

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO
IN SCIENZE FISIOPATOLOGICHE, NEUROPSICOBIOLOGICHE
ED ASSISTENZIALI DEL CICLO DELLA VITA

XXV CICLO

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

DOSAGGIO DIRETTO DELLA RENINA CON METODICA

CHEMILUMINOMETRICA:

CONFRONTO CON LA TECNICA ENZIMATICA

ED UTILIZZO NELLO SCREENING

DELL'IPERALDOSTERONISMO PRIMITIVO

Dottorando: Dott.ssa Chiara Lonati
Matr. n° R08593

Tutor: Prof. Alberto Morganti

Coordinatore: Prof. Roberto Weinstein

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

1.	Introduzione	pag. 3
1.1	Il sistema renina-angiotensina-aldosterone: visione classica	pag. 3
1.2	Il sistema renina-angiotensina-aldosterone tissutale	pag. 7
2.	L'iperaldosteronismo primitivo	pag. 10
2.1	Prevalenza	pag. 10
2.2	Fisiopatologia	pag. 14
3.	Selezione dei pazienti con sospetto iperaldosteronismo primitivo	pag. 17
3.1	Variabilità del rapporto aldosterone-renina in fase pre-analitica	pag. 18
3.2	Variabilità del rapporto aldosterone-renina in fase analitica	pag. 20
3.2.1	Dosaggio della PRA e dell'aldosterone plasmatico	pag. 20
3.2.2	Dosaggio della renina con tecnica diretta immunoradiometrica	pag. 22
3.2.3	Dosaggio della renina con tecnica diretta chemiluminometrica	pag. 23
3.2.4	Interpretazione del rapporto aldosterone-renina	pag. 27
4.	Scopo dello studio	pag. 29
5.	Pazienti e metodi	pag. 30
5.1	Pazienti	pag. 30
5.2	Metodi	pag. 31
5.2.1	Dosaggio dell'attività reninica plasmatica	pag. 32
5.2.2	Dosaggio della renina diretta chemiluminometrica	pag. 33
5.2.3	Dosaggio dell'aldosterone	pag. 34
5.2.4	Calcolo del rapporto aldosterone-renina	pag. 35
6.	Risultati	pag. 36
7.	Discussione	pag. 49
8.	Conclusioni	pag. 58
	Bibliografia	pag. 60

1. INTRODUZIONE

1.1 IL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE: VISIONE CLASSICA

Già nel 1898 gli studi pionieristici di Tigerstedt e Bergman avevano descritto gli effetti ipertensivanti di estratti di rene di coniglio infusi nel cane (1), ma fu solamente nel Novecento che si attribuì tale fenomeno alla renina. La principale funzione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (SRAA) è la regolazione degli equilibri idroelettrolitici e della pressione arteriosa, in particolare nelle condizioni di deplezione idro-salina. Il SRAA è infatti filogeneticamente molto antico e si ritiene che si sia sviluppato come fondamentale meccanismo di adattamento ad un ambiente ostile per la preservazione del volume circolante, della perfusione agli organi vitali e della funzione cardiovascolare e renale (2).

La renina, un'aspartil-proteasi, agisce da fattore limitante nella cascata proteolitica che porta alla formazione di Angiotensina I e II (AI e AII). Essa viene sintetizzata come prorenina non solamente nel rene, ma anche in altri apparati quali le gonadi, l'occhio ed il sistema nervoso; peraltro, è solamente nell'apparato juxta-glomerulare del nefrone che avviene l'attivazione irreversibile della prorenina mediante clivaggio di un segmento di 43 aminoacidi da parte di una proteasi catepsino-simile e successiva esocitosi. Il

75% della prorenina viene peraltro costitutivamente secreto come tale in circolo, ove si rileva in un rapporto di circa 10:1 con la renina e può andare incontro ad attivazione reversibile mediante temporanee modificazioni steriche a carico del pro segmento con esposizione del sito attivo in grado di legare l'angiotensinogeno. In vitro l'attivazione reversibile della prorenina per modifica conformazionale può avvenire per esposizione a basso pH (3.3-4.0) o a basse temperature (-4°C). Per lungo tempo si è ritenuto che la prorenina fosse solamente un precursore inattivo della renina, ma la scoperta del recettore per la prorenina ha modificato sostanzialmente tale convinzione. Il recettore della prorenina lega sia la prorenina che la renina, dimostrando peraltro per la prorenina un'affinità nettamente superiore. In seguito al legame con il suo recettore, la prorenina subisce delle modifiche conformazionali analoghe a quelle indotte dall'esposizione basso pH e bassa temperatura, acquisendo attività enzimatica per esposizione del sito attivo. Inoltre, da studi in vitro è emerso che la prorenina potrebbe anche regolare una serie di cascate di segnalazione intracellulare, in particolare attraverso l'attivazione del sistema delle MAP kinasi, in maniera del tutto indipendente dalla genesi di All e senza subire alcuna modifica sterica (3,4). Il rilascio di renina da parte delle cellule dell'apparato juxtaglomerulare viene stimolato da molteplici fattori quali la deplezione di sodio, l'ipovolemia e l'attivazione beta adrenergica. Tali meccanismi sono a loro volta regolati da feed-back negativi corti, mediati dall'All e lunghi, controllati dalle variazioni del volume

plasmatico e dei valori pressori. La stimolazione in acuto del SRAA incrementa il rilascio in circolo di renina da parte dell'apparato juxta-glomerulare ma non modifica i livelli di prorenina; in concomitanza di una stimolazione cronica, al contrario, si assiste ad un incremento sia della prorenina che della renina e ad un aumento del rapporto renina/prorenina. Esistono comunque importanti eccezioni in cui si rilevano livelli estremamente elevati di prorenina, anche 100 volte superiori rispetto alla renina ed in cui la prorenina stessa appare un marcatore di danno d'organo, come si osserva ad esempio nel diabete mellito con complicanze micro vascolari sia retiniche che renali (5).

La principale funzione della renina consiste nella conversione del suo substrato di sintesi epatica, l'angiotensinogeno (Ang), in Angiotensina I (AI), un decapeptide privo di attività biologica. La disponibilità di Ang rappresenta il fattore limitante della cascata enzimatica e la sintesi del substrato è a sua volta regolata da plurimi fattori tra cui ricordiamo l'insulina, gli estrogeni, i glucocorticoidi, gli ormoni tiroidei e l'AI stessa.

L'AI viene convertita in AII, un octapeptide, dall'enzima di conversione dell'angiotensina (ACE), diffuso ubiquitariamente nell'organismo ma localizzato preferenzialmente a livello dell'endotelio vascolare. L'AII, a sua volta, è in grado di stimolare il rilascio dell'aldosterone da parte della zona glomerulosa della corteccia surrenalica ma anche di esercitare una potente azione vasocostrittiva unitamente ad effetti inotropi e cronotropi positivi sul

miocardio (6). Infine, l'All è in grado di potenziare tali azioni inducendo direttamente rilascio di noradrenalina dalle terminazioni nervose ortosimpatiche.

L'All esercita le proprie azioni interagendo con due principali classi di recettori, AT1 e AT2, sottoclassi di una famiglia più ampia di recettori accoppiati alle G proteine e codificati da due geni distinti (7-10). Sebbene la maggior parte degli effetti emodinamici dell'All sia mediata dagli AT1, sembra che gli AT2 possano esercitare un'azione in un certo qual modo antagonista a quella svolta dagli AT1 (11,12). E' sempre attraverso il legame con gli AT1 che l'All stimola la sintesi ed il rilascio dell'aldosterone, sebbene tale fenomeno sia anche regolato dalla potassiemia e dai livelli di ACTH circolante (13). L'aldosterone, a sua volta, esercita un fondamentale ruolo nel controllo della volemia e degli equilibri elettrolitici inducendo il riassorbimento di sodio attraverso il canale epiteliale ENaC espresso dalla cellula principale del tubulo collettore renale e l'escrezione di potassio ed idrogenioni attraverso canali apicali posti nella medesima sede. Affini, sebbene meno rilevanti, sono i sistemi di trasporto apicale controllati dall'aldosterone e livello colico e cutaneo (14).

1.2 IL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONE TISSUTALE

Finora si è delineata la visione tradizionale del SRAA in qualità di sistema ormonale circolante deputato al controllo della volemia e della pressione arteriosa. Da ulteriori studi è peraltro emerso come, oltre al SRAA circolante, esista un SRAA tissutale ubiquitariamente distribuito e dotato di un ruolo centrale nella patologia cardiovascolare. Con l'eccezione della renina, è stata dimostrata la produzione locale di pressoché tutti i componenti del SRAA, che agirebbero dunque a livello tissutale con un meccanismo autocrino e paracrino (15,16). Un esempio paradigmatico a conferma di questa ipotesi è costituito dal SRAA tissutale encefalico: l'identificazione dei recettori AT1 e AT2 al di là della barriera ematoencefalica, non permeabile all'Ang prodotta a livello sistemico, ha generato l'ipotesi, in un secondo tempo confermata, della sintesi locale sia di Ang che di ACE. In seguito è stata confermata la rilevanza del SRAA encefalico, che appare coinvolto nella secrezione di vasopressina, nella regolazione del riflesso barocettivo e nella modulazione delle efferenze simpatiche (17-19).

L'organizzazione del SRAA a livello cardiaco non è ancora del tutto chiarita, in quanto pare che alcuni elementi del sistema, oltre alla renina, debbano essere captati dal circolo sistemico, ma è peraltro ben attestato il ruolo fondamentale del SRAA nei processi di fibrosi, ipertrofia e rimodellamento miocardico (20).

E' possibile che il SRAA circolante e quello tissutale svolgano ruoli sinergici nell'omeostasi cardiovascolare agendo con dinamiche temporali differenti. Infatti il SRAA circolante, mediante la rapida secrezione di renina in risposta alle modificazioni di volume, pressione e natremia ed il conseguente pronto incremento dell'All, consente un ripristino a breve termine degli equilibri idrosalini mediante vasocostrizione diretta e rilascio di aldosterone, che determina a sua volta riassorbimento renale di sodio e acqua. Il SRAA tissutale, invece, attraverso i documentati effetti pro-mitogeni e proliferativi, potrebbe essere coinvolto nei meccanismi di adattamento a lungo termine inducendo modificazioni strutturali a livello cardiaco, renale e vascolare in risposta alle alterazioni pressorie e volemiche. L'All è infatti in grado di aumentare l'espressione di proto-oncogeni e geni fetali e di indurre l'espressione genica di numerose sostanze biologicamente attive quali citochine, fattori di crescita, endotelina 1, trombossano A2 (21,22). Inoltre l'All, al pari dell'aldosterone, agisce sui cardiomiociti, i fibroblasti, le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce e mesangiali renali attivando numerose cascate di trasduzione intracellulare del segnale (23,24).

In modo analogo, è anche possibile che i due SRAA svolgano un ruolo sinergico nella genesi del danno d'organo. A conferma di ciò, numerosi studi di intervento hanno dimostrato come i farmaci bloccanti del SRAA modulino le alterazioni strutturali cardiache, vascolari e renali in un'ampia gamma di condizioni patologiche associate o meno ad ipertensione arteriosa (25-28).

Tra gli studi che in modo più convincente hanno dimostrato il ruolo patogenetico del SRAA ricordiamo lo studio HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation study) che ha valutato se la terapia con un inibitore dell'ACE, il ramipril, fosse in grado di ridurre la morbilità e la mortalità cardiovascolare in una popolazione ad alto rischio. Dopo un follow-up medio di 4.5 anni il ramipril ha ridotto in modo significativo l'endpoint primario, rappresentato dall'incidenza di infarto miocardico acuto (9.9% vs 12.3%), di ictus (3.4% vs 4.9%) e di morte cardiovascolare (6.1% vs 8.1%) (29).

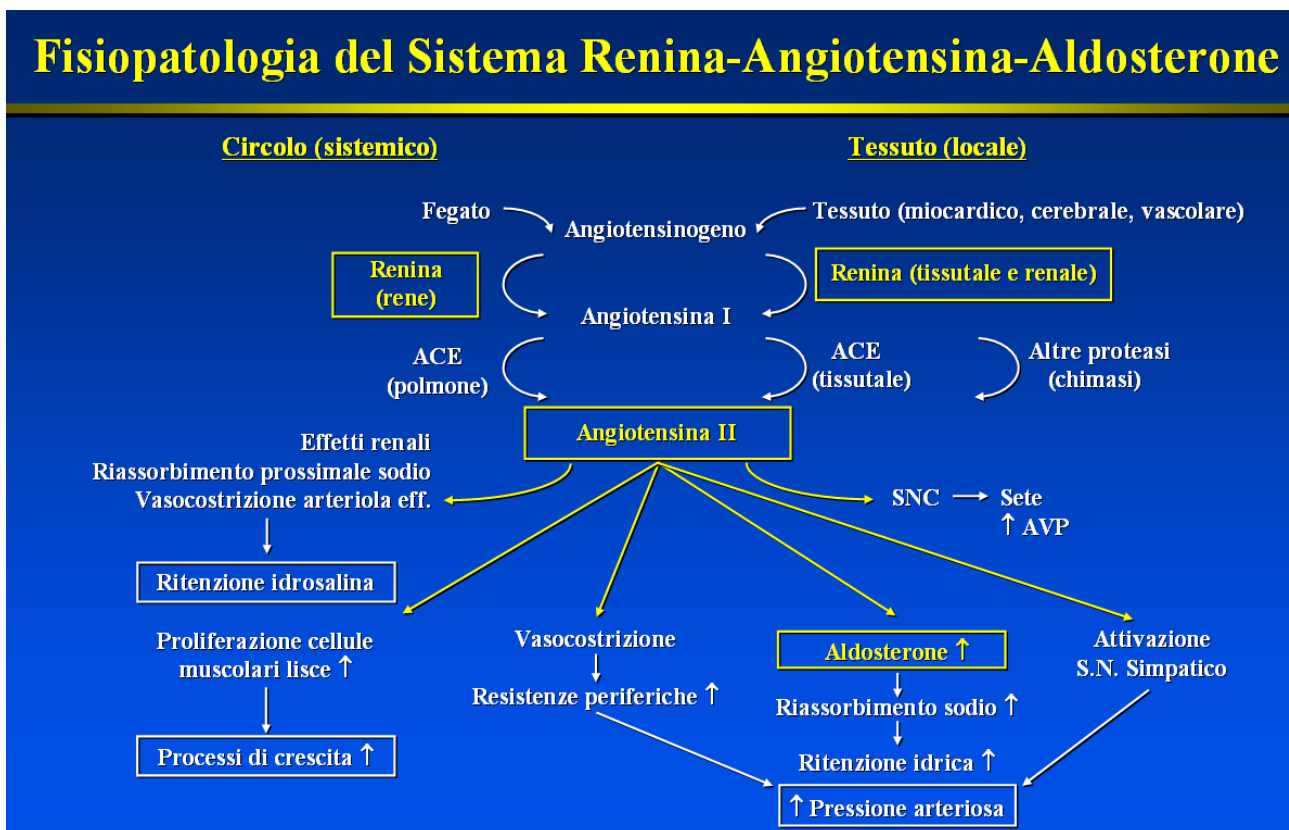


Figura 1: Fisiologia del sistema renina-angiotensina-aldosterone

2. L'IPERALDOSTERONISMO PRIMITIVO

2.1 PREVALENZA

Il primo caso di iperaldosteronismo primario (IP) fu descritto da Conn nel 1955 in una donna con tumore surrenalico (30). La segnalazione del caso clinico fu seguita a breve dalla descrizione degli aspetti biochimici dell'aldosterone e dei suoi effetti biologici. Fu dunque possibile stabilire un nesso causale tra l'eccesso di produzione dell'ormone e lo stato ipertensivo ad esso associato, venne coniato il termine "Aldosterone Producing Adenoma" (APA) e si definì IP o sindrome di Conn il quadro clinico correlato (31). La prevalenza dell'IP è stata oggetto di discussione fin dalla sua scoperta. Conn e collaboratori sostenevano infatti che almeno il 20% degli ipertesi essenziali fosse in realtà portatore di IP spesso anche in assenza dell'ipopotassiemia che, almeno in origine, era ritenuta il tratto patognomonico. Peraltro, già alla fine degli anni Sessanta si era affermata la convinzione che l'IP fosse piuttosto raro e lo stesso Conn finì per convenire che una prevalenza del 7.5% fosse in realtà più realistica (32). Negli anni successivi la prevalenza dell'IP continuò ad essere soggetta a stime molto variabili, comprese tra l'1.4% ed il 32% ed influenzate probabilmente dalla variabilità delle casistiche selezionate (33). In ogni modo, se in passato si riteneva che tale patologia non interessasse più dell'1% della popolazione

generale degli ipertesi, negli ultimi vent'anni le stime di prevalenza sono progressivamente cresciute alimentando nella comunità scientifica un acceso dibattito in merito ad una potenziale "epidemia" di IP (34,35).

