazioni di pressione arteriosa o peso corporeo⁵⁸. L'effetto farmacologico diretto sembrerebbe attribuibile al blocco del recettore mineralcorticoide cardiaco.

Anche un'azione di tipo antiaritmico dello spironolattone potrebbe rendere ragione dell'aumento della sopravvivenza osservato nel RALES. Tale effetto è stato verificato recentemente in pazienti con disfunzione ventricolare sinistra⁶¹. In questi pazienti il trattamento si associava ad una diminuzione dei battiti ectopici ventricolari e degli episodi di tachicardia ventricolare non sostenuta, rilevati con ECG dinamico. Anche durante test da sforzo si evidenziava un significativo miglioramento sul piano aritmico. L'azione antiaritmica sarebbe in parte mediata da effetti sulla bilancia autonoma e sulla regolazione ionica (questi ultimi connessi anche con riduzioni della vasocostrizione coronarica) ed in parte spiegabile con effetti diretti dello spironolattone a livello cardiaco, indipendenti dall'antagonismo dell'aldosterone. Un trattamento con 50 mg/die di spironolattone per 4 settimane si è dimostrato efficace nel ridurre la dispersione del QT (possibile marker di rischio per morte cardiaca improvvisa) e nell'incrementare la variabilità RR (indice di aumento del tono vagale)⁶². Questi effetti mostrano un picco nelle prime ore del mattino⁶² e, limitatamente all'influenza sulla variabilità RR, persistono fino a 12 mesi dall'inizio del trattamento⁶³.

Dopo la pubblicazione del RALES è stato rivalutato lo stesso effetto diuretico dello spironolattone. Infatti la sua efficacia clinica potrebbe essere spiegata semplicemente da un aumento della natriuresi non associata ad una risposta neuroendocrina della stessa entità di quella prodotta da dosi equivalenti di furosemide⁶⁴. In ratti con SCC di origine ischemica, l'aggiunta di spironolattone alla terapia con ACE-inibitore determina un aumento della diuresi e dell'escrezione di sodio, con riduzione della pressione telediastolica ventricolare sinistra. Non essendo questo effetto ottenibile con spironolattone o ACE-inibitore in monoterapia, si è supposta un'interazione tra piccole dosi di spironolattone e ACE-inibitori, tale da inibire il riassorbimento di sodio a diversi livelli del tubulo renale⁶⁴.

Lo spironolattone sembra possedere anche effetti positivi sulla funzione endoteliale. In pazienti con SCC trattati per 1 mese con 50 mg di spironolattone si è osservato un miglioramento della funzione endoteliale, un incremento dell'attività dell'ossido nitrico, un'attenuazione della vasocostrizione mediata dall'angiotensina I, ma non dall'angiotensina II, e quindi un'inibizione vascolare della conversione dell'angiotensina I in angiotensina II, anche in presenza di trattamento cronico con ACE-inibitore⁶⁵. A sostegno dell'ipotesi di un impatto dello spironolattone sulla funzione endoteliale sta non solo il fatto che l'aldosterone riduce l'attività dell'ossido nitrico⁶⁶, ma anche la correlazione inversa tra livelli dell'ormone e compliance arteriosa, in parte legata all'ossido nitrico⁶⁷.

