

Raffaello Buoninconti

# I recettori dell'angiotensina



Dalla biologia molecolare  
alla terapia con gli antagonisti recettoriali

---

**I recettori dell'angiotensina**  
**Dalla biologia molecolare**  
**alla terapia con gli antagonisti recettoriali**

Raffaello Buoninconti

Raffaello Buoninconti

# **I recettori dell'angiotensina**

**Dalla biologia molecolare  
alla terapia  
con gli antagonisti recettoriali**

RAFFAELLO BUONINCONTI  
Professore Associato fr  
Facoltà di Medicina  
Seconda Università degli Studi di Napoli

ISBN 978-88-470-0566-2

Springer fa parte di Springer Science+Business Media  
springer.com  
© Springer-Verlag Italia 2007

Quest'opera è protetta dalla legge sul diritto d'autore. Tutti i diritti, in particolare quelli relativi alla traduzione, alla ristampa, all'uso di figure e tabelle, alla citazione orale, alla trasmissione radiofonica o televisiva, alla riproduzione su microfilm o in database, alla diversa riproduzione in qualsiasi altra forma (stampa o elettronica) rimangono riservati anche nel caso di utilizzo parziale. Una riproduzione di quest'opera, oppure di parte di questa, è anche nel caso specifico solo ammessa nei limiti stabiliti dalla legge sul diritto d'autore, ed è soggetta all'autorizzazione dell'Editore. La violazione delle norme comporta sanzioni previste dalla legge.

L'utilizzo di denominazioni generiche, nomi commerciali, marchi registrati, ecc., in quest'opera, anche in assenza di particolare indicazione, non consente di considerare tali denominazioni o marchi liberamente utilizzabili da chiunque ai sensi della legge sul marchio.

In copertina: figura originale dell'autore (v. p. 101)

Progetto grafico della copertina: Simona Colombo, Milano  
Progetto grafico e impaginazione: Rudi Olivi, Signum s.r.l., Bollate (Mi)  
Stampa: Signum s.r.l., Bollate (Mi)

*Stampato in Italia*  
Springer-Verlag Italia Srl, Via Decembrio 28, I-20137 Milano

*ad Angela*

*“Almost all aspects of the life are engineered at the molecular level, and without understanding molecules, we can only have a very sketchy understanding of life itself”*

Francis Crick  
Of Molecules and Men - 1966

*“In medicine, the final test of the usefulness of an idea is its effect on therapy”*

G. Pickering  
1961

## Ringraziamenti

Se (come spero) sono riuscito a raccogliere in una unica trattazione i lavori più importanti finora pubblicati sul SRA, il merito va anche a tutti coloro che con pazienza mi hanno aiutato nella difficile ricerca di voci bibliografiche introvabili, di fotocopie e di collegamenti in rete.

In particolare desidero ringraziare:

la Sig.ra Sbordone Castillett e le sue collaboratrici della biblioteca centralizzata della Facoltà di Medicina (SUN);

il Dr. Scielzo, bibliotecario dell'Istituto di Clinica Medica (SUN);

la Sig.ra Faller e le sue collaboratrici della biblioteca della Stazione Zoologica A. Dohrn.

La mia sincera affettuosa gratitudine va anche ai miei figli Mario e Roberto, che con la loro conoscenza del computer hanno trasformato la mia incomprensibile grafia in un testo chiaro e leggibile e hanno tradotto in immagini comprensibili qualche mia ipotesi personale.

Infine, non posso dimenticare le Dr. Hofmann, Rizza e Born, che hanno validamente contribuito a risolvere i tanti problemi editoriali, ed hanno dato anche a questo mio nuovo lavoro una veste degna delle tradizioni di Springer.

# Introduzione

La storia del Sistema Renina-Angiotensina (SRA), che si sarebbe sviluppata tumultuosamente durante tutto il XX secolo, inizia nel 1898, con la pubblicazione di un lavoro intitolato semplicemente “Rene e Circolazione”, nel quale gli AA, fisiologi dell’Università di Stoccolma (Tigerstedt e Bergman 1898) descrivevano le proprietà ipertensivanti di una sostanza da essi identificata in un estratto salino del rene di coniglio e pertanto denominata Renina (R) (“... *there is indeed a substance in the kidney that causes increase in blood pressure by means of vascular contractions*”).

Nello stesso lavoro i due ricercatori avanzavano anche l’ipotesi che questa sostanza fosse responsabile dell’ipertrofia miocardica osservata nelle malattie renali e che un’eccessiva produzione di essa fosse dannosa per l’apparato cardiovascolare<sup>1</sup>.

Pur non avendo suscitato molto interesse negli ambienti scientifici dell’epoca, la scoperta della R apriva comunque un capitolo nuovo nella medicina del 19° secolo e quindi avrebbe meritato ulteriori ricerche per definire meglio la struttura e le funzioni di questa sostanza. Invece, dopo quel primo lavoro i due AA abbandonarono l’argomento e lasciarono Stoccolma per dedicarsi ad attività completamente diverse: Tigerstedt (che intanto era ritornato nella sua patria d’origine, la Finlandia) a ricerche sul metabolismo, e Bergman alla professione medica nella città di Malmo (Aurell 1998; Phillips e Schmidt-Otto 1999).

Indipendentemente dai motivi che lo determinarono<sup>2</sup>, il comportamen-

<sup>1</sup> “We would like to point out, however, that we do not put forward a new hypothesis concerning renal disease and hypertrophy of the heart because that would require many experiments. We would only suggest a role for this pressure-elevating substance from the kidney” (Tigerstedt e Bergman 1898).

<sup>2</sup> Tra i tanti motivi invocati per spiegare il comportamento di Tigerstedt vi è quello patriottico, ossia il suo desiderio di ritornare in Finlandia (in quel tempo sotto il dominio russo), ove egli si dedicò attivamente anche alla cura dei prigionieri di guerra; oppure quello “opportunistico” e cioè che il lavoro sulla Renina gli servisse solo come presentazione al Congresso di Medicina di Mosca, del quale egli era stato eletto presidente. Un’altra spiegazione potrebbe essere l’accoglienza piuttosto fredda, a volte addirittura critica, che la comunità scientifica dell’epoca riservò al suo lavoro e che durò a lungo, tanto che ancora nel 1933 Starling non lo citò nel suo trattato di fisiologia (Phillips e Schmidt-Otto 1999).



to di Tigerstedt rimane comunque difficile da spiegare, perché da un lato egli continuò a citare il suo lavoro fino al 1923 in tutte le 10 edizioni del suo trattato di fisiologia (quindi era consapevole della sua importanza), ma dall'altro non si interessò più dell'argomento, probabilmente perché non intuì che la Renina da lui scoperta era soltanto il primo passo per l'identificazione di un sistema biologico, il SRA, fondamentale per il controllo dell'omeostasi nella maggior parte degli organismi viventi.

Programmato milioni d'anni fa, quando questi organismi passarono dall'acqua alla terraferma e dovettero quindi sviluppare nuovi meccanismi per adattarsi al nuovo *habitat* (Henderson e coll. 1993; Nishimura 2004), questo sistema ha infatti il compito di conservare il patrimonio idrico-elettrolitico e di mantenere la perfusione adeguata alle esigenze dei vari organi: quindi è a tutti gli effetti un sistema indispensabile per la sopravvivenza - ("*survival system*") (Sealey e Laragh 1995).

In particolari condizioni fisiopatologiche e per effetto di meccanismi non sempre identificabili, tale sistema può tuttavia non rispondere più al *feedback* che normalmente arresta il suo funzionamento quando l'omeostasi cardiocircolatoria e idrico-elettrolitica si sono normalizzate, per cui esso continua a funzionare in misura sproporzionata alle esigenze dell'organismo, ed i suoi effetti finiscono per danneggiare proprio quegli organi (cervello, cuore e vasi, reni) dei quali esso dovrebbe preservare la funzione (Unger 2002).

Questi effetti – che possono essere pertanto benefici o dannosi, a seconda del modo in cui lavora il sistema – si realizzano grazie ad una complessa organizzazione strutturale e funzionale, in quanto:

- 1) esistono due SRA, uno circolante ed uno tessutale (Dzau 1988)<sup>3</sup>, quest'ultimo definito anche con il termine di "*local angiotensin generating system*" (Danser 2004) perché la sua sintesi sembra legata ad uno o più componenti (renina e/o prorenina) provenienti dalla circolazione. I due sistemi sono strettamente collegati fra loro, ma possono anche funzionare indipendentemente l'uno dall'altro, quello circolante con un meccanismo esocrino e quello tessutale con un meccanismo auto- e/o paracrino (Dzau e Pratt 1993);

<sup>3</sup> Secondo Dzau ("*The Renin Angiotensin System: A Billion years of evolution*": 13<sup>th</sup> Scientific Meeting of the ISH, Montreal 1990) l'esistenza di due SRA – uno locale e l'altro endocrino, ma entrambi capaci di agire sugli stessi organi bersaglio – potrebbe essere spiegata dal punto di vista dell'evoluzione ammettendo che questo processo si sia svolto in tempi diversi per ciascuno dei due sistemi: l'identificazione della R nei vasi renali di alcuni pesci, la cui esistenza sembra risalire a cinquecento milioni d'anni fa, suggerisce che il sistema tessutale è quello primordiale ed è deputato soprattutto al controllo del tono vasale, mentre quello circolante sarebbe comparso più tardi, quando fu necessario fornire agli organismi viventi dei meccanismi di risposta rapida per il controllo cardiovascolare e del volume dei liquidi corporei.

- 2) per funzionare entrambi i sistemi dispongono, oltre che dell'Angiotensina II, anche di alcuni suoi metaboliti (Angiotensina III, Angiotensina IV, Ang-(1-7)) (Ardaillou e Chansel 1998; Campbell 2001), ciascuno dei quali produce effetti biologici altrettanto significativi ed, in alcuni casi, anche opposti a quelli prodotti dalla molecola d'origine;
- 3) all'interno dei due sistemi esistono molteplici siti di legame per questi polipeptidi, ciascuno capace di riconoscere in maniera selettiva il proprio ligando e di tradurre i suoi messaggi in risposte biologiche (Chiu e coll. 1994; de Gasparo e coll. 1995a).

Questi siti rappresentano pertanto l'elemento indispensabile per la comparsa di queste risposte e l'identificazione dei loro diversi sottotipi (recettori AT1, AT2, AT4, Ang-(1-7)) – realizzata prima con metodiche biochimiche (DDT) (Whitebread e coll 1989) e poi in via farmacologica, mediante farmaci in grado di antagonizzarli (Timmermanns e coll. 1993) – ha aumentato notevolmente le nostre conoscenze sui meccanismi con cui lavora il SRA ed ha suggerito anche le modalità per inibirlo (Ferrario e coll. 2006 a e b).

L'uso sempre più ampio di questi antagonisti – ed in particolare di quelli che antagonizzano i recettori AT1 – ha dimostrato però che soprattutto questi ultimi, inizialmente sintetizzati con lo scopo di curare in maniera più razionale l'IA, sono in realtà capaci di produrre effetti benefici anche in altre condizioni morbose (dall'Alzheimer al diabete mellito, dalle malattie renali a quelle respiratorie), che almeno in via primitiva non appaiono legate ad un alterato funzionamento del SRA.

I meccanismi con cui si realizzano tutti questi effetti non sono ancora chiari, per cui sono in corso altre ricerche, con lo scopo di vedere che cosa avviene realmente “dietro la facciata” di questi recettori, quando essi sono stimolati dall'agonista o bloccati dall'antagonista. I dati finora acquisiti sono sicuramente promettenti, tuttavia ciascuno di essi riguarda quasi sempre un solo aspetto della biologia recettoriale e, per di più, i risultati sono “frammentati” in pubblicazioni prodotte da ricercatori di estrazione diversa – biologi molecolari, biochimici, fisiologi o farmacologi, per cui non sempre è possibile avere una visione completa dello stato dell'arte.

La presente rassegna è nata con lo scopo di riunire in una trattazione per quanto possibile unitaria tutte queste conoscenze, in modo da inserirle in un unico contesto, nel quale i dati sperimentali abbiano la loro naturale conclusione in quelli clinici e questi ultimi, a loro volta, trovino la loro spiegazione nelle premesse fornite dal laboratorio.

Essa è stata divisa in due parti. Nella prima sono discusse le ricerche che hanno reso possibile la classificazione di questi recettori, la definizione della loro struttura e dei meccanismi che li attivano e la dimostrazione degli effetti che ciascuno di essi produce. A conclusione di questa prima parte

sono esaminati anche i rapporti tra i diversi recettori del SRA ed il continuo dialogo che si svolge tra di loro e che contribuisce al funzionamento del sistema.

La seconda parte è dedicata alle applicazioni in campo terapeutico scaturite dalle ricerche, quindi nel corso di essa sono descritte le caratteristiche farmacologiche degli antagonisti dei recettori AT1, il loro meccanismo d'azione, gli effetti che producono ed i risultati ottenuti, soprattutto nel trattamento di alcune patologie più diffuse come l'IA, lo scompenso cardiaco, la nefropatia e lo *stroke*.

# Sommario

## Le ricerche di biologia molecolare

<b>Cap. 1</b>	<b>La classificazione dei recettori dell'Angiotensina</b>	1
1.1	I recettori AT1 e AT2	3
1.2	Il recettore AT4	5
1.3	Il recettore dell'Ang-(1-7)	6
1.4	I recettori atipici	8
1.4.1	Il recettore AT3	8
1.4.2	I siti di legame intracellulari	8
<b>Cap. 2</b>	<b>Il recettore AT1: la struttura ed il legame con le GPs</b>	13
2.1	La struttura del recettore AT1	15
2.2	Il legame del recettore AT1 con le GPs	19
2.3	La cascata dei segnali	22
<b>Cap. 3</b>	<b>Il recettore AT1: la fosforilazione, l'internalizzazione e la riattivazione</b>	29
3.1	La fosforilazione del recettore AT1	30
3.2	L'internalizzazione e la riattivazione de recettore AT1	32
<b>Cap. 4</b>	<b>Il recettore AT1: la distribuzione e gli effetti</b>	39
4.1	La distribuzione del recettore AT1	39
4.2	Gli effetti prodotti dal recettore AT1	43
<b>Cap. 5</b>	<b>Il recettore AT2: la struttura, l'attivazione del segnale e la distribuzione</b>	51
5.1	La struttura del recettore AT2	51
5.2	Il recettore AT2 e le GPs	54
5.3	L'attivazione del segnale	55
5.4	La distribuzione del recettore AT2	58
<b>Cap. 6</b>	<b>Il recettore AT2: gli effetti</b>	63
6.1	Gli effetti sulla PA	63
6.2	Gli effetti sul cuore	71

---

6.3	Gli effetti sul rene	72
6.4	Gli effetti a livello del SNC	74
6.5	Gli effetti sulla crescita e sui fenomeni proliferativi	76
6.6	I recettori AT2 e l'apoptosi	79
6.7	Gli effetti sull'aterogenesi	82
<b>Cap. 7</b>	<b>Le risposte atipiche dei recettori AT1 ed AT2 – Il <i>crossstalk</i> e la dimerizzazione</b>	<b>83</b>
7.1	Le risposte atipiche	83
7.2	Il <i>crossstalk</i> e la dimerizzazione	86
<b>Cap. 8</b>	<b>Il recettore AT4</b>	<b>89</b>
8.1	La distribuzione e la farmacologia del recettore AT4	89
8.2	Gli effetti prodotti dai recettori AT4	90
<b>Cap. 9</b>	<b>L' Ang-(1-7) ed il suo recettore</b>	<b>93</b>
<b>Cap. 10</b>	<b>I rapporti dei recettori AT1 e AT2 con quelli AT4 e dell'Ang-(1-7)</b>	<b>99</b>
<b>La terapia con gli antagonisti recettoriali</b>		
<b>Cap. 11</b>	<b>Gli antagonisti dei recettori AT1</b>	<b>105</b>
11.1	La farmacocinetica degli AT1-Antagonisti	107
11.2	La farmacodinamica degli antagonisti dei recettori AT1	111
11.3	Gli effetti prodotti dagli antagonisti del recettore AT1	113
11.4	Gli effetti pleiotropi	118
<b>Cap. 12</b>	<b>Il meccanismo d'azione degli antagonisti dei recettori AT1</b>	<b>123</b>
12.1	Il blocco dei recettori AT1	123
12.2	La partecipazione dei recettori AT2 e degli altri componenti il SRA	124
12.3	Gli effetti mediati dal SNC	126
<b>Cap. 13</b>	<b>La tollerabilità e le reazioni avverse</b>	<b>129</b>
<b>Cap. 14</b>	<b>Le principali indicazioni terapeutiche degli AT1RA – I grandi <i>trials</i></b>	<b>131</b>
14.1	L'ipertensione arteriosa	131
14.2	Lo scompenso cardiaco	139
14.3	La nefropatia	143
14.4	Lo <i>stroke</i>	145

<b>Cap. 15 Esistono differenze nell'efficacia clinica dei diversi antagonisti dei recettori AT1 e qual è la dose giusta di questi farmaci?</b>	149
<b>Conclusioni: il passato, il presente ed il futuro</b>	151
<b>Bibliografia</b>	155
<b>Sigle a singola lettera ed a tre lettere per gli aminoacidi</b>	187
<b>Indice analitico</b>	189

# **Le ricerche di biologia molecolare**

# La classificazione dei recettori dell'Angiotensina

L'esistenza di questi recettori era stata ipotizzata già negli anni '70, quando era stato dimostrato che nell'aorta di coniglio l'Angiotensina II marcata si lega ad alcune strutture specifiche, di tipo recettoriale, collocate sulla membrana cellulare e saturabili con una concentrazione di Angiotensina II di  $10^{-7}$  (Goodfriend e Lin 1970). Successivamente, quando apparve evidente che la risposta al polipeptide variava a seconda delle linee cellulari esaminate (Glossmann e coll. 1974), fu avanzata l'ipotesi che questi siti di legame fossero di tipo diverso (Meyer e coll. 1970), e questa ipotesi fu confermata da Chiu (Chiu e coll. 1989) e Whitebread (Whitebread e coll. 1989), che dimostrarono l'inattivazione di alcuni di questi siti da parte di una sostanza – il DTT –, che riduce la loro capacità di legare l'Angiotensina II, interrompendo i due ponti disolfuro presenti in ciascuna delle quattro anse intracellulari. Altri siti sono invece stimolati da questa sostanza, che aumenta la loro capacità di legame con il peptide.

Infine, partendo dall'osservazione di Furakawa (Furakawa e coll. 1982), secondo cui alcuni derivati imidazolici (S8307 e S8308) si comportano come antagonisti deboli ma specifici dell'Angiotensina II, negli anni '80 furono sintetizzati alcuni composti, mediante i quali fu possibile caratterizzare questi siti recettoriali anche farmacologicamente: infatti, alcune di queste molecole, a struttura difenilimidazolica (DuP 753) erano capaci di antagonizzare i siti inattivati dal DTT, mentre altri, a struttura tetraidroimidazopiridinica (spinacine) (PD123177 ed omologhi), antagonizzavano i siti stimolati dal DTT (Blankley e coll. 1991; Carini e coll. 1991).

Essendo state condotte in laboratori diversi, queste ricerche determinarono tuttavia una certa confusione nella terminologia adottata per indicare i due siti recettoriali: quello sensibile al DuP 753 inizialmente fu denominato AII-1, AII- $\alpha$  o AII-B, mentre quello insensibile fu denominato AII-2, AII- $\beta$  o AII-A. Queste diverse definizioni furono unificate nel 1991, quando una commissione di esperti propose di assegnare ai due tipi di recettori – quello antagonizzato dal Dup 753 e quello antagonizzato dal PD123319 e dal PD123177 – la denominazione rispettivamente di recettori AT1 e AT2, riservando la denominazione di AT1<sub>A</sub> e AT1<sub>B</sub>, AT2<sub>A</sub> ed AT2<sub>B</sub> e così via ad eventuali sottotipi di individuazione successiva (Bumpus e coll. 1991).



Appena quattro anni più tardi fu necessario, però, ampliare questa classificazione (de Gasparo e coll. 1995b), in quanto era stata accertata l'esistenza di altri siti recettoriali, che furono denominati AT3 ed AT4. Tuttavia ad essi non fu possibile dare una collocazione precisa, perché i loro meccanismi di trasduzione erano ignoti, e perché essi non erano stati clonati (e non lo sono tuttora). La definizione di AT3 fu data ad un sito di legame evidenziato nelle linee cellulari Neuro-2A del neuroblastoma del topo (Chaki ed Inagami 1992), caratterizzato da una bassa affinità per l'Angiotensina III, ed insensibile sia al DuP 753 che al PD123319, per cui, esso si comporta come un recettore non-AT1 e non-AT2. Il termine AT4 fu dato, invece, ad un recettore caratterizzato da una significativa affinità per un altro metabolita dell'Angiotensina II – l'Ang 3-8 o Angiotensina IV –, dotato di caratteristiche tali da giustificare la sua differenziazione dai recettori AT1 e AT2 e la sua inclusione tra i recettori del SRA (de Gasparo e coll. 1995b) (Fig. 1).

Più recentemente, il *Council for High Blood Pressure Research* ed il Comitato Internazionale di Farmacologia per la nomenclatura dei recettori (IUPHAR), hanno stabilito tre criteri necessari per poter considerare questi siti come dei veri e propri recettori: 1) operazionale, 2) trasduzionale e 3) strutturale, che riguardano rispettivamente: 1) l'affinità di legame di questi recettori con gli agonisti e gli antagonisti, 2) gli eventi che si verificano allorché si realizza tale legame e 3) la sequenza aminica del recettore e la possibilità di clonarlo (Humphrey e Barnard 1998).

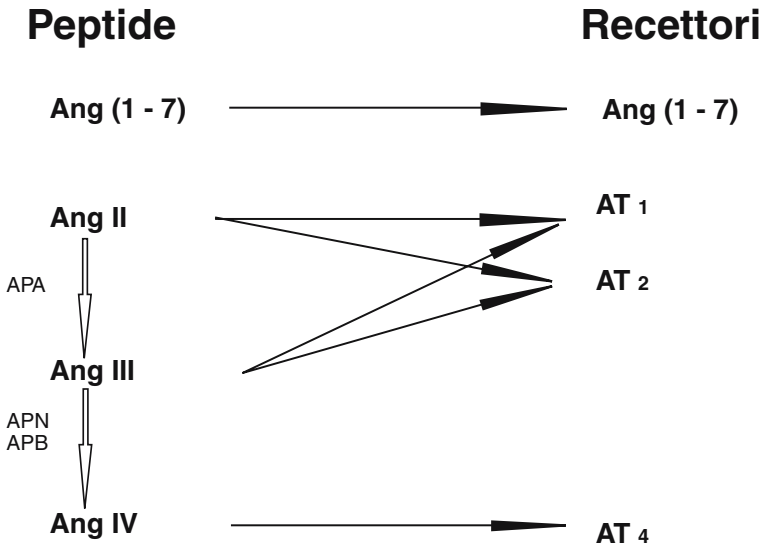


Fig. 1. Peptidi attivi dell'angiotensina e loro recettori (APA = Aminopeptidasi A; APB = Aminopeptidasi B; APN = Aminopeptidasi N)

## 1.1 - I recettori AT1 e AT2

Allo stato attuale delle nostre conoscenze questi due recettori sono gli unici dotati dei tre requisiti richiesti dall'IUPHAR (Humphrey e Barnard 1998; de Gasparo e coll. 2000).

Per indicare la loro classe strutturale, a ciascuno di essi è stato assegnato un codice alfanumerico, che è 2.1 Ang. 01.000.00.00 per quello AT1, e 2.1 Ang. 02.000.00.00 per quello AT2, ove i primi due numeri indicano la classe strutturale, il termine Ang la famiglia recettoriale di appartenenza ed i numeri 01 e 02 il tipo di recettore (AT1 e AT2), mentre gli zeri sono riservati ad eventuali varianti per duplicazione.