Probabilmente l'incremento della prevalenza dell'IP è stato dovuto almeno in parte a due importanti fattori inerenti alla fase diagnostica. In primo luogo, la disponibilità di tecniche di imaging sempre più raffinate ha consentito di visualizzare microadenomi che in passato erano abitualmente sfuggiti alla diagnosi. In secondo luogo, l'introduzione come test di screening del rapporto aldosterone/renina (ARR) e la sua rapida diffusione ha consentito di identificare molti più casi di IP rispetto all'epoca in cui l'ipopotassiemia era ritenuta requisito imprescindibile per l'avvio di approfondimenti diagnostici (36).

Al di là dei progressi nel campo della diagnostica, una solida evidenza del ruolo emergente dell'IP come causa di ipertensione secondaria è derivata dallo studio PAPY, condotto in Italia su una popolazione di oltre 1000 ipertesi di nuova diagnosi afferenti ad Ambulatori Specialistici, in cui la prevalenza dell'IP è risultata pari all'11.2% (37, 38).

Lo studio PAPY presentava due punti di forza. In primo luogo, definiva criteri diagnostici rigorosi in quanto, oltre all'evidenza biochimica di IP, si richiedeva anche:

-la dimostrazione della lateralizzazione della secrezione di aldosterone mediante cateterismo selettivo delle vene surrenali che e/o scintigrafia surrenalica.

-la conferma anatomopatologica dell'adenoma.

-il miglioramento dello stato ipertensivo dopo surrenalectomia oppure, nel caso in cui questa non fosse praticabile, dopo introduzione di antialdosteronici in terapia.

Il secondo merito dello studio PAPY è stato di aver effettuato la distinzione tra IP da APA ed iperaldosteronismo idiopatico (IHA), riconducibile ad una iperplasia surrenalica mono o bilaterale (MHA e BHA) e non suscettibile di trattamento chirurgico. Con tale classificazione, la prevalenza globale dell'IP è risultata dell'11.2%, di cui il 4.8% sostenuto da APA ed il 6.4% da IHA.

Sulla base di tali dati si può dunque concludere che l'IP rappresenta la più comune forma di ipertensione arteriosa secondaria e che la ricerca più approfondita di tale condizione nei pazienti ipertesi è giustificata dall'elevata prevalenza anche in popolazioni non particolarmente selezionate.

Tuttavia, l'entusiasmo per la ricerca "a tappeto" dell'IP in tutti gli ipertesi è stato oggetto anche recentemente di critiche a causa dell'elevato rapporto costo-beneficio di tale strategia. Kaplan e collaboratori (39) hanno calcolato che l'iter diagnostico per una conferma definitiva di IP verrebbe a costare circa 250.000 dollari, spesa chiaramente insostenibile per qualunque sistema sanitario. Considerando anche sovrastimata tale cifra, in quanto calcolata

nell'ambito particolare dell'assistenza sanitaria statunitense, è comunque inevitabile, alla luce dell'elevata prevalenza dell'ipertensione arteriosa (25-30% in Italia, pari a circa 20 milioni di ipertesi), che si effettui una selezione a priori dei soggetti da indagare per IP.

Secondo le Linee Guida definite nel 2008 dalla Società Europea di Endocrinologia (40) sono candidate ad approfondimento diagnostico per la ricerca di IP le seguenti categorie di pazienti:

- 1 Soggetti con ipopotassiemia spontanea o indotta da diuretici.
- 2 Soggetti portatori di ipertensione arteriosa resistente e/o di stadio 2 e 3.
- 3 Soggetti affetti da ipertensione arteriosa ad insorgenza precoce e/o colpiti da ictus cerebrale prima dei 50 anni d'età.
- 4 Soggetti ipertesi con riscontro di masse surrenaliche.
- 5 Soggetti portatori di ipertensione arteriosa con danno d'organo cardiaco, renale, cerebrale sproporzionato rispetto ai valori pressori.
- 6 Soggetti affetti da ipertensione arteriosa e sindrome metabolica.

E' indubbiamente da sottolineare come il rapporto costo-beneficio dello screening diagnostico sarà tanto più favorevole quanto maggiore la probabilità pre-test nella popolazione selezionata.

2.2 FISIOPATOLOGIA

L'IP, a prescindere che sia causato da un adenoma o da un'iperplasia surrenalica, si caratterizza per una produzione eccessiva ed autonoma di aldosterone responsabile sia dell'incremento della pressione arteriosa che dell'ipopotassiemia.

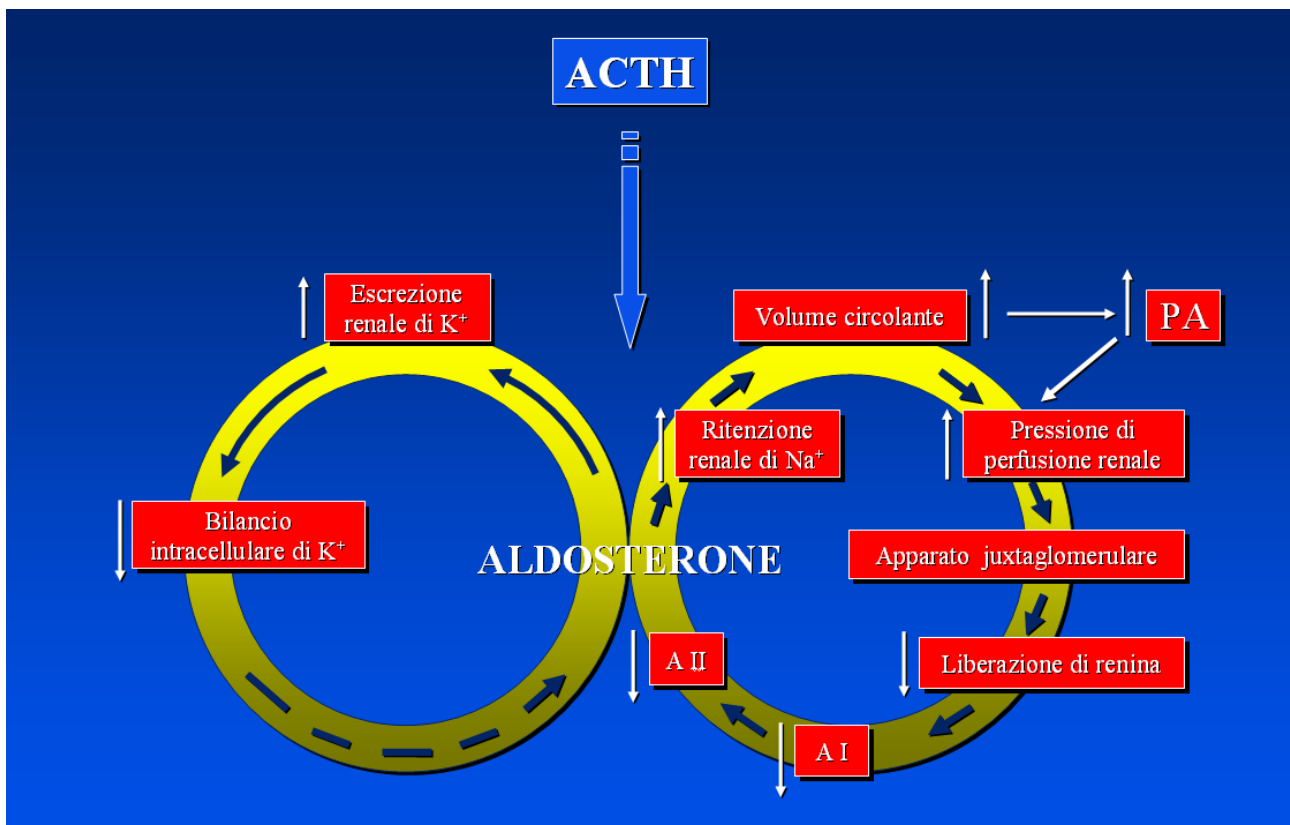


Figura 2: Fisiopatologia dell'iperaldosteronismo primitivo.

L'aldosterone induce un aumento dell'espressione del canale epiteliale del sodio (ENaC) a livello del tubulo collettore cui consegue un incremento del

riassorbimento renale di sodio ed acqua, a sua volta responsabile dell'espansione del volume plasmatico e dell'incremento della pressione arteriosa. Inoltre, l'aumentato riassorbimento di sodio incrementa le perdite luminali di potassio provocandone la deplezione intra ed extra-cellulare. L'aumento pressorio e l'espansione volemica determinano, mediante attivazione dei barocettori, un'inibizione dell'asse renina-angiotensina cui non corrisponde peraltro una riduzione dell'aldosterone in quanto secreto in modo autonomo e deregolato. L'ipopotassiemia, al contrario, è ancora in grado di inibire almeno parzialmente la produzione dell'ormone mediante un meccanismo di feed-back corto ed è per questo motivo che la supplementazione di potassio non corregge l'ipokaliemia associata all'IP, in quanto determina un ulteriore incremento dell'aldosterone. Come conseguenza della spiccata ipopotassiemia si sviluppa alcalosi sia plasmatica che urinaria e si instaura una "tubulopatia ipokaliemica" caratterizzata da un difetto tubulare acquisito nell'acidificazione e concentrazione delle urine, a sua volta responsabile di poliuria e polidipsia. L'ipopotassiemia determina inoltre significative alterazioni nei potenziali transmembranari con iperpolarizzazione cellulare e difetto di conduzione nervosa. Ciò è all'origine dei crampi e delle parestesie tipicamente associate a tale alterazione elettrolitica e, nelle forme più gravi, può provocare un vero e proprio blocco di conduzione con paralisi flaccida ascendente e paralisi respiratoria. A livello cardiaco le alterazioni elettrofisiologiche indotte dall'ipopotassiemia si

manifestano più comunemente con l'allungamento del QT, ma possono anche indurre eventi aritmici maggiori o ridotta sensibilità dei miociti agli stimoli nervosi ed umorali, con conseguente compromissione della funzione contrattile.

Inoltre, l'aldosterone di per sé è dotato di significativi effetti pro-mitogeni ed infiammatori che magnificano il danno d'organo attribuibile al solo stato ipertensivo (41) e che giustificano l'incremento del rischio e degli eventi cardiovascolari osservato nei pazienti affetti da IP rispetto agli ipertesi essenziali (42, 43).

Non è da escludere che l'aldosterone incrementi il rischio cardiovascolare anche mediante effetti indiretti di carattere metabolico. La secrezione insulinica è infatti potassio mediata e le condizioni ipopotassiemia si associano tipicamente ad alterazioni del metabolismo glucidico fino al diabete mellito franco, che peraltro regredisce dopo asportazione chirurgica dell'adenoma e normalizzazione della kaliemia.

3. SELEZIONE DEI PAZIENTI CON SOSPETTO IPERALDOSTERONISMO PRIMITIVO

Alla luce delle considerazioni sopra esposte è possibile concludere che l'IP costituisce una patologia ad elevata prevalenza nella popolazione degli ipertesi, in particolare nei soggetti portatori di ipertensione arteriosa grave e resistente alla politerapia farmacologica; inoltre, tale condizione è potenzialmente pericolosa in quanto si associa spesso a danno d'organo ed è responsabile di un importante incremento del rischio di eventi cardiovascolari. Considerati tali presupposti, la possibilità di trattare efficacemente tale patologia con l'exeresi chirurgica degli adenomi e comunque con la terapia antialdosteronica nelle forme non operabili (44) sottolinea l'importanza di un'adeguata e tempestiva diagnosi e rende necessario disporre di un'affidabile indagine di screening. Come già accennato, l'ipokaliemia non è dotata di sufficiente sensibilità per essere utilizzata come criterio di selezione per sospetto IP, in quanto solo la metà dei pazienti con APA e il 17% di quelli con IHA la manifestano (37,38).

Il test di screening attualmente suggerito dalle Linee Guida per la diagnosi dell'IP è rappresentato dal rapporto aldosterone/renina (ARR), che pone al numeratore l'aldosterone e al denominatore la renina misurata con metodica enzimatica ed espressa come attività reninica plasmatica (PRA) (40). L'ARR è dotato di accuratezza diagnostica superiore sia alla misurazione del

potassio che a quella del solo aldosterone, in quanto tali analiti possono essere significativamente alterati anche in patologie differenti dall'IP, come ad esempio gli iperaldosteronismi secondari e la malattia renovascolare (45, 46). Inoltre, l'associazione di bassi valori di renina con elevati livelli di aldosterone può consentire di differenziare gli IP dall'ipertensione essenziale a bassa renina, condizione che si osserva in circa il 30% degli ipertesi essenziali e che è stata arbitrariamente definita per valori di PRA <0.65 ngAl/ml/h (47). E' peraltro da sottolineare come anche nell'ipertensione a bassa renina si possa rilevare un ARR elevato e come gli errori pre-analitici e i limiti delle metodiche di dosaggio possano influenzare significativamente l'ARR generando sia falsi positivi che falsi negativi.

3.1 VARIABILITA' DEL RAPPORTO ALDOSTERONE-RENINA IN FASE PRE-ANALITICA

Come già accennato, l'aldosterone è influenzato dai valori di potassiemia in modo inversamente proporzionale. Per evitare l'effetto inibitorio sulla secrezione di aldosterone derivante dall'ipokaliemia le Linee Guida raccomandano di correggere tale alterazione elettrolitica con adeguata supplementazione. Si dovrebbe, inoltre, controllare il contenuto sodico della dieta garantendo un apporto giornaliero non superiore a 150 mEq; in tal

modo sarà possibile evitare un'eccessiva espansione volemica, a sua volta in grado di ridurre la secrezione di aldosterone.