Prospettive e considerazioni conclusive

Una fase cruciale per la promozione di un farmaco, per il quale è già stato documentato un beneficio in trial di mortalità, è costituita dagli studi osservazionali di outcome dai quali si attendono conferme di efficacia attinenti alla pratica clinica quotidiana. Per lo spironolattone non sono stati ancora pubblicati dati prodotti da studi di questo tipo. Sono stati invece presentati dati concernenti l'uso dello spironolattone in epoca antecedente la pubblicazione del RALES, provenienti dal database IN-CHF (Italian Network-Chronic Heart Failure). Si tratta di una rete di oltre 130 centri cardiologici, rappresentativi della realtà ospedaliera nazionale, che hanno raccolto in un'unica banca dati informazioni clinico-prognostiche, strumentali e farmacologiche relative a pazienti con SCC. Su un totale di 8102 pazienti, 6850 erano in trattamento diuretico. Antialdosteronici erano prescritti nel 21% dell'intera popolazione, quasi esclusivamente in associazione con altri diuretici dell'ansa e solo raramente (0.4%) come unico diuretico^{68,69}. La concomitante terapia con digitale o furosemide, una classe funzionale NYHA III-IV, una frazione di eiezione < 30%, la presenza di fibrillazione atriale, la storia di ricovero per scompenso nell'anno precedente ed il sesso femminile sono risultati fattori predittivi indipendenti dell'uso di antialdosteronico. La presenza di terzo tono, una creatinemia > 2.5 mg, l'eziologia ischemica della disfunzione ventricolare sinistra, valori elevati di pressione arteriosa e la concomitante terapia con ACE-inibitore sono invece emersi come fattori associati ad un minor utilizzo di antialdosteronici. La dose media di spironolattone somministrata è stata di 82 ± 35 mg/die (range 12.5-200 mg/die), posologia notevolmente superiore a quella effettivamente utilizzata nello studio RALES (dose media giornaliera di 26 mg). Pertanto, prima del RALES gli antialdosteronici sono stati utilizzati in circa un quinto dei pazienti con SCC afferenti alla rete IN-CHF e in un quarto di quelli in terapia con diuretici, a dosi generalmente medio-

alte, o per ottenere un effetto congiunto diuretico e risparmiatore di potassio o per trattare quadri clinici di particolare gravità.

Sarà interessante vedere nei prossimi anni se e come la divulgazione dei risultati del RALES modificherà nel medio periodo l'uso di questi farmaci, consentendo di verificare l'impatto della terapia antialdosteronica sulla pratica clinica quotidiana.

Dato che nel RALES sono stati arruolati pazienti in classe funzionale avanzata, resta incerto il ruolo del trattamento antialdosteronico nei pazienti con minor compromissione funzionale, questione che verrà affrontata nello studio AREA IN-CHF (AntiRemodeling Effect of Aldosterone receptors blockade IN mild Congestive Heart Failure), promosso dall'Area Scompensato dell'ANMCO (Tab. V). Lo studio di nuovi antagonisti competitivi dei recettori dell'aldosterone come l'eplerenone, dotati di maggior selettività recettoriale e gravati da un minor tasso di effetti collaterali⁷⁰⁻⁷² sarà ancora una volta occasione e stimolo per produrre nuove conoscenze sullo SCC (Eplerenone Post-AMI for Heart failure Efficacy and SURvival Study-EPHESUS; Tab. VI).

Infine una nota di cautela. L'entità dei benefici clinici osservati nel RALES ha colto di sorpresa la comunità medico-scientifica, suscitando inizialmente notevoli perplessità. Non era infatti mai accaduto di usare per decenni un farmaco in una patologia specifica, senza che se ne comprendesse appieno l'efficacia. Si tratta dell'ennesima conferma della difficoltà di vedere ciò che non si sa e del rischio di scotomizzare l'evidenza, in assenza di un quadro analitico orientante o, in alternativa, di un'amplificazione di un trend positivo pro-

Tabella V. Schema relativo allo studio AREA IN-CHF.

Criteri di inclusione	Classe NYHA I-II Frazione di eiezione < 40% Terapia stabile
Criteri di esclusione	Scompensato cardiaco di origine valvolare operabile Angina instabile Infarto o intervento di bypass meno di 3 mesi prima Terapia inotropica e.v. negli ultimi 3 mesi Neoplasie maligne Cardiopatie congenite Fibrillazione o tachicardia ventricolare Epatite cronica o cirrosi Creatinina plasmatica > 2.5 mg/dl e K ⁺ > 5 mEq/l
Trattamento	Placebo Aldosterone 25-50 mg/die
Endpoint primario	Cambiamento dei volumi ventricolari e della frazione di eiezione
Endpoint secondari	Cambiamento in classe NYHA Mortalità per causa cardiaca Ospedalizzazione per causa cardiaca Combinazione della mortalità e delle ospedalizzazioni per causa cardiaca

Tabella VI. Schema relativo allo studio EPHESUS.