Per indicare invece la struttura aminoacidica e la collocazione cromosomica di questi due recettori è stato usato un ulteriore codice (de Gasparo e coll. 2000): nell'uomo il recettore AT1 ha il codice h 359 aa, P30556, chr 3, per indicare che esso contiene 359 aminoacidi, la cui sequenza è riportata al file n. 30556 del Protocollo svizzero, e che il gene che lo codifica si trova sul cromosoma 39 (Q); il recettore AT2 ha invece il codice h 363 aa, P50052, chr X q22-q23, perché contiene 363 aminoacidi e si trova sul cromosoma X q22-q23.

Come suggeriscono questi codici, ciascuno dei due recettori ha delle particolari caratteristiche biochimiche e strutturali, che, tuttavia, possono variare in funzione di fattori diversi come la localizzazione, la specie, lo stato del bilancio sodico, e così via: ad es., i recettori AT1 presenti nel tessuto nervoso mostrano una sensibilità al DTT minore di quelli periferici, ed anche la loro capacità di legame con l'Angiotensina II o con l'antagonista specifico (Losartan) è diversa da specie a specie (ad es. nei bovini è molto minore che in altre specie) (Timmermans e coll. 1993; de Gasparo e coll. 1994a).

Inoltre, nell'uomo ed in alcune specie animali (cane, maiale, coniglio) il recettore AT1 non ha duplicati (Curnow 1996), mentre nel ratto e nel topo ne esistono due sottotipi (de Gasparo e coll. 1994a), che sono probabilmente il risultato di una duplicazione genica avvenuta nel corso dell'evoluzione, dopo il distacco dei roditori dall'albero filogenetico dei mammiferi (Yoshida e coll. 1992). I due sottotipi – definiti AT1<sub>A</sub> e AT1<sub>B</sub> – sono collocati rispettivamente, nel ratto sul cromosoma 17q12 e 2q24, e nel topo su quello 13 e 3, per cui anche il loro codice è diverso: quello del ratto è r359aa, P 29089, P 25095, chr 17, chr 2; quello del topo è m359aa, P 29754, P 29755, chr 13, chr 3 (de Gasparo e coll. 2000).

Nonostante la diversa collocazione, i due sottotipi hanno comunque una eguale capacità di legare l'agonista, e coincidono per il 92% del loro DNA e per il 95% della sequenza aminoacidica, diversificandosi solo nell'ultima ansa extracellulare, che contiene sequenze diverse. A livello di quest'ansa

esiste una certa somiglianza tra il recettore AT1 dell'uomo e quello AT1<sub>B</sub> del ratto; tuttavia il confronto tra la sequenza aminoacidica delle anse ic dei due sottotipi e quella del recettore AT1 dell'uomo, dimostra che quest'ultimo funzionalmente è simile al sottotipo AT1<sub>A</sub> (Inagami 1995).

Il recettore AT2 presenta caratteristiche strutturali simili nell'uomo e nei roditori (72 % di identità tra l'uomo ed il ratto), ed è di tipo unico (de Gasparo e coll. 2000). La possibilità che anche di esso esistano dei sottotipi non può comunque essere esclusa, dal momento che le sue caratteristiche molecolari e funzionali presentano delle differenze, a cominciare dal peso (de Gasparo e coll. 1994a; de Gasparo e coll. 1994b;). Quest'ultimo, che normalmente è compreso tra i 60 (miometrio umano) ed i 113 kDa (cellule PC12), in una particolare linea cellulare che esprime prevalentemente questo tipo di recettore - NG 108-15 -, è infatti diverso per la forma glicosilata e quella de-glicosilata, perché è rispettivamente di 92 e 56.2 kDa. Le stesse differenze sono state osservate anche per i recettori AT2 presenti nella granulosa ovarica del ratto e nei fibroblasti R3T3 (che hanno un peso molecolare rispettivamente di 79 e 100 kDa), quindi, è probabile che in queste linee cellulari i recettori AT2 abbiano modalità diverse di glicosilazione (Servant e coll. 1996).

L'esistenza di due sottotipi sembra d'altronde confermata da altre ricerche (Tsutsumi e Saavedra 1992), le quali dimostrano che in ratti di due settimane (caratterizzati da una notevole espressione di recettori AT2) il legame della <sup>125</sup>I-Sar<sup>1</sup>-Ang II con questi recettori è inibito dal pretrattamento con GTPγ<sub>s</sub> o con PTX in alcune strutture dell'encefalo (n. ventrotalamico, n. mediale genicolato e LC), mentre non lo è in altre (n. dell'ipoglosso, oliva inferiore) e nelle cellule R3T3.

In queste strutture è diversa anche la sensibilità al DTT, perché nell'oliva inferiore e nel n. dell'ipoglosso i recettori AT2 appaiono sensibili ad esso, mentre nel n. talamico ventrale ed in quello mediodorsale l'incubazione con DTT riduce soltanto del 40% il legame di questi recettori con l'Angiotensina II (Tsutsumi e Saavedra 1992).

Due sottopopolazioni di recettori AT2 sono state isolate anche in una linea cellulare differenziata del neuroblastoma - N1E-115, caratterizzata da una sensibilità al DTT ed al PD 123319 diversa da quella di altre linee cellulari (Reagan e coll. 1996).

L'esistenza di queste sottopopolazioni è suggerita anche dal fatto che alcuni di questi recettori (definiti AT2<sub>A</sub>) si legano con determinate subunità delle GPs, mentre altri (definiti AT2<sub>B</sub>) sono incapaci di contrarre tale legame (Zhang e Pratt 1996b); ciò fa supporre l'esistenza di una interazione selettiva tra queste subunità delle GPs ed i recettori AT2, in grado di dar luogo a risposte cellulari diverse.

## 1.2 - Il recettore AT4

Il recettore AT4 è stato inserito nel contesto dei recettori del SRA come un razionale per spiegare gli effetti prodotti dall'Angiotensina IV e la presenza in diverse strutture di siti di legame ad alta affinità per questo peptide (de Gasparo e coll. 1995a; Vauquelin e coll. 2002). Esso ha una bassa affinità per l'Angiotensina II, è insensibile agli AT1 – ed agli AT2RA, ed invece è sensibile ad un antagonista specifico – il Divalinal Ang IV (de Gasparo e coll. 2000).

Strutturalmente, questo recettore si presenta come una glicoproteina, costituita da una subunità  $\alpha$  con un peso molecolare di 165 kDa, e da una subunità  $\beta$  con un peso molecolare di 60 kDa (Zhang e coll. 1999a). Tuttavia prima nel surrene, e poi nel cervello, nel cuore e nei reni è stata identificata una banda con un peso molecolare di 225 kDa (Mustafa e coll. 2001); quindi è probabile che esso sia un recettore multimerico. Nell'ippocampo, invece, il suo peso molecolare è minore: 150 kDa (Zhang e coll. 1999a). Inoltre esso non si lega alle GPs, la sua stimolazione con Angiotensina IV non modifica i classici messaggeri (cGMP,  $Ca^{2+}$ , inositolo fosfato, acido arachidonico) (Mustafa e coll. 2001), e si internalizza rapidamente.

Alcuni dati sembrano tuttavia mettere in dubbio la possibilità che l'Angiotensina IV sia l'unico ligando per il recettore AT4, in quanto in alcuni sistemi cellulari (cellule epiteliali del tubulo prossimale) il Divalinal Ang IV si comporta come un agonista, perché produce risposte simili a quelle prodotte dall'Angiotensina IV (Handa 2001). Inoltre, nelle strutture cerebrali in cui è presente questa Angiotensina è stato identificato anche un altro peptide, ottenuto per idrolisi della catena  $\beta$  dell'emoglobina – la LVV-emorfina 7 (Moeller e coll. 1997) –, dotato di una significativa affinità per questo recettore, del quale esso potrebbe essere il ligando specifico.

Secondo altri AA (Albiston e coll. 2001; Chai e coll. 2004) l'AT4 si identificherebbe con una proteina di membrana omologa delle aminopeptidasi A ed N – la cosiddetta IRAP (*Insulin-regulated aminopeptidase*), costituita da 916 aminoacidi e capace di eliminare l'aminoacido N-terminale di alcuni peptidi bioattivi, tra i quali l'Angiotensina III e l'Angiotensina IV.

Mediante l'inibizione *in situ* e le metodiche immunoistochimiche è stato anche visto che nel cervello di topo la distribuzione dell'IRAP mRNA è sovrapponibile a quella dei siti di legame della Nec<sup>1</sup>-Ang IV (Norleucina<sup>1</sup> – Ang IV), e che entrambi i ligandi del recettore AT4 – l'Angiotensina IV e la LWH7 – inibiscono l'attività catalitica dell'IRAP (Albiston e coll. 2001). Tra il recettore AT4 e l'IRAP esiste anche una somiglianza strutturale, dal momento che quest'ultima è costituita anch'essa da una breve terminazione citoplasmatica N-terminale, da un singolo dominio transmembranale e da un grosso dominio C-terminale extracellulare (Chai e coll. 2004).

La possibilità che il sistema IRAP/AT4 rappresenti l'unico sito di ricognizione cellulare per l'Angiotensina IV è invece messa in dubbio dall'osservazione che nell'uomo il recettore AT1 preattivato ha una significativa affinità per l'Angiotensina IV e può essere attivato da essa, come dimostra anche la possibilità di bloccare alcuni degli effetti prodotti da questa Angiotensina mediante un AT1RA (Le e coll. 2002).

### 1.3 - Il recettore dell'Ang-(1-7)

Anche se le proprietà di questo recettore – che non è stato ancora clonato – non sono allo stato attuale ben definite, numerosi dati suggeriscono la sua esistenza, per spiegare il comportamento non “classico” (non AT1 – o AT2 – dipendente) dell'Ang-(1-7), (Vauquelin e coll. 2002).

Già negli anni '90, Santos (Santos e coll. 1994), e Tallant (Tallant e coll. 1997), in colture di cellule endoteliali bovine e di coronarie di cane, avevano evidenziato un sito di legame specifico per questa Angiotensina, insensibile al Losartan ed al PD 123319, ma che poteva essere antagonizzato da un analogo dell'Ang-(1-7) - la [D-Ala 7] - Ang-(1-7) (A799), ottenuto sostituendo la prolina in posizione 7 con la D-alanina.

Questo antagonista, che interrompe il legame della J<sup>125</sup>-Ang-(1-7) con le membrane delle cellule endoteliali (Santos e coll. 2000), agisce sia a livello centrale che periferico, non interferisce con l'effetto pressorio, miotropo e dipsogenico dell'Angiotensina II, né con il suo legame con le membrane della midollare del surrene (ricche di recettori AT1 e AT2); invece blocca sia la vasodilatazione dell'arteriola afferente del coniglio, prodotta dall'Ang-(1-7) (Ren e coll. 2002), sia l'aumento pressorio che essa produce dopo somministrazione nella RVLM (Fontes e coll. 1997).

Nei ratti SHR ed in quelli TGR (mRen2-27), esso innalza anche i livelli pressori, riduce la liberazione di prostaciclina e di NO prodotta dall'epta-peptide e si oppone alla riduzione dei livelli di TXA2 (Vauquelin e coll. 2002).

Nonostante questi risultati, l'esistenza di un recettore specifico per l'Ang-(1-7) non è stata facile da accertare, anche perché quello che dovrebbe essere il suo antagonista specifico – la [D-Ala7]-Ang-(1-7) – è in grado anche di comportarsi da agonista, cioè può anche stimolare la sintesi di fosfatidilcolina prodotta dall'Ang-(1-7) nel rene (Gironacci e coll. 2000; Ferrario e coll. 2004) oppure, alla stessa maniera di quest'ultima, può ridurre la liberazione del PAI-1 o del TPA nelle cellule endoteliali della vena ombelicale dell'uomo (Yoshida e coll. 2002).

Inoltre, a rendere più difficili queste ricerche è stato dimostrato che la liberazione di NO e di cGMP, prodotta dall'Ang-(1-7) nelle cellule endotelia-

li di aorta di bue ed in quelle di coronarie di maiale, può essere bloccata del tutto dall'HoE 140 (BK2-antagonista), e parzialmente dalla [D-Ala7]-Ang-(1-7), dal Losartan o dal PD123319, (e ciò suggerisce che i recettori responsabili delle molteplici azioni di questa Angiotensina sono in realtà di tipo diverso e che, alla comparsa di queste azioni, oltre ai recettori BK2, contribuiscono anche quelli AT1 e AT2) (Diz e coll. 2005). Questo contributo s'inserisce, probabilmente, nel quadro dei rapporti che legano tra di loro i diversi recettori del SRA (vedi Cap. 10).

Poiché anche la vasodilatazione kinino-mediata prodotta dall'Ang-(1-7) nelle arterie coronarie di maiale può essere bloccata da un AT2RA (PD123319) e non dall'antagonista specifico, è stata prospettata anche l'esistenza di un sito di legame non AT2 – ma PD123319-sensibile (Gorelik e coll. 1998). Un metabolita dell'Ang-(1-7) – l'Ang-(3-7) – ha inoltre una significativa affinità per il recettore AT4, il cui blocco attenua l'inibizione, prodotta dall'Ang-(1-7), dei fenomeni di trasporto che si verificano nel tubulo prossimale del ratto (Handa e coll. 2001).

Ricerche molto recenti (Santos e coll. 2003) condotte in reni di topo WT, hanno tuttavia eliminato queste incertezze, in quanto hanno dimostrato che il recettore di questa Angiotensina si identifica con l'oncogene Mas (Jackson e coll. 1988): dopo delezione di quest'ultimo, la capacità di legame dell'Ang-(1-7), nel rene degli animali studiati, appare infatti inibita, e l'effetto antidiuretico che essa produce nei ratti sottoposti a carico idrico è bloccato (Santos e coll. 2003). Egualmente abolita è la vasodilatazione che compare dopo infusione di Ang-(1-7). Viceversa, in cellule CHO e COS nelle quali era stato trasferito il Mas oncogene e che erano state trattate con varie concentrazioni di Ang-(1-7), la liberazione di acido arachidonico appare aumentata (Walther e coll. 2002).

## 1.4 - I recettori atipici

Questi recettori – che costituiscono un gruppo eterogeneo di siti di legame saturabili e specifici per l'Angiotensina II – sono stati identificati nei mammiferi, negli anfibi e negli uccelli (Smith 1996), in strutture che non hanno però alcun rapporto evidente con il controllo dei volumi extracellulari e/o dei livelli pressori (apparato digerente, apparato riproduttivo, vescica, milza, nervi).

Attualmente, di questi recettori conosciamo soltanto la localizzazione, ma ignoriamo le loro funzioni (“recettori orfani”); tuttavia, la loro esistenza fa pensare che nel corso dell'evoluzione il SRA abbia svolto, e probabilmente svolge ancora, ruoli diversi che interessano anche la riproduzione, l'embriogenesi e le difese organiche e che potrebbero anche essere antece-

denti alla funzione che esso attualmente svolge nei confronti dell'apparato cardiovascolare (Goodfriend 2000).

#### **1.4.1 Il recettore AT3**

Questa denominazione non indica un recettore specifico per l'Angiotensina III (che infatti non ha alcuna affinità per esso e che produce i suoi effetti tramite i recettori AT1 e AT2), bensì un sito di legame identificato da Chaki e Inagami (1992) in colture cellulari di neuroblastoma del topo (Neuro-2A). In queste cellule, il recettore AT3 contribuirebbe ad aumentare il cGMP con un meccanismo che comprende l'attivazione della NO-sintasi. Questo recettore è insensibile al Losartan ed al PD123319, ma è inibito dall'incubazione delle colture cellulari con [Sar1-Ile8]-Angiotensina II.

#### **1.4.2 I siti di legame intracellulari**

##### **a) La proteina citosolica**

Questa proteina – che è stata identificata nella frazione solubile di cellule provenienti da tessuti diversi (nervoso, miocardico, epatico, uterino) e che recentemente è stata anche clonata (de Gasparo e coll. 1995a) – ha una massa molecolare compresa tra i 60 e gli 80 kDa e si differenzia da altri tipi di proteine per la presenza nella sua molecola di 704 aminoacidi (de Gasparo e coll. 1994a).

Né il Losartan né il PD123177 hanno affinità per essa, che appare pertanto diversa dai classici recettori AT1 e AT2 della membrana cellulare, tuttavia essa presenta una notevole affinità per l'Angiotensina II ed ancor più per l'Angiotensina III. Inoltre, un antisiero per questa proteina è capace di inibire la contrazione dell'arteria renale prodotta dall'Angiotensina II (Smith 1996). Le caratteristiche sopra descritte fanno pensare che si tratti di una proteina *transporter* (de Gasparo e coll. 1994a; de Gasparo e coll. 1994b), deputata, dopo l'internalizzazione del complesso recettore/Angiotensina e la sua scissione, al trasporto dell'Angiotensina II nel nucleo, ove il polipeptide produrrebbe i suoi effetti. In via alternativa, dal momento che l'Angiotensina II può essere sintetizzata anche all'interno della cellula, questa proteina potrebbe servire per il trasporto del polipeptide dal luogo della sua sintesi alla membrana cellulare.

## b) Il sito di legame nucleare

La comparsa di una spiccata radioattività nel nucleo delle cellule endoteliali e muscolari lisce era stata osservata già diversi anni fa, dopo iniezione di Angiotensina II marcata nel VS di ratti adulti (Robertson e Khairallah 1971), e questo risultato è stato riconfermato, successivamente, anche in colture di cellule epatiche (Bootz e coll. 1992). Negli anni '90, è stato poi identificato un sito nucleare di legame per l'Angiotensina II, che ha proprietà simili ma non identiche a quelle del recettore AT1 per quanto riguarda il suo peso molecolare e la sua affinità per il Losartan, ma che è insensibile al DTT.

Il significato di questo sito è ancora sconosciuto, tuttavia esso potrebbe essere responsabile di alcuni effetti prodotti dall'Angiotensina II al livello del nucleo (aumento della sintesi di RNA, modifiche della conformazione cromatinica), verso il quale il polipeptide sarebbe trasportato dalla proteina citosolica (de Gasparo e coll. 1994a; de Gasparo e coll. 1994b).

## c) Il Mas oncogene

Isolato in origine dal DNA del carcinoma epidermoide, e così denominato per la sua abilità di rendere tumorigene le cellule NIH3T3, il Mas oncogene è stato anche clonato (Monnot e coll. 1991) ed è l'unico oncogene caratterizzato da una proteina con 7 domini idrofobici transmembranalni.

Secondo Jackson e coll. (1988) esso è assimilabile al gruppo dei recettori dell'Angiotensina II, in quanto l'iniezione del suo mRNA in oociti di *xenopus*, aumenta la sensibilità di queste cellule al polipeptide e produce un aumento del Ca ic; inoltre, i siti contenenti quest'oncogene mostrano un'affinità per l'Angiotensina II e l'Angiotensina III simile a quella dei recettori AT1, anche se di tipo inverso (Ang.III > Ang.II > Ang.I), e sono sensibili al DTT (Hanley 1991).

Nonostante questi dati, l'ipotesi di Jackson è tuttavia ancora controversa, sia perché dopo iniezione del suo mRNA nell'oocita di *hamster* il numero dei siti di legame per l'Angiotensina II non aumenta, sia perché questo mRNA è stato localizzato in zone del cervello (corteccia cerebrale, ippocampo) diverse da quelle dei recettori AT1 (Smith 1996). Inoltre, gli oociti di *xenopus* già contengono dei recettori angiotensinici, per cui è possibile che la risposta al polipeptide prodotta dal Mas dipenda soltanto da variazioni dell'espressione di questi recettori (Smith 1996). Egualmente difficile da spiegare, è l'insensibilità dei siti contenenti il Mas al DuP 753 ed all'EXP655 (rispettivamente AT1- e AT2RA) e la loro sensibilità ad un antagonista della sostanza P, la [D-Arg1, D-Pro2, D-Trp7,9, Leu11] - sostanza P (Smith 1996).



Come è stato già detto nel Cap. 1.3, recentemente Santos e coll. (2003) hanno dimostrato che il Mas oncogene s'identifica con il recettore dell'Ang-(1-7). Ancora più recentemente, il gruppo di Walther (Kostenis e coll. 2005) ha dimostrato che il Mas forma con il recettore AT1 un complesso etero-oligomero, che è insensibile agli AT1- e AT2RA: la produzione di IP e la mobilizzazione del  $Ca^{2+}$  ic, mediate dalla Angiotensina II, si riducono del 50%, dopo co-espressione del Mas; viceversa, topi privi del gene Mas mostrano un aumento della vasocostrizione dei microvasi mesenterici Angiotensina-mediata.

#### **d) I siti di legame dei microrganismi**

Questi siti sono stati evidenziati in colture di CML di aorta di ratto e di cellule glomerulari mesangiali di opossum, contenenti rispettivamente il *Mycoplasma hyorhinitis* e l'*Acholeplasma laidlawii* (contaminanti comuni delle colture cellulari).

Essi sono caratterizzati da una significativa affinità per l'Angiotensina I e l'Angiotensina II, e da una bassa o moderata affinità per l'Angiotensina III; tuttavia, i siti contaminati con l'*A. laidlawii* appaiono diversi da quelli contaminati con il *M. hyorhinitis*, perché presentano per la Saralasin un'affinità 20 volte maggiore, e 40 volte maggiore per l'Ang-(1-7) (de Gasparo e coll. 1995a).

Questi siti differiscono dai recettori AT1 e AT2, in quanto sono insensibili a concentrazioni micromolari di DuP 753 e di PD123319. Viceversa, il DTT ha un effetto diverso sul legame con la  $^{125}$ -Ang II, a seconda delle dosi impiegate: concentrazioni comprese tra 0.3 e 30 mM lo aumentano fino al 150%, mentre concentrazioni maggiori (100 mM) lo riducono fino al 70% (Smith 1996).

Il significato di questi siti per ora è sconosciuto, anche se è stato ipotizzato che l'Angiotensina II si serva di essi per espletare qualche sua funzione ancora ignota. Comunque, la loro scomparsa dopo decontaminazione suggerisce che essi sono localizzati proprio su questi agenti patogeni e che, quindi, lo studio dei recettori dell'Angiotensina II dovrebbe avvenire in ambiente quanto più possibile sterile (de Gasparo e coll. 1995a).

#### **e) I siti di legame delle cellule epiteliali dell'intestino**

Due siti di legame ad alta affinità per l'Angiotensina I e l'Angiotensina II e con una moderata affinità per l'Ang-(1-7) sono stati descritti in colture di cellule epiteliali intestinali di ratto (RIE-1, IEC-6 e IEC-18). Di essi, alcuni (RIE-1 e IEC-6) sono del tipo AT1, altri invece (IEC-18) non sono classifi-

cabili, perché appaiono insensibili sia al DuP 753 sia al PD123319 (Smith 1996).

#### **f) I siti di legame negli anfibi, nei pesci e negli uccelli**

Nelle membrane cardiache e negli oociti follicolari dello *xenopus* sono stati evidenziati dei siti di legame ad alta affinità per l'Angiotensina II, l'Angiotensina III e la [Sar1-Ile8]-Ang II, sensibili al DTT ma insensibili al Losartan ed agli antagonisti degli AT2 (Bergsma e coll. 1993; Nishimura 2004). Questi siti – che sono costituiti da 362 o 363 aminoacidi – sono caratterizzati da un'omologia con i recettori AT1 di circa il 60%, per quanto riguarda gli aminoacidi, e di circa il 65%, per ciò che concerne i nucleotidi. Essi si legano alle GPs e stimolano l'idrolisi del fosfatidilinositolo difosfato, con formazione di inositolo trifosfato (IP3) e liberazione di  $Ca^{2+}$ .

Diversi sono, invece, i recettori identificati (e clonati) nel surrene di due specie di volatili, il pollo (c AT1) e il tacchino (t AT1): entrambi hanno un'identità del 75% con il recettore AT1 dei mammiferi, attivano la via dell'IP3 e presentano una notevole affinità per l'Angiotensina II ed i suoi metaboliti, ma sono insensibili sia al DuP 753 che al PD123319. Nel pollo è stata evidenziata una risposta pressoria bifasica all'Angiotensina II, cioè un'iniziale rapida caduta della PA (mediata probabilmente da recettori vasodilatatori) ed un successivo aumento pressorio di modesta entità (mediato dalle catecolamine) (Nishimura 2004).