Un altro fattore confondente si correla alla postura: passando dal clino all'ortostatismo si osserva un incremento sia della renina, principalmente simpato-mediato, che dell'aldosterone, ma potrebbe accadere che l'aldosterone aumenti proporzionalmente più della renina per una ridotta clearance metabolica a livello epatico, aumentando significativamente l'ARR (48). Al fine di garantire una maggiore uniformità di risultati, è stato dunque consigliato di eseguire il prelievo ematico dopo che il paziente è rimasto seduto per almeno 15 minuti.

L'elemento confondente più importante è peraltro rappresentato dall'interferenza farmacologica. La maggior parte dei farmaci antipertensivi modifica infatti la secrezione di renina e, conseguentemente, ha effetti indiretti sull'aldosterone. Gli ACE inibitori, i sartani e i diuretici determinano un incremento reattivo della renina ed una conseguente riduzione dell'ARR con rischio di falsi negativi (49) mentre i beta bloccanti e i simpatolitici centrali possono generare falsi positivi determinando una riduzione della renina (50). L'interpretazione dell'ARR viene ulteriormente complicata dal fatto che spesso questi farmaci vengono somministrati in associazione, esercitando a volte effetti opposti sulla secrezione reninica (come ad esempio nel caso di diuretici e beta bloccanti), a volte azioni sinergiche (come nel caso di bloccanti del SRAA e diuretici). Da queste problematiche deriva l'indicazione

delle Linee Guida a calcolare l'ARR in wash out da farmaci antipertensivi, con l'eccezione di calcio antagonisti ed alfa-litici, dotati di effetti modesti sulla secrezione di renina e aldosterone. Il wash out farmacologico è peraltro spesso difficoltoso se non addirittura pericoloso poiché richiede una sospensione della terapia per 3 settimane in pazienti spesso affetti da ipertensione severa (34). Inoltre, l'indicazione assoluta al wash out potrebbe non trovare una completa giustificazione nella pratica clinica. Vi sono infatti evidenze in letteratura che, escludendo i beta bloccanti che sono effettivamente in grado di ridurre spiccatamente la specificità del test con un numero inaccettabile di falsi positivi, le altre classi farmacologiche potrebbero non influenzare l'ARR in modo così significativo da renderne assolutamente necessaria la sospensione (51, 52).

3.2 VARIABILITA' DEL RAPPORTO ALDOSTERONE-RENINA IN FASE ANALITICA

3.2.1 DOSAGGIO DELLA PRA E DELL'ALDOSTERONE PLASMATICO

La determinazione dell'attività reninica plasmatica (PRA, ngAl/ml/h) mediante saggio enzimatico ha rappresentato per decenni il gold standard per la misurazione della renina. Questa metodica garantisce la massima accuratezza anche per valori di renina estremamente bassi, come si osserva

nell'IP, poiché grazie al prolungamento dei tempi di incubazione, durante la quale l'enzima reagisce con il suo substrato, è possibile generare AI in concentrazioni sufficienti da poter essere misurate agevolmente nella successiva fase radioimmunologica (47). D'altra parte, tale metodica è tecnicamente complessa, completamente manuale e gravata da lunghi tempi di esecuzione. Inoltre, nel saggio enzimatico i valori finali della PRA sono ottenuti sottraendo all'AI generata a 37°C quella presente in aliquote dello stesso campione mantenute a 4°C (blank). L'errore metodologico sistematico nel calcolo di un valore ottenuto per differenza è all'origine della scarsa riproducibilità inter-laboratorio della PRA, specialmente per valori bassi e molto bassi, che impedisce un'adeguata standardizzazione dei risultati e ne rende poco praticabile l'impiego al di fuori dei centri specializzati (53). Come diretta conseguenza, anche la soglia di normalità dell'ARR per la diagnosi di IP è risultata molto variabile nei diversi studi, ponendo serie limitazioni al suo utilizzo come test di screening. Al fine di evitare false positività dell'ARR in pazienti con renina costituzionalmente bassa, come i soggetti di razza nera e gli anziani, è stato dunque proposto di fissare arbitrariamente il valore più basso di PRA a 0.2 ngAI/ml/h. Ciò, peraltro, rende necessario fissare anche per l'aldosterone un limite assoluto, che nei soggetti con IP non dovrebbe essere inferiore a 15 ng/dl. Da ultimo, occorre sottolineare come anche le metodiche radioimmunometriche di misurazione dell'aldosterone abbiano spesso dimostrato una scarsa riproducibilità (54), per cui si stanno

affermando nuove tecniche di dosaggio mediante spettrometria di massa in grado di fornire risultati più affidabili (55).

3.2.2 DOSAGGIO DELLA RENINA CON TECNICA DIRETTA IMMUNORADIOMETRICA

Al fine di ovviare ai limiti della PRA, oltre 20 anni fa sono stati messi a punto anticorpi monoclonali che hanno consentito la quantificazione diretta della renina con metodica immunoradiometrica (IrR) (56). Nelle sue prime applicazioni questa tecnica comportava una prima fase di incubazione del plasma con una sospensione di ossido ferroso adeso a particelle di poliacrilamide agarosio sui cui era adsorbito un primo anticorpo monoclonale specifico sia per la renina che per la prorenina. Al termine dell'incubazione i complessi antigene-anticorpo formati venivano separati dal surnatante mediante barre magnetiche e risospesi in una soluzione tamponata contenente un secondo anticorpo radiomarcato con iodio 125 e specifico per la sola renina attiva. Si formavano così dei complessi a sandwich che, dopo lavaggio del tracciante in eccesso, venivano quantificati attraverso la misurazione della radioattività che risultava direttamente proporzionale al loro numero. L'IrR così determinata mostrava una buona correlazione con la PRA (57) ed una più elevata riproducibilità sia inter che intra-laboratorio (58). L'accuratezza della metodica è stata peraltro oggetto di discussione poiché la

prorenina è presente nel plasma in concentrazioni molto superiori a quelle della renina e potrebbe dunque cross-reagire con gli anticorpi renina-specifici, causando problemi di sovrastima soprattutto nei campioni di plasma a bassa renina come quelli ottenuti nei casi di IP, in cui la prorenina è particolarmente elevata. Inoltre, la metodica diretta immunoradiometrica con la tecnica sopra descritta appariva penalizzata da una limitata sensibilità, il che la rendeva ulteriormente inaccurata negli stati a bassa renina, in cui è invece possibile mantenere un'adeguata performance diagnostica della PRA mediante prolungamento dei tempi di incubazione (59). Da ultimo, rappresentava una significativa limitazione all'utilizzo della metodica di dosaggio diretto l'impiego di sostanze radioattive, che comporta l'adozione di particolari misure di radioprotezione laboratoristica.

3.2.3 DOSAGGIO DELLA RENINA CON TECNICA DIRETTA CHEMILUMINOMETRICA

Al fine di eliminare l'impiego dei radioisotopi e di incrementare ulteriormente la sensibilità diagnostica, più di recente è stata sviluppata una tecnica alternativa per la determinazione diretta chemiluminometrica della renina plasmatica (CliR). Tale metodica, completamente automatizzata, si caratterizza per la semplice e rapida esecuzione (circa 40 minuti) e presenta il vantaggio aggiuntivo di non impiegare anticorpi radiomarcanti. Il saggio si

articola in una prima fase di incubazione in cui il plasma viene posto a contatto con un anticorpo in fase solida (particelle magnetiche) diretto sia verso la prorenina che verso la renina umana. Successivamente si effettua un ciclo di lavaggio per eliminare il materiale non legato e si aggiunge un secondo anticorpo, specifico per la sola renina e coniugato con una molecola di isoluminolo (Fig.3).

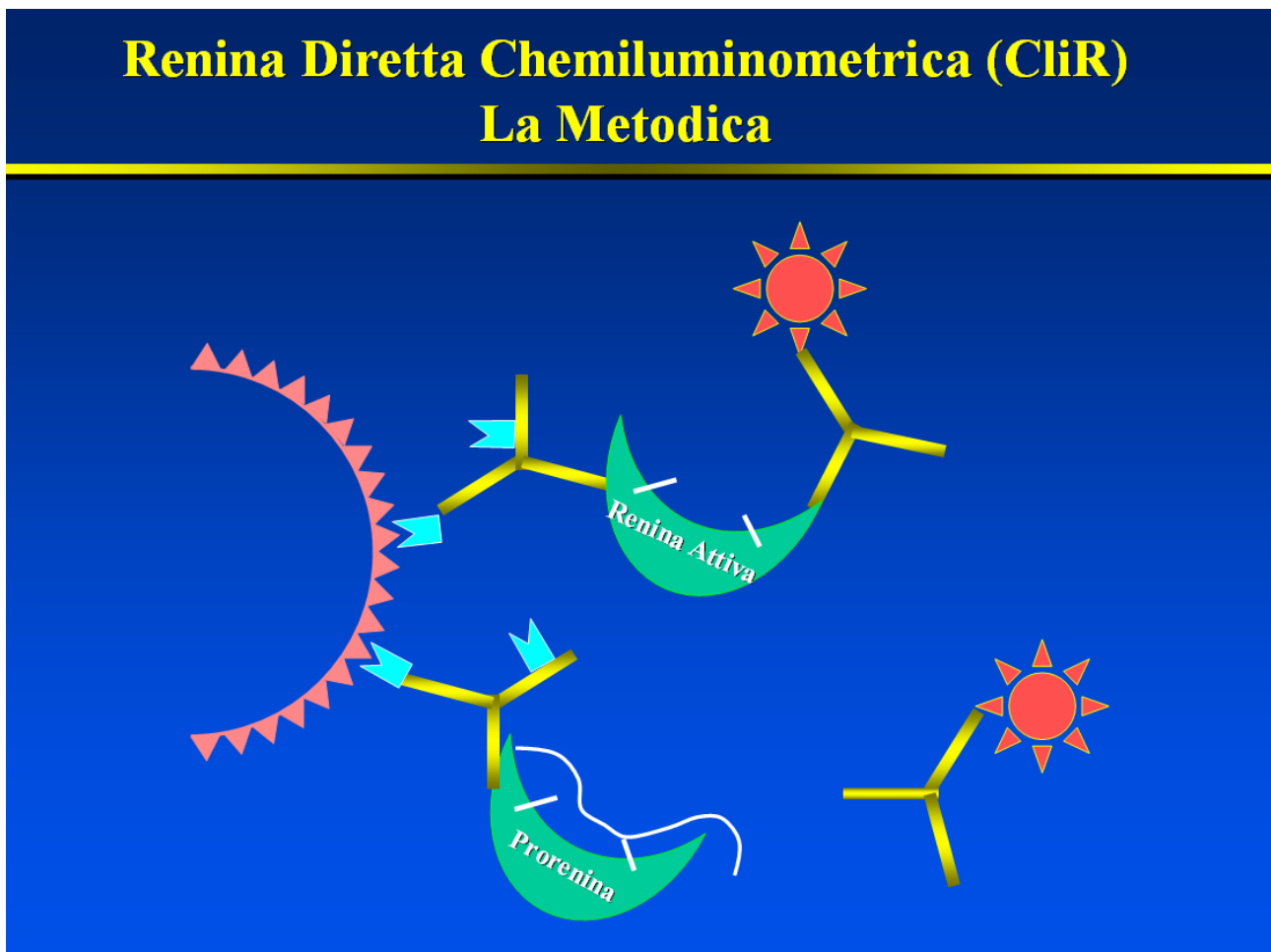


Figura 3: Un primo anticorpo diretto viene incubato con particelle magnetiche ricoperte da anticorpi diretti contro la renina e la prorenina. Un secondo anticorpo specifico per la sola renina legato ad una molecola di isoluminolo forma una struttura a sandwich.

Posto a contatto con appositi reagenti starter (perossido di idrogeno in ambiente basico) l'isoluminolo subisce una rottura dei legami tra due atomi di azoto dell'anello eterociclico e si trasforma in acido aminoftalico, sprigionando luce (Fig.4).



Figura 4: La reazione generante luce.

Il segnale luminoso viene misurato da un fotomoltiplicatore come Unità di Luce Relative (RLU) e risulta proporzionale alla concentrazione della renina nel campione di plasma il cui valore finale, espresso in mUI/l si ottiene per

estrapolazione da una curva standard di calibratori a contenuto noto di renina (Fig. 5).

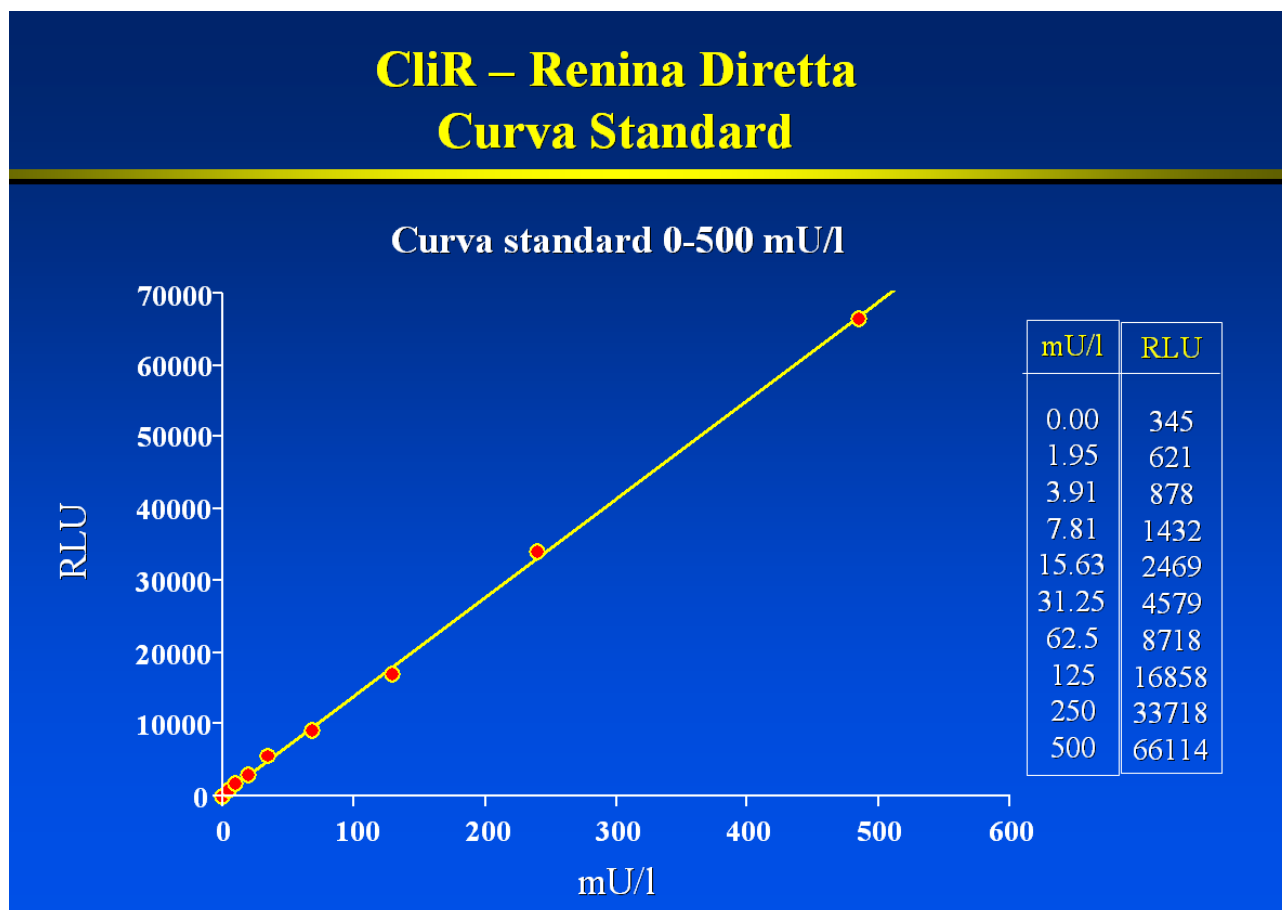


Figura 5: Curva standard della metodica chemiluminometrica.