N. pazienti	6200
Follow-up	2.5 anni, o almeno fino ad avere 1012 decessi
Criteri di inclusione	Infarto miocardico documentato complicato da scompenso cardiaco Frazione di eiezione < 40% Condizioni cliniche stabili da 3 a 14 giorni dopo infarto miocardico
Criteri di esclusione	Scompensato cardiaco di origine valvolare o congenita Instabilità clinica Angina postinfartuale Impianto di defibrillatore Previsione di bypass aortocoronarico o trapianto cardiaco Creatinina plasmatica > 2.5 mg/dl e K ⁺ > 5 mEq/l
Trattamento	Placebo Eplerenone 25 mg/die aumentato dopo 4 settimane a 50 mg/die
Endpoint primari	Mortalità per tutte le cause Mortalità per tutte le cause e ospedalizzazioni per cause cardiovascolari
Endpoint secondari	Mortalità per cause cardiovascolari Mortalità improvvisa Morte per scompenso cardiaco Morte per infarto del miocardio Ictus Ospedalizzazione per tutte le cause

dotto dal gioco del caso? Il dilemma non sembra risolvibile senza i dati di altri studi clinici controllati, in attesa dei quali è oggi ragionevole considerare raccomandato l'antialdosteronico nei pazienti con SCC in classe funzionale avanzata.

Riassunto

Nello scompenso cardiaco cronico si è assistito ad una continua evoluzione dei paradigmi fisiopatologici (modello cardio-renale, vascolare, neurormonale) con conseguente cambiamento dell'approccio terapeutico. La migliore comprensione dei meccanismi di mantenimento dell'omeostasi circolatoria ha a sua volta generato nuovi cicli di studi che hanno evidenziato gli aspetti non solo sistemici, ma anche paracrini dei sistemi neurormonali e stimolato lo sviluppo di nuovi farmaci. L'analisi del percorso di sviluppo di un farmaco può in alcuni casi costituire un passo nella progressione delle conoscenze mediche. In questo senso l'aldosterone e lo spironolattone diventano un "caso" interessante che in questo lavoro viene analizzato attraverso le tappe fondamentali che hanno portato alla promozione dello spironolattone da diuretico a farmaco neurormonale e poi alla valorizzazione dei suoi effetti "centrali".

Parole chiave: Fisiopatologia; Renina-angiotensina; Scompenso cardiaco.