## Il recettore AT1: la struttura ed il legame con le GPs

La stimolazione del recettore AT1 prodotta dall'Angiotensina II dà luogo ad una serie di eventi, la cui sequenza – secondo l'ipotesi più accreditata (Thomas 1999; Conchon e Clauser 2004) (Fig. 2) – inizia con una modifica della conformazione del recettore, che permette ad esso di legarsi ad alcune proteine eterotrimeriche (GPs) e di attivare le vie di transduzione del segnale. Successivamente, nel giro di pochi secondi, il recettore viene fosforilato in corrispondenza della Ser e della Thr contenute nella sua terminazione carbossilica e ciò determina il suo distacco dalle GPs (e la cessazione della transduzione del segnale), ed il suo legame con altre proteine (le  $\beta$ -ar-

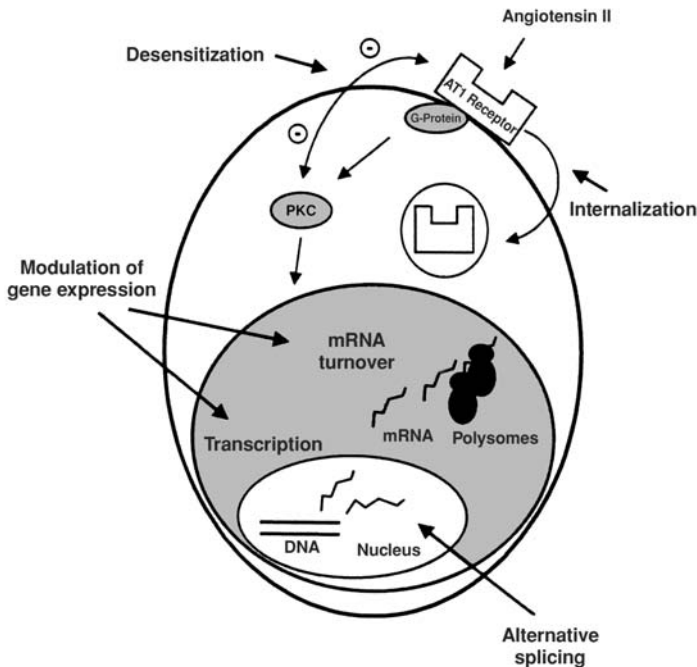


Fig. 2. I meccanismi di regolazione dei recettori AT1 (Da: Wassmann e Nickenig 2004, con autorizzazione)

restine), che provvedono a trasportare il complesso ormone/recettore all'interno della cellula. Infine, per effetto del pH acido esistente a questo livello, il complesso ormone/recettore si dissocia, il recettore viene defosforilato (quindi riattivato) e si ricicla sulla membrana cellulare, mentre l'Angiotensina II giunge ai recettori citoplasmatici e nucleari, oppure è degradata dalle peptidasi.

La mutagenesi sito-diretta ha dimostrato che, per il succedersi di questi eventi, è determinante la presenza nella terminazione carbossilica del recettore di alcune sequenze aminoacidiche (*"the magic tail of GPCRs"*: Bockaert e coll. 2003) (Fig. 3), per cui la descrizione di queste sequenze e del ruolo che esse svolgono è una premessa indispensabile per comprendere i meccanismi con i quali l'Angiotensina II si lega al recettore e produce i suoi effetti.

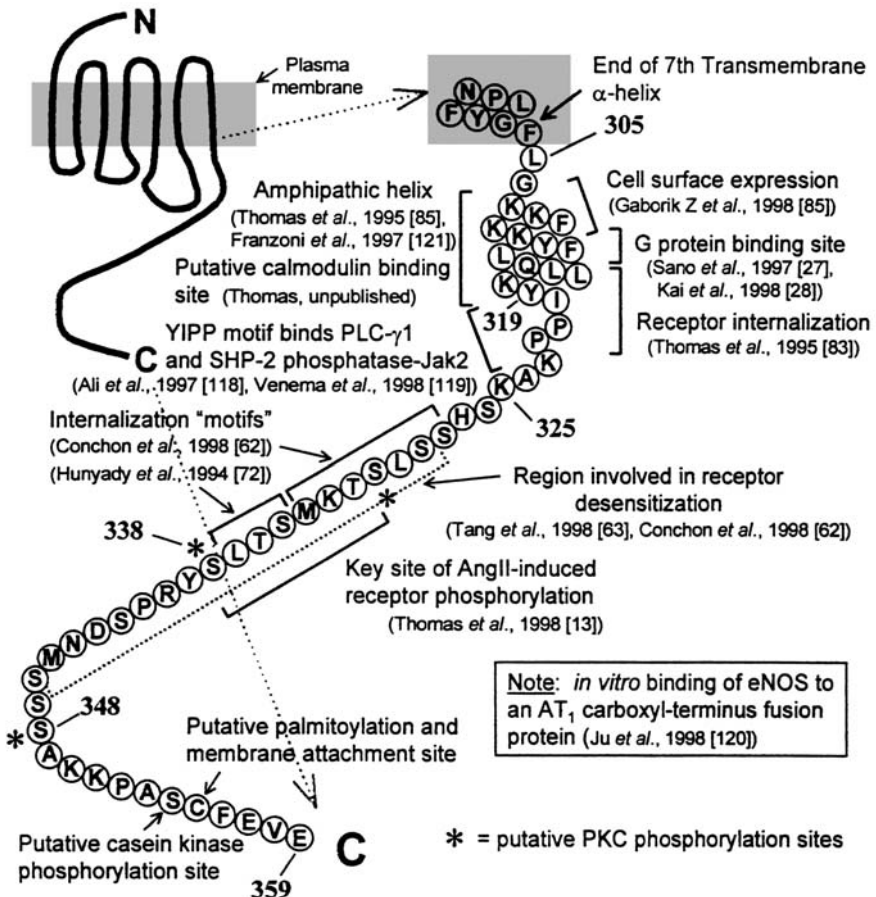


Fig. 3. La terminazione carbossilica del recettore AT1 (Da: Thomas 1999, con autorizzazione)

## 2.1 - La struttura del recettore AT1

Dopo l'identificazione di questo recettore con metodiche farmacologiche (Carini e coll. 1991; Blankley e coll. 1991), la sua clonazione - realizzata in cellule surrenali di bovini e in CML di ratto (Sasaki e coll. 1991; Murphy e coll. 1991) - ha permesso di dimostrare che esso è una glicoproteina con un peso molecolare di circa 41 kDa ed è collocato nello strato lipidico della membrana. I 359 aminoacidi che lo compongono sono allineati secondo una configurazione tridimensionale, in modo da formare 7  $\alpha$ -eliche transmembranalì (Fig. 4) (Conchon e Clauser 2004), collegate da tre anse extracellulari che terminano con un gruppo aminico necessario per il legame con l'Angiotensina II, e da tre anse intracellulari che terminano con un gruppo carbossilico (*"the magic tail"*), necessario per il legame del recettore con il complesso polimerico delle GPs.

Esistono inoltre tre siti di consenso per la N-glicosilazione, l'Asn4 nella terminazione aminica e l'Asn176 e l'Asn188 nella II ansa extracellulare (Thomas 1999).

Nel dominio extracellulare, sono contenuti 4 residui di Cys (Cys18, Cys101, Cys180 e Cys274), due dei quali (Cys101 e Cys180) formano un ponte disolfuro tra la II e la III ansa extracellulare (che è comune a tutti i

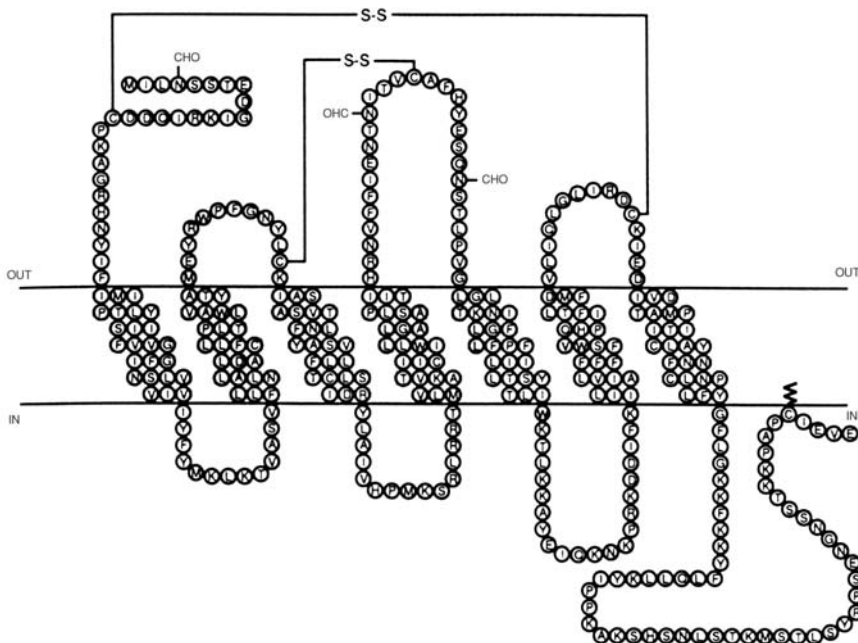


Fig. 4. La struttura del recettore AT1 (Da: Inagami T e coll. 1994, con autorizzazione)

GPCRs), mentre gli altri due (Cys18 e Cys274) formano un altro ponte, che è presente soltanto in questo recettore e che collega la prima e l'ultima ansa extracellulare (Ohyama e coll. 1995). Di questi due ponti, quello formato dalla Cys101 e dalla Cys180 riveste un ruolo critico per il legame non peptidico, ma contribuisce anche al legame con l'agonista: le ricerche condotte mediante sostituzione di questi due aminoacidi, hanno dimostrato che esso si riduce di 10 volte dopo sostituzione di uno solo di essi, e fino a 100 volte dopo la sostituzione di entrambi. Il legame con l'antagonista non peptidico (Losartan) non è modificato invece da queste mutazioni, quindi gli elementi necessari per esso sono diversi da quelli necessari per quello con l'agonista (Schambye e coll. 1994).

In condizioni di inattività, i due ponti stabilizzano il recettore nella sua conformazione, che invece si modifica quando esso viene a contatto con l'agonista. Per effetto di questo contatto, le eliche del recettore AT1 subiscono una rotazione in senso orario, che inizia dalla III elica TM e che - grazie al ponte disolfuro presente su di esso, che funziona come lo stantuffo di una locomotiva - si trasmette successivamente alla IV e V elica e, successivamente, alla VI e VII (Inoue e coll. 1997) (Fig. 5). Tale rotazione modifica la conformazione del recettore, che assume una *agonist-bound conformation*, e determina un riassetto nelle interazioni molecolari della sua struttura, per effetto del quale tra gli aminoacidi del recettore e le regioni ionizzate della molecola dell'Angiotensina II (in particolare quelle corrispondenti ai segmenti N- e C-terminali), si creano contatti multipli che lo preparano al legame con le GPs (Inoue e coll. 1997).

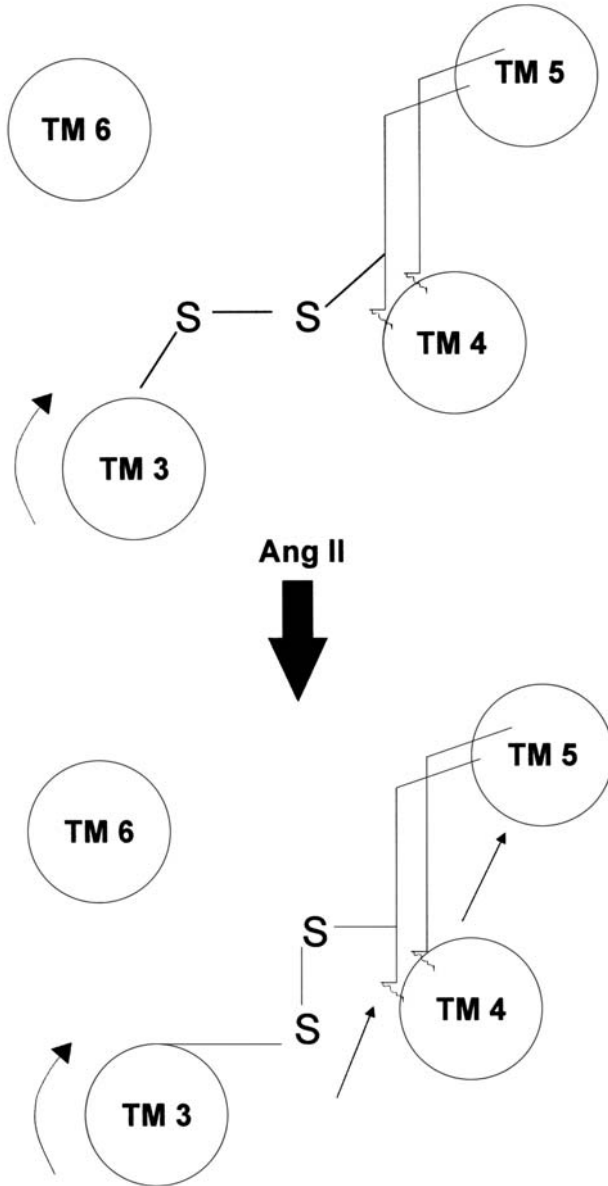
Secondo il modello proposto da Karnik (Karnik e coll. 1996), questi contatti non si realizzerebbero simultaneamente, ma attraverso interazioni successive tra recettore ed agonista, ciascuna delle quali produce una modifica di lieve entità ma significativa della conformazione del recettore che, come risultato finale, porta alla completa attivazione di esso.

Fin dalle prime ricerche (Hunyady e coll. 1996), era stato accertato che l'agonista interagisce innanzitutto con la superficie extracellulare del recettore e che determinanti per questa interazione e per l'attivazione di esso, sono soprattutto la Tyr<sup>4</sup> e la Phe<sup>8</sup> dell'Angiotensina II, perché sono necessarie sia per il legame con il recettore, sia per il trasporto delle informazioni necessarie per la risposta biologica (Hunyady e coll. 2001).

Questi residui - che funzionano come *agonist switches* (Hunyady e coll. 2001) - modificano infatti la conformazione del recettore, perché la Tyr<sup>4</sup>, mediante la sua catena laterale, interagisce con la Asn<sup>11</sup>, e la Phe<sup>8</sup> interagisce con la His<sup>256</sup>, e queste interazioni determinano l'attivazione del recettore (Noda e coll. 1996).

Il legame con l'antagonista non peptidico (Losartan) non risente di queste mutazioni (Hunyady e coll. 1996), perché gli aminoacidi necessari per

## AT1R: "ready form"



## AT1R: "agonist-bound form"

Fig. 5. La rotazione delle eliche TM prodotta dal legame del recettore AT1 con l'Angiotensina II

esso sono diversi da quelli che legano l'agonista: questi ultimi sono localizzati prevalentemente nelle regioni extracellulari, mentre i primi sono localizzati in una zona più profonda del recettore, compresa tra la III e la VII elica (Schambye e coll. 1994; Conchon e Clauser 2004).

In sintesi, gli aminoacidi più importanti ai fini del legame con l'agonista sono (Feng e coll. 1995; Hunyady e coll. 2001; Vauquelin e Vanderheyden 2004):

- a) la Lys<sup>102</sup> e la Ser<sup>105</sup>, collocate nella III elica TM, in prossimità della superficie extracellulare. Questi due residui non sembrano interagire direttamente con il ligando, ma la loro mutazione riduce l'affinità del recettore per esso, probabilmente perché entrambi contribuiscono a formare la tasca intramembranale ed a stabilizzare la conformazione del recettore (Hunyady e coll. 1996);
- b) l'Asn<sup>111</sup>, collocata nella III elica. Questo residuo – mantenuto in posizione obbligata dalla sua interazione con la Asn<sup>295</sup> della VII elica (i due residui sono in stretta vicinanza spaziale) – serve a stabilizzare il recettore nella sua conformazione basale, inattiva (*ground state*: R). Quando però il recettore è stimolato dall'Angiotensina, il contatto rompe il legame della Asn<sup>295</sup> con l'Asn<sup>111</sup>, che pertanto non è più obbligata nella sua posizione, e ciò fa sì che il recettore assuma “*a more relaxed conformation*”: (R') (Vauquelin e Vanderheyden 2004), che prepara i siti di legame TM ad accogliere la terminazione C-carbossilica dell'agonista. Successivamente, per il crearsi di nuove interazioni con la Tyr<sup>4</sup> e la Phe<sup>8</sup> dell'agonista, il recettore AT1 viene completamente attivato (R'') (Conchon e Clauser 2004).

Il fatto che la mutazione N111G – che determina la rottura del legame tra la III e la VII elica TM – dia luogo ad un recettore preattivato (che può essere però attivato del tutto dall'Angiotensina IV, la cui potenza per effetto di questa mutazione aumenta di ben 90 volte: Le e coll. 2002; Chai e coll. 2004), suggerisce che in questo meccanismo l'Asn<sup>111</sup> abbia il compito di mantenere l'equilibrio tra una condizione di inattività ed una condizione di parziale attivazione del recettore.

Kambayashi e coll. (1994) hanno dimostrato, inoltre, che il profilo farmacologico del recettore mutante N111G somiglia a quello del recettore AT2, piuttosto che a quello del recettore AT1, e questo dato – insieme con la presenza nella VII elica del recettore AT2 di un residuo di Asn in posizione equivalente a quella dell'Asn<sup>111</sup> del recettore AT1 - fa pensare che l'interazione Asn<sup>111</sup>/Asn<sup>295</sup> (cioè tra la III e la VII elica) serva anche a determinare la capacità dell'agonista di legarsi in maniera selettiva con l'uno o con l'altro dei due recettori (Kambayashi e coll. 1994; Noda e coll. 1995);

- c) la Lys<sup>199</sup>, situata nella V elica. Questo residuo si lega ai gruppi carbossilici dell'Angiotensina II, in modo da formare *a salt-linked triad*, stabiliz-



zata da interazioni multiple e che serve a posizionare la catena laterale della Phe<sup>8</sup> nella tasca del recettore, in modo da favorire la sua attivazione (Noda e coll. 1995; Hunyady e coll. 1996). La mutazione della Lys<sup>199</sup> con Gly riduce, infatti, di almeno 8 volte l'affinità di legame del recettore per la [<sup>125</sup>I]-Ang II, e di almeno 20 volte quella per la [<sup>125</sup>I]-Sar<sup>1</sup>-Ile<sup>8</sup>-Ang II (Yamano e coll. 1995);

- d) la His<sup>256</sup>, nella VI elica. Secondo Noda (Noda e coll. 1995), l'interazione di questo aminoacido con l'anello aromatico della Phe<sup>8</sup> dell'Angiotensina II sarebbe importante non tanto per il legame con l'agonista, quanto per l'attivazione del recettore, perché – essendo collocato a ridosso dell'anello aromatico della Phe<sup>8</sup> – esso è in grado di “trasmettere” l'occupazione della tasca al recettore, che si attiva. L'attivazione, infatti, non si verifica dopo mutazione H256A e H256Q (Noda e coll. 1995);
- e) la Phe<sup>259</sup> e l'Asp<sup>263</sup> (VI elica) rappresentano probabilmente il punto di attacco del ligando con la His<sup>6</sup>.

Secondo Correa e coll. (2002), anche i 3 aminoacidi alifatici Leu<sup>262</sup>, Leu<sup>265</sup> e Leu<sup>268</sup>, collocati nella terminazione distale della VI elica, sarebbero importanti per il legame con l'agonista, in quanto la loro mutazione (L262D, L265D, L268D) (L3D) riduce l'affinità del recettore sia per l'Angiotensina II che per gli antagonisti peptidici e non peptidici (Losartan).

## 2.2 - Il legame del recettore AT1 con le GPs

Per le sue caratteristiche strutturali e per le modalità di transduzione del segnale, il recettore AT1 appartiene alla superfamiglia dei GPCRs (*G-Protein Coupled Receptors*), così definiti perché per iniziare la transduzione del segnale devono legarsi alle proteine G (Harris 2001).

Queste proteine – che idrolizzano il guanosin-trifosfato (GTP) – funzionano come interruttori molecolari, perché permettono il trasferimento dell'informazione dall'esterno all'interno della cellula, in modo da attivare le molecole effettrici intracellulari (Sayeski e coll. 1998).

Esse sono costituite da 3 subunità di dimensioni diverse:  $\alpha$  (39-52 kDa),  $\beta$  (36-37 kDa) e  $\gamma$  (6-8 kDa). Il tipo  $\alpha$  si suddivide a sua volta in 3 sottotipi:  $G\alpha_s$ , che attiva l'adenilciclasi ed aumenta il cAMP;  $G\alpha_{i/o}$ , che ha invece un'azione inibitrice su entrambi questi composti;  $G\alpha_{q/11}$ , che attiva la fosfolipasi C- $\beta$  ( $\beta$ -PLC), la quale, a sua volta, idrolizza il fosfatidilinositolo 1,4-difosfato (PIP2) in inositolo trifosfato (IP3) e dialglicerolo (DAG), con conseguente liberazione di Ca<sup>2+</sup> dai depositi intracellulari ed attivazione dei processi PKL-dipendenti (Gether e Kobilka 1998).

In condizioni di riposo le tre subunità  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  sono legate al GDP (guanidindifosfato) mediante la subunità  $\alpha$ . Quando il recettore si lega con l'a-

gonista e modifica la sua conformazione, questa variazione viene trasmessa alla subunità  $\alpha$ , che si stacca dalle subunità  $\beta$  e  $\gamma$  e, mediante un sottotipo  $\alpha_q$ , si lega al GTP per cui si crea un nuovo complesso  $G\alpha_q/GTP$  (Fig. 6). Il recettore si lega a questo complesso, dando così inizio alla transduzione del segnale e, quindi, alla comparsa degli effetti prodotti dall'Angiotensina II. Quando, per l'intervento della Gtp-asi contenuta nella subunità  $\alpha$ , il GTP è idrolizzato in GDP, la subunità  $\alpha$  si lega nuovamente alle subunità  $\beta$  e  $\gamma$  e la transduzione del segnale si arresta (Harris 2001).

Le tecniche di ingegneria molecolare (mutagenesi sito-specifica del recettore AT1 mediante chimere recettoriali, ed uso di peptidi sintetici) hanno dimostrato che, per essere attivate e dare inizio alla transduzione del segnale, le GPs devono legarsi ad alcune sequenze aminoacidiche del recettore AT1 e, precisamente, quelle  $G\alpha_{i/o}$  e  $G\alpha_q$  alla II e III ansa intracellulare e quelle  $G\alpha_q$  alla terminazione carbossilica (Wang e coll. 1995; Inagami 1999a; Hunyady e coll. 2001).