Questa nuova metodica, oltre a dividerne i vantaggi rispetto alla tecnica enzimatica, consente di superare i limiti di sensibilità della tecnica immunoradiometrica dimostrandosi accurata fino a concentrazioni di renina nell'ordine di 2 mU/l. Già negli studi di validazione la renina immunoreattiva chemiluminometrica aveva evidenziato una buona correlazione con la PRA

anche nel terzile inferiore (60, 61) ma ancora più rilevanti sono stati i risultati di un recente studio multicentrico in cui la CliR ha dimostrato una riproducibilità inter ed intra-laboratorio elevata, nettamente superiore alla PRA (62). Peraltro, i fattori di conversione tra le due metodiche non sono stati ancora definiti con certezza, anche perché se un valore di PRA pari a 1 ngAl/ml/h corrispondeva a circa 8.2 mU/l con la tecnica chemiluminometrica sviluppata originariamente da Nichols Laboratories ed attualmente non più in commercio, il fattore di conversione definito per l'analogo metodo brevettato da DiaSorin è pari a 12 mU/l. Inoltre, data la relativa novità della metodica, si dispone di poche evidenze circa l'utilizzo della CliR per il calcolo del rapporto aldosterone/renina (63,64).

3.2.4 INTERPRETAZIONE DEL RAPPORTO ALDOSTERONE-RENINA

Poiché l'ARR è calcolato con tecniche di dosaggio differenti per entrambi i parametri del rapporto, espressi tra l'altro con unità di misura diverse, i limiti di normalità variano molto da laboratorio a laboratorio ed i risultati sono spesso scarsamente confrontabili (36, 65-69). Nella tabella 1 sono illustrati i valori di riferimento dell'ARR con la renina espressa sia come PRA che come IrR e CliR. I valori di cut-off per la diagnosi di IP con il relativo range sono riportati con le diverse unità di misura impiegate sia per la renina che per

l'aldosterone plasmatico, utilizzando per quest'ultimo un fattore di conversione di 27.7 pmol/l corrispondenti a 1 ng/dl.

Range di Cut-off dell'ARR e Cut-off Consigliato dalle Linee Guida Endocrine Society

	PRA (ngAI/ml/h)	PRA (pmol/l/min)	DRC (ng/l)	DRC (mU/l)
Aldosterone (ng/dl)	30 (range 20-40)	2.5 (range 1.6-3.1)	5.7 (range 3.8-7.7)	3.7 (range 2.4-4.9)
Aldosterone (pmol/l)	750	60	144	91

Funder SW et al., J Clin End Metab 2008; 93: 3266-3281

Tabella 1: Valori soglia di ARR per lo screening di iperaldosteronismo primitivo. La sigla DRC indica la concentrazione reninica plasmatica determinata con metodica diretta.

4. SCOPO DELLO STUDIO

Alla luce delle considerazioni sopra esposte ci siamo dunque proposti per il nostro studio i seguenti obiettivi:

1. Confrontare la CliR con la PRA e stabilire il fattore di conversione tra le due metodiche in una popolazione di ipertesi essenziali in trattamento con diverse classi farmacologiche.
2. Valutare la correlazione della CliR e della PRA con l'aldosterone sia in clino che in ortostatismo.
3. Confrontare l'ARR calcolato con la PRA (ARRP) e con la CliR (ARRD) in una popolazione di ipertesi essenziali in trattamento e in 10 pazienti con adenoma surrenalico al fine di stabilire il fattore di conversione tra ARRP e ARRD e la soglia di normalità dell'ARRD per lo screening dell'iperaldosteronismo.
4. Confrontare l'ARR calcolato con le due metodiche in clino ed ortostatismo al fine di stabilire se le modifiche posturali alterino significativamente il rapporto.
5. Valutare l'effetto della terapia con beta bloccanti sulla specificità dell'ARR e le eventuali differenze in pazienti trattati anche con inibitori del sistema renina-angiotensina.
6. Analizzare l'influenza di ACE inibitori e sartani sulla performance diagnostica dell'ARR nello screening dell'IP.

5. PAZIENTI E METODI

5.1 PAZIENTI

La nostra casistica di ipertesi essenziali era costituita da 88 pazienti (50 maschi e 33 femmine) di età compresa tra 18 e 88 anni, di cui la metà in trattamento con bloccanti del sistema renina angiotensina-aldosterone (ACE inibitori o sartani). Dei 44 pazienti non in trattamento con bloccanti del SRAA 27 erano maschi di età compresa tra i 13 e i 77 anni, 17 erano femmine tra i 19 e i 76 anni. 6 di questi pazienti assumevano anche beta-bloccanti. Dei 44 pazienti in trattamento con bloccanti del SRAA 23 erano maschi di età compresa tra i 33 e i 78 anni, 21 erano femmine tra i 38 e gli 88 anni. 12 di questi pazienti assumevano beta bloccanti. Inoltre, nella popolazione complessiva degli ipertesi essenziali 31 pazienti assumevano calcio antagonisti e 24 diuretici, mentre nessuno era in terapia con antialdosteronici. I valori medi di pressione arteriosa nella casistica globale degli ipertesi essenziali al momento della visita ambulatoriale erano pari a $153 \pm 29/92 \pm 15$ mmHg. Distinguendo per gruppi di trattamento, i valori medi di pressione arteriosa erano pari a $145 \pm 19/94 \pm 11$ mmHg nel gruppo non in terapia con bloccanti del RAS e a $161 \pm 35/90 \pm 18$ mmHg nel gruppo in trattamento con tali classi farmacologiche.

Costituivano criteri di esclusione, al fine di evitare l'arruolamento di pazienti portatori di iperaldosteronismo primitivo non diagnosticato, valori di PRA in clinostatismo <0.2 ngAl/ml/h ed il riscontro di valori di PRA dopo stimolo posturale uguali o inferiori rispetto alla PRA in clinostatismo. In tutti i pazienti, inoltre, le indagini morfologiche (ecografia, RM o TC addome) dovevano essere risultate negative per espansi surrenalici.

Abbiamo inoltre studiato un gruppo di 10 pazienti, di cui 6 maschi e 4 femmine, di età compresa tra i 21 e i 66 anni, portatori di APA dimostrato istologicamente la cui asportazione si è associata a miglioramento del controllo pressorio. 7 di questi pazienti erano in trattamento con calcio antagonisti e/o alfa-litici, 4 assumevano anche bloccanti del SRAA.

Tutti i pazienti sono stati reclutati presso l'Ambulatorio Ipertensione Arteriosa dell'Ospedale San Giuseppe di Milano tra il 2007 e il 2012 e valutati nell'ambito dell'abituale iter diagnostico per i pazienti ipertesi di prima diagnosi.

5.2 METODI

I campioni ematici per il dosaggio di PRA, CliR, Aldosterone e Potassio sono stati prelevati in potassio EDTA da una vena anticubitale, tra le ore 8:00 e le ore 12:00, in clinostatismo e dopo un'ora di ortostatismo attivo. Per evitare la crioattivazione della prorenina i campioni sono stati mantenuti a temperatura

ambiente e quindi centrifugati per 15 minuti a 3500 giri/minuto. Dopo rimozione della componente cellulare, le aliquote di plasma sono state congelate rapidamente e conservate a -20° fino al momento del dosaggio.

5.2.1 DOSAGGIO DELL'ATTIVITA' RENINICA PLASMATICA

La PRA è stata misurata con il kit fornito da DiaSorin (REN-CKT, Diasorin S.p.A, Saluggia) precedentemente validato (70).

Dopo rapido scongelamento 500 µl di plasma in duplicato vengono portati a pH 6 mediante l'aggiunta di soluzioni contenenti citrato come tampone e fenilmetilsulfonilfluoride come inibitore dell'angiotensinasi ed incubate per 90 minuti a 37°C e a 4°C (blank). Al termine dell'incubazione i campioni vengono sottoposti al saggio radioimmunometrico: 50 µl di ciascun campione vengono posti in provette rivestite di anticorpi anti-Angiotensina I ed incubati a temperatura ambiente in presenza di 50 µl di AI marcata con ¹²⁵I per 18 ore. Le concentrazioni di AI sono quindi calcolate mediante estrapolazione da una curva standard con il calibratore più basso posto a 0.3 ng/ml di AngI. I livelli finali di PRA vengono quindi calcolati mediante sottrazione del blank dal generato a 37°C. La variabilità inter-test fornita dal produttore oscilla tra 7.7% 11.5% e quella variabilità intra-test si colloca tra 7.5% e 9.9% per livelli di PRA compresi tra 2.3 e 13.5 ng/ml/h.

5.2.2 DOSAGGIO DELLA RENINA DIRETTA CHEMILUMINOMETRICA

La CliR è stata determinata con un analizzatore completamente automatizzato LIAISON utilizzando reagenti forniti da DiaSorin (Saggio Diretto della Renina LIAISON; DiaSorin S.p.A., Saluggia) (21). In questa metodica la renina viene legata a sandwich da un anticorpo (mAb 12-12, “capture antibody”) specifico per renina e prorenina ed adsorbito su particelle paramagnetiche e da un anticorpo specifico per la sola renina (mAb 11-12, “detection antibody”) coniugato con una molecola di isoluminolo. 200 µl di plasma in EDTA vengono incubati per 30 minuti a 37°C con 20 µl del mAb di cattura adsorbito sulle particelle paramagnetiche e con 100 µl del mAb di rilevazione coniugato con l’isoluminolo. Dopo una fase di lavaggio si aggiunge perossido di idrogeno come reagente starter per indurre la reazione luminosa. La luce emessa, misurata in Unità di Luce Relativa, è direttamente proporzionale alla concentrazione di renina, espressa in mU/l. I valori finali di CliR vengono calcolati su di una curva di lavoro passante per due punti e aggiustata mediante estrapolazione da una curva standard di riferimento per mantenere l’accuratezza del saggio analitico.

La sensibilità analitica del metodo, definita come la minima concentrazione che si distingue dallo zero per almeno 2 deviazioni standard, si colloca tra 1.13 e 0.53 mU/l, mentre la sensibilità funzionale, definita come la

concentrazione per cui il coefficiente di variazione tra test supera il 20%, si colloca tra 1.6 e 2.0 mU/l.

L'intervallo analitico del test si colloca tra 2.0 e 500 mU/l. La variabilità inter-test fornita dal produttore varia dal 10% al 5.2% per livelli compresi tra 4.1 e 278 mU/l. La variabilità intra-test varia dal 3.7% al 1.2% per livelli compresi tra 13.4 e 264 mU/l. Il tempo per ottenere il primo risultato è di 40 minuti con 170 risultati all'ora.

5.2.3 DOSAGGIO DELL'ALDOSTERONE

L'Aldosterone è stato determinato mediante Saggio Radioimmunometrico AldoCTK-2 fornito da DiaSorin S.p.A. Il principio del dosaggio consiste nella competizione tra aldosterone marcato e aldosterone contenuto nel campione di plasma per un numero fisso e limitato di siti anticorpali. La quantità di aldosterone marcato legata all'anticorpo in fase solida è inversamente proporzionale alla concentrazione di aldosterone non marcato presente nel campione. 200 µl di siero e 500 µl di tracciante (aldosterone marcato con ¹²⁵I) vengono incubati per 18-22 ore a temperatura ambiente sul fondo di provette rivestite con antisiero di coniglio anti-aldosterone. Successivamente, la miscela di incubazione viene completamente rimossa e viene misurata la radioattività delle provette mediante un contatore gamma. I valori finali di A vengono calcolati su di una curva di taratura ottenuta ponendo in ordinata la

media dei conteggi di 5 calibratori a contenuto noto di aldosterone espressa come percentuale rispetto ad un calibratore zero e in ascissa la corrispondente concentrazione di aldosterone in pg/ml.

La sensibilità analitica del metodo è pari a 10 pg/ml al 95% di confidenza. L'intervallo analitico del test si colloca tra 7.5 e 1000 pg/ml. La variabilità inter-test, espressa come coefficiente di variazione, è pari al 7% per livelli medi di aldosterone di 91.3 pg/ml, al 3.4% per livelli medi di aldosterone di 230.3 pg/ml ed al 4.3% per livelli medi di 607.5 pg/ml. La variabilità intra-test è del 5.3% per livelli medi di aldosterone di 86.4 pg/ml, al 3.8% per livelli medi di 249.9 pg/ml e a 1.7% per livelli medi di aldosterone di 495.6 pg/ml.

5.2.4 CALCOLO DEL RAPPORTO ALDOSTERONE-RENINA

L'ARR è stato calcolato ponendo al numeratore l'aldosterone espresso in ng/dl ($1 \text{ ng/dL} = 10 \text{ pg/ml}$) e al denominatore la PRA espressa in ng/ml/h o la CliR espressa in mU/l ($1 \text{ mU/L} = 1 \text{ } \mu\text{U/ml}$).

6. RISULTATI

Negli 88 ipertesi essenziali i valori medi di CliR erano 18 mU/l (range 2-255) in clinostatismo e 28 mU/l (range 4-471) in ortostatismo e i corrispondenti valori di PRA erano 0.6 ngAl/ml/h (range 0.2-11.2) e 1.3 ngAl/ml/h (range 0.3-16.0) (Fig.6).