Bibliografia

1. Tourniaire A, Blum J, Guyot R, Madignier M. Myocardial hyperexcitability in decompensated cardiopathies. Effect of spironolactone. *Sem Hop* 1969; 45: 1388-92.
2. Levy B. The efficacy and safety of furosemide and a combination of spironolactone and hydrochlorothiazide in congestive heart failure. *J Clin Pharmacol* 1977; 17: 420-30.
3. Cohen AB. Hyperkalaemic effect of triamterene. *Ann Intern Med* 1966; 65: 521-7.
4. Bourke E. Diuresis and serum electrolytes levels: a comparative clinical study on butanide (Burinex), bumetamide-KCl (Burinex-K) and furosemide. *Clin Trial J* 1974; 11: 9-13.
5. Jackson P, Ramsey L, Wakefield V. Relative potency of spironolactone, triamterene and potassium chloride in thiazide-induced hypokalaemia. *Br J Clin Pharmacol* 1982; 14: 257-63.
6. Hussain M, Walton K, Davidson C, Morgan DB. A study of two different diuretic/potassium combinations in heart failure. *Postgrad Med J* 1985; 61: 29-33.
7. Dyckner T, Wester PO. Potassium/magnesium depletion in patients with cardiovascular disease. *Am J Med* 1987; 82 (Suppl 3A): 11-7.
8. Coppage WS Jr, Liddle GW. Mode of action and clinical usefulness of aldosterone antagonists. *Ann NY Acad Sci* 1960; 88: 815-21.
9. Ginsberg DJ, Saad A, Gabuzda GJ. Metabolic studies with diuretic triamterene in patients with cirrhosis and ascites. *N Engl J Med* 1964; 271: 1229-35.
10. Hutcherson DE. Recent advances in the pharmacology of diuretic drugs. *Am J Med Sci* 1967; 243: 620-30.
11. Kaplan NM. Our appropriate concern about hypokalaemia. *Am J Med* 1984; 70: 762-8.
12. van Vliet AA, Donker AJ, Nauta JJ, Verheugt FW. Spironolactone in congestive heart failure refractory to high-dose loop diuretic and low-dose angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Am J Cardiol* 1993; 71: 21A-28A.
13. Schohn DC, Jahn HA. Effects of a potassium-sparing/thiazide diuretic combination on cardiovascular reactivity to vasopressor agents. *Am J Cardiol* 1990; 65: 15-7.
14. Laragh JH. Hormones and the pathogenesis of congestive heart failure: vasopressin, aldosterone and angiotensin II: further evidence for renal-adrenal interaction from studies in hypertension and cirrhosis. *Circulation* 1962; 25: 1015-23.
15. Davis JO. The physiology of congestive heart failure. In: Hamilton WF, ed. *Handbook of physiology II*. Vol 3. Washington, DC: American Physiology Society, 1965: 2071-122.
16. Anand IS, Ferrari R, Kalra GS, Wahi PL, Poole-Wilson PA, Harris PC. Edema of cardiac origin. Studies of body water and sodium, renal function, hemodynamic indexes, and plasma hormones in untreated congestive cardiac failure. *Circulation* 1989; 80: 299-305.
17. The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987; 316: 1429-35.
18. Swedberg K, Eneroth P, Kjekshus J, Snapinn S. Effects of enalapril and neuroendocrine activation on prognosis in severe congestive heart failure (follow-up of the CONSENSUS trial). CONSENSUS Trial Study Group. *Am J Cardiol* 1990; 66: 44D-45D.
19. Swedberg K, Eneroth P, Kjekshus J, Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation* 1990; 82: 1730-6.