Le sequenze coinvolte in questa interazione sono (Wang e coll. 1995; Kai e coll. 1998):

a) la sequenza Asp<sup>125</sup>-Arg<sup>126</sup>-Tyr<sup>127</sup> (DRY), situata nella porzione N-terminale della II ansa intracellulare (Hunyady e coll. 2001). La presenza di questa tripletta appare indispensabile per il legame con le GPs e l'attivazione del recettore, come dimostra la scomparsa del legame dopo la muta-

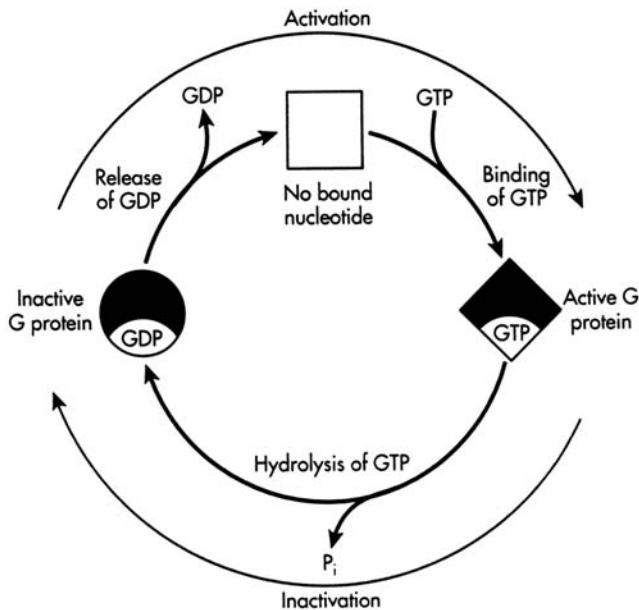


Fig. 6. Attivazione ed inattivazione delle GPs (Da: Berne e Levy 2000)

zione Gly-Gly-Ala. Tuttavia, i 3 residui della sequenza DRY non sembrano avere tutti la stessa importanza: la sostituzione della sola Asp<sup>125</sup> o della sola Arg<sup>126</sup> con Ala- riduce, infatti, in maniera non significativa la produzione di IP<sub>3</sub>, che invece appare ridotta significativamente dopo la sostituzione di entrambe questi residui con Ala- (Gaborik e coll. 2003). Poiché in questo caso di doppia sostituzione appare compromessa anche l'internalizzazione del recettore e poiché i due fenomeni – produzione di IP<sub>3</sub> ed internalizzazione – richiedono requisiti strutturali diversi, è ipotizzabile che l'Asp<sup>125</sup> e l'Arg<sup>126</sup> siano importanti anche nella variazione di forma del recettore prodotta dall'agonista.

Secondo altri AA (Ohshima e coll. 2002), la Asp<sup>125</sup> sarebbe necessaria per l'associazione con le GPs e per la trasduzione del segnale, l'Arg<sup>126</sup> servirebbe esclusivamente per il legame con la proteina G<sub>q</sub> e non con altre GPs, mentre la Tyr<sup>127</sup> non avrebbe alcuna importanza per questo legame, dal momento che la mutazione Y127A produce risposte simili (produzione di IP<sub>3</sub>) a quelle osservate nell'animale WT;

- b) la Tyr215 e la Leu222, situate al confine della V elica con la III ansa intracellulare. Questi due aminoacidi appaiono indispensabili sia per il legame con le GPs, sia per la produzione di IP<sub>3</sub>, dal momento che entrambi i fenomeni non si verificano dopo loro mutazione (Hunyady e coll. 2001);
- c) i residui da 234 a 240 situati nella III ansa intracellulare. La sostituzione di questi residui con segmenti analoghi di altri recettori modifica in maniera diversa la capacità del recettore AT1 di attivare le vie di trasduzione del segnale: la sostituzione con segmenti analoghi del recettore  $\alpha_1\beta$ -AR, non impedisce ad esso di attivare queste vie di trasduzione e non modifica in maniera selettiva la sua capacità di tradurre le azioni dell'Angiotensina II in effetti biologici; viceversa, la sostituzione con segmenti omologhi del recettore AT2 impedisce il legame con la GP<sub>q</sub>/11 (Conchon e coll. 1997; Kai e coll. 1998);
- d) i residui jonizzati Lys240, Lys242, Arg244, Asp246, Asp247, situati nella porzione C-terminale della III ansa intracellulare. Le ricerche condotte con recettori chimerici AT1/AT2 hanno dimostrato che la sostituzione di questi aminoacidi impedisce al recettore di legarsi con le GPs, senza inibire tuttavia la sua internalizzazione (v. Cap. 3.2); viceversa, la sostituzione dei residui apolari (Ile238, oppure Phe239) inibisce entrambi i fenomeni (Zhang e coll. 2000; Hunyady e coll. 2001);
- e) gli aminoacidi 306-320, situati nella porzione C-terminale della regione juxtamembranale (VII elica), che si legano prevalentemente con le GP $\alpha_q$ . Il ruolo di questi aminoacidi appare ancora incerto. Secondo Balmforth e coll. (1995), più importante sarebbe il dominio compreso tra gli aminoacidi 309 e 318, in quanto l'interruzione al livello della Phe309 o la sua delezione impediscono la conversione GDP/GTP e la formazione di IP<sub>3</sub>.

- Secondo altri AA (Sano e coll. 1997), determinante sarebbe soprattutto la presenza del dominio Tyr312, Phe313 e Leu314, in quanto la mutazione di questi tre aminoacidi dà luogo a recettori insensibili al GTP $\gamma$ S e dotati di una ridotta capacità di liberare IP $_3$  dopo stimolazione con Angiotensina II. L'interruzione dopo il residuo 314 sarebbe invece priva di effetti, sia sull'affinità del recettore AT $_1$  per il ligando, sia sull'associazione di esso con le GPs (Thomas e coll. 1995a; Sano e coll. 1997);
- f) anche la funzione degli ultimi 45 aminoacidi non è ancora ben definita: la loro eliminazione dopo la Lys314 dà luogo, infatti, ad un recettore con proprietà "enigmatiche" (Thomas e coll. 1995a), perché caratterizzato da una ridotta espressione di superficie, ma con una normale capacità di legarsi alle GPs ed attivare il segnale.

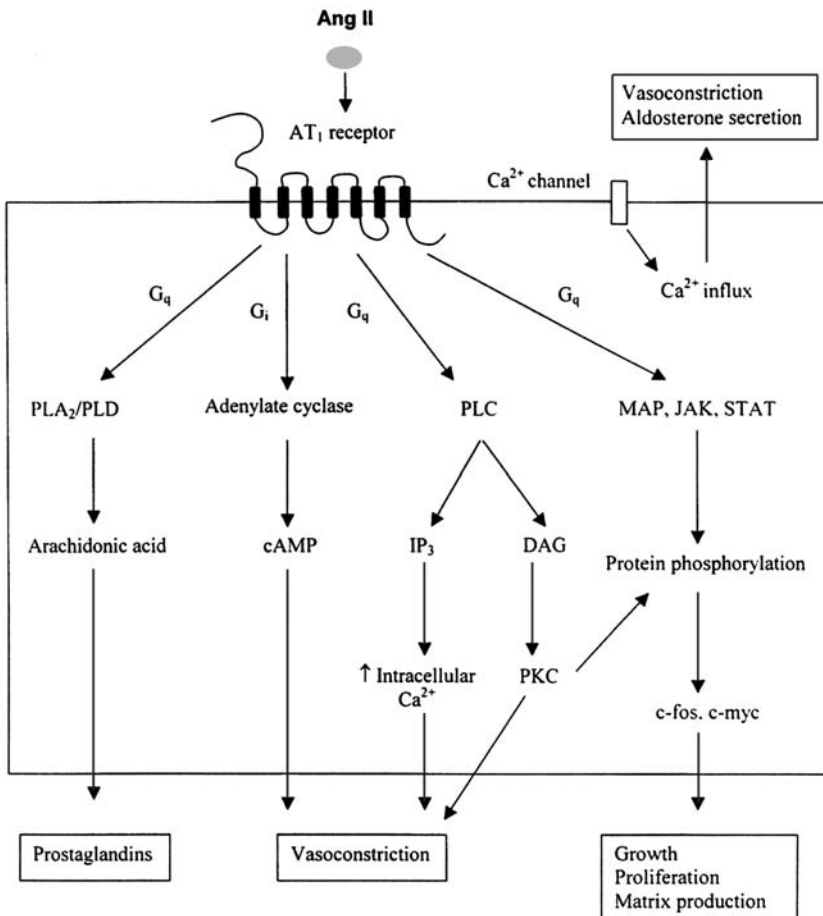


Fig. 7. La cascata dei segnali attivata dal recettore AT $_1$  (Da: Dinh e coll. 2001, © The Biochemical Society, con autorizzazione)

## 2.3 - La cascata dei segnali

Il legame del recettore AT1 con l'agonista e la sua associazione con le proteine G costituiscono la premessa necessaria per l'attivazione di una cascata di segnali (Fig. 7), che trasmettono l'informazione dall'ambiente extracellulare alle proteine intracellulari dalle quali dipendono la contrazione delle CML, la crescita cellulare, la mitogenesi, l'apoptosi e la differenziazione (Griendling e coll. 1997; Touyz e Schiffrin 2000).

Questa cascata si realizza con modalità diverse ed in tempi successivi, per cui è possibile dividere i segnali che essa produce in 3 gruppi: quelli immediati, che compaiono nel giro di pochi secondi; quelli precoci, che compaiono nel giro di qualche minuto e quelli più tardivi, che si verificano nel giro di qualche ora (Touyz e Schiffrin 2000) (Tabella 1).

I segnali che compaiono immediatamente dopo il legame del recettore con le GPs (*immediate signaling events*) (Tab. 1), consistono nell'attivazione, mediata dalle GPs, della PLC, che determina l'idrolisi del fosfatidilinositolo, la formazione di IP3 e l'accumulo di DAG. L'IP3 mobilizza il  $\text{Ca}^{2+}$  dai depositi sarcoplasmatici, mentre il DAG attiva la PKC, che a sua volta attiva lo scambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Ushio-Fukai e coll. 1998; Berry e coll. 2001).

Questi eventi producono una variazione bifasica del pH intracellulare, cioè prima la sua acidificazione e poi la sua alcalinizzazione. Quest'ultima aumenta la sensibilità al  $\text{Ca}^{2+}$  dei meccanismi dai quali dipendono la contrazione e la sintesi del DNA; ciò stimola l'interazione

**Tabella 1.** La successione dei segnali attivati dal recettore AT1

- 
- **I segnali immediati:**
    - a) fosforilazione della PLC, formazione di IP3 ed accumulo di DAG;
    - b) aumentata concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$ ;
    - c) attivazione della PKC;
    - d) variazioni del pH ic (alcalinizzazione);
    - e) attivazione della famiglia Src delle kinasi.
  - **I segnali a medio termine:**
    - a) attivazione delle TYK;
    - b) attivazione della MAPKs, della PLA2 e del metabolismo dell'acido arachidonico;
    - c) modulazione dei nucleotidi ciclici.
  - **I segnali a lungo termine:**
    - a) produzione di ROS;
    - b) aumentata espressione dei proto-oncogeni e dei fattori di crescita.
-

actina/miosina, con conseguente comparsa di una vasocostrizione dei diversi distretti vascolari.

Entro qualche minuto, a questi primi segnali seguono gli *early signaling events*, che hanno il compito di controllare più a lungo termine altre funzioni delle CML, quali la crescita, la migrazione e la composizione della matrice extracellulare (Inagami 1999a) (Tabella 1).

Tali segnali comprendono la fosforilazione delle TYK, delle MAPK e della PLA2, l'attivazione del metabolismo dell'acido arachidonico e la modulazione dei nucleotidi ciclici (Touyz e Schiffrin 2000).

Alla famiglia delle TYK (tirosinkinasi) appartengono:

- a) le januskinasi (JaK1 e 2), che mediante le proteine STAT (*Signal transducer and activator of transcription*), contribuiscono alla crescita ed alla differenziazione cellulare, all'apoptosi, allo sviluppo ed al rimodellamento;
- b) le Kinasi Src (che sono tra le prime ad essere attivate quando l'Angiotensina II si lega al recettore), importanti per la liberazione dei secondi messaggeri (IP3 e Ca<sup>2+</sup>) e per l'attivazione delle ERK1 e 2;
- c) le Kinasi della adesione focale (FAK), che controllano la morfologia e la motilità cellulare e la riorganizzazione del citoscheletro (Berk 1999; Haendeler e Berk 2000).

Al gruppo della MAPK (Mitrogen Activated Protein Kinase) (la cui attivazione può essere bloccata dal Losartan: Inagami e coll. 1999a) appartengono:

- a) l'ERK1 e l'ERK2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase) (con le isoforme ERK3 ed ERK5, quest'ultima detta anche "*big MAPK 1*"). Esse sono importanti per l'induzione delle risposte trofiche delle CML e sono attivate dalla doppia fosforilazione di due aminoacidi presenti nel motivo TEY, la serina e la treonina, che a loro volta attivano altri fattori nucleari di trascrizione (Elk-1, TAL1), alcune proteine strutturali (MBP, MAP-2) e gli enzimi di trascrizione (PHAS-1), mediante i quali stimolano i processi di crescita, l'apoptosi e la differenziazione cellulare (Touyz e coll. 1999a; Berry e coll. 2001);
- b) le proteine JNK/SAPK, (Stress-Activated Protein Kinase) che inibiscono invece questi processi e, pertanto, agiscono sulla crescita cellulare in maniera opposta all'ERK1 e 2 (Touyz e Schiffrin 2000).

L'attività delle MAPK dura dai 4 ai 5 minuti; poi esse sono rapidamente defosforilate dal MKP-1 (Duff e coll. 1995), la cui espressione è stimolata dall'Angiotensina II tramite i recettori AT2, che quindi avrebbero il compito di opporsi alla stimolazione della crescita prodotta dall'ERK1 e 2 (Fischer e coll. 1998).

Nell'arco di pochi minuti, viene attivata anche la PLA 2 (Dulin e coll.

1998) e dai fosfolipidi di membrana si libera acido arachidonico che, tramite le ciclossigenasi, le lipossigenasi ed il citocromo P450, è convertito nei diversi eicosanoidi (Touyz e Schiffrin 2000): la ciclossigenasi catalizza la formazione di prostaglandina PGH<sub>2</sub>, la quale, dalla trombossano-sintasi è convertita successivamente in trombossano (TXA) (che contribuisce alla contrazione prodotta dall'Angiotensina II) e per mezzo della prostaciclina-sintasi in PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) o in PGE<sub>2</sub> (che attenuano invece questa vasostrizione). Tutti questi eicosanoidi influenzano i meccanismi vasali e renali importanti per la regolazione pressoria (Nasjiletti 1998).

L'attivazione della PLA<sub>2</sub> è mediata dai recettori AT1 nelle CML ed in quelle endoteliali, e da quelli AT2 nei cardiomiociti di ratto neonato, nelle cellule neuronali e nelle cellule epiteliali del tubulo renale prossimale. Questi recettori AT2 partecipano anche all'attivazione di un'altra cascata di segnali, quella dei nucleotidi ciclici cAMP e cGMP, che riducono la concentrazione del Ca<sup>2+</sup> e la sensibilità ad esso e producono una vasodilatazione (Gohlke e coll. 1998). In alcune condizioni patologiche (ad es. il danno intimale da catetere), la stimolazione dei recettori AT2 produce, invece, una diminuzione dei livelli di cGMP (Moroi e coll. 1997).

L'attivazione della PLD (fosfolipasi D), che si verifica nell'arco di 2 min. e dura circa 1 h., è un'altra componente critica per la traduzione del segnale e la mitogenesi (Gomez-Cambronero e Kiere 1998). Le vie attivate dalla PLD comprendono la mobilitazione del Ca<sup>2+</sup> intracellulare ed il suo ingresso nelle cellule, con un meccanismo tirosinkinasi-dipendente (Touyz e Schiffrin 2000) e, pertanto, influenzano la contrazione miocardica e vascolare e contribuiscono all'ipertrofia del miocardio ed alla proliferazione delle CML. Questi effetti sono mediati dall'acido fosfatidico e da altri metaboliti, che a livello della parete vasale influenzano la produzione di anioni superossido, stimolando la NADH/NADPH-ossidasi.

Più lenti a comparire sono, infine, i segnali (*late signaling events*) (Tabella 1) mediante i quali l'Angiotensina II produce i suoi effetti a lungo termine sulla crescita cellulare, la migrazione, la fibrosi e la deposizione di collagene nelle CML, contribuendo in tal modo ai processi di ipertrofia e rimodellamento dell'apparato cardiovascolare ed alle alterazioni caratteristiche dell'aterosclerosi (Touyz e Schiffrin 2000).

Questi segnali comprendono l'attivazione delle specie ossigeno-reattive (ROS) e di alcuni protoncogeni e fattori di crescita.

L'attivazione delle ROS ad opera dell'Angiotensina II compare circa 1 ora dopo il contatto del peptide con il recettore, dura circa 24 h. e si verifica tramite un enzima - la NA(D)PH (che è aumentata nella IA) - che genera l'anione superossido O<sub>2</sub><sup>-</sup>, rapidamente convertito in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dalla superossido dismutasi (Fridovich e coll. 1997). Alla comparsa delle ROS (che può esse-

re bloccata dal Losartan: Rajagopalan e coll. 1996), contribuiscono probabilmente anche i metaboliti dell'acido arachidonico e l'idrolisi PLD-media della fosfatidilcolina (Seshiah e coll. 2002).

Il ruolo delle ROS è duplice: in situazioni di normalità, funzionano come secondi messaggeri per il controllo del tono vasale e della crescita cellulare; viceversa, in alcune condizioni come l'ipertensione e l'aterosclerosi, il ruolo diventa patologico, perché la loro produzione nelle CML, nelle cellule avventiziali, mesangiali ed endoteliali aumenta, con conseguente perossidazione dei lipidi, stimolazione dell'induzione genica e della crescita cellulare (quindi ipertrofia ed iperplasia dei vasi) ed accumulo delle molecole di adesione (ICAM) (Rajagopalan e coll. 1996; Griendling e Ushio-Fukai 2000).

La responsabilità dell'Angiotensina II nella comparsa di queste alterazioni è dimostrata dal fatto che la produzione di superossido è aumentata soltanto nei ratti infusi con essa e non in quelli infusi con catecolamine (Laursen e coll. 1997; Griendling e Ushio-Fukai 2000). Sia l'aumento del superossido, che la ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente che si accompagna ad esso, compaiono anche dopo infusione del polipeptide a dosi insufficienti ad innalzare i livelli pressori. Quindi è l'Angiotensina II, di per sé e non l'aumento pressorio che essa produce, il fattore che stimola l'espressione di queste ROS (Laursen e coll. 1997).

L'altra cascata dei segnali, mediante i quali l'Angiotensina II produce i suoi effetti a lungo termine ed agisce come potente fattore di competenza e/o di progressione, comprende l'espressione nelle CML dell'uomo e del ratto di alcuni protooncogeni: c-fos, c-myc, c-jun, erg-1 (Touyz e Schiffrin 2000). Questi effetti possono essere diretti ed, in tal caso, essi sono mediati dall'attivazione delle vie ERK1/ERK2-dipendenti e della 70 kDa-S6 kinasi; oppure possono essere indiretti, per l'aumento locale dei fattori di crescita ed, in particolare, del TGF- $\beta$  e del PDGF (Dubey e coll. 1997).

L'Angiotensina II stimola, inoltre, la fosforilazione della tirosina ed attiva il substrato 1 del recettore insulinico e la protein-tirosin fosfatasi 1D; ciò suggerisce l'esistenza di una cascata convergente di segnali intracellulari, che è stimolata sia dall'Angiotensina II che dall'IGF-1 (Ali e coll. 1997).

Nelle CML, nelle cellule mesangiali ed in quelle endoteliali, l'Angiotensina II aumenta anche l'espressione del PAI-1 mRNA, quindi funziona come fattore pro-trombotico (Nishimura e coll. 1997). Quest'effetto è mediato dai recettori AT1, dal momento che può essere inibito dal Losartan, ma nelle cellule endoteliali dell'aorta di bovini, appare mediato dall'Angiotensina IV e dal suo recettore AT4. Anche tali effetti appaiono indipendenti dall'aumento pressorio, in quanto si verificano egualmente dopo somministrazione di dosi subpressorie del polipeptide (Griffin e coll. 1991).



Di fronte alla moltitudine dei segnali sopra descritti (Fig. 7 e Tabella 1), è piuttosto difficile valutare con esattezza l'impatto che ciascuno di essi produce, soprattutto sui processi proliferativi cellulari e sul tono vasale. La difficoltà nasce anche dal continuo colloquio che si svolge tra l'Angiotensina II ed altre sostanze vasoattive (ET-1, AVP, catecolamine, serotonina), grazie al quale il polipeptide è in grado di amplificare le proprie risposte vascolari. Pertanto, anche se gli effetti prodotti dall'Angiotensina II sulla struttura e sulle funzioni dell'apparato cardiovascolare restano determinanti, il risultato finale dipende dall'attivazione selettiva delle molteplici vie di trasduzione del segnale, oltre che dal fenotipo delle CML stimulate, perché è l'insieme di questi elementi che determina il percorso della cellula verso la contrazione, la proliferazione, l'ipertrofia e/o la migrazione cellulare (Touyz e Schiffrin 2000).

# Il recettore AT1: la fosforilazione, l'internalizzazione e la riattivazione

L'inattivazione e l'internalizzazione sono due momenti fondamentali nella biologia del recettore AT1, perché hanno il compito di modulare le sue risposte all'Angiotensina II in rapporto alle esigenze dell'omeostasi (Bunemann e coll. 1999). L'inattivazione attenua infatti la transduzione del segnale ogni qualvolta lo stimolo sia eccessivo o prolungato; mentre l'internalizzazione serve a trasportare il complesso recettore/ligando all'interno della cellula dove esso si dissocia per effetto del pH acido intracellulare, ed i suoi componenti vanno incontro a destini diversi: l'agonista – mediante i recettori putativi presenti nel citoplasma e nel nucleo – espleta le sue azioni autocrine e paracrine, per poi essere inattivato dagli enzimi lisosomiali; il recettore va, invece, a riciclarsi sulla membrana cellulare, per dare inizio ad una nuova cascata di segnali, che sono però GPs-indipendenti (Bunemann e coll. 1999; Thomas 2000; Ferguson 2001).

Pur essendo cronologicamente distinti (l'inattivazione precede infatti l'internalizzazione e si verifica più rapidamente: Ferguson 2001), i due fenomeni sono strettamente collegati mediante una sequenza di eventi molecolari, che hanno il duplice scopo di inibire le vie di transduzione del segnale e, contemporaneamente, favorire l'ingresso nella cellula del complesso recettore/agonista e la riattivazione del recettore.

Come era stato già suggerito negli anni '80 (Sibley e Lefkowitz 1985) e come è stato confermato negli anni seguenti da altri AA (Schmid e coll. 1998; Thomas e coll. 1998), condizione importante, anche se non determinante (v. dopo), per il verificarsi di questi fenomeni è la fosforilazione di alcuni domini ricchi di serina e treonina presenti nella porzione C-terminale del recettore AT1 (Fig. 3): la fosforilazione di questi domini determina, infatti, il distacco del recettore dalle GPs (per cui cessa la transduzione del segnale) e, nello stesso tempo, aumenta la sua affinità per alcune proteine citosoliche, le  $\beta$ arrestine, che si legano ad esso e lo "indirizzano" verso le cavità della membrana cellulare (Ferguson e coll. 1996).

### 3.1 - La fosforilazione del recettore AT1

Questo fenomeno – che rappresenta il mezzo più rapido per l'inattivazione del recettore (anche se il rapporto causale tra i due fenomeni non è ancora chiaro) – compare alcuni secondi o qualche minuto dopo che esso si è legato all'Angiotensina II ed è agonista-, tempo- e dose-dipendente (Thomas e coll. 1998). La modifica della conformazione del recettore AT1 prodotta da questo legame, fa sì che i residui della sua terminazione C-carbossilica si trovino esposti all'azione di alcune kinasi, la PKA e PKC (cAMP-dipendente) e le GRKs (in particolare le GRK 1, 2 e 5), che determinano la sua fosforilazione e, quindi, in risposta ad essa, il distacco del recettore dalle GPs (Freedman e Lefkowitz 1996; Oppermann e coll. 1996a; Balmforth e coll. 1997).