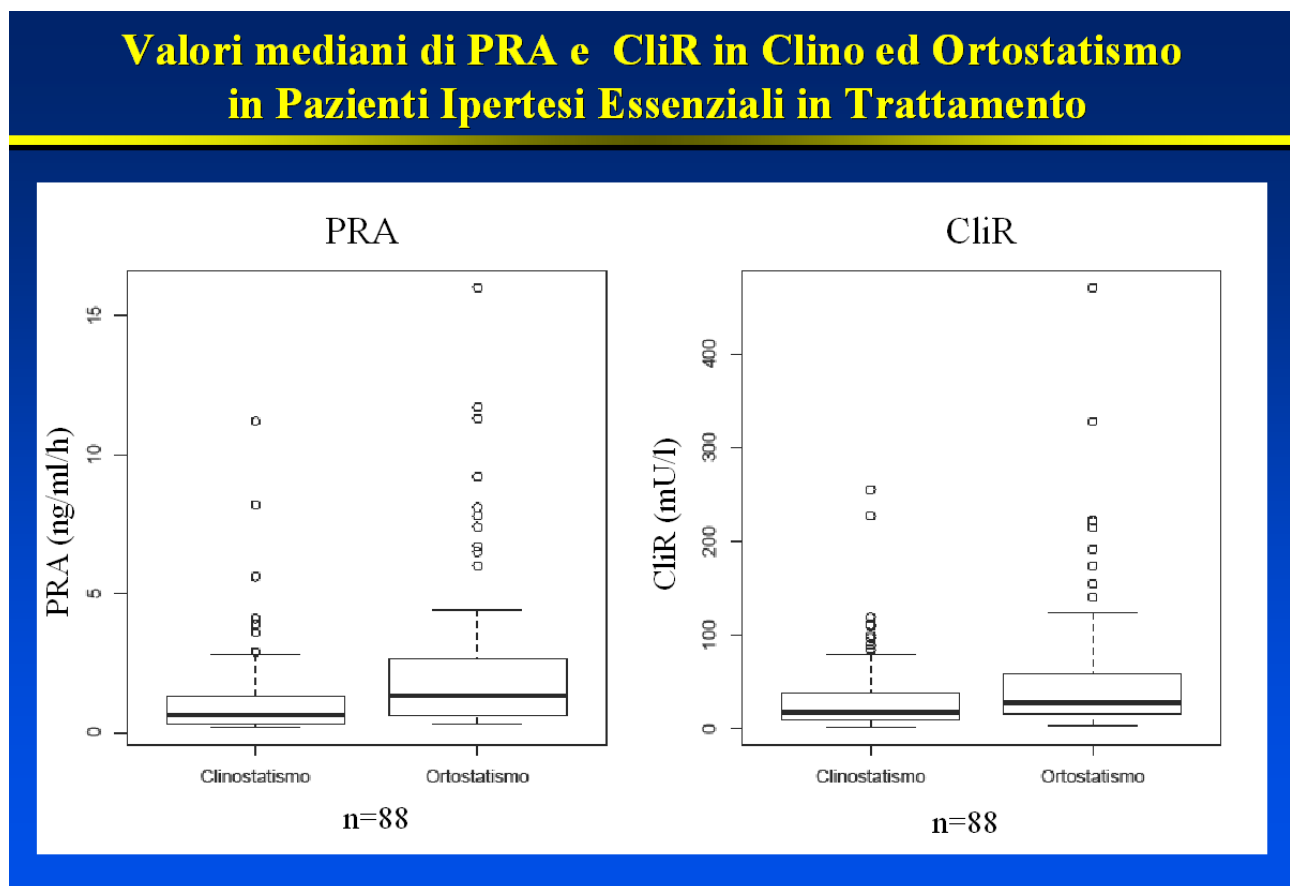


Figura 6: Valori medi di PRA e CliR in clino ed ortostatismo nella popolazione complessiva degli ipertesi essenziali studiati mentre assumevano terapia antipertensiva.

I valori basali sia di CliR che di PRA nei pazienti non trattati con bloccanti del SRAA erano più bassi che nei pazienti in trattamento, ma tali differenze non raggiungevano la significatività statistica. Infatti, nei 44 ipertesi essenziali non in trattamento con bloccanti del SRAA i valori mediani di CliR erano 16 mU/l (range 2-111) in clinostatismo e 27 mU/l (5-192) in ortostatismo e i corrispondenti valori di PRA erano 0.5 ngAl/ml/h (range 0.2-3.9) e 1.1 ngAl/ml/h (range 0.3-7.8) mentre nei 44 pazienti in trattamento con bloccanti del SRAA i valori mediani di CliR erano 20 mU/l (range 4-255) in clinostatismo e 32 mU/l (range 4-471) in ortostatismo e i corrispondenti valori di PRA erano rispettivamente 0.8 ng/ml/ (range 0.2-11.2) e 1.7 ngAl/ml/h (range 0.3-11.7) ($p = 0.31$ e $p = 0.29$ per i confronti della CliR nei due sottogruppi rispettivamente in clino ed ortostatismo, $p = 0.24$ e $p = 0.25$ per la PRA rispettivamente in clino ed ortostatismo).

Se l'incremento posturale della PRA costituiva un imprescindibile criterio di inclusione e si osservava dunque in tutti i pazienti della casistica, anche per quanto riguarda la CliR si verificavano incrementi statisticamente significativi nel passaggio dal clino all'ortostatismo a prescindere dal trattamento farmacologico. Infatti, anche nei pazienti trattati con beta bloccante, teoricamente in grado di inibire la risposta della renina allo stimolo posturale, solamente in 1 dei 6 casi non in terapia con inibitori del SRAA e in 2 dei 12 in terapia con tali classi farmacologiche non si verificava l'atteso incremento in ortostatismo.

Nel gruppo complessivo degli 88 ipertesi essenziali, sia in clino che in ortostatismo vi era una forte correlazione tra CliR e PRA con r_s sui ranghi di Spearman rispettivamente di 0.85 e 0.84. La regressione lineare non parametrica di Passing-Bablok sui logaritmi di tutti i valori considerati in clino ed in ortostatismo forniva stima della pendenza di 1.01, un' intercetta di 3.2 ed un fattore di conversione tra PRA e CliR di 24.6 su scala naturale (Fig.7).

PRA vs CliR nei pazienti ipertesi essenziali: Passing-Bablok

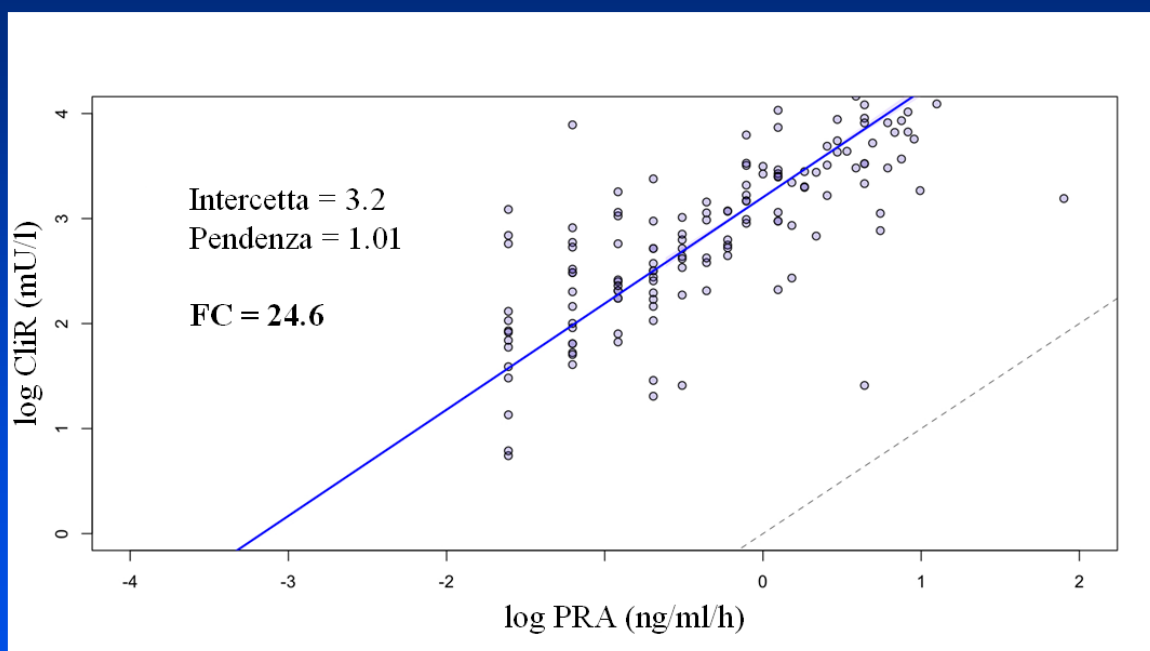


Figura 7: Analisi della regressione di Passing-Bablok sui logaritmi di tutti i valori di PRA e CliR in clino ed ortostatismo nella popolazione globale degli ipertesi essenziali.

Anche considerando separatamente i due sottogruppi dei non trattati e dei trattati con inibitori del SRAA si osservava una forte correlazione tra PRA e CliR sia in clino ed ortostatismo, con r_s sui ranghi di Spearman rispettivamente di 0.80 e 0.82 per i non trattati e di 0.88 e 0.84 per i trattati. Il trattamento con inibitori del SRAA non modificava significativamente il fattore di conversione tra le due metodiche. Infatti, nel sottogruppo dei pazienti non trattati con bloccanti del SRAA la regressione lineare non parametrica di Passing-Bablok sui logaritmi di tutti i valori considerati in clino ed in ortostatismo forniva stima della pendenza di 1.03, un' intercetta di 3.24 ed un fattore di conversione tra PRA e CliR di 25.6 su scala naturale mentre nel sottogruppo dei pazienti trattati con bloccanti del SRAA la medesima analisi forniva stima della pendenza di 0.99, un' intercetta di 3.19 ed un fattore di conversione tra PRA e CliR di 24.2 su scala naturale.

Nella popolazione complessiva degli ipertesi essenziali la mediana dell'aldosterone in clinostatismo era 7.8 ng/dl (range 0.3-31) e 18.4 ng/dl (range 2.3-60) in ortostatismo (Fig.8).

Valori mediiani di Aldosterone in Clino ed Ortostatismo in Pazienti Ipertesi Essenziali

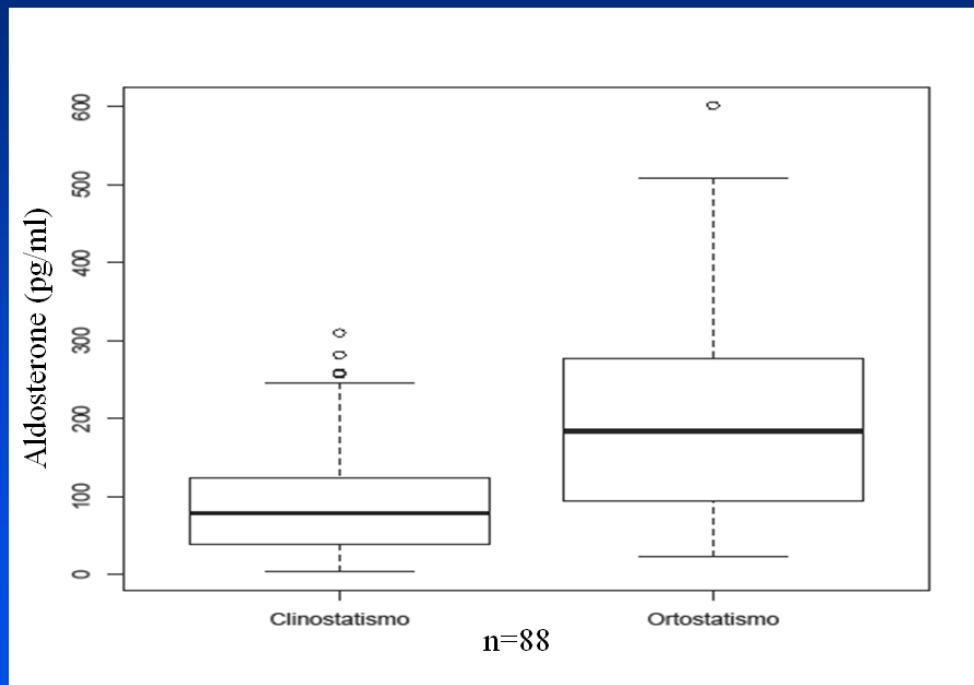


Figura 8: Valori mediiani di aldosterone in clino ed ortostatismo nella popolazione complessiva degli ipertesi essenziali.

I valori basali di aldosterone nei pazienti non trattati con bloccanti del SRAA erano significativamente più alti che nei pazienti in trattamento con tali farmaci. I valori mediiani di aldosterone in clino e ortostatismo erano infatti pari a 9.4 ng/dl (range 0.8-31) e 22.7 ng/dl (range 6-60) nei pazienti non trattati ed a 5.7 ng/dl (range 0.3-21) e 16.9 ng/dl (range 2.3-32) nei pazienti trattati con inibitori del SRAA ($p = 0.01$ e $p = 0.001$ per i confronti dell'aldosterone nei due sottogruppi rispettivamente in clino ed ortostatismo).

Anche l'aldosterone incrementava in modo significativo in risposta allo stimolo posturale. E' a tal proposito interessante notare come gli incrementi dell'aldosterone fossero quantitativamente simili nei pazienti non trattati e nei pazienti trattati con inibitori del SRAA, in quanto solo in 3 soggetti del gruppo in trattamento l'aldosterone non aumentava in ortostatismo. La mancata risposta dell'aldosterone allo stimolo posturale veniva inoltre osservata in solamente uno dei pazienti trattati con beta-bloccante, 12 dei quali assumevano tra l'altro anche inibitori del SRAA.

Nei pazienti non trattati con bloccanti del SRAA si osservava una correlazione, peraltro di lieve entità, tra i valori di CliR e PRA ed i corrispettivi valori di aldosterone sia in clinostatismo (r_s 0.50 e 0.53 rispettivamente) che in ortostatismo (r_s 0.38 e 0.50 rispettivamente) mentre, come atteso, nei soggetti trattati con bloccanti del SRAA non vi era alcuna correlazione tra la renina misurata con le due metodiche e l'aldosterone.

Negli 88 ipertesi essenziali la mediana dell'ARR calcolato con la CliR (ARRD) era 0.4 (range 0.01-3) in clinostatismo e 0.5 (range 0.02-7.8) in ortostatismo mentre i valori mediani dell'ARR calcolato con la PRA (ARRP) erano 12 (range 0-71) in clinostatismo e 13 (range 0-80) in ortostatismo (Fig.9).

Valori mediiani di ARR in Clino ed Ortostatismo in Pazienti Ipertesi Essenziali

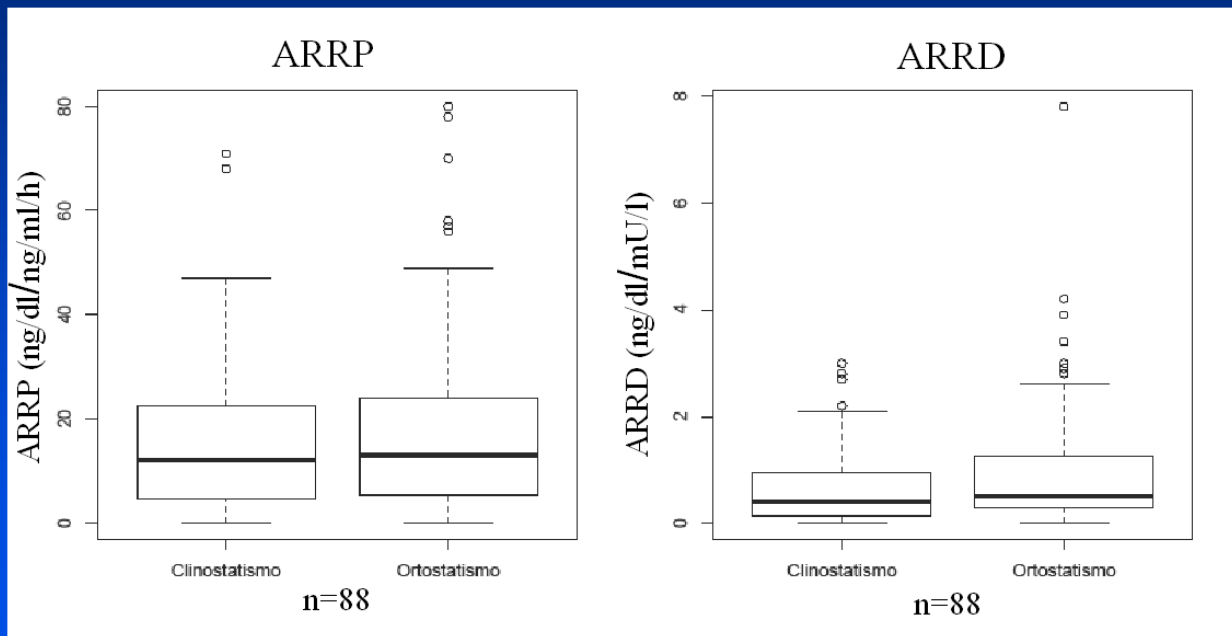


Figura 9: Valori mediiani di ARR e ARRd in clino ed ortostatismo nella popolazione complessiva degli ipertesi essenziali.