20. Vaughan D, Lamas G, Pfeffer M. Role of left ventricular dysfunction in selective neurohumoral activation in the recovery phase of anterior wall acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1990; 66: 529-32.
21. Benedict C, Johnstone D, Weiner D, et al. Relation of neurohumoral activation to clinical variables and degree of left ventricular dysfunction: a report from the registry of SOLVD. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 1410-20.
22. Cleland JGF, Dargie HJ, Hodsmen GP, et al. Captopril in heart failure: a double-blind controlled trial. *Br Heart J* 1984; 52: 530-5.
23. Biollaz J, Brunner HR, Gavras I, Waeber B, Gavras H. Antihypertensive therapy with MK421: angiotensin II-renin relationships to evaluate efficacy of converting enzyme blockade. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982; 4: 966-72.
24. Struthers AD. Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in chronic heart failure. *J Card Fail* 1996; 2: 47-54.
25. Givertz MM. Manipulation of the renin-angiotensin system. *Circulation* 2001; 104: E14-E18.
26. Wang W. Chronic administration of aldosterone depresses baroreceptor reflex function in the dog. *Hypertension* 1994; 24: 571-5.
27. Malik M, for the Task Force of the European Society of Cardiology and North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 1996; 93: 1043-65.
28. Barr CS, Lang CC, Hanson J, Arnott M, Kennedy N, Struthers AD. Effects of adding spironolactone to an ACE inhibitor in chronic congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995; 76: 1259-65.
29. Arora RB, Somami P. Ectopic arrhythmia provoking action of aldosterone. *Life Sci* 1962; 5: 215-8.
30. Schohn DC, Jahn HA, Pelletier BC. Dose-related cardiovascular effects of spironolactone. *Am J Cardiol* 1993; 71: 40A-45A.
31. Clement DL. Effect of spironolactone on systemic blood pressure, limb blood flow and response to sympathetic stimulation in hypertensive patients. *Eur J Clin Pharmacol* 1988; 21: 263-7.
32. MacFadyen RJ, Barr CS, Struthers AD. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart failure patients. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 30-4.
33. Pitt B, Zannad F, Remme W, et al, for the Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. *N Engl J Med* 1999; 341: 709-17.
34. Levitt JJ. Spironolactone therapy and amenorrhea. *JAMA* 1970; 211: 2014-25.
35. Smith WG. (letter) *Lancet* 1962; 2: 886.
36. Herman E, Rado J. Fatal hyperkalemic paralysis associated with spironolactone. Observation on a patient with severe renal disease and refractory oedema. *Arch Neurol* 1966; 15: 74-7.
37. Brown JJ, Chinn RH, Ferriss JB, Fraser R, Lever AF, Robertson JI. Spironolactone in hyperaldosteronism. *BMJ* 1969; 13: 684-8.
38. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991; 83: 1849-65.
39. Sun Y, Ratajska A, Zhou G, Weber KT. Angiotensin converting enzyme and myocardial fibrosis in the rat receiving angiotensin II or aldosterone. *J Lab Clin Med* 1993; 122: 395-403.
40. Robert V, Van Thiem N, Cheav SL, Mouas C, Swynghedauw B, Delcayre C. Increased cardiac types I and III