Le ricerche condotte su linee cellulari diverse, capaci di esprimere il recettore AT1, hanno dimostrato che il contributo di queste diverse kinasi alla fosforilazione dipende non soltanto dal tipo di cellula, ma anche dalla concentrazione dell'agonista sulla membrana cellulare (Ferguson e coll. 1996; Balmforth e coll. 1997): infatti, mentre a concentrazioni fisiologiche (0,1 – 1 nM di Angiotensina II) prevale il contributo della PKC, a concentrazioni di Angiotensina II di 100 nM (cioè a concentrazioni non più fisiologiche ma farmacologiche) prevale invece il contributo delle GRK, che è tanto più significativo quanto più elevata è tale concentrazione (Balmforth e coll. 1997). Inoltre, in cellule embrionali di rene umano, il pretrattamento con un attivatore della PKC (estere forbolico: TPA), in presenza di basse concentrazioni di Angiotensina II (0,1–1 nM) induce una fosforilazione che ammonta al  $60 \pm 14\%$  di quella che si verifica con alte concentrazioni di Angiotensina II (100 nM); viceversa, il trattamento con un suo inibitore (Ro 31-8220), inibisce quasi del tutto la fosforilazione prodotta dalle basse concentrazioni, ma blocca solo parzialmente quella prodotta dalle concentrazioni più elevate (Balmforth e coll. 1997).

Anche in cellule clonate di fegato, dopo attivazione delle PKC mediante TPA, è stata osservata una più rapida comparsa sia della fosforilazione che dell'inattivazione ed una ridotta risposta cellulare all'Angiotensina II (Garcia-Caballero e coll. 2001). Al contrario, la rapida inattivazione dei segnali può essere rallentata dall'inibizione delle PKC. In questo caso interverrebbero le GRKs, come dimostra la scomparsa di entrambi i fenomeni (fosforilazione e inattivazione), dopo inibizione di queste kinasi mediante anticorpi GRKs oppure mediante oligonucleotidi antisenso (Oppermann e coll. 1996b; Mezsáros e coll. 2000). Un'augmentata espressione di queste PKC potenzia, invece, l'inattivazione agonista-dipendente di numerosi GPCRs, tra i quali anche il recettore AT1. Inoltre, in cellule HEK 293, la co-espressione delle GRK 2, 3 e 5 e dell'AT1 dà luogo alla fosforilazione agonista-dipen-

dente di questo recettore e, nello stesso tempo, riduce l'attivazione della fosfolipasi C (Oppermann e coll. 1996b).

Secondo i dati di Tang (Tang e coll. 1998), alla fosforilazione contribuirebbe anche una kinasi eparino-sensibile, in grado di fosforilare una proteina di fusione (Tioredoxina) contenente l'intera terminazione citosolica del recettore AT1. Questa kinasi non può essere assimilata alle GRK 2, 3 o 5, dal momento che in cellule CHO capaci di esprimere il recettore AT1, la stimolazione con Angiotensina II non provoca la sua dislocazione.

Le sequenze aminoacidiche sulle quali agiscono le kinasi sono diverse e sono collocate in quella porzione della terminazione C-carbossilica del recettore, compresa tra gli aminoacidi 326 e 348, che contiene almeno 10 residui di Ser e di Thr (Fig. 3). Tuttavia, quali di questi aminoacidi siano determinanti per la fosforilazione e quali di essi siano interessati dalle PKCs o dalle GRKs è ancora controverso (Conchon e Clauser 2004).

Secondo Smith (Smith e coll. 1998), il fatto che in preparati di cellule COS-7 la fosforilazione si riduca di circa il 40% dopo interruzione a livello della Ser335 oppure dopo doppia mutazione della Ser335 e della Thr336 con Alanina (ST-AA), dimostrerebbe che la fosforilazione del recettore AT1 si realizza nel segmento della terminazione carbossilica che contiene 11 aminoacidi di Serina e Treonina. Il processo segue un andamento bifasico, perché è caratterizzato da un tempo iniziale più rapido (circa 30 sec.), seguito da un tempo più lento (circa 3 min.). L'inibizione della PKC, mediante staurosporina, elimina quest'ultimo, ma non mostra alcun effetto sulla fase rapida, che appare mediata dalle GRKs (Oppermann e coll. 1996a; Thomas e coll. 1998).

In accordo con questi risultati, il gruppo di Thomas (Thomas e coll. 1998) ha dimostrato che l'interruzione a livello della Lys325 (che elimina gli ultimi 34 aminoacidi) inibisce completamente l'incorporazione del 32P nel recettore e, contemporaneamente, amplifica la transduzione del segnale; quindi, la sequenza Thr332-x-x-Ser-Thr-x-Ser338, collocata al centro della terminazione C-carbossilica del recettore (Fig. 3), sembra essere quella più importante per la sua fosforilazione, come conferma anche l'inibizione di quest'ultima dopo mutazione dei residui di Ser- e Thr- con Ala (Quian e coll. 2001).

La riduzione della fosforilazione, osservata nelle cellule COS-7 dopo sostituzione del motivo diacidico Asp236-Asp237 con Alanina (DD-AA) o Asparagina (DD-NN), suggerisce che anche questo motivo (collocato nella porzione distale della III ansa intracellulare, e quindi separato dal segmento Ser326-Thr338), è importante per la modifica della conformazione del recettore e per la sua fosforilazione GRKs -mediata (Olivares-Reyes e coll. 2001).

Nonostante la maggior parte dei dati suggeriscano l'esistenza di un rapporto tra la fosforilazione e l'inattivazione, dal momento che l'inibizione della prima impedisce anche il verificarsi della seconda, la causalità di questo rapporto non è ancora dimostrata con certezza (Tang e coll. 1998).

Infatti, anche se essa sembra confermata dalla riduzione dell'inattivazione e dalla contemporanea amplificazione della trasduzione del segnale, che si verificano dopo inibizione della fosforilazione mediante interruzione della terminazione carbossilica a livello della Ser328 (Conchon e Clausser 2004), altri dati suggeriscono che l'inattivazione può verificarsi anche in maniera indipendente dalla fosforilazione, ad es. dopo inibizione della PKC mediante staurosporina (Oppermann e coll. 1996a) oppure dopo sostituzione con Alanina (DD-AA) od Asparagina (DD-NN) del motivo diacido Asp236-Asp237 nella III ansa intracellulare (nel qual caso è ridotta solo la fosforilazione, mentre le altre funzioni del recettore rimangono immutate) (Olivares-Reyes e coll. 2001).

La dimostrazione di un rapporto tra fosforilazione ed inattivazione è resa d'altronde difficile dal fatto che quest'ultima può essere sia omologa che eterologa (Freedman e Lefkowitz 1996, Ferguson 2001): nel primo caso, essa interessa soltanto il recettore stimolato dall'agonista specifico (quindi è agonista-dipendente) e richiede il contributo prevalente delle GRKs; nel secondo caso, invece, può verificarsi anche in assenza dell'agonista, si realizza mediante la protein-kinasi (PKA) cAMP-dipendente e riduce la risposta all'attivazione di recettori di tipo diverso. Questo tipo di inattivazione è stato dimostrato anche in cellule HEK 293 (Bunemann e coll. 1999).

La fosforilazione, inoltre, non abolisce del tutto la capacità del recettore AT1 di legarsi alle GPs e di produrre così i suoi effetti, ma la riduce soltanto, in misura peraltro modesta (dal 10 al 30%) (Freedman e Lefkowitz 1996, Ferguson 2001), quindi esso rappresenta una condizione importante, ma non determinante, per l'inattivazione del recettore AT1. Più probabilmente, svolge un ruolo facilitante, cioè "prepara" questi recettori all'interazione con alcune proteine citosoliche, le *β*arrestine (*arresting agents*), così definite perché arrestano la trasduzione del segnale e, mediante l'intervento anche di altre proteine intracellulari (clatrina, src, DP2), contribuiscono a perfezionare l'inattivazione del recettore e, nello stesso tempo, favoriscono la sua internalizzazione e riattivazione (Ferguson 2001).

### 3.2 - L'internalizzazione e la riattivazione del recettore AT1

L'internalizzazione (endocitosi) del recettore AT1 ha il duplice compito di regolare il numero dei recettori AT1 presenti sulla membrana cellulare e di favorire l'ingresso dell'Angiotensina II nella cellula, in modo da permette-

re ad essa, una volta scisso il legame con il recettore, di espletare le sue molteplici azioni autocrine e paracrine (Thomas 1999) (Fig. 8).

Il fenomeno – che si verifica soltanto per i recettori AT1 e AT4 ma non per quello AT2 (Matsubara 1998) – ha una cinetica più lenta rispetto all'internalizzazione (nel ratto compare nel giro di 5 min. per il tipo AT1A e un poco più lentamente per quello AT1B) e può essere inibito dal Losartan o da  $T < 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Hein e coll. 1997a; Hunyady e coll. 2001).

Le ricerche condotte su cellule di epatoma, cellule surrenali e CML, hanno dimostrato che la modifica della conformazione allosterica del recettore AT1 prodotta dal suo legame con l'agonista e la sua isomerizzazione nella forma attiva espongono "i motivi di internalizzazione" ai diversi meccanismi che provvedono ad internalizzarlo (Hunyady e coll. 2000).

I più importanti di questi motivi sono contenuti nel dominio Thr332-Ser338, e sono gli stessi che vengono fosforilati dalle chinasi dopo il legame tra il recettore AT1 e le GPs (Kule e coll. 2004): l'interruzione progressiva della terminazione carbossilica in corrispondenza di questo dominio si traduce, infatti, in una riduzione della fosforilazione ed in una concomitante progressiva inibizione della cinetica dell'internalizzazione (Thomas e coll. 1998). Lo stesso avviene nelle cellule CHO-K1, dopo sostituzione degli aminoacidi Thr332, Ser335, Thr336 e Ser338 con un aminoacido neutro

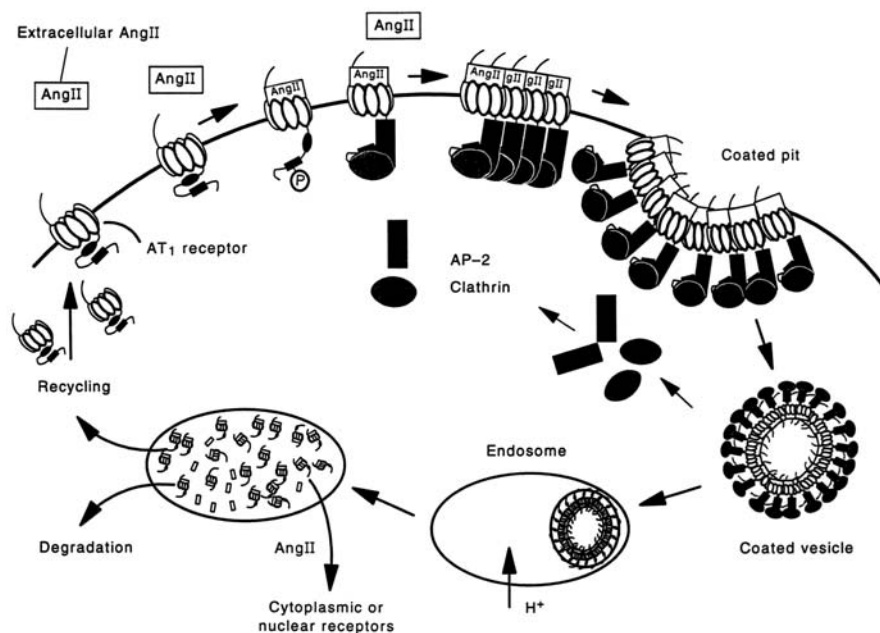


Fig. 8. I meccanismi di internalizzazione del recettore AT1 (Da: Thomas e coll. 1996, con autorizzazione)

(Alanina). Viceversa, l'internalizzazione si verifica nuovamente quando la Ser335 e la Thr336 sono sostituite con acido glutammico, in modo da riprodurre l'ambiente acido della fosforilazione (Thomas 2000).

Altre ricerche dimostrano tuttavia che, pur conservando il recettore una normale affinità per l'Angiotensina II e la capacità di legarsi alle GPS, la sua internalizzazione può essere inibita in maniera significativa anche mediante interruzione della terminazione carbossilica a livello della Lys325, in modo da eliminare i rimanenti 34 aminoacidi (Thomas e coll. 1995b).

Secondo Thomas (Thomas e coll. 1995b; Thomas 2000), questi risultati dimostrano che i motivi necessari per l'internalizzazione sono in realtà due: uno distale alla Lys333, che comprende anche il motivo Ser335-Thr336-Leu337 (STL) di Hunyady (Hunyady e coll. 1994b; Hunyady e coll. 1996) e l'altro situato nel dominio 315-329. L'internalizzazione è, infatti, inibita sia dopo eliminazione del motivo STL, sia dopo le mutazioni Leu316-Phe e/o Tyr319-Ala, che cadono appunto nel dominio 315-329 (Thomas e coll. 1995b).

Gli studi con i recettori mutanti suggeriscono, però, che l'internalizzazione può verificarsi anche indipendentemente dal legame con le GPs: un recettore mutante Asp74-Asn, pur non essendo capace di legarsi alla proteina Gq, è infatti regolarmente internalizzato dopo stimolazione con Angiotensina II. Viceversa, altri recettori mutanti subiscono un'alterata internalizzazione, ma attivano egualmente la proteina Gq (Conchon e coll. 1994; Hunyady e coll. 1994a e b), quindi nella struttura del recettore AT1 esistono motivi con funzioni diversificate, alcuni dei quali servono per il legame con le GPs, ed altri per l'internalizzazione (Hunyady e coll. 2001).

Anche se le ultime ricerche hanno ridimensionato il suo ruolo, la fosforilazione rimane comunque un fenomeno importante, se non altro perché facilita il legame del recettore AT1 con le  $\beta$ arrestine ed in tal modo favorisce la sua internalizzazione (Ferguson e coll. 1996; Ferguson 2001; Quian e coll. 2001).

Le  $\beta$ arrestine sono espresse in maniera ubiquitaria in tutto l'organismo e costituiscono una famiglia di almeno 4 proteine citosoliche multifunzionali (Ferguson e coll. 1996; Leftkowitz 1998), delle quali le più importanti ai fini dell'internalizzazione sono la  $\beta$ arrestina-1 (arrestina-2) e la  $\beta$ arrestina-2 (arrestina-3), distinte dalle  $\beta$ arrestine visive perché funzionano come *versatile adaptor proteins* (Leftkowitz 1998; Ferguson 2001).

La fosforilazione del recettore interrompe il loro stato d'inattività, per cui esse si spostano rapidamente dall'ambiente citosolico alla membrana cellulare e modificano la conformazione della loro molecola, in modo da presentare i 120 - 150 aminoacidi del loro dominio idrofobico al recettore AT1. Per effetto di questa modifica esse si legano con due regioni della loro molecola a due corrispondenti regioni del recettore AT1: mediante una

frazione della loro metà terminale, (denominata *activation-recognition domain*, perché riconosce lo stato d'attivazione del recettore) si legano alla II o III ansa ic del recettore e, mediante una frazione più piccola (*phosphorylation recognition domain*), situata nella loro porzione centrale, alla terminazione carbossilica fosforilata dalle GRK<sub>s</sub> (Oakley e coll. 1999 e 2001). La fosforilazione della terminazione carbossilica rappresenta, pertanto, un elemento importante sia per il reclutamento di queste proteine sia per il loro legame con il recettore: in colture di cellule CHO-KI e HEK293, questo legame appare infatti compromesso, dopo che la fosforilazione è stata inibita mediante interruzione seriata della terminazione carbossilica a partire dalla Lys<sup>325</sup> oppure dopo sostituzione di 4 residui (T332, S335, T336 e S338) con Alanina (Quian e coll. 2001; Kule e coll. 2004).

Ai fini dell'internalizzazione, le  $\beta$ arrestine funzionano come *docking proteins* perché, dopo avere staccato il recettore AT1 dalle GPs ed essersi legate ad esso, lo trasportano verso le numerose, piccole cavità presenti sulla membrana cellulare (Thomas 1999; Hunyady e coll. 2000) (Fig. 8). Queste cavità sono rivestite da un lattice policlonale, la clatrina, indispensabile per il processo di internalizzazione, come dimostra il mancato verificarsi di essa dopo distruzione della clatrina mediante ossido di fenilarsina o saccarosio ipertonico (Heuser e Anderson 1989; Hunyady e coll. 2000).

Successivamente, in qualche minuto, queste concavità vanno incontro ad un processo d'invaginazione e si trasformano in vescicole. Per l'intervento di una GTPasi-l-dinamina (Schmid e coll. 1998; Gaborik e coll. 2001), che forma un collare alla base di esse, queste ultime si staccano poi dalla membrana, perdono il loro rivestimento di clatrina, che viene riciclata e provvedono a trasferire il complesso recettore/ligando all'interno della cellula (*shuttle vesicles*) ove, per effetto del pH acido, esso si scinde ed i suoi componenti vanno incontro a destini diversi: il ligando – che essendo internalizzato è protetto dalla degradazione ad opera delle endopeptidasi endoteliali (come dimostra la maggiore durata della sua attività rispetto a quella dell'Angiotensina II plasmatica) – viene riutilizzato per espletare le sue azioni autocrine e paracrine (Thomas e coll. 1996) oppure può espletare le sue azioni a livello intracellulare, mediante i recettori putativi presenti nel citoplasma (le cui proprietà fisico-chimiche sono tuttavia diverse da quelle dei recettori presenti sulla membrana cellulare: Hunyady e coll. 2000). Il recettore, invece, è indirizzato verso gli endosomi, ove è defosforilato da una fosfatasi GPCR<sub>s</sub>-specifico, si riattiva e va a riciclarsi sulla membrana cellulare senza però legarsi nuovamente alle GPs, come dimostra la sua minore affinità per l'Angiotensina II (Ferguson 2001). Una piccola quantità di questi recettori può essere anche indirizzata verso i lisosomi dove essi sono degradati (Bunemann e coll. 1999).

Il processo – che è di tipo dinamico, in quanto l'internalizzazione ed il



riciclarci del recettore sono in continuo equilibrio tra loro – richiede alcuni minuti ed è meno efficiente dell'inattivazione, il che potrebbe spiegare perché nello scompenso e nella IA esso non riesce a compensare né l'aumentata inattivazione del recettore, che è stata osservata in queste condizioni morbose, né l'efficacia limitata nel tempo di alcuni farmaci agonisti (Gros e coll. 1997).

A regolare lo spostamento dei recettori AT1 verso gli endosomi dopo la rottura del legame tra essi e le  $\beta$ arrestine, contribuisce il legame che si crea tra gli ultimi 10 aminoacidi della loro terminazione (349-359) ed un'altra *binding protein* - la Rab-5a (Seachrist e coll. 2002; Dale e coll. 2004). La presenza della Rab-5a servirebbe ad evitare la degradazione lisosomiale del recettore ed a regolare la sua riattivazione: l'interruzione a livello 349 della sua terminazione carbossilica impedisce, infatti, il legame con questa proteina e si traduce in un aumentato trasporto verso i lisosomi. Un incremento di questo trasporto ed una maggiore degradazione del recettore AT1 sono stati osservati, anche dopo inibizione dell'attività di un'altra *binding protein*, la Rab-7 (Dale e coll. 2004).

Secondo qualche altro autore (Zhang e coll. 1999b; Anborgh e coll. 2000), la separazione del complesso recettore/agonista dalle  $\beta$ arrestine non si verificerebbe alla stessa maniera per tutti i recettori: per alcuni di essi - come quelli  $\beta$ 2 - avverrebbe con relativa facilità, mentre per altri - tra i quali il recettore AT1 - si verificerebbe più lentamente, per cui non si può escludere che altri meccanismi contribuiscano alla riattivazione, come ad es. la mobilitazione di recettori sintetizzati *ex-novo* oppure il reclutamento di recettori presenti nel *pool* intracellulare (Anborgh e coll. 2000; Ferguson 2001).

Nonostante tali risultati suggeriscano che le  $\beta$ arrestine e la GTPasi-1-dinamina svolgono un ruolo determinante, altri dati sembrano tuttavia negarlo: infatti, anche se è stato accertato che una maggiore espressione di  $\beta$ arrestine aumenta l'internalizzazione di circa il 40% con un meccanismo dinamina-dipendente, dal momento che la comparsa del fenomeno è impedita dalla dinamina mutante (Zhang e coll. 1996 e 1999b), è stato anche dimostrato che, a differenza del recettore  $\beta$ 2, quello AT1 è capace di internalizzarsi anche senza il contributo di queste proteine citosoliche ed in presenza della  $\beta$ arrestina-1-V53D (Zhang e coll. 1999b).

A questi risultati - che suggeriscono la capacità dei GPCRs di internalizzarsi in modo differente nei diversi tipi di cellule, a seconda del loro *milieu* cellulare - contribuiscono molto probabilmente anche le caveole (*The most enigmatic organelle found in cells*) (Ishizaka e coll. 1998; Razani e coll. 2002).

Con questo termine, s'intendono delle piccole invaginazioni della membrana cellulare (che possono assumere anche la forma di vescicole, più pic-

cole però di quelle rivestite di clatrina), costituite da una struttura lipidica, i cui componenti principali sono il colesterolo ed i fosfolipidi, ma distinte dallo strato fosfolipidico della membrana, perché rivestite da un gruppo di proteine denominate caveoline, Cav-1, Cav-2 e Cav-3 (Razani e coll. 2002). Le 3 isoforme sono tutte espresse nelle VSMC, tuttavia soltanto il Cav-1 mRNA appare regolato dall'Angiotensina II. Mediante ricerche condotte su CML di ratti SD, è stato dimostrato che, dopo aggiunta di Angiotensina II, i recettori dispersi sulla membrana cellulare si aggregano e, almeno in parte, migrano verso le caveole (Ishizaka e coll. 1998). Contemporaneamente, i livelli di Cav-1 si riducono, mentre quelli del suo mRNA aumentano con un meccanismo Ca-dipendente che può essere bloccato dal Losartan (Leclerc e coll. 2002). Quindi l'Angiotensina II aumenta la degradazione della Cav-1, ma come fenomeno compensatorio aumenta anche la sua sintesi.

Lo spostamento dei recettori AT1 verso le zone della membrana ricche di caveole può essere inibito da procedure che impediscono la loro internalizzazione, come le basse temperature, il pretrattamento con ossido di fenilarsina oppure il Losartan (Razani e coll. 2002).

La presenza nella membrana delle VSMC arricchite con Cav-1, oltre che dell'adenilcicliasi e delle PKs, anche di subunità delle GPs ( $G\alpha_q/11$  e  $G\beta$ ), insieme con la dimostrazione che nella terminazione citoplasmatica del recettore esiste un *caveolin-binding-like motif* (Tyr302 - Phe304 - Phe309 - Tyr312) (Leclerc e coll. 2002), suggerisce che le caveole costituiscano anch'esse un meccanismo di trasduzione del segnale, anche se è ancora controverso il modo in cui esse contribuiscono alla comparsa di esso (Razani e coll. 2002).

Nonostante tali evidenze, il ruolo svolto dalle caveole ai fini dell'internalizzazione rimane incerto, sia perché quest'ultima si verifica egualmente dopo la loro inibizione mediante deplezione di colesterolo, sia perché lo spostamento dei recettori AT1 verso di esse, dopo stimolo angiotensinico, non è stato dimostrato da tutti gli AA (Leclerc e coll. 2002).

In sintesi, l'internalizzazione del recettore AT1 può verificarsi con tre diverse modalità: a) arrestina-, dinamina- e clatrina- dipendente; b) arrestina- indipendente, dinamina- dipendente e c) arrestina- e dinamina- indipendente (Bunemann e coll. 1999).

I gruppi di Dzau (Daviet e coll. 1999) e di Horiuchi (Cui e coll. 2000) hanno dimostrato che al fenomeno dell'internalizzazione contribuisce anche una proteina di membrana - l'ATRAP (*AT1 receptor-associated protein*), che interagisce con il dominio carbossiterminale del recettore AT1: in colture di VSMC, nelle quali era stato trasferito questo recettore, un'aumentata espressione dell'ATRAP riduce, infatti, il loro numero sulla membrana cellulare ed aumenta la loro internalizzazione.