I valori di ARRd e ARRP nei pazienti non trattati con bloccanti del SRAA erano significativamente più alti che nei pazienti in trattamento con tali farmaci ($p = 0.04$ e $p = 0.02$ per i confronti dell'ARRd nei due sottogruppi rispettivamente in clino ed ortostatismo, $p = 0.02$ per l'ARRP sia in clino che in ortostatismo). Infatti, nei 44 ipertesi essenziali non in trattamento con bloccanti del SRAA i valori mediiani di ARRd erano 0.5 (range 0.05-2.8) in clinostatismo e 0.7 (0.1-3.4) in ortostatismo e i corrispondenti valori di ARRP

erano 15 (range 1-47) e 17 (range 3-58) mentre nei 44 pazienti in trattamento con bloccanti del SRAA i valori mediani di ARRD erano 0.25 (range 0.01-2.8) in clinostatismo e 0.3 (range 0.02-7.8) in ortostatismo e i corrispondenti valori di ARRP erano rispettivamente 6 (range 0-71) e 8.5 (range 0-80).

Tra gli ARR calcolati con le due metodiche nella popolazione globale degli ipertesi essenziali vi era una forte correlazione sia in clino che in ortostatismo con r_s rispettivamente di 0.88 e 0.92.

L'analisi della regressione lineare non parametrica di Passing-Bablok sui logaritmi di tutti i valori in clino ed in ortostatismo evidenziava una pendenza di 1.12, un'intercetta di -3.53 e un fattore di conversione su scala naturale tra ARRP e ARRD di 0.03 (Fig.10).

ARRP vs ARRD nei Pazienti Ipertesi Essenziali: Passing-Bablok

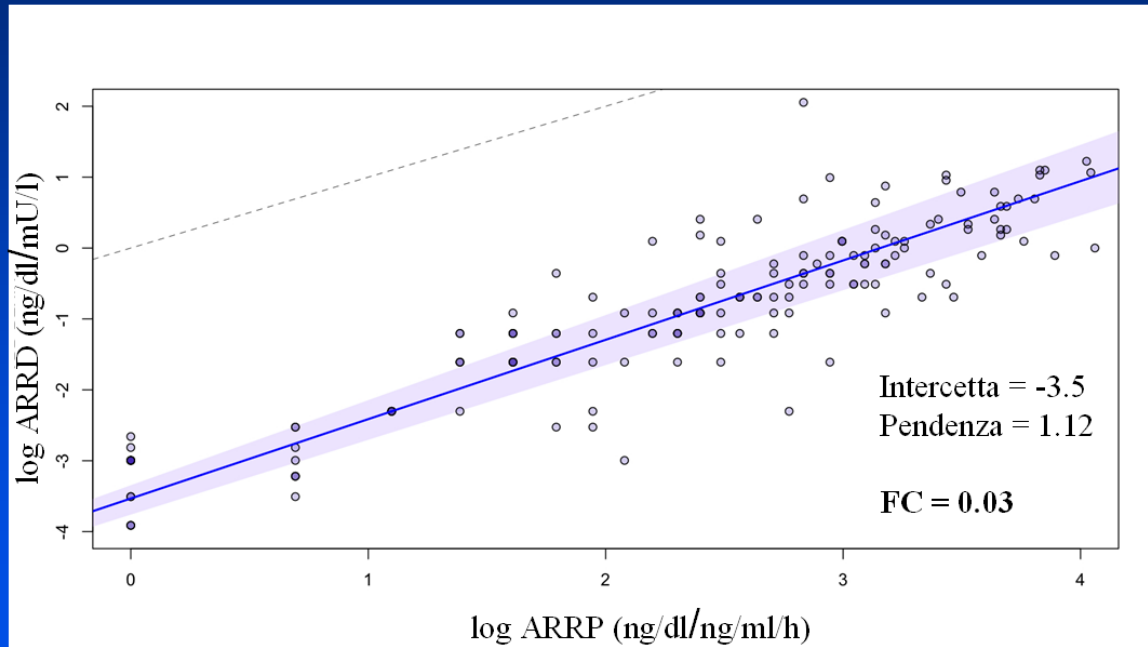


Figura 10: Analisi della regressione di Passing-Bablok sui logaritmi di tutti i valori di ARRP e ARRD in clino ed ortostatismo nella popolazione globale degli ipertesi essenziali.

Considerando separatamente i due sottogruppi dei non trattati e dei trattati con inibitori del SRAA si confermava una forte correlazione tra ARRP e ARRD sia in clino ed ortostatismo, con r_s sui ranghi di Spearman rispettivamente di 0.75 e 0.86 per i non trattati e di 0.91 e 0.92 per i trattati.

Nel sottogruppo dei pazienti non trattati con bloccanti del SRAA la regressione lineare non parametrica di Passing-Bablok sui logaritmi di tutti i valori considerati in clino ed in ortostatismo forniva stima della pendenza di 1.20, un'intercetta di -3.78 ed un fattore di conversione tra ARRP e ARRD di

0.02 su scala naturale. Nel sottogruppo dei pazienti trattati con bloccanti del SRAA la regressione lineare non parametrica di Passing-Bablok sui logaritmi di tutti i valori considerati in clino ed in ortostatismo forniva stima della pendenza di 1.11, un' intercetta di -3.48 ed un fattore di conversione tra ARRП e ARRD di 0.03 su scala naturale.

Considerando sia il gruppo degli ipertesi essenziali nel suo insieme che i due sottogruppi in trattamento e non con inibitori del SRAA, i valori di ARRП non si modificavano significativamente passando dal clino all'ortostatismo ($p = 0.39$, $p = 0.06$, e $p = 0.07$ per i confronti dell'ARRП in clino e in ortostatismo rispettivamente nei pazienti non trattati con bloccanti del SRAA, nei pazienti trattati e nella popolazione globale); al contrario l'ARRD in ortostatismo risultava significativamente superiore rispetto all'ARRD in clinostatismo ($p = 0.001$, $p < 0.0001$ e $p < 0.0001$ per i confronti dell'ARRD in clino e in ortostatismo rispettivamente nei pazienti non trattati con bloccanti del SRAA, nei pazienti trattati e nella popolazione globale).

Assumendo come limite soglia di normalità per l'ARRП un valore di 30, secondo quanto raccomandato dalle linee guida (40), nella popolazione globale degli ipertesi essenziali vi erano 13 falsi positivi in clinostatismo (15%) e 18 in ortostatismo (20%), con specificità 0.85 (IC95% 0.76-0.92) e 0.78 (0.68-0.87) rispettivamente. Dei 13 falsi positivi in clinostatismo, 4 erano in trattamento con beta bloccanti e 2 di questi assumevano anche ACEI o sartani, mentre tra i 18 falsi positivi in ortostatismo 6 erano trattati con beta

bloccante e 3 di questi anche con ACEI o sartani. Ponendo invece come limite soglia per l'ARRD un valore di 3.7 si osservavano 0 falsi positivi in clinostatismo e 4 in ortostatismo (5%), con specificità pari a 1 (IC95% 0.96-1) e 0.95 (0.88-0.99) rispettivamente. Tre dei falsi positivi in ortostatismo risultavano tali anche con l'ARRP e 1 solo, trattato anche inibitori del SRAA, assumeva beta bloccanti (Fig.11).

Distribuzione di ARRP e ARRD in Clino ed Ortostatismo Rispetto ai Limiti Soglia di Normalità in Pazienti Ipertesi Essenziali

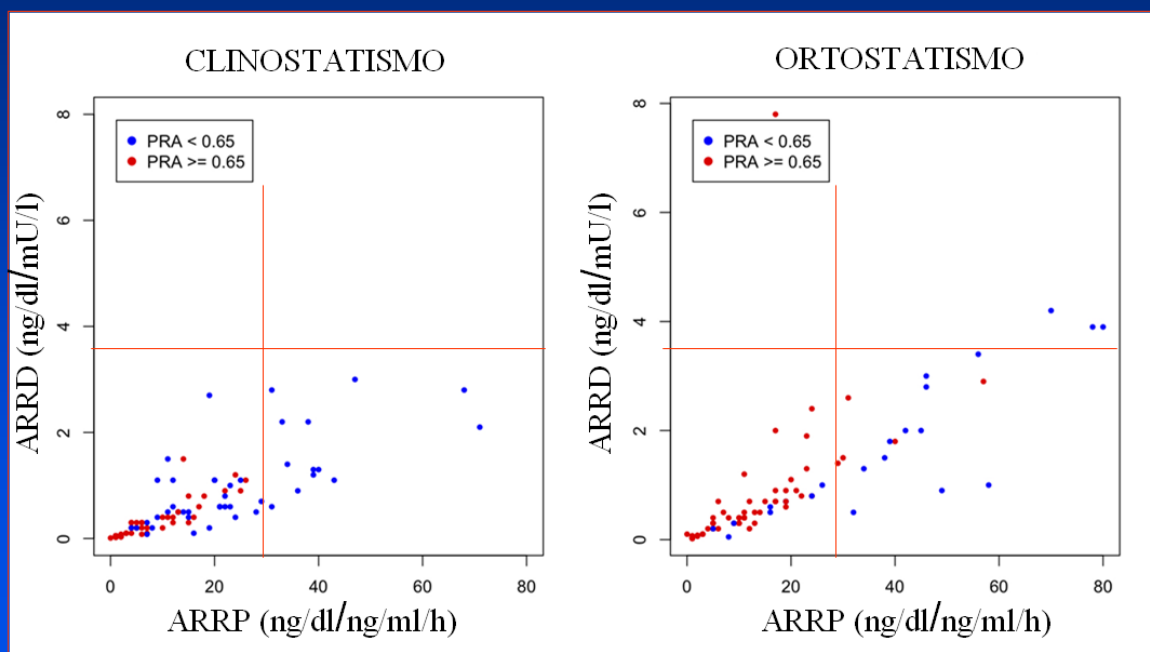


Figura 11: Distribuzione dei valori di ARRP e ARRD in clino ed ortostatismo rispetto ai limiti soglia di normalità nella popolazione globale degli ipertesi essenziali. Si noti come 13 su 13 e 13 su 18 delle false positività fossero di soggetti classificati tradizionalmente come “low renin” (47).

I dati individuali dei pazienti ipertesi essenziali con ARRП falsamente positivo sono riportati nella Tabella 2.

CLINOSTATISMO					
Paziente	PRA (ng/ml/h)	ClR (mU/l)	A (ng/dl)	ARRP	ARRD
1	0.2	5.9	7.9	40	1.3
2	0.2	6.3	7.8	39	1.2
3*	0.5	7.6	16.5	33	2.2
4	0.2	4.9	13.6	68	2.8
5*	0.2	6.8	14.2	71	2.1
6	0.5	8.7	18.8	38	2.2
7	0.3	12.0	10.6	36	0.9
8	0.3	12.0	13.0	43	1.1
9	0.6	14.0	20.2	34	1.4
10	0.4	20.6	12.5	31	0.6
11	0.2	2.2	6.2	31	2.8
12*	0.3	8.7	11.7	39	1.3
13*	0.2	3.1	9.4	47	3.0
Media \pm DS	0.3 \pm 0.1	8.7 \pm 5.0	12.5 \pm 4.2	42 \pm 13	1.8 \pm 0.8
ORTOSTATISMO					
Paziente	PRA (ng/ml/h)	ClR (mU/l)	A (ng/dl)	ARRP	ARRD
1*	0.4	21.3	19.4	49	0.9
2	0.4	10.6	13.5	34	1.3
3	0.5	11.1	19.6	39	1.8
4	0.4	6.7	27.9	70	4.2
5	0.5	12.2	18.8	38	1.5
6	0.6	12.6	25.0	42	2.0
7*	0.6	9.7	27.4	46	2.8
8	0.3	6.1	23.5	78	3.9
9*	0.3	6.1	24.0	80	3.9
10	0.7	10.1	21.8	31	2.6
11*	0.3	18.4	9.5	32	0.5
12	0.5	29.3	29.2	58	1.0
13	0.5	11.5	22.7	45	2.0
14*	0.4	6.2	18.4	46	3.0
15	1.3	27.2	39.4	30	1.5
16	0.7	13.8	40.1	57	2.9
17	0.3	5.0	16.8	56	3.4
18*	0.9	19.9	36.3	40	1.8
Media \pm DS	0.5 \pm 0.3	13.2 \pm 7.2	24.1 \pm 8.3	48 \pm 15	2.3 \pm 1.1

Tabella 2: Dati individuali dei pazienti con ARRП falsamente positivo in clinostatismo e in ortostatismo. I pazienti in trattamento con inibitori del SRAA sono segnalati in rosso. I pazienti in trattamento con beta bloccante sono indicati con un asterisco.

Nella grande maggioranza dei casi, i valori di PRA in clinostatismo erano vicini alla sensibilità funzionale del metodo (0.2 ngAl/ml/h) mentre per la ClR (sensibilità funzionale 2 mU/l) questo accadeva solo in 3 casi. Inoltre, in

clinostatismo solo tre pazienti presentavano valori di aldosterone superiori a 15 ng/dl, che è considerato il limite superiore di normalità. In media la PRA in clinostatismo era numericamente inferiore nei pazienti con ARRП falsamente positivo che nei pazienti con risultato veramente negativo (PRA 0.3 + 0.1 vs 1.4 + 1.8 ngAl/ml/h rispettivamente) mentre per la CliR tale differenza era meno evidente a causa dell'ampio range di valori osservato nel gruppo dei veri negativi (CliR 8.7 + 5 vs 37.7 + 44.6 mU/l rispettivamente). In ortostatismo tra i 18 pazienti con ARRП falsamente positivo i valori di PRA vicini alla sensibilità funzionale del metodo erano nettamente meno numerosi rispetto al clinostatismo. Tuttavia la maggioranza dei soggetti presentava valori piuttosto elevati di aldosterone rispetto ai pazienti con ARRП veramente negativo (aldosterone 24.1 + 8.3 ng/dl vs 18.7 + 13.3 ng/dl nei falsi positivi e nei veri negativi rispettivamente).