- collagen mRNAs in aldosterone-salt hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 30-6.
41. Young M, Fullerton M, Diller R, Funder J. Mineralcorticoids, hypertension and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 1994; 93: 2578-83.
 42. Young M. Adrenal steroids and cardiac fibrosis. *Steroids* 1995; 60: 133-6.
 43. Robert V, Heymes C, Silvestre JS, et al. Angiotensin AT1 receptor subtype as a cardiac target of aldosterone: role in aldosterone-salt-induced fibrosis. *Hypertension* 1999; 33: 981-6.
 44. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, et al. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation* 1999; 99: 2694-701.
 45. Duprez DA, Bauwens FR, De Buyzere ML, et al. Influence of arterial blood pressure and aldosterone on left ventricular hypertrophy in moderate essential hypertension. *Am J Cardiol* 1993; 71: 17A-20A.
 46. Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 563-75.
 47. Van Belle E, Bauters C, Wernet N. Neointimal thickening after balloon denudation is enhanced by aldosterone and inhibited by spironolactone and aldosterone antagonist. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 27-32.
 48. Slight VK, Chilakamari VK, Nasr S, et al. Inhibition of tissue repair by spironolactone: role of mineralcorticoids in fibrous tissue formation. *Mol Cell Biochem* 1998; 189: 47-54.
 49. Brilla CG. Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz* 2000; 25: 299-306.
 50. Delcayre C, Silvestre JS, Garnier A, et al. Cardiac aldosterone production and ventricular remodeling. *Kidney Int* 2000; 57: 1346-51.
 51. Degre S, Detry JM, Unger P, Cosyns J, Brohet C, Kormoss N. Effects of spironolactone-aldosterone on left ventricular hypertrophy. *Acta Cardiol* 1998; 53: 261-7.
 52. Sato A, Suzuki Y, Saruta T. Effects of spironolactone and angiotensin-converting enzyme inhibitor on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. *Hypertens Res* 1999; 22: 17-22.
 53. Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure. Insights from the Randomized Aldactone Evaluation Study (RALES). *RALES Investigators. Circulation* 2000; 102: 2700-6.
 54. Struthers AD. Why does spironolactone improve mortality over and above an ACE-inhibitor in chronic heart failure? *Br J Clin Pharmacol* 1999; 47: 479-82.
 55. Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* 1987; 79: 1-6.
 56. Silvestre JS, Robert V, Heymes C. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat: physiological regulation. *J Biol Chem* 1998; 273: 4883-91.
 57. Mizuno Y, Yoshimura M, Yasue H, et al. Aldosterone production is activated in the failing ventricles in humans. *Circulation* 2001; 103: 72-7.
 58. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Effect of spironolactone on plasma brain natriuretic peptide and left ventricular remodeling in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1228-33.
 59. Klappacher G, Franzen P, Haab D. Measuring extracellular matrix turnover in the serum of patients with idiopathic or ischemic dilated cardiomyopathy and impact on diagnosis and prognosis. *Am J Cardiol* 1995; 75: 913-8.
 60. Sato A, Takane H, Saruta T. High serum level of procollagen type III amino-terminal peptide contributes to the efficacy of spironolactone and angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy on left ventricular hypertrophy in essential hypertensive patients. *Hypertens Res* 2001; 24: 99-104.
 61. Ramires FJA, Mansur A, Coelho O, et al. Effect of spironolactone on ventricular arrhythmias in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated or to ischemic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2000; 85: 1207-12.
 62. Yee KM, Pringle SD, Struthers AD. Circadian variation in the effects of aldosterone blockade on heart rate variability and QT dispersion in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1800-7.
 63. Korkmaz ME, Muderrisoglu H, Ulucam M, Ozin B. Effects of spironolactone on heart rate variability and left ventricular systolic function in severe ischemic heart failure. *Am J Cardiol* 2000; 86: 649-53.
 64. Bauersachs J, Fraccarollo D, Ertl G, Gretz N, Wehling M, Christ M. Striking increase by low-dose spironolactone in congestive heart failure only in combination with ACE inhibitors. Mechanistic evidence to support RALES. *RALES Investigators. Circulation* 2000; 102: 2325-8.
 65. Farquharson CAJ, Struthers AD. Spironolactone increases nitric oxide bioactivity, improves endothelial vasodilator dysfunction, and suppresses vascular angiotensin I/angiotensin II conversion in patients with chronic heart failure. *Circulation* 2000; 101: 594-7.
 66. Ikeda U, Kanbe T, Nakayama I, Kawahara Y, Yokoyama M, Shimada K. Aldosterone inhibits nitric oxide synthesis in rat vascular smooth muscle cells induced by interleukin-1 beta. *Eur J Pharmacol* 1995; 290: 69-73.
 67. Duprez DA, De Buyzere ML, Rietzchel ER, et al. Inverse relationship between aldosterone and large artery compliance in chronically treated heart failure patients. *Eur Heart J* 1998; 19: 1371-6.
 68. Faggiano P. L'uso dei diuretici in soggetti con scompenso cardiaco cronico. Analisi su 8102 pazienti nell'Italian Network on Congestive Heart Failure (IN-CHF). (abstr) *Ital Heart J* 2000; 1 (Suppl 1): 82.
 69. Faggiano P. L'uso dei farmaci antialdosteronici in pazienti con scompenso cardiaco cronico. L'atteggiamento del cardiologo ospedaliero italiano prima dei risultati dello studio RALES. (abstr) *Ital Heart J* 2000; 1 (Suppl 1): 82.
 70. Cook CS, Zhang L, Fisher JS. Absorption and disposition of a selective aldosterone receptor antagonist, eplerenone, in the dog. *Pharm Res* 2000; 11: 1426-31.
 71. Delyani JA. Mineralcorticoid receptor antagonists: the evolution of utility and pharmacology. (abstr) *Kidney Int* 2000; 4: 1408-11.
 72. Delyani JA, Robinson EL, Rudolph AE. Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction. *Am J Physiol* 2001; 281: H647-H654.