# Il recettore AT1: la distribuzione e gli effetti

## 4.1 - La distribuzione del recettore AT1

Gli studi di legame condotti con gli antagonisti non peptidici e, più recentemente, la autoradiografia *in vitro* e le tecniche immunoistochimiche, hanno dimostrato che i recettori AT1 sono ampiamente distribuiti nell'organismo sia dell'uomo che di diverse specie animali (primati, cani, bovini, roditori, pesci, serpenti) e sono particolarmente numerosi in quegli organi dai quali dipendono l'omeostasi cardiocircolatoria e quella idrico-elettrolitica (Nishimura 2004). In alcuni di questi organi, sono espressi da soli (vasi, polmoni, fegato, apparato gastroenterico, vescica e placenta), in altri (cervello, cuore, arterie renali, surreni), sono presenti insieme ai recettori AT2 (Zhuo e coll. 1998) (Fig. 9).

Questo tipo di distribuzione non è tuttavia uniforme, ma può variare da specie a specie nello stesso tessuto: ad es. la corteccia e la midollare surrenale del ratto contengono rispettivamente recettori AT1 e AT2, mentre il surrene dei bovini contiene prevalentemente recettori AT1 (Wong e Hajjiali. 1994). L'espressione recettoriale varia anche in rapporto ai livelli di Angiotensina II, riducendosi se le concentrazioni aumentano e viceversa (*feedback* negativo) (Lassegue e coll. 1995). Oltre all'Angiotensina II, anche altri elementi possono modulare questa espressione: fattori di crescita, citokine, ormoni, alcuni fattori di rischio (colesterolo, diabete, deficit di estrogeni) (Wassmann e Nickenig 2006).

Nell'apparato cardiovascolare dell'uomo e del ratto i recettori AT1 sono prevalenti rispetto a quelli AT2 (circa l'80%) (Zhuo e coll. 1998).

Nel cuore la loro localizzazione è consistente con gli effetti che l'Angiotensina II produce sul flusso coronarico, sulla contrazione miocardica e sulla FC: la più alta concentrazione è stata evidenziata nel sistema di conduzione (nodo del seno, nodo AV) e la più bassa nel miocardio ventricolare (Saavedra e coll. 1993). A livello di quest'ultimo, i recettori AT1 sono distribuiti con un criterio puntiforme in corrispondenza dell'epicardio atriale e delle aa. coronarie intramiocardiche, mentre meno diffusa è la loro distribuzione nel miocardio atriale e ventricolare, nel quale, anche se in minore quantità, sono presenti anche i recettori AT2 (Allen e coll. 2000).

	AT <sub>1</sub> receptors	AT <sub>2</sub> receptors
<b>Kidney</b>		
- glomeruli	+	
- proximal tubules	+	
- vasculature	+	+
- medullary interstitial cells	+	
<b>Adrenal gland</b>		
- cortex	+	+
- medulla	+	+
<b>Heart</b>		
- myocardium	+	+
- ganglia	+	
- conduction system	+	
<b>Brain</b>		
- circumventricular organs	+	
- thalamus	+	+
- basal ganglia	+	
- cerebellar cortex	+	+
- medulla oblongata	+	

Fig. 9. La distribuzione dei recettori AT<sub>1</sub> (confrontata con quella dei recettori AT<sub>2</sub>) (Da: Allen e coll. 2000, con autorizzazione)

Dense bande di recettori AT<sub>1</sub> sono state evidenziate anche nelle cellule gangliari intracardiache che circondano l'aorta e la vena cava superiore (Allen e coll. 2000) e nelle grosse arterie intratoraciche (aorta e a. polmonare), con una distribuzione uniforme su tutta la tunica media ed in parte sull'avventizia (Zhuo e coll. 1998).

La distribuzione sopra descritta si modifica nel cuore scompensato per cardiopatia dilatativa o ischemica: in entrambe le condizioni, il numero di questi recettori è notevolmente diminuito (Asano e coll. 1997; Kurabayashi e Yazaki 1997), probabilmente per effetto della loro prolungata stimolazione ad opera dell'Angiotensina II, la cui formazione nello scompenso è aumentata per l'*upregulation* dell'ACE (Zisman 2004); il numero degli AT<sub>2</sub>, invece, è aumentato.

Nelle CML dell'aorta e delle arterie mesenteriche del ratto e del coniglio i recettori AT<sub>1</sub> sono gli unici presenti, come dimostra la possibilità di bloccare i loro effetti mediante il Losartan (Zhuo e coll. 1998). In minor misura, sono stati evidenziati anche nella tunica media e nell'avventizia dell'aorta ascendente e della arteria polmonare (Allen e coll. 1999).

In colture di CML, Wang e coll. (2003) hanno osservato una significativa *upregulation* dei recettori per effetto della proteina C-reattiva, che si accompagna a fenomeni di migrazione e proliferazione di queste cellule e ad una aumentata produzione di ROS. Tale effetto può essere bloccato dal Losartan.

Nel rene dei mammiferi adulti (uomo, primati e roditori), i recettori AT1 sono presenti in quantità significative lungo la fascia più interna della midollare (Zhuo e coll. 1997), ove essi sono concentrati in bande trasversali; in quantità minori nella porzione più esterna di essa. Nelle cellule interstiziali renomidollari sono esclusivamente del tipo AT1<sub>A</sub>. L'espressione di mRNA di questi recettori è stata evidenziata anche a livello delle CML dei tubuli prossimali e distali e della papilla (Harrison-Bernard e coll. 1997).

Nei glomeruli più superficiali essi sono presenti in quantità più elevata rispetto a quelli presenti nelle strutture JG e sono disposti secondo un gradiente che si identifica con la reattività all'Angiotensina II e con il contenuto in renina (Zhuo e coll. 1997).

Mediante autoradiografia, la presenza di recettori AT1 caratterizzati da una significativa affinità per l'Angiotensina II e per l'Angiotensina III è stata dimostrata anche nelle cellule mesangiali del glomerulo (Zhuo e coll. 1997).

Una distribuzione diversa è presente invece nel surrene, che contiene non solo i recettori AT1 ma anche quelli AT2 e AT4, anche se con notevoli differenze da specie a specie, sia per quanto riguarda le modalità della loro distribuzione che il loro numero. Nella corticale di molti roditori, della scimmia e dell'uomo e nelle cellule cromaffini della midollare, quelli AT1 prevalgono (Zhuo e coll. 1998), mentre in altre specie prevalgono gli AT2, anche se in numero minore (Allen e coll. 2000). Una significativa presenza di recettori AT1 è stata evidenziata anche nell'adenoma surrenalico (Cook e coll. 1993).

Nel SNC, mediante l'autoradiografia e l'ibridizzazione, la presenza di questi recettori – che è strettamente correlata con quella delle terminazioni nervose angio-immunoreattive situate sia all'interno che all'esterno della BEE – è stata evidenziata sia nell'uomo che in altre specie, soprattutto in quelle strutture dalle quali dipende il controllo dell'attività cardiocircolatoria e del bilancio idrico-elettrolitico (Allen e coll. 1999): essi sono presenti e numerosi nel SFO, nell'OVLT, nel nucleo preottico mediano, nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, nell'ante-ipofisi e nella AP, in alcune strutture del rombencefalo (NTS, nucleo parabrachiale laterale, midolla ventrolaterale rostrale e caudale, NDMV e n. intermedio radicolare); nel mesencefalo (sostanza grigia periacqueduttale), nell'ipotalamo (SON e re-

gione parvocellulare del PVN) ed in alcune zone del sistema limbico, nell'ippocampo e nella corteccia piriforme (Allen e coll. 1999; Mc Kinley e coll. 2003). Tutte le strutture citate sono prive di recettori AT2. In alcune di esse (eminenza mediana, neuroni dopaminergici ascendenti dei gangli basali, MVL rostrale e caudale, NTS), è stata evidenziata una stretta correlazione anche tra la distribuzione di recettori AT1 e quella dei neuroni catecolaminergici. Una significativa quantità di recettori AT1 è presente anche nella colonna di cellule intermedio-laterale e nel corno dorsale del midollo spinale. Inoltre, essi sono stati evidenziati anche in strutture che non appaiono strettamente coinvolte nel controllo cardiocircolatorio o dell'equilibrio idrico-elettrolitico (strutture limbiche) (von Bohlen und Halbach e Albrecht 1998).

Questo tipo di distribuzione è simile in tutti i mammiferi studiati, compreso l'uomo, ma con variazioni da specie a specie: ad es. nell'ippocampo del gerbillo l'espressione di questi recettori è maggiore che nelle altre specie; tuttavia, essi non mostrano alcuna affinità per il ligando specifico e mostrano una ridotta affinità per il Losartan, per cui andrebbero considerati come dei recettori "atipici" o, comunque, come un altro sottotipo dei recettori AT1 (Moriuchi e coll. 1998).

Diversa è anche la distribuzione nel SNC delle due isoforme del recettore AT1: l'isoforma AT1<sub>A</sub> è quella prevalente nel ratto adulto, mentre nel ratto immaturo l'AT1<sub>B</sub> mRNA è stato evidenziato nel lobo anteriore dell'ipofisi e nell'ippocampo, dove è associato al recettore AT1<sub>A</sub> in corrispondenza delle cellule piramidali e granulari (Saavedra 1999).

Recettori AT1 sono presenti anche nel fegato, nelle venule postsinusoidali, ove più evidente è l'azione vasocostrittrice dell'Angiotensina II (Casini e coll. 2000) e nel pancreas (superficie delle  $\beta$ cellule, dotti pancreatici e vasi), dove si associano ai recettori AT2 (Haulica e coll. 2005). Inoltre, sono stati evidenziati anche nella placenta della donna e della femmina di ratto gravide e nell'utero (mentre nel miometrio della multipara prevalgono gli AT2) (Kalenga e coll. 1991). Nell'uomo e nel ratto essi sono numerosi nel liquido seminale, nelle cellule di Leydig del testicolo ed in quelle epiteliali dell'epididimo, e nell'uomo sono presenti anche nella prostata, nella regione peri-uretrale in corrispondenza del muscolo liscio stromale, quindi essi sembrano partecipare anche al controllo della gravidanza nella femmina e della spermatogenesi nel maschio (Leung e Sernia 2003).

Sia nell'animale che nell'uomo l'espressione di questi recettori può comunque variare (*downregulation* oppure *upregulation*) in rapporto a fattori diversi, come la temperatura (Moulik e coll. 2000) e lo stato del bilancio idrico-elettrolitico (Schmid e coll. 1997). Una dieta a basso contenuto di Na

determina una diminuzione temporanea dell'AT1<sub>A</sub> mRNA (ma non dell'AT1<sub>B</sub> mRNA) nel rene, nel fegato e nel polmone di ratti SD ed un aumento dell'AT1<sub>A</sub> mRNA nel surrene (Schmid e coll. 1997). Risultati diversi sono stati ottenuti, invece, da Strelow e coll. (1999): secondo questi AA un incremento dell'apporto sodico riduce il numero dei recettori AT1 nel rene di ratti Dahl Na-S e Na-R e lo aumenta nel cervello, più rapidamente nei ratti Na-S e più lentamente (quattro settimane) in quelli Na-R.

Viswanathan e coll. (2000) hanno dimostrato che nei bambini fino a due anni d'età – cioè in un periodo cruciale per l'adattamento alle variazioni che si verificano con la crescita – la distribuzione dei recettori dell'Angiotensina II varia a seconda dei tessuti: i glomeruli renali e le arterie cerebrali esprimono, infatti, solo recettori AT1, mentre più dell'80% di quelli espressi nell'aorta toracica e nelle arterie intralobulari sono del tipo 2. Anche in questo tipo di soggetti, l'espressione dei recettori AT1 è influenzata dallo stato del bilancio idrico-elettrolitico (Schmid e coll. 1997).

## 4.2 - Gli effetti prodotti dal recettore AT1

I recettori AT1 mediano la maggior parte degli effetti che l'Angiotensina II produce sull'equilibrio pressorio e su quello idrico-elettrolitico, sui processi di crescita e su quelli infiammatori: la loro stimolazione produce una vasocostrizione generalizzata (che è maggiore nel rene e minore nel cervello, nei polmoni e nei muscoli scheletrici), aumenta la PA, la sintesi dell'Aldosterone ed il riassorbimento sodico a livello del tubulo prossimale, modula la filtrazione glomerulare, favorisce la crescita cellulare nel miocardio e nelle VSMC (nelle quali stimola anche l'espressione di alcuni proto-oncogeni: Patel e coll. 1996) e la produzione di ROS, ed induce la comparsa di fenomeni fibrotici, infiammatori e trombotici (de Gasparo e coll. 1995a; de Gasparo e coll. 2000; Schiffrin e coll. 2001; Kaschina e Unger 2003) (Tabella 2).

Tramite questi recettori, l'Angiotensina II aumenta anche il tono simpatico e contribuisce all'equilibrio autonomo, perché stimola la liberazione di NA nel SNC, nella midollare del surrene, e nei gangli simpatici, dove questi recettori sono presenti sia a livello pre- che postsinaptico (Balt e Pfaffendorf 2004).

Gli effetti citati sono stati dimostrati in via farmacologica, mediante gli AT1RA (Timmermans e coll. 1993) e, più recentemente, con la tecnica del *gene targeting*, che permette di selezionare ceppi di topi o di ratti privi di uno o di entrambi i sottotipi AT1<sub>A</sub> e AT1<sub>B</sub> dei quali questi animali sono portatori, e di studiare gli effetti prodotti da questa delezione (Brede e Hein 2004).

**Tabella 2.** Gli effetti prodotti dai recettori AT1 (Modificata da: Burnier e Brunner 2000, con autorizzazione)**The effects of AT1 receptor stimulation**


---

Vasoconstriction (preferentially coronary, renal, cerebral)  
 Sodium retention (angiotensin, aldosterone production)  
 Water retention (vasopressin release)  
 Renin-suppression (negative feedback)  
 Myocytes and smooth-muscle-cell hypertrophy  
 Stimulation of vascular and myocardial fibrosis  
 Inotropic/contractile (cardiomyocytes)  
 Chronotropic/arrhythmogenic (cardiomyocytes)  
 Stimulation of plasminogen activator inhibitor-1  
 Stimulation of superoxide formation  
 Activation of sympathetic nervous system  
 Increased endothelin secretion

---

Con questa tecnica è stato dimostrato che, similmente a quanto accade dopo somministrazione di un AT1RA, negli animali privi del gene  $AT1_A$  ( $AT1_A^{-/-}$ ) (che è simile a quello AT1 dell'uomo) (Coffman e coll. 2001), si verifica una diminuzione della PAS di circa 24 mmHg (Oliverio e Coffman 2000) (Fig. 10), che si riduce ulteriormente dopo deplezione sodica e dopo Losartan. Poiché la PA aumenta nuovamente dopo carico sodico (Ito e coll. 1995; Oliverio e coll. 1997), è probabile che alla riduzione pressoria contribuisca la deplezione di Na e del volume extracellulare.

Anche la risposta all'Angiotensina II è diversa nei ratti omo- ed eterozigoti: nei primi ( $Agtr1_A^{-/-}$ ) la PA non si modifica dopo stimolo angiotensinico, mentre in quelli eterozigoti ( $Agtr1_A^{+/-}$ ) compare un aumento pressorio di breve durata, seguito da un'altrettanto fugace risposta depressoria (Ito e coll. 1995; Sugaya e coll. 1995). La componente pressoria è inibita dal Losartan o dal Candesartan, ma paradossalmente è potenziata dalla somministrazione di un ACEI (Enalapril) che, riducendo la formazione di Angiotensina II, impedisce a quest'ultima di stimolare i recettori AT2 (che producono effetti opposti a quelli AT1) (Oliverio e coll. 1998b).

La struttura e lo sviluppo dell'apparato cardiovascolare di questi animali sono apparentemente normali e la loro sopravvivenza appare diminuita di poco rispetto all'animale WT (Ito e coll. 1995). A differenza di quanto avviene per la PA, il recettore  $AT1_A$  non sembrerebbe dunque produrre effetti importanti sullo sviluppo dell'apparato cardiocircolatorio; tuttavia, in contrasto con questi dati, Harada (Harada e coll. 1999a) ha dimostrato che, 4 settimane dopo la legatura dell'arteria coronaria sinistra, la sopravvivenza dei topi  $Agtr1_A^{-/-}$  è maggiore di quella dei topi WT, ed anche il rimodellamento del VS dopo infarto ed il numero dei battiti prematuri durante la riperfusione, appaiono ridotti.



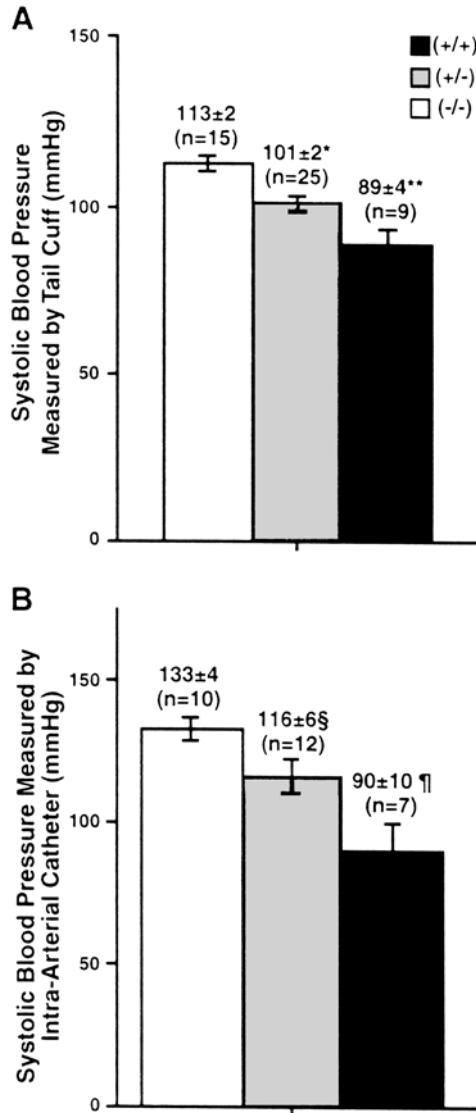


Fig. 10. Il comportamento della PAS negli animali AT1<sup>-/-</sup> (Da: Oliverio e Coffman 2000, con autorizzazione)

A confermare questo ruolo del sottotipo AT1<sub>A</sub>, i topi nei quali durante la vita embrionale era stata prodotta un' aumentata espressione di esso (fino a 200–400 volte) (*gain of function*), mostrano alla nascita un fenotipo particolare caratterizzato da una notevole ipertrofia sia degli atri che dei ventricoli, da un aumento del collagene interstiziale e dei fibroblasti e dalla

morte per scompenso nel giro di qualche settimana. L'ECG rivela un blocco della conduzione A-V, con allungamento dell'intervallo PR e bradicardia. Queste alterazioni appaiono indipendenti dalle condizioni emodinamiche degli animali, in quanto la loro PA è normale, ma sono dovute più probabilmente ad un'azione diretta dell'Angiotensina II sui cardiomiociti, che è mediata appunto dagli AT1 e che può essere inibita dal Losartan (Hein e coll. 1997b; Paradis e coll. 2000).

Queste lesioni miocardiche mancano invece nel ratto con un'aumentata espressione di recettori AT1<sub>A</sub> e compaiono solo dopo che la PA è stata aumentata mediante bendaggio aortico (Hoffmann e coll. 1996); quindi, a seconda della specie, lo stesso sottotipo di recettore può avere un impatto diverso sul fenotipo.

Per quanto riguarda i reni di questi animali AT1<sub>A</sub> (-/-), essi appaiono normali all'esame macroscopico, ma una più attenta analisi morfometrica dimostra che, a partire dalla terza settimana di vita, sono presenti un'ipertrofia dell'apparato JG con conseguente aumento della R, un marcato ispessimento della tunica media delle arterie intrarenali ed una moderata espansione del mesangio in numerosi glomeruli (Matsusaka e coll. 1996; Oliverio e coll. 1998a). È presente, inoltre, una idronefrosi, per un difettoso funzionamento della peristalsi (Miyazaki e Ichikawa 2001).

Queste alterazioni potrebbero dipendere dalla mancata transduzione del segnale prodotto dall'AT1 nelle cellule mesangiali o da un recettore non di tipo AT1<sub>A</sub> oppure dalla stimolazione di queste cellule mediata in via sostitutiva dai nervi simpatici.

Del tutto assente è il *feedback* tubulo-glomerulare, che regola l'apporto di Na al tubulo distale (Schnermann e coll. 1997). A differenza di quanto avviene nell'animale ACE (-/-), questo *feedback* non può essere riattivato dalla somministrazione di Angiotensina II, quindi anch'esso appare modulato dal recettore AT1<sub>A</sub> a livello dell'arteriola afferente o della macula densa. Questi animali presentano, inoltre, una sopravvivenza lievemente ridotta rispetto agli animali WT (Oliverio e coll. 1998a). Anche i livelli plasmatici di VP appaiono normali, ma dopo stimolazione mediante privazione d'acqua, gli animali AT1 KO mostrano una risposta dell'ormone attenuata rispetto a quelli non manipolati (Morris e coll. 2001).

Almeno a giudicare dalle risposte osservate negli animali privi del suo gene, il recettore AT1<sub>B</sub>, sembrerebbe meno importante di quello AT1<sub>A</sub>.

Gli animali AT1<sub>B</sub> (-/-) hanno, infatti, una PAM simile a quella degli animali WT ( $100 \pm 3$  mmHg vs  $101 \pm 5$  mmHg) ed anche la risposta pressoria all'Angiotensina II è sovrapponibile nei 2 ceppi. Inoltre, essi mostrano un aspetto normale, e tale è anche la morfologia del cuore, dei reni e dei surreni (Chen e coll. 1997).

Questi risultati farebbero pensare, pertanto, che i recettori AT1<sub>B</sub> sono dei *redundant AT1 receptors* (secondo la definizione di Davisson e coll. 2000), e che il loro ruolo è vicariato dal sottotipo AT1<sub>A</sub> o da un altro tipo di recettore non AT1<sub>A</sub> o non AT2 non ancora identificato (Chen e coll. 1997).

Contro questa possibilità c'è però la persistenza negli animali Agtr1<sub>A</sub> (+/-) di una risposta pressoria all'Angiotensina II, anche se modesta, che può essere inibita dal Losartan (Ito e coll. 1995; Oliverio e coll. 1997) e questa reazione può essere spiegata soltanto con la capacità del sottotipo AT1<sub>B</sub> di vicariare l'azione ipertensivante di quello AT1<sub>A</sub>, quando quest'ultimo sia stato eliminato. Allo stesso modo, cioè con la capacità anche del sottotipo AT1<sub>B</sub> di produrre una costrizione dei vasi di resistenza, può essere spiegato il mantenimento negli animali AT1<sub>A</sub> (+/-) di un'emodinamica renale praticamente normale, nonostante la diminuzione della PAM (Stec e Sigmond 2001).

Altrettanto necessaria appare la presenza dei recettori AT1<sub>B</sub> nel sistema SNC, pur essendo essi in minoranza rispetto a quelli AT1<sub>A</sub>. Secondo Davisson (2000), a livello di quest'organo, i due sottotipi avrebbero funzioni diverse: quelli AT1<sub>A</sub> sarebbero importanti per il controllo pressorio, mentre gli AT1<sub>B</sub> contribuirebbero soprattutto a controllare il bilancio idrico: nei topi AT1<sub>B</sub> (-/-), il fenomeno della sete è infatti notevolmente attenuato e non ricompare neppure in presenza di dose elevate di Angiotensina II (Davisson e coll. 2000), quindi entrambi i sottotipi hanno funzioni importanti, anche se diversificate.

La capacità del sottotipo AT1<sub>B</sub> di contribuire agli effetti prodotti dall'Angiotensina II è confermata dalla comparsa di numerose alterazioni morfologiche e funzionali nei topi nati dall'incrocio di animali AT1<sub>A</sub> KO con animali AT1<sub>B</sub> KO, e quindi privi di entrambi i sottotipi di questi recettori (Oliverio e coll. 1998b). Questi animali presentano un fenotipo molto più compromesso rispetto a quelli privati del solo gene dell'AT1<sub>A</sub>, simile a quello che compare dopo delezione del gene dell'AOPEN o dell'ACE (Tsuchida e coll. 1998): sia la loro crescita che la loro sopravvivenza sono ridotte (circa il 40% di essi hanno un difetto del setto interventricolare e muoiono poco dopo la nascita); la risposta pressoria all'Angiotensina II è assente ed anche la PA è diminuita in maniera molto più significativa rispetto ai topi AT1<sub>A</sub> KO, ma, similmente a quanto avviene in questi ultimi, aumenta dopo somministrazione di un ACEI (Enalapril), probabilmente per l'inibizione del segnale mediato dagli AT2 (Oliverio e Coffman 2000).