Nei 10 pazienti con APA la mediana di CliR, PRA e aldosterone in clinostatismo era rispettivamente 0.8 mU/l (range 0.2-10.2), 0.1 ngAl/ml/h (range 0.1-0.6) e 36.8 ng/dl (range 11.8-122). Negli APA la mediana dell'ARRD in C era 34 (2.8-244) e il corrispondente valore di ARRП era 298 (48-1222). Con entrambe le metodiche l'ARR risultava significativamente superiore nei pazienti affetti da APA rispetto agli ipertesi essenziali ($p < 0.0001$). Prendendo peraltro in esame i dati individuali dei 10 pazienti, nessuno di essi presentava un ARRП inferiore al cut-off di 30 consigliato dalle linee guida, mentre in 1 caso, in trattamento con bloccanti del SRAA, l'ARRD

era inferiore al limite soglia di 3.7. La sensibilità dell'ARRP e dell'ARRD era quindi rispettivamente 1 e 0.75 nei pazienti con APA.

7. DISCUSSIONE

Il primo risultato significativo del nostro studio consiste nell'osservazione che la renina diretta chemiluminometrica ha dimostrato una forte correlazione con la PRA in tutto il range dei valori esaminati; inoltre, come evidenziato dall'analisi della regressione di Passing-Bablok, la relazione tra le due metodiche si è mantenuta lineare anche nel terzile più basso, in cui la CliR sembra essere meno accurata della PRA.

Un dato interessante è rappresentato dal fattore di conversione tra PRA a CliR che nella popolazione globale degli ipertesi essenziali è risultato pari a 24.6 e si è modificato solo di poco considerando separatamente i due sottogruppi trattati e non con bloccanti del SRAA. Tale valore, infatti, si discosta nettamente dal fattore di conversione di circa 12 inizialmente fornito in letteratura (71) ma sovrapponibile a quanto osservato nel già citato studio multicentrico condotto da Morganti et al. con le stesse metodiche per il dosaggio della PRA e della CliR (62).

In secondo luogo, la CliR appare in grado di evidenziare, al pari della PRA, la risposta fisiologica del SRAA allo stimolo posturale a prescindere dal trattamento farmacologico. Infatti anche nei pazienti trattati con inibitori del SRAA, pur in presenza di valori assoluti più bassi rispetto ai pazienti non trattati, la CliR era significativamente superiore in ortostatismo rispetto al clinostatismo. Inoltre, la CliR incrementava in risposta allo stimolo posturale

anche nella maggior parte (15/18) dei pazienti in trattamento con beta bloccante. E' da notare come studi precedenti con la metodica immunoradiometrica, dotata di sensibilità inferiore alla CliR, non abbiano documentato con altrettanta evidenza una risposta allo stimolo posturale (58). Occorre sottolineare, inoltre, la moderata correlazione osservata tra CliR e aldosterone sia in clino che in ortostatismo nel sottogruppo non trattato con ACE inibitori e sartani, a conferma che anche la tecnica chemiluminometrica è in grado di evidenziare gli effetti funzionali del SRAA sulla secrezione di aldosterone. Tale correlazione non è stata mantenuta nei pazienti in trattamento con bloccanti del SRAA e, per effetto di questi, nella popolazione generale degli ipertesi essenziali, poiché tali terapie esercitano effetti di segno opposto stimolando la renina e, almeno teoricamente, riducendo mediante blocco dell'asse ormonale l'aldosterone. Peraltro, la mancata correlazione tra CliR e aldosterone in ortostatismo nei pazienti trattati con antagonisti del SRAA si osservava in presenza di incrementi posturali sia della renina che dell'aldosterone quantitativamente non dissimili da quelli rilevati nei pazienti non in trattamento con tali farmaci. Ciò suggerisce che in questa circostanza altri fattori diversi dalla renina fossero in grado di assumere il controllo della secrezione dell'aldosterone. L'incremento dell'aldosterone durante stimolo posturale è infatti un fenomeno complesso in cui la renina gioca certamente un ruolo fondamentale ma non esclusivo. Tra i possibili fattori coinvolti ricordiamo in particolare la ridotta clearance epatica

dell'aldosterone, le modifiche della potassiemia e, soprattutto nei pazienti in trattamento con inibitori del SRAA, lo stimolo esercitato dall'ACTH (72). Infine, l' "escape" dell'aldosterone che si osserva almeno nella metà dei pazienti trattati con bloccanti del SRAA (73) potrebbe aver contribuito all'incremento posturale osservato.

Data l'esiguità dei dati disponibili, ancora più significativi appaiono i risultati del nostro studio relativamente all'impiego della ClIR per il calcolo dell'ARR. Numerosi studi hanno infatti preso in esame l'ARR calcolato utilizzando la renina diretta (63, 64, 74-78) ma solo tre di essi hanno confrontato l'ARRD con l'ARRP in pazienti ipertesi (63, 64, 74). Tuttavia tali studi sono stati effettuati durante sospensione della terapia antipertensiva, mentre noi abbiamo volutamente condotto la nostra analisi mentre i pazienti assumevano la loro abituale terapia antipertensiva per valutare gli effetti dei farmaci sul calcolo dell'ARR. Nel nostro studio l'ARRD si è dimostrato una valida alternativa per lo screening dell'IP in quanto ha evidenziato una forte correlazione con l'ARRP ed una relazione lineare in tutto il range dei valori esaminati, indipendentemente dal trattamento farmacologico. Del tutto nuova appare inoltre l'informazione riguardante il fattore di conversione da ARRP ad ARRD, che nella nostra popolazione di ipertesi essenziali è risultato pari a 0.03, modificandosi solo di poco nel caso in cui si distinguesse tra le due sottopopolazioni trattate e non con inibitori del SRAA.

A differenza di altri studi (79), passando dal clino all'ortostatismo, i valori di ARR_P non subivano variazioni significative poiché gli incrementi di PRA e aldosterone erano di entità sovrapponibile. Questo rilievo presenta importanti risvolti pratici, poiché verrebbe ad escludere che la variabilità pre-analitica dell'ARR_P possa dipendere dalle condizioni posturali del paziente al momento del prelievo ed autorizzerebbe dunque l'impiego dell'ARR_P senza tenere conto di tale variabile. Ciò non sarebbe peraltro valido nel caso in cui per il calcolo dell'ARR si impieghi la Cl_R, in quanto l'ARR_D in ortostatismo è risultato significativamente superiore all'ARR_D in clinostatismo. Tale rilievo è verosimilmente attribuibile al fatto che gli incrementi percentuali della Cl_R erano stati leggermente inferiori a quelli della PRA. Di conseguenza, il denominatore più basso rispetto a quello dell'ARR_P ha determinato un incremento significativo dell'ARR_D nel passaggio dal clino all'ortostatismo.

Al contrario, sia i valori di ARR_D che quelli di ARR_P nei pazienti trattati con bloccanti del SRAA sono risultati significativamente inferiori rispetto ai pazienti non trattati. ACE inibitori e sartani, infatti, determinano un incremento della renina per il venir meno dei meccanismi di feed-back negativo mentre riducono l'aldosterone per interruzione della cascata ormonale. Se ciò può costituire un limite nello screening dell'IP poiché determina una riduzione della sensibilità del test, non influisce peraltro sulla sua specificità. Nei pazienti con IP, infatti, la renina è profondamente soppressa e, a sua volta, l'aldosterone è elevato in modo indipendente dalla renina. Considerati tali

presupposti, il trattamento con bloccanti del SRAA è probabilmente in grado di incrementare il valore predittivo positivo del test poiché evidenziare una renina soppressa nonostante lo stimolo farmacologico rappresenta un indice di sospetto estremamente rilevante per una secrezione autonoma di aldosterone. A questo proposito è comunque utile esercitare una certa cautela nell'extrapolare i nostri dati ai pazienti con iperplasia surrenalica in cui persiste un certo grado di controllo della renina sulla secrezione dell'aldosterone. In questi pazienti, non rappresentati nella nostra casistica, gli antagonisti del SRAA potrebbero infatti causare false negatività (52).

Dalla letteratura emerge come l'ARR sia gravato da un'elevata incidenza di false positività, riscontrabili nel 20-60% dei casi sottoposti a screening (34).

Tale dato non è irrilevante se si considera che, in presenza di un ARR patologico, occorre avviare il paziente ad una serie di indagini confermatorie spesso complesse, costose e non scevre da rischi. E' proprio per migliorare indirettamente la specificità del test che le Linee Guida hanno posto come criterio aggiuntivo per proseguire le indagini di approfondimento di un sospetto IP quello di avere, oltre che un ARR patologico, anche dei valori di aldosterone superiori a 15 ng/dl. Confrontando i valori di ARRP e ARRD con il cut-off di normalità suggerito dalle Linee Guida (40) emerge come la metodica diretta sia gravata da un minore numero di false positività rispetto all'enzimatica, dimostrando dunque una maggiore specificità sia in clino che in ortostatismo. In particolare, se i falsi positivi per l'ARRP considerato nella

popolazione totale degli ipertesi essenziali erano 13 in clinostatismo e 18 in ortostatismo, per l'ARRD non si osservavano falsi positivi in clinostatismo mentre se ne avevano solamente 4 in ortostatismo. A tali numeri corrispondeva una specificità per l'ARRD rispetto all'ARRP di 1 vs 0.85 in clinostatismo e di 0.95 vs 0.78 in ortostatismo. E' interessante osservare come questi falsi positivi fossero equamente distribuiti tra i pazienti trattati e non con inibitori del SRAA nonostante nel gruppo dei trattati l'ARR fosse significativamente più basso sia in clino che in ortostatismo. Un terzo dei falsi positivi è stato osservato in pazienti in terapia con beta-bloccanti confermando la tendenza di questi farmaci a generare false positività in quanto riducono la renina in proporzione maggiore rispetto all'aldosterone (49, 50). Tuttavia dei 12 pazienti in trattamento combinato con beta-bloccanti e inibitori del SRAA solamente tre risultavano falsi positivi, suggerendo come ACEI e sartani possano in parte controbilanciare l'aumento dell'ARR provocato dall'effetto renino-soppressivo dei beta bloccanti. La metodica diretta chemiluminometrica avrebbe dunque, rispetto all'enzimatica, il vantaggio di ridurre il numero delle false diagnosi di IP definite in base alla soglia convenzionale per l'ARRD ≥ 3.7 . Anche considerando il criterio aggiuntivo suggerito dalle Linee Guida per la prosecuzione degli approfondimenti diagnostici (aldosterone >15 ng/dl) l'ARRD manterrebbe una maggiore specificità diagnostica: il numero dei falsi positivi, infatti, si ridurrebbe a 3 in clino e 16 in ortostatismo per l'ARRP mentre si

confermerebbe a 4 in ortostatismo per l'ARRD. Infine, tale conclusione rimarrebbe valida anche ponendo come cut-off dell'ARRD un valore inferiore come quello pari a 2.6 proposto da Perschel e coll (75). In questo caso, infatti, si osserverebbero 4 pazienti con valori di ARRD superiori alla soglia in clinostatismo, ma tutti con aldosterone inferiore a 15 ng/dl; le false positività in ortostatismo salirebbero invece a 9, mantenendosi comunque inferiori rispetto a quelle ottenute con l'ARRP. E' inoltre da sottolineare come, anche nello studio di Perschel, la sovrapposizione dei valori di ARRP ottenuti in volontari sani e nei pazienti con IP fosse maggiore rispetto a quanto osservato per l'ARRD.

Questa differenza nella specificità dell'ARR calcolato con le due metodiche merita senza dubbio un commento. Come già accennato e similmente a quanto osservato nello studio di Ferrari et al (74), anche nella nostra casistica abbiamo rilevato una forte correlazione lineare tra ARRP e ARRD in tutto il range dei valori esaminati. Tuttavia, i nostri risultati sembrano suggerire che la PRA tenda a sovrastimare l'ARR rispetto alla CliR, in particolare per valori di renina nel terzile inferiore. Altri ricercatori hanno osservato che per livelli bassi o molto bassi di renina la correlazione tra PRA e renina diretta è più debole, principalmente per la minore accuratezza della metodica diretta in tale range di valori (59). Per questo motivo in molti studi il valore minimo di renina diretta è stato posto pari a 5 o 6 mU/l (64, 77). Tuttavia la maggiore accuratezza della PRA nel rilevare i livelli molto bassi di renina potrebbe

essere uno svantaggio per la specificità dell'ARR. Infatti dall'analisi dei dati individuali dei pazienti con ARRP falsamente positivo risulta che in clinostatismo la grande maggioranza dei valori di PRA era prossima alla sensibilità funzionale del metodo (0.2 ngAl/ml/h) mentre solo pochi dei valori di CliR erano vicini al limite inferiore di sensibilità di 2 mU/l. Anche in ortostatismo la specificità dell'ARRD si confermava migliore rispetto all'ARRP ma era tuttavia inferiore rispetto al corrispondente valore in clinostatismo. Questo potrebbe dipendere dall'elevata frequenza di valori bassi di PRA ma anche dagli elevati livelli di aldosterone che erano in media più elevati nei test falsamente positivi rispetto ai veri negativi.

Le considerazioni sopra esposte potrebbero essere almeno in parte ridimensionate dal fatto che, applicando il fattore di conversione di 0.03 da noi ricavato mediante l'analisi di regressione, il cut-off di 30 dell'ARRP corrisponderebbe per l'ARRD non al canonico 3.7 bensì ad un valore inferiore, pari a 0.9. Con questo cut-off, infatti, il numero di falsi positivi per l'ARRD salirebbe a 24 in clinostatismo (di cui però solo 7 con valori di aldosterone >15 ng/dl) e a 29 in ortostatismo (di cui 25 con valori di aldosterone >15 ng/dl), negando dunque la maggiore specificità dell'ARR calcolato con la renina chemiluminometrica.

Nei pazienti affetti da IP i valori di ARR calcolato con entrambe le metodiche sono risultati significativamente superiori rispetto agli ipertesi essenziali. Applicando i cut-off convenzionali non si osservavano falsi negativi con

l'ARRP mentre con l'ARRD un solo paziente, in trattamento con inibitori del SRAA, risultava falsamente negativo. Sembrerebbe dunque che il calcolo dell'ARR con la ClIR, in accordo con altri studi, non modifichi significativamente la sensibilità del test di screening che nel nostro studio, come in altri recenti studi di popolazione (78), non sembrerebbe risentire del trattamento antipertensivo. Occorre tuttavia cautela nel trarre conclusioni definitive dai nostri dati considerata l'esiguità della casistica e l'ampiezza del range di valori osservati sia per la renina misurata con entrambe le metodiche che per l'aldosterone.

8. CONCLUSIONI

Il dosaggio diretto della renina mediante tecnica chemiluminometrica è caratterizzato, rispetto alla metodica enzimatica, da una maggiore rapidità e semplicità di esecuzione e da una minore variabilità intra ed inter-laboratorio.

Grazie a tali peculiarità, la CliR si pone come una valida alternativa alla PRA per il dosaggio della renina ed il calcolo dell'ARR.

Nel nostro studio, CliR e PRA si sono dimostrate fortemente correlate nei pazienti ipertesi essenziali in trattamento farmacologico, con un fattore di conversione tra PRA e CliR di 24.6 su scala naturale.

Anche l'ARRD e l'ARRP sono risultati fortemente correlati nella stessa popolazione di ipertesi essenziali, con un fattore di conversione tra ARRP e ARRD di 0.03.

L'ARRP non si è sostanzialmente modificato passando dal clino all'ortostatismo, mentre l'ARRD è risultato significativamente superiore in ortostatismo probabilmente per un incremento percentuale leggermente inferiore della CliR rispetto alla PRA in seguito a stimolo posturale.