Anche i reni presentano delle alterazioni simili a quelle prodotte dalla mancanza di Angiotensina II, cioè il mancato sviluppo della pelvi e la completa assenza della peristalsi ureterale, per cui compare un quadro a tipo di uropatia ostruttiva con atrofia della midollare interna del rene e riduzione del potere di concentrazione delle urine (Miyazaki e Ichikawa 2001).

La tunica media dei vasi intrarenali è ipertrofica ed è circondata da cellule di tipo infiammatorio. Questa ipertrofia, che non è stata evidenziata in altri distretti vascolari, non è spiegabile con la capacità dell'Angiotensina II di stimolare i fenomeni proliferativi e neppure con la situazione emodinamica, dal momento che negli animali  $AT1_B$  KO la PA è diminuita. Essa potrebbe essere dovuta all'intervento della R oppure alla ridotta pressione di perfusione renale per la diminuzione della PA sistemica (Brede e Hein 2004).

Anche se il sottotipo  $AT1_A$  è necessario per la comparsa degli effetti prodotti dall'Angiotensina II, soprattutto per quanto riguarda il controllo dei livelli pressori, la sua presenza deve essere dunque "integrata" da quella del sottotipo  $AT1_B$ : per ricapitolare tutti gli effetti prodotti dal recettore  $AT1$  è necessaria cioè la presenza di entrambi i sottotipi, in quanto ciascuno di essi, anche se con modalità diverse, contribuisce allo sviluppo ed alle funzioni delle strutture deputate all'omeostasi.

Come è ormai ampiamente dimostrato (Balt e Pfaffendorf 2004), la vasostrizione prodotta dall'Angiotensina II è dovuta, oltre che all'azione diretta del polipeptide sulle CML, anche alla capacità dei recettori  $AT1$  di stimolare il sistema nervoso simpatico a livello del SNC, della midollare del surrene e della terminazione adrenergica, con conseguente liberazione di NA (Fig. 11).

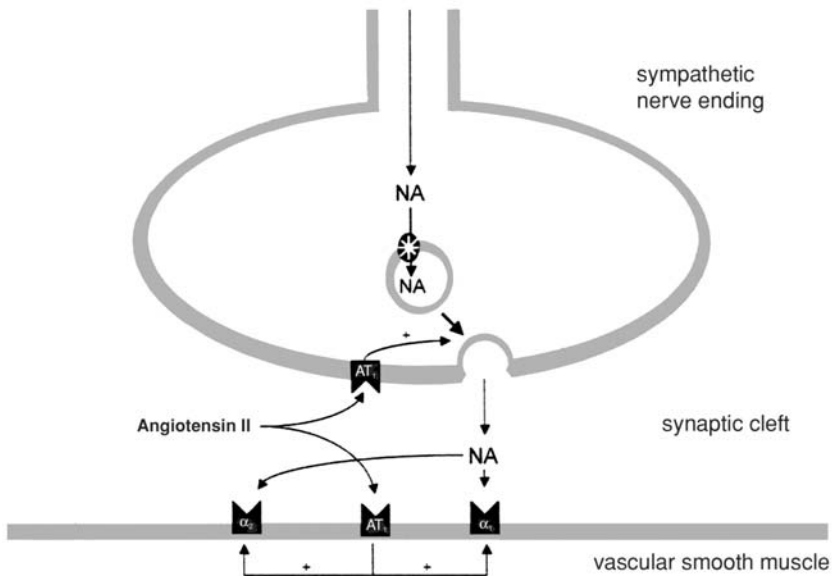


Fig. 11. Il ruolo dei recettori  $AT1$  nella liberazione di NA dalla terminazione adrenergica (Da: Balt e Pfaffendorf 2004, con autorizzazione)

Questa stimolazione si verifica sia a livello pre- che postsinaptico, ma il ruolo dei recettori AT1 nei due compartimenti appare diverso (Cox e coll. 1995). A livello postsinaptico, la liberazione di NA è mediata dai recettori AT1<sub>A</sub> (Pinheiro e coll. 2002): negli animali AT1<sub>A</sub> (-/-) compare, infatti, uno squilibrio autonomico caratterizzato da una significativa riduzione della variabilità della PA e dell'intervallo del polso, mentre la FC rimane praticamente immodificata (Chen e coll. 2005).

A livello presinaptico, l'azione dell'Angiotensina II non appare invece mediata con altrettanta certezza dai recettori AT1<sub>A</sub>, in quanto a questo livello gli AT1RA non appaiono tutti ugualmente efficaci nel modulare la liberazione di NA, e lo diventano solo dopo che la loro concentrazione è stata aumentata di oltre 400 volte (Chen e coll. 2005), per cui è stato ipotizzato che a questo livello esistano recettori atipici di tipo AT1<sub>B</sub>-simile.

Ai fini dell'attività simpatica, il tipo di recettore interessato può anche variare da specie a specie: mentre nel rene di ratto l'aumento della neurotrasmissione prodotto dall'Angiotensina II appare mediato dai recettori AT1, nell'atrio dell'uomo a questo aumento contribuiscono anche i recettori AT2 e la liberazione di NO. Quest'ultimo agirebbe, comunque, con un meccanismo diverso a livello pre- e postsinaptico: nel primo caso, faciliterebbe l'incremento della trasmissione simpatica, mentre nel secondo caso lo impedirebbe (Stegbauer e coll. 2005) (v. Cap. 6: Gli effetti dei recettori AT2).

I recettori AT1 contribuiscono anche allo sviluppo dell'aterosclerosi, perché in risposta all'Angiotensina II aumentano la produzione delle ROS e stimolano l'attivazione della NADH/NAD(P)H ossidasi, con conseguente rottura dell'equilibrio esistente tra Angiotensina II e NO (Rajagopalan e coll. 1996). Inoltre, aumentano la produzione di alcune molecole infiammatorie (MCP-1 e VCAM-1) (Werner e Nickenig 2003; Wassmann e Nickenig 2006). L'esposizione delle CML alle LDL aumenta l'espressione del loro mRNA, che appare addirittura raddoppiata o triplicata nei conigli con iperlipemia ereditaria e nell'uomo ipercolesterolemico (Nickenig e coll. 1999). Un aumento di questa espressione è stato osservato anche dopo somministrazione di CRP, che è considerata un fattore proaterosclerotico ed un potenziale fattore di rischio (Wang e coll. 2003). La comparsa delle lesioni aterosclerotiche è impedita da un AT1RA (Losartan) (Strawn e coll. 2000a e b), mentre il trattamento per 4 settimane con una statina produce una *down-regulation* recettoriale, indipendente dalla riduzione del colesterolo. Quindi gli effetti benefici di questi farmaci ipocolesterolemizzanti potrebbero, almeno in parte, essere dovuti anche alla riduzione del numero di recettori AT1 (Nickenig e coll. 1999).

Secondo Wassmann e Nickenig (2004) la *upregulation* dei recettori AT1

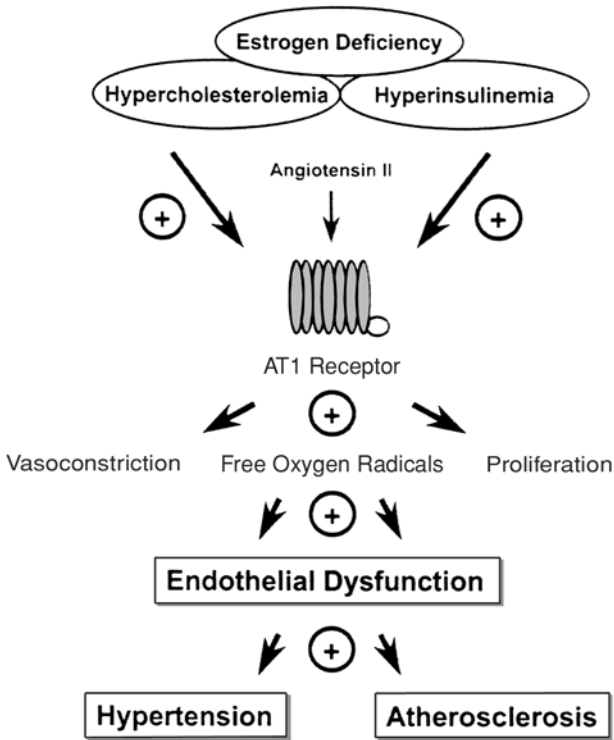


Fig. 12. La interazione dei recettori AT1 con i fattori di rischio per lo sviluppo dell'aterosclerosi (Da: Wassmann e Nickenig 2004, con autorizzazione)

osservata nell'aterosclerosi dimostrerebbe l'esistenza di un meccanismo molecolare mediante il quale essi legano i diversi fattori di rischio (ipercolesterolemia, iperinsulinemia, deficit di estrogeni) e, tramite le ROS, la vasoconstrizione e la proliferazione, contribuiscono alla comparsa della disfunzione endoteliale che caratterizza la IA e l'aterosclerosi (Fig. 12).

# Il recettore AT2: la struttura, l'attivazione del segnale e la distribuzione

A differenza dei recettori AT1 – identificati sin dalle prime ricerche come i principali mediatori delle azioni espletate dall'Angiotensina II, quelli AT2 sono stati inizialmente considerati privi di un preciso significato funzionale (“*Does the AT2 receptors play a physiological role?*”: de Gasparo e coll. 1994b), ed anche se in questi ultimi anni il sipario si è finalmente alzato anche su di essi (Douglas 1996), ancora oggi alcune delle loro funzioni appaiono enigmatiche (Gallinat e coll. 2000).

I motivi che hanno reso difficili le ricerche sui recettori AT2 sono almeno tre: 1) a differenza di quelli AT1, essi sono espressi soltanto in alcuni tipi di cellule e di tessuti (cellule endoteliali, cellule della parete vasale, alcune strutture cerebrali, surreni, tessuto miocardico e cutaneo); 2) funzionano con meccanismi non convenzionali, sia per quanto riguarda la trasduzione del segnale, sia per gli effetti che essi producono; 3) in linea di massima le loro azioni sono mascherate da quelle di tipo opposto, espletate dai recettori AT1, ed affiorano soltanto dopo il blocco di questi ultimi (Steckelings e coll. 2005).

Nonostante queste difficoltà, la maggior parte dei dati ottenuti, sia *in vivo* che *in vitro*, dimostrano che i recettori AT2 (anche se con alcune eccezioni: v. Cap. 7) lavorano in senso opposto a quelli AT1 e, con i loro effetti, contribuiscono a modulare quei complessi programmi biologici che comprendono lo sviluppo embrionale, la differenziazione cellulare e l'apoptosi, il controllo della PA e la funzione renale (Fig. 13). Numerosi dati suggeriscono, inoltre, che essi sono coinvolti anche nella comparsa di alcune condizioni morbose, come l'IA e lo scompenso cardiaco (Blume e coll. 2001).

Per produrre questi effetti, i recettori AT2 dispongono di una struttura che in parte è simile a quella dei recettori AT1; tuttavia, pur avendo per l'Angiotensina II la stessa capacità di legame, il loro meccanismo d'azione è diverso.

## 5.1 - La struttura del recettore AT2

Identificato inizialmente con metodiche biochimiche (DTT) e poi con quelle farmacologiche (antagonisti selettivi non peptidici) (Timmermans e

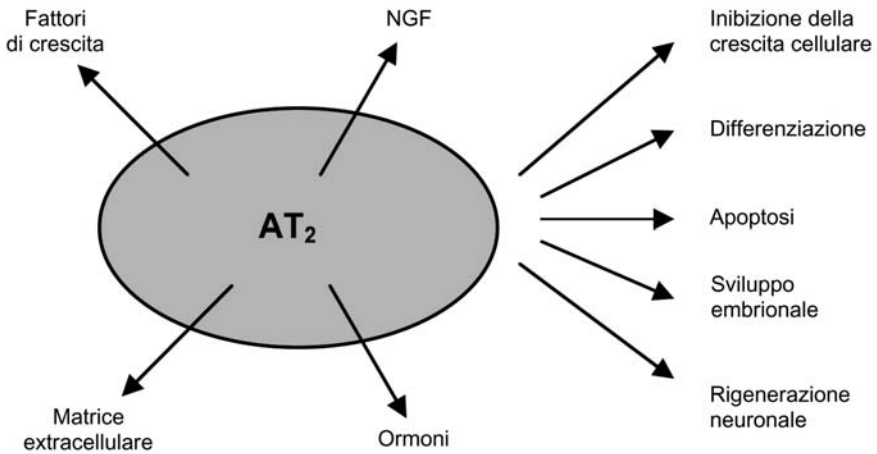


Fig. 13. La modulazione dei programmi biologici ad opera dei recettori AT<sub>2</sub> (Modificata da: Unger 1999, con autorizzazione)

coll. 1993), questo recettore è stato clonato nei primi anni '90 in diverse specie animali, compreso l'uomo (Mukoyama e coll. 1993; Koike e coll. 1994).

Strutturalmente, esso si presenta come una glicoproteina costituita da 363 aminoacidi allineati in modo da formare 7 eliche transmembranalì, collegate da 2 ponti disolfuro (Cys35–Cys290 e Cys117–Cys195), che legano, rispettivamente, l'estremità N-terminale alla III ansa transmembranalì e la I alla II ansa transmembranalì, alla stessa maniera di quanto avviene per il recettore AT<sub>1</sub> (Fig. 14) (Herding e coll. 2001). Similmente a quanto avviene per quest'ultimo, l'eliminazione del legame tra la I e la II ansa (Cys117–Cys195) determina l'inattivazione del recettore; viceversa, la distruzione del ponte Cys35–Cys290, che crea un legame tra la estremità N-terminale e la III ansa, aumenta la sua affinità per il ligando (Nahmias e Boden 2004).

A differenza del recettore AT<sub>1</sub> (che ne possiede soltanto 3), quello AT<sub>2</sub> contiene 5 siti di glicosilazione, situati nel dominio N-terminale extracellulare, la cui deglicosilazione enzimatica ha comunque un modesto effetto sulla sua capacità di legame (Servant e coll. 1996). La massa molecolare oscilla tra i 60 ed i 113 kDa, probabilmente in rapporto ad un diverso grado di glicosilazione (Servant e coll. 1996) oppure per fenomeni di oligo- o dimerizzazione (de Gasparo e coll. 2000).

Pur avendo un'eguale affinità per l'Angiotensina II, la sequenza aminoacidica di questo recettore, dedotta dal suo DNA, mostra un'analogia piuttosto bassa con quella del recettore AT<sub>1</sub> (compresa tra il 32 ed il 40%, a seconda degli AA: Kambayashi e coll. 1994; Gallinat e coll. 2000), limitata ad alcuni domini idrofobici: la mutagenesi del recettore AT<sub>1A</sub>, combinata con



il modello ottenuto al computer del recettore AT2 e del suo legame con l'Angiotensina II, ha dimostrato che alcuni aminoacidi del recettore AT1, importanti per il legame con l'agonista, sono presenti anche in quello AT2, come ad esempio la Asn127 (equivalente all'Asn111 del recettore AT1), la Lys118 e la Lys216 (equivalenti, rispettivamente, alla Lys102 ed alla Lys199 del recettore AT1), l'Arg183 (equivalente all'Arg167 del recettore AT1) e l'Asp297 (equivalente all'Asp281 del recettore AT1) (Miura e Karnik 1999; de Gasparo e coll. 2000).

Come era stato dimostrato fin dagli anni '90 mediante analoghi dell'Angiotensina II, il legame Angiotensina II/recettore AT2 si realizza a due livelli, in quanto l'Angiotensina II, con la sua estremità N-terminale, interagisce con i primi 30 residui della terminazione aminica e, con la sua terminazione carbossilica, con la metà interna del 3° dominio transmembranale del recettore AT2 (residui 129-138) (Servant e coll. 1997; Yee e coll. 1998).

Studi più recenti con recettori chimerici, ottenuti mediante la sostituzione della porzione distale del recettore AT1 con quella del recettore AT2 e con il trasferimento del cDNA di questi recettori chimerici in cellule COS, hanno dimostrato che anche la III ansa extracellulare e la VII ansa transmembranale del recettore AT2 sono importanti ai fini del legame con l'agonista CGP42112 (Hines e coll. 2001).

Le differenze strutturali ed il minor grado d'identità con il recettore AT1

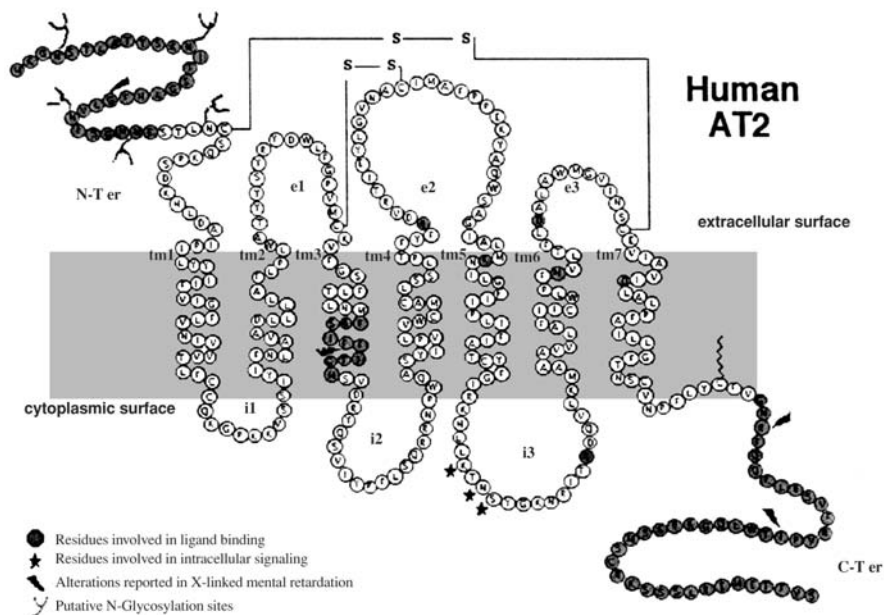


Fig. 14. La struttura del recettore AT2 (Da: Nahmias e Boden 2004, con autorizzazione)

sono evidenti soprattutto nella III ansa transmembranale e nella terminazione carbossilica (Gallinat e coll. 2000; Volpe e coll. 2003).

Per effetto di questa diversa conformazione basale, anche il legame dei due recettori con l'agonista si realizza mediante differenti modelli di ricognizione molecolare: infatti, mentre il recettore AT1 presenta una conformazione obbligata (*is constrained*) e può essere attivato solo dal legame con l'Angiotensina II, quello AT2 invece è libero (*is relaxed*), il che rappresenta una caratteristica inaspettata per un recettore che, seppure in maniera atipica, appartiene al gruppo dei GPCRs (v. dopo). Similmente al recettore AT1 mutante N111G, esso è *constitutively* attivo e le modifiche della molecola dell'Angiotensina II – a differenza di quanto avviene per il recettore AT1 – non riducono la sua affinità per essa (Miura e Karnik 1999; Nahmias e Boden 2004).

Sulla base di questi dati, è stato pertanto ipotizzato che l'attivazione di questo recettore possa verificarsi anche in maniera ligando-indipendente (Miura e coll. 2005), e questa ipotesi è confortata da due osservazioni: 1) la sostituzione della III ansa ic di esso con quella del recettore AT1 attiva le vie di trasduzione del segnale proprie di quest'ultimo (Wang e coll. 1995), e 2) la capacità del recettore di eterodimerizzarsi con il recettore AT1 e di attenuare, in tal modo, i segnali prodotti da quest'ultimo, per cui esso appare come l'antagonista naturale del recettore AT1 (AbdAlla e coll. 2001b) (v. Cap. 7.2).

## 5.2 - Il recettore AT2 e le GPs

Nonostante la sequenza aminoacidica dei recettori AT2 e la loro esposizione sulla membrana cellulare già suggerissero la loro appartenenza alla famiglia dei GPCRs (Hines e coll. 2001), le prime ricerche, condotte su cellule in grado di esprimere solo questi recettori (R3T3, PC12W, cellule della granulosa ovarica), sembravano dimostrare che essi sono insensibili agli analoghi del GTP $\gamma$ s, e la loro stimolazione in membrane di endometrio umano, corteccia cerebellare bovina e glomerulosa surrenalica appariva incapace di produrre un legame con la [35S]GTP $\gamma$ s (Bottari e coll. 1991).

Gli studi elettrofisiologici hanno dimostrato invece che la stimolazione delle correnti del K<sup>+</sup>, prodotta da questi recettori in colture di neuroni provenienti dall'ipotalamo e dal tronco encefalico di ratti, si verifica tramite una proteina G PTX-sensibile (Kang e coll. 1994). Mediante ricerche di immunoselezione condotte in feti di ratto, è stato visto inoltre che i recettori AT2 catalizzano lo scambio del GDP con il GTP, attraverso una proteina Gi $\alpha$ 2 oppure Gi $\alpha$ 3 (Berry e coll. 2001). Gli esperimenti di co-immunopre-

citazione con anticorpi anti-GPs, hanno anche evidenziato che gli effetti prodotti dai recettori AT2 sui canali del  $K^+$ , sull'inibizione della crescita e sulla diminuzione della sintesi del DNA, possono essere inibiti mediante anticorpi anti-Gi (Zhang e Pratt 1996b; Hansen e coll. 2000).

La loro capacità di legarsi, a differenza di quelli AT1, prevalentemente ad un tipo di GPs – le Gi – suggerisce pertanto che i recettori AT2 sono atipici e che il loro legame con queste proteine si realizza con modalità diverse da quelle utilizzate da altri GPCRs (Hansen e coll. 2000). In alcune linee cellulari, le vie di trasduzione del segnale attivate da questi recettori appaiono, infatti, insensibili alla tossina della pertosse (PTX). Nelle cellule NG108-15 del neuroblastoma essi inibiscono inoltre l'apertura dei canali del Ca tramite l'attivazione di un'altra GP non identificata, ma che comunque sarebbe diversa dalla PGi (Buisson e coll. 1995). Feng e coll. (2002) hanno, infatti, dimostrato che un'altra GP – la proteina  $G\alpha$  – funziona come proteina di sostegno (*scaffold protein*) nell'associazione costitutiva tra i recettori AT2 e la tirosin-fosfatasi SHP-1; quindi essi sembrano capaci di legarsi anche ad altre GPs o, comunque, di funzionare tramite vie GPs-indipendenti (Nahmias e Boden 2004).

A favore di questa possibilità, è stato accertato che l'attivazione della GTP si verifica anche dopo rimozione delle GPs dalla membrana cellulare, e che nelle cellule di neuroblastoma NG 108-15 questi recettori inibiscono l'apertura dei canali del  $Ca^{2+}$  attivando una proteina G non identificata, ma comunque diversa da quella Gi (Buisson e coll. 1995).

La possibilità di un duplice meccanismo d'azione – GPs-dipendente e GPs-indipendente – sembra trovare una conferma anche nel diverso comportamento di questi recettori in rapporto ad alcune condizioni fisiologiche (ad es. l'età dell'animale) oppure ai diversi requisiti d'affinità che essi avrebbero per l'Angiotensina II (Reagan e coll. 1996).

Anche se questi dati farebbero pensare all'esistenza anche per questi recettori AT2 di due sottotipi, tale ipotesi non appare comunque sostenibile, in quanto sia nel genoma dell'uomo che in quello del ratto, esiste una sola copia del recettore (Mukoyama e coll. 1993). L'unica spiegazione alternativa è la esistenza di entità molecolari diverse, che non possiedono una significativa omologia per quanto riguarda la loro sequenza aminoacidica, ma hanno in comune un'affinità per quei ligandi, come il CGP42112 ed il PD123319, che li definiscono farmacologicamente (Nahmias e Boden 2004).