L'ARR calcolato con le due metodiche si è invece ridotto in egual misura (circa di un terzo) durante trattamento con inibitori del SRAA.

ARRD e ARRP, indipendentemente dalla postura e dal trattamento farmacologico, sono risultati significativamente inferiori negli ipertesi essenziali rispetto ai 10 soggetti affetti da IP.

Alla luce di tali osservazioni è dunque possibile affermare che l'ARRD può essere impiegato in alternativa all'ARRP per lo screening dell'IP.

Assumendo i valori di cut-off convenzionali, il calcolo dell'ARR con la renina diretta riduce, rispetto alla PRA, il numero dei falsi positivi sia in clino che in ortostatismo. La specificità di ARRD appare dunque superiore a quella di ARRP e ciò si osserva in particolar modo in clinostatismo poiché i valori molto bassi di PRA, attribuibili almeno in parte al trattamento con beta-bloccante, tendono a magnificare l'ARRP. In queste condizioni posturali la specificità dell'ARRD è invece eccellente nonostante il trattamento antipertensivo in corso. La terapia con inibitori del SRAA potrebbe anzi migliorare ulteriormente la specificità del test, anche se potenzialmente a scapito di una minore sensibilità.

BIBLIOGRAFIA

1. Tigerstedt R, Bergman PG. Niere und kreislauf. Archiv fur physiologie 1898;8: 223-271.
2. Henderson IW, Brown JA, Balment RJ. The renin-angiotensin system and volume homeostasis. In: Brown JA, Balment RJ, Rankin JC (Eds). New insights in vertebrate kidney function, 1993. Society for Experimental Biology Seminar Series 52, Cambridge University, UK; 311-350.
3. Nguyen G, Delarue F, Burcklè C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. J Clin Invest 2002; 109: 1417-1427.
4. Saris JJ, van den Eijnden MMED, Lamers JMJ, Saxena PR, Schalekamp MADH, Danser AHJ. Prorenin-induced myocyte proliferation: no role for intracellular angiotensin II. Hypertension 2002; 39: 573-577.
5. Luetscher JA, Kraemer FB, Wilson DM, Schwartz HC, Bryer-Ash M. Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications. N Engl J Med 1985; 312: 1412-1417.
6. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II. Role of an intracardiac renin-angiotensin system. Annu Rew Physiol 1992; 54: 227-241.

7. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 1991; 352: 233-236.
8. Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M et al. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 1991; 351: 230-232.
9. Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M, Sasamura H, Pratt RE, Dzau VJ. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 1993; 268; 24539-24542.
10. Kambayashi Y, Bardhan S, Takahashi K, Tsuzuki S, Inui H, Hamakubo T et al. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J Biol Chem* 1993; 268; 24543-24546.
11. Volpe M, Musumeci B, De Paolis P, Savoia C, Morganti A. Angiotensin II AT2 receptors subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? *J Hypertens* 2003; 21: 1429-1443.
12. Kashina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and functions. *Blood Press* 2003; 12: 70-88.
13. Basset M, White P, Rainey W. The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217: 67-74.

14. Peter JF, Morag JY. Mechanism of mineralcorticoid action. *Hypertension* 2005; 46: 1227-1235.
15. Dzau VJ. Molecular and physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: emphasis on cardiovascular control. *J Hypertens* 1998; 6: S7-S12.
16. Johnston CI, Burrell LM, Perich R, Jandeleit K, Jackson B. The tissue renin-angiotensin system and its functional role. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992; 19: 1-5.
17. Lippoldt A, Paul M, Fuxe K, Ganten D. The brain renin-angiotensin system: molecular mechanism of cell to cell interactions. *Clin Exp Hypertens* 1995; 17: 251-266.
18. McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM et al. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 901-918.
19. Saavedra JM. Brain angiotensin II: new developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol* 2005; 25: 485-512.
20. Ruzicka M, Leenen FH. Update on local cardiac renin-angiotensin system. *Curr Opin Cardiol* 1997; 12: 347-355.
21. Ferrario CM, Strawn WB. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006; 98: 121-128.

22. Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signalling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 953-970.
23. Sturthers A. Aldosterone-induced vasculopathy. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217: 239-241.
24. Losel R, Schultz A, Wehling M. A quick glance at rapid aldosterone action. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 217: 137-141.
25. Chiurciu C, Remuzzi G, Ruggenenti P. Angiotensin-converting enzyme inhibition and renal protection in nondiabetic patients: the data of meta-analyses. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 58-63.
26. Grandi AM, Laurita E, Solbiati F, Marchesi C, Maresca AM, Nicolini E et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors influence left ventricular mass and function independently of the antihypertensive effect. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006; 8: 487-492.
27. Kjeldsen SE, Strand A, Julius S, Okin PM. Mechanism of angiotensin II type 1 receptor blocker action in the regression of left ventricular hypertrophy. *J Clin Hypertens* 2006; 8: 487-492.
28. Shrader J, Kulschewski A, Dendorfer A. Inhibition of the renin-angiotensin system and the prevention of stroke. *Am J Cardiovasc Drugs* 2007; 7: 25-37.
29. The Heart Outcomes Prevention Evaluation study investigators. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on

- cardiovascular events in high risk patients. *N Engl J Med* 2000; 342: 145-153.
30. Conn JW. Primary hyperaldosteronism: a new clinical syndrome. *J Lab Clin Med* 1955; 43: 3-7.
 31. Conn JW, Hinerman DL. Spironolactone-induced inhibition of aldosterone biosynthesis in primary aldosteronism: morphological and functional studies. *Metabolism* 1977; 26: 1293-1297.
 32. Conn JW. A concluding response. *Arch Intern Med* 1969; 123: 154-165.
 33. Rossi GP. Primary aldosteronism: a needle in a haystack or a yellow cab on fifth avenue? *Curr Hypertens Rep* 2004; 6: 1-4.
 34. Kaplan NM. Primary aldosteronism: evidence against a second epidemic. *J Hypertens* 2012; 30:1899-1902.
 35. Funder JW. Ultimately we are in furious agreement. *J Hypertens* 2012; 30:1903-1905.
 36. Mulatero P, Stowasser M, Loh KC, Fardella CE, Gordon RD, Mosso L et al. Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1045-1050.
 37. Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C et al. A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1125 hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 2293-2300.

38. Rossi GP, Bernini G, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Giacchetti G et al. Renal damage in primary aldosteronism: results of the PAPY Study. *Hypertension* 2006; 48: 232-238.
39. Kaplan NM. The current epidemic of primary aldosteronism: causes and consequences. *J Hypertens* 2004; 22: 863-869.
40. Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanchez CE, Mantero F, Stowasser M et al. Case detection, diagnosis and treatment of patients with primary aldosteronism: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3266-3281.
41. Brewster UC, Setaro JF, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system: cardiorenal effects and implications for renal and cardiovascular disease states. *Am J Med Sci* 2003; 326: 15-24.
42. Rossi G, Boscaro M, Ronconi V, Funder JW. Aldosterone as a cardiovascular risk factor. *Trands Endocrinol Metab* 2005; 16: 104-107.
43. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, Blacher J, Safar ME, Mourad JJ. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary hyperaldosteronism. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1243-1248.
44. Catena C, Colussi G, Di Fabio A, Valeri M, Marzano L, Uzzau A et al. Mineralocorticoid antagonists treatment versus surgery in primary hyperaldosteronism. *Horm Metab Res* 2010; 42: 440-445.
45. Stowasser M, Gordon RD, Gunasekera TG, Cowley DC, Ward G, Archibald C et al. High rate of detection of primary aldosteronism,

- including surgically treatable forms, after “non selective” screening in hypertensive patients. *J Hypertens* 2003; 21: 2149-2157.
46. McKenna TJ, Sequeira SJ, Heffernan A, Chambers J, Cunningham S. Diagnosis under random conditions of all disorders of the renin-angiotensin-aldosterone axis, including primary hyperaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 952-957.
 47. Sealey JE. Plasma renin activity and plasma prorenin assays. *Clin Chem* 1991; 37: 1811-1819.
 48. Gordon RD. The challenge of more robust and reproducible methodology in screening for primary aldosteronism. *J Hypertens* 2004; 22: 251-255.
 49. Stowasser M, Gordon RD, Rutherford JC, Nikwan NZ, Daunt N, Slater GJ. Diagnosis and management of primary aldosteronism. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2001; 2: 156-169.
 50. Gordon MS, Williams GH, Hollenberg NK. Renal and adrenal responsiveness to angiotensin II: influence of β -adrenergic blockade. *Endocr Res* 1992; 18: 115-131.
 51. Gallay BJ, Ahmad S, Xu L, Toivola B, Davidson RC. Screening for primary aldosteronism without discontinuing hypertensive medications: plasma aldosterone-renin ratio. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 699-705.

52. Mulatero P, Rabbia F, Milan A, Paglieri C, Morello F, Chiandussi L et al. Drug effects on aldosterone/plasma renin activity ratio in primary aldosteronism. *Hypertension* 2002; 40: 897-902.
53. Bangham DR, Robertson I, Robertson JIS, Robinson CJ, Tree M. An international collaborative study on renin assay: establishment of the international reference preparation of human renin. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1975; 2: S135-S159.
54. Schirpenbach C, Seiler L, Maser-Gluth C, Beuschlein F, Reincke M, Bidlingmaier M. Automated chemiluminescence-immunoassay for aldosterone during dynamic testing: comparison to radioimmunoassay with and without extraction steps. *Clin Chem* 2006; 52: 1749-1755.
55. Guo T, Taylor rl, Singh RJ, Soldin SJ. Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006; 372: 76-82.
56. Galen FX, Devaux C, Atlas S, Guyenne T, Menard J, Corvol P. new monoclonal antibodies directed against human renin. Powerful tools for investigation of the renin system. *J Clin Invest* 1984; 74: 723-735.
57. Morganti A, Turolo L, Pulazzini E, Zanchetti A. Comparative measurement of immunoreactive renin, plasma renin activity and angiotensin II in human plasma. *Clin Exp Hypertens* 1987; 9: 1367-1381.

58. Morganti A, Pelizzola D, Mantero F, Gazzano G, Opocher G, Piffanelli , on behalf of the Italian Multicenter Study for Standardization of Renin Measurement. Immunoradiometric versus enzymatic renin assay: results of the Italian Multicenter Comparative Study. *J Hypertens* 1995; 13: 19-26.
59. Sealey JE, Trenkwalder P, Gahnem F, Catanzaro D, Laragh JH. Plasma renin methodology: inadequate sensitivity and accuracy of direct renin assay for clinical applications compared with the traditional enzymatic plasma renin activity assays. *J Hypertens* 1995; 13: 27-30.
60. De Bruin RA, Bouhuizen A, Diederich S, Perschel FH, Boosma F, Deinum J. Validation of a new automated renin assay. *Clin Chem* 2004; 50: 2111-2116.
61. Hartman D, Sagnella GA, Chesters CA, McGregor GA. Direct renin assay and plasma renin activity assay compared. *Clin Chem* 2004; 50: 2159-2161.
62. Morganti A, on behalf of the European study group for the validation of DiaSorin Liaison direct renin assay. A comparative study on inter and intralaboratory reproducibility of renin measurement with a conventional enzymatic method and a new chemiluminescent assay of immunoreactive renin. *J Hypertens* 2010; 28: 1307-1312.
63. Dorrian CA, Toole BJ, Alvarez-Mandrazo S, Kelly A, Connell JMC, Wallace AM. A screening procedure for primary aldosteronism based

- on the DiaSorin Liaison automated chemiluminescent immunoassay for direct renin. *Ann Clin Biochem* 2010; 47: 195-199.
64. Rossi GP, Barisa M, Belfiore A, Desideri GB, Ferri C, Letizia C et al. The aldosterone-renin ratio based on the plasma renin activity and the direct renin assay for diagnosing aldosterone-producing adenoma. *J Hypertens* 2010; 28: 1892-1899.
65. Gordon RD, Stowasser M, Tunny TJ, Klemm SA, Rutherford JC. High incidence of primary aldosteronism in 199 patients referred with hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994; 21: 315-318.
66. Lim PO, Dow E, Brennan G, Jung RT, MacDonald TM. High prevalence of primary aldosteronism in the Tayside hypertension clinic population. *J Hum Hypertens* 2000; 14: 311-315.
67. Loh KC, Koay ES, Khaw MC, Emmanuel SC, Young WF Jr. Prevalence of primary aldosteronism among Asian hypertensive patients in Singapore. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 2854-2859.
68. Tiu SC, Choi CH, Shek CC, Ng YW, Chan FK, Ng CM et al. The use of aldosterone-renin ratio as a diagnostic test for primary hyperaldosteronism and its test characteristics under different conditions of blood sampling. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 72-78.
69. Young WF Jr. Primary aldosteronism: update on diagnosis and treatment. *The Endocrinologist* 1997; 7: 213-221.

70. Glorioso N, Dessi-Fulgheri P, Madeddu P, Oppes M, Palermo M, Mancina G et al. A reevaluation of methodological aspects of a commercial RIA kit for plasma renin activity. *J Nucl Med Allied Sci* 1985; 29: 235-239.
71. Campbell DJ, Nussberger J, Stowasser M, Danser AHJ, Morganti A, Frandsen E et al. Activity assays and immunoassays for plasma renin and prorenin: information provided and precautions necessary for accurate measurement. *Clin Chem* 2009; 55: 867-877.
72. Morganti A, Sealey JE, Lopez-Ovejero JA, Pickering TG, Laragh JH. The substitutive role of ACTH in supporting aldosterone response to head-up tilt during acute renin suppression in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1979; 1: 130-135.
73. Bomback AS, Klemmer PJ. The incidence and implications of aldosterone breakthrough. *Nat Clin Pract Nephrol* 2007; 3: 486-492.
74. Ferrari P, Shaw SG, Nicod J, Saner E, Nussberger J. Active renin versus plasma renin activity to define aldosterone-to-renin ratio for primary aldosteronism. *J Hypertens* 2004; 22: 377-381.
75. Perschel FH, Schemer R, Seiler L, Reincke M, Deinum J, Maser-Gluth C et al. Rapid screening test for primary hyperaldosteronism: ratio of plasma aldosterone-to-renin concentration determined by fully automated chemiluminescence immunoassays. *Clin Chem* 2004; 50: 1650-1655.

76. Corbin F, Douville P, Lebel M. Active mass concentration to determine aldosterone-to-renin ratio in screening for primary aldosteronism. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2011; 4: 115-120.
77. Ducher M, Mounier-Vehier C, Baguet JP, Tartiere JM, Sosner P, Regnier-Le Coz S et al. Aldosterone-to-renin ratio for diagnosing aldosterone-producing adenoma: a multicentre study. *Arch Cardiovasc Dis* 2012; 105: 623-630.
78. Hannemann A, Bidlingmaier M, Friedrich N, Manolopoulou J, Spyroglou A, Volzke H et al. Screening for primary aldosteronism in hypertensive subjects: results from two German epidemiological studies. *Eur J Endocrinol* 2012; 167: 7-15.
79. Yin G, Zhang S, Yan L, Wu M, Xu M, Li F et al. One-hour upright posture is an ideal position for serum aldosterone concentration and plasma renin activity measuring on primary aldosteronism screening. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2012; 120: 388-394.