### 5.3 - L'attivazione del segnale

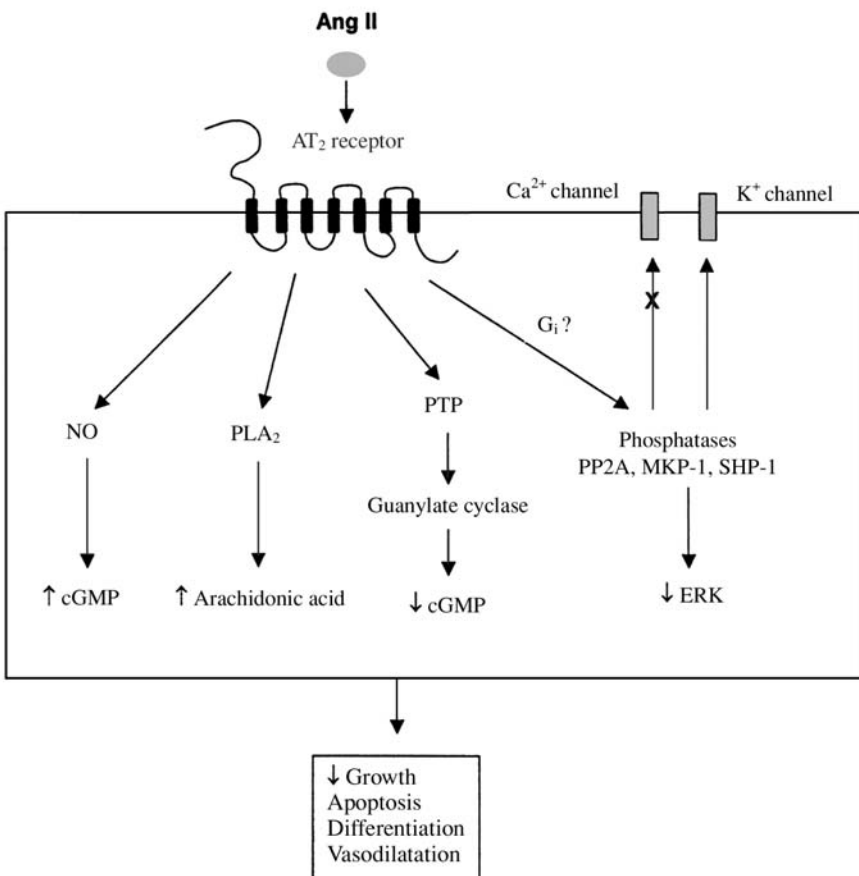
L'identificazione delle vie di trasduzione del segnale attivate dall'AT2 è ancora incompleta, sia perché questo recettore è stato clonato in epoca

piuttosto recente, sia perché – in accordo con la sua natura “enigmatica” (Gallinat e coll. 2000) – queste vie variano a seconda del tipo di cellule o di tessuto esaminati (Unger 1999).

I risultati finora ottenuti dimostrano comunque che i segnali attivati dal recettore AT<sub>2</sub> sono diversi da quelli attivati dal recettore AT<sub>1</sub> e producono effetti che si oppongono a quelli prodotti da quest'ultimo.

Le vie di transduzione comprendono l'attivazione della tirosin-fosfatasi e l'inibizione delle proteinkinasi (Nahmias e Boden 2004) (Fig. 15).

Le ricerche condotte su linee cellulari di tipo diverso (N1E-115, NG108-15, fibroblasti RT3, PC12W), hanno confermato che questi recettori attivano alcune fosfatasi proteiche (Inagami e coll. 1999b) ed in particolare la protein-fosfatasi 2A (PP2A) e la fosfatasi MAP-1, con conseguente inattiva-



**Fig. 15.** La transduzione del segnale prodotta dai recettori AT<sub>2</sub> (Da: Dinh e coll. 2001, © The Biochemical Society, con autorizzazione)

zione dell'ERK1 e 2 e con essa dei fenomeni proliferativi, e con defosforilazione della proteina anti-apoptotica Bcl-2 (Horiuchi e coll. 1997; Nouet e Nahmias 2000).

In accordo con l'inibizione che esercitano sulla crescita, i recettori AT2 attivano anche la SHP-1, che è una fosfatasi vanadato-sensibile, in grado di regolare in maniera negativa l'attività delle citokine e delle GF (Bedecs e coll. 1997). La SHP-1 sarebbe responsabile anche della defosforilazione della januskinasi (JAK) 2 e dell'arresto della cascata JAK/STAT attivata dal recettore AT1 (Marrero e coll. 1998).

Questa azione modulatrice – che può essere annullata dal trattamento con ortovanadato (inibitore della fosfotirosinfosfatasi) o con acido okadaico (che inibisce la fosfatasi fosfoserina/treonina) – è stata confermata sia *in vivo* che *in vitro*: i topi transgenici con un'aumentata espressione di AT2 cardiaci, mostrano una ridotta attività dell'ERK rispetto ai controlli (Masaki e coll. 1998); viceversa, in colture di CML provenienti da topi Agtr2-, si verifica un aumento dei fenomeni proliferativi e, contemporaneamente, un aumento dell'ERK (Akishita e coll. 1999).

Anche in colture di neuroni provenienti dall'ipotalamo e dal tronco encefalico di ratti neonati, l'aumento dell'ERK1 e 2, prodotto dalla stimolazione dei recettori AT1, può essere antagonizzato in misura dose-dipendente dalla stimolazione dei recettori AT2 con un loro agonista – il CGP42112; invece esso è potenziato da un antagonista - il PD123319 (Huang e coll. 1996).

Il trasferimento in colture di CML del cDNA di questo recettore inibisce, inoltre, l'attivazione degli STAT 1 e 2 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), importanti soprattutto per la crescita cellulare (Horiuchi e coll. 1999a).

Determinante per la comparsa di questi fenomeni è la presenza della III ansa ic: in colture di neuroni di ipotalamo e del tronco encefalico di ratti l'iniezione di un peptide costituito dai 22 aminoacidi corrispondenti a quelli della III ansa (PEP-22) induce, infatti, un aumento delle correnti del K<sup>+</sup>, simile a quello prodotto dalla stimolazione di questi recettori; il trasferimento dello stesso peptide in preparati di CML provoca una diminuzione della sintesi del DNA e della proliferazione cellulare e riduce l'attività delle MAPK (Hayashida e coll. 1996). Questi effetti possono essere bloccati dal pretrattamento con la PTX (Nahmias e Boden 2004). Inoltre, recettori AT1 chimerici nei quali la III ansa ic era stata sostituita con quella del recettore AT2, producono segnali specifici di quest'ultimo, pur mantenendo le proprietà di legame proprie di quello AT1 (Daviet et. al.2001).

L'inserimento del PEP-22 in preparati di VMSC è in grado tuttavia di ridurre, ma non d'inibire del tutto l'attività delle MAPK e la crescita cellulare, per cui è possibile che, oltre a quelli contenuti nella III ansa ic, anche altri domini – in particolare quelli presenti nella I e nella II ansa ic e nella

terminazione carbossilica di questo recettore – siano necessari per il legame con le GPs e l'attivazione del segnale (Hayashida e coll. 1996).

Una proteina capace di legarsi alla terminazione carbossilica del recettore AT<sub>2</sub> è stata recentemente identificata da Wruck (Wruck e coll. 2005). Questo polipeptide, denominato ATBP 50 (*AT<sub>2</sub>R binding protein of 50 kDa*), avrebbe una funzione regolatrice, sarebbe cioè in grado di modulare l'attività della membrana plasmatica e, con essa, la funzione del recettore. Un'alterata interazione di quest'ultimo con la ATBP 50 potrebbe essere all'origine di alcune patologie che appaiono legate ad una sua mutazione (ad es. il ritardo mentale) (Vervoort e coll. 2002). La localizzazione del gene ATBP 50 sul cromosoma 8p21.3, cioè in una regione che presenta delle anomalie in alcune forme neoplastiche, farebbe inoltre di questo gene un potenziale fattore patogenetico per tale patologia (Wruck e coll. 2005).

#### 5.4 - La distribuzione del recettore AT<sub>2</sub>

L'espressione e la distribuzione di questi recettori appaiono regolate da fattori intra- ed extracellulari: *in vitro*, l'espressione del loro mRNA è ridotta dai fattori che stimolano la proliferazione cellulare (bFGF, NGF, PDGF), dal desametonone e dall'aldosterone, dall'IRF-1, dall'aumento del Ca<sup>2+</sup>, dall'attivazione della PKC; è aumentata, invece, per effetto dell'insulina, della IGF, dell'interleukina, degli estrogeni e dell'Angiotensina II (Ichiki e coll. 1995a; Gallinat e coll. 2000; Nahmias e Boden 2004) (Fig. 16). A differenza di quan-

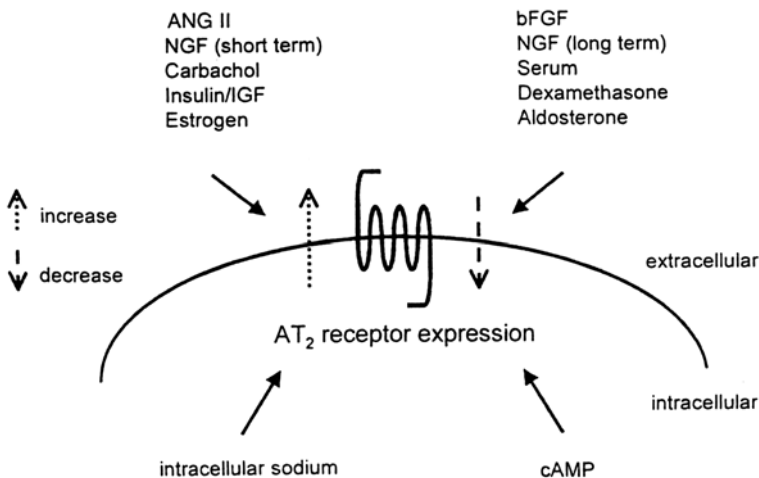


Fig. 16. Fattori intra- ed extracellulari che modificano l'espressione dei recettori AT<sub>2</sub> (Da: Gallinat e coll. 2000, con autorizzazione)

**Tabella 3.** La distribuzione dei recettori AT2 (Da: Wruck e coll. 2004, con autorizzazione)

Tissue	Fetus	Newborn	3 week	8 week
Adrenal	+	+	+	+
Cortex		+	+	+
Medulla				
Ovary				
Follicular granulosa	+	+		+
Kidney				
Cortex	+++	+		
Medulla (outer strip)	+	++		
Heart	±			
Uterus				
Myometrium				
Blood vessels				+
Heart	±			
Aorta	+			+
Pancreas	+			
Trachea	+			
Stomach	+			
Mesenchyme	+			
Skin	+++	±		
Tongue	+++	±		
Skeletal muscle	+			

to avviene con i recettori AT1, nessuna variazione del loro numero è stata osservata dopo conservazione prolungata delle colture cellulari anche a temperature molto basse (Moulik e coll. 2000).

Determinante per il verificarsi di queste variazioni è l'età (Berry e coll. 2001). In accordo con il loro ruolo nei processi di sviluppo e differenziazione cellulare, durante la vita fetale i recettori AT2 sono espressi in maniera ubiquitaria in quasi tutti i tessuti, sia dell'uomo che di altre specie animali, in particolare nella lingua e nella cute (Grady e coll. 1991) (Tabella 3). Viceversa, il loro numero si riduce significativamente nell'età adulta nella maggior parte dei tessuti e soltanto in alcuni organi – cervello, cuore e vasi, pancreas, rene, surrene ed utero – è possibile evidenziare ancora la loro presenza, spesso insieme a quella degli AT1, distribuita secondo un criterio non uniforme, ma tessuto-specifico e specie-specifico (Shanmugam e coll. 1995).

Un diverso comportamento di questi recettori è stato osservato anche in rapporto ai livelli pressori dell'animale esaminato (Heagerty 2005): nelle arterie di resistenza dei ratti SHR il loro numero infatti è diminuito rispetto ai ratti WKY e la loro stimolazione produce una vasocostrizione. La nor-

malizzazione dei livelli pressori riporta la loro espressione a livelli eguali a quelli dei ratti normotesi WKY e fa ricomparire la loro azione vasodilatatrice (You e coll. 2005).

Nel SNC la distribuzione dei recettori AT2 assume caratteristiche particolari (Buoninconti e Buoninconti 2000).

Le ricerche condotte negli anni '90 avevano già dimostrato che nel cervello di ratto adulto i recettori AT2 sono presenti, insieme a quelli AT1, in numero praticamente uguale in alcune strutture (mesencefalo e tronco encefalico); in altre (nuclei ipotalamici) essi sono meno numerosi di quelli AT1, mentre sono presenti in numero significativo in altre (n. cerebellare, oliva inferiore, LC). Dati più recenti dimostrano che questa distribuzione è in realtà anche più complessa, in quanto in alcune aree cerebrali i recettori AT2 sono espressi soltanto durante la vita fetale, in altre soltanto dopo la nascita, mentre nell'età adulta solo alcuni di essi sono presenti in determinate strutture importanti per il controllo cardiocircolatorio e per l'equilibrio idrico-elettrolitico (SFO, PVN, complesso vagale dorsale, AP) (Nuyt e coll. 1999; Allen e coll. 1999; Buoninconti 2005).

Come ha dimostrato l'autoradiografia ad emulsione, nel ratto dopo la nascita il numero di questi recettori raddoppia, insieme a quello degli AT1, nei cardiomiociti e nelle CML dell'aorta e dell'a. polmonare e rimane elevato almeno fino alla 16° settimana; poi, a partire da quest'epoca, si riduce a quantità trascurabili, mentre il numero dei recettori AT1 rimane invariato. Viceversa, in colture di fibroblasti provenienti da tessuto miocardico di ratti con un giorno di vita, il numero di questi recettori è minore di quello osservato al 19° giorno (Sechi e coll. 1992). Nel ratto adulto il gene del recettore AT2 è presente soltanto nel 10% dei cardiomiociti, mentre quello del recettore AT1 è espresso per il 40% (Wang e coll. 1998). Quindi, i due tipi di recettore espletano funzioni diverse nel cuore neonatale ed in quello adulto (Suzuki e coll. 2004).

Nel cuore dell'uomo il quadro è diverso, in quanto gli AT2 sono espressi nei fibroblasti in quantità maggiore che nei miocardiociti (Wharton e coll. 1998), in misura corrispondente a circa il 40% di tutti i siti di legame per l'Angiotensina II. Questa proporzione si modifica in alcune cardiopatie (cardiomiopatia dilatativa, infarto e/o ipertrofia del miocardio, scompenso) perché il numero dei recettori AT2 aumenta di circa 3 volte, mentre quello degli AT1 diminuisce (Tsutsumi e coll. 1998); quindi i due tipi di recettori sembrerebbero modulare in senso opposto la formazione della matrice extracellulare (Suzuki e coll. 2004).

Una modifica dell'espressione genica dei recettori AT2 nel corso dello sviluppo è stata osservata anche nei vasi (sia nell'endotelio che nelle CML),



cioè un aumento durante la vita fetale, poi una diminuzione rapida e significativa subito dopo la nascita (Henrion e coll. 2001).

Nell'aorta fetale di ratto, al 18° giorno di gestazione, i recettori AT2 sono presenti in quantità corrispondenti all'80–85% di tutti i siti di legame per l'Angiotensina II e la percentuale rimane imm modificata fino a 2 settimane dopo la nascita; poi passa da un livello medio molto elevato (300 fmol/mg di proteina) a livelli molto più bassi, anche minori di 10 fmol/mg di proteina (Viswanathan e coll. 1991).

Cook e coll. (1994) hanno dimostrato che nel ratto durante la gestazione (che dura 21 gg.) le variazioni dell'AT2 mRNA vanno in senso opposto alla sintesi del DNA: nell'aorta di questi animali, i livelli di mRNA sono bassi sino al 15° giorno di gestazione, poi aumentano rapidamente e significativamente dal 16° al 21° giorno e nell'immediato periodo postnatale. Nello stesso periodo, la sintesi del DNA va incontro ad un processo inverso, perché da valori iniziali elevati (75%) scende a valori piuttosto bassi (30–40%) tra il 17° ed il 18° giorno di gestazione. Contemporaneamente, l'espressione dei recettori AT2 aumenta in misura significativa. La diminuzione del DNA può essere impedita dalla somministrazione in utero, tra il 18° ed il 21° giorno, di un AT2RA (PD123319), che riporta la sintesi dell'acido nucleico a valori simili a quelli osservati al 15° giorno, mentre effetti opposti sono stati osservati dopo somministrazione di un AT1RA (DuP753). Quindi, almeno in parte, questa sintesi appare mediata dall'azione degli AT2. Un aumento dell'AT2 mRNA è stato osservato anche nella parete dell'a. carotide danneggiata dal passaggio di un palloncino (Nakajima e coll. 1995), nella media e nell'intima dell'a. femorale di cane alla quale era stato applicato un manicotto di compressione (Akishita e coll. 2000) e nei topi SHR sia neonati che adulti (Touyz e coll. 1999b).

Recettori AT2 sono stati identificati anche nelle CML e nell'endotelio dei vasi del cervello, del cuore, del rene, dell'utero ed in quelli mesenterici, in numero più significativo in quelli di calibro minore (Nora e coll. 1998).

Nelle cellule endoteliali di aa. coronarie provenienti da SHR, l'mRNA dei due tipi dei recettori è presente secondo un rapporto AT1/AT2 di circa 80/20% (Stoll e coll. 1995).

I dati ottenuti nell'uomo sono meno numerosi. Mediante l'autoradiografia e l'ibridizzazione *in situ*, l'espressione di questi recettori è stata evidenziata nelle aa. interlobulari, nei vasi coronarici (nei quali essi rimangono imm modificati in condizioni di scompenso cardiaco) e nelle aa. dell'utero (Henrion e coll. 2001).

Anche nel rene la distribuzione dei recettori AT2 e l'espressione del loro mRNA appaiono legate all'età ed alla specie.

Nel topo, l'AT2 mRNA è espresso significativamente nelle cellule mesenchimali del mesonefro dal 12° al 16° giorno della vita fetale, quando cioè inizia la regressione di questa struttura, il che conferma che anche a tale livello i recettori AT2 contribuiscono all'apoptosi (v. Cap. 6.6). A partire dal 16° giorno, l'AT2 mRNA compare anche nella capsula renale e nella porzione interna della midollare, ove è presente in quantità rilevante lungo il dotto papillare e quello collettore (Kakuchi e coll. 1995).

Nel ratto, durante la vita fetale, la proteina dell'AT2 è presente nel mesenchima, poi diminuisce significativamente dopo la nascita, quando permane soltanto nei glomeruli corticali e negli elementi tubulari. Nell'animale adulto, mediante tecniche di immunostochimica ed il *Western blot* con anticorpi specifici policlonali, essa è stata evidenziata nei glomeruli (anche se in quantità minori rispetto al ratto neonato), nei tubuli della corticale e nelle cellule interstiziali (Ozono e coll. 1997).

Nel rene dell'uomo adulto, i recettori AT2 sono presenti nei vasi preglomerulari e nell'interstizio tubulare. Un loro aumento, sia a livello glomerulare che interstiziale, è stato osservato dopo dieta iposodica (Grone e coll. 1992).

Una certa quantità di recettori AT2, insieme a quelli AT1, è presente anche nel surrene, in percentuale variabile a seconda della specie. Nella midollare di ratto il rapporto AT1/AT2 è approssimativamente di 20:80, mentre nella corticale del ratto, della scimmia e dell'uomo questi recettori rappresentano dal 10 al 40% di tutti i siti di legame per l'Angiotensina II (Chang e Lotti 1990).

Recettori AT2 sono stati evidenziati in quantità significativa anche nel miometrio della donna, della femmina di ratto e della pecora, con un rapporto AT1/AT2 di 15:85; nell'utero gravido essi diminuiscono, per aumentare di nuovo dopo il parto (de Gasparo e coll. 1994c).

Mediante immunostochimica con anticorpi policlonali specifici, la presenza di questi recettori e del loro mRNA è stata dimostrata anche nel polmone dell'uomo (in particolare nelle cellule endoteliali, in cellule epiteliali bronchiali e nelle sottostanti ghiandole mucose) (Bullock e coll. 2001), nel timo (Correa e coll. 1994) e nel pancreas (Chappell e coll. 1994).

Un loro aumento, specie nel derma superficiale, si verifica anche nelle ferite della cute (Kimura e coll. 1992).

### Il recettore AT2: gli effetti

La dimostrazione che anche i recettori AT2 producono effetti importanti, ed in linea di massima opposti a quelli prodotti dai recettori AT1, è arrivata solo in questi ultimi anni (de Gasparo e coll. 2000; Stoll e Unger 2001), quando con metodiche di tipo diverso è stato accertato che questi effetti sono molteplici, perché interessano i livelli pressori e l'attività miocardica, i processi proliferativi e l'apoptosi, la funzione renale, alcune funzioni del SNC ed alcuni parametri metabolici, in pratica tutti i fattori dai quali dipende la omeostasi (Unger 1999; Carey e coll. 2005a eb) (Tabella 4).

**Tabella 4.** Gli effetti prodotti dai recettori AT2

---

Inibizione della crescita cellulare  
Differenziazione cellulare  
Riparazione tissutale  
Apoptosi  
Vasodilatazione  
Sviluppo dell'apparato urinario

---

#### 6.1 - Gli effetti sulla PA

La capacità dei recettori AT2 di produrre una vasodilatazione, in opposizione alla vasocostrizione prodotta dai recettori AT1, era stata ipotizzata già all'inizio degli anni '90, quando Widdop (Widdop e coll. 1992) aveva dimostrato che la vasodilatazione che compare dopo somministrazione di un AT1RA si riduce o scompare dopo blocco dei recettori AT2.

Qualche anno più tardi, Scheuer e Perrone (1993), nei topi ai quali era stata somministrata Angiotensina III, osservarono la comparsa di una risposta bifasica caratterizzata prima da un aumento della PA e poi, dopo circa 10 sec., da una sua diminuzione. Poiché il Losartan (AT1RA) era capace di bloccare soltanto la prima fase di questa risposta (aumento della PA), potenziando la seconda (diminuzione della PA) e visto che invece il PD123319 (AT2RA) produceva effetti opposti, gli AA ipotizzarono che la prima fase

fosse dovuta ad una vasocostrizione mediata dai recettori AT1 e la seconda ad una vasodilatazione mediata da quelli AT2.

Questo effetto è stato confermato dalle ricerche successive condotte nei topi con delezione del gene di questi recettori (AT2KO o *null mice*), nei quali la PAS è più alta rispetto agli animali WT ed anche la risposta pressoria all'Angiotensina II risulta aumentata (Ichiki e coll. 1995b; Siragy e coll. 1999a) (Fig. 17). Risultati solo in parte simili sono stati ottenuti da Hein (Hein e coll. 1995) (risposta pressoria all'Angiotensina II aumentata, ma PA normale) e da Munzenmayer (Munzenmayer e Greene 1995) (aumento della risposta pressoria all'Angiotensina II dopo somministrazione di PD123319).

Nei ratti SHR, la stimolazione di questi recettori con un agonista, il CGP42112, potenzia inoltre la risposta depressoria prodotta da un AT1RA (Barber e coll. 1999).

Un aumento della PA basale e della risposta pressoria all'Angiotensina II è stato osservato anche in topi adulti che, all'età di 5 gg., avevano ricevuto una singola iniezione di un vettore retrovirale contenente l'antisense per il cDNA di questi recettori (AT2R-AS) (Wang e coll. 2004), senza tuttavia, alcun effetto sul comportamento degli animali, come era stato invece osservato da Hein.

La somministrazione di un AT1RA (Candesartan) insieme ad un AT2-agonista (CGP41112) riduce i livelli pressori ed aumenta la conduttanza a livello dei vasi renali, mesenterici e del treno posteriore. L'aggiunta di un AT2RA (PD123319) abolisce, invece, questa risposta (Xiao-Li e Widdop 2004).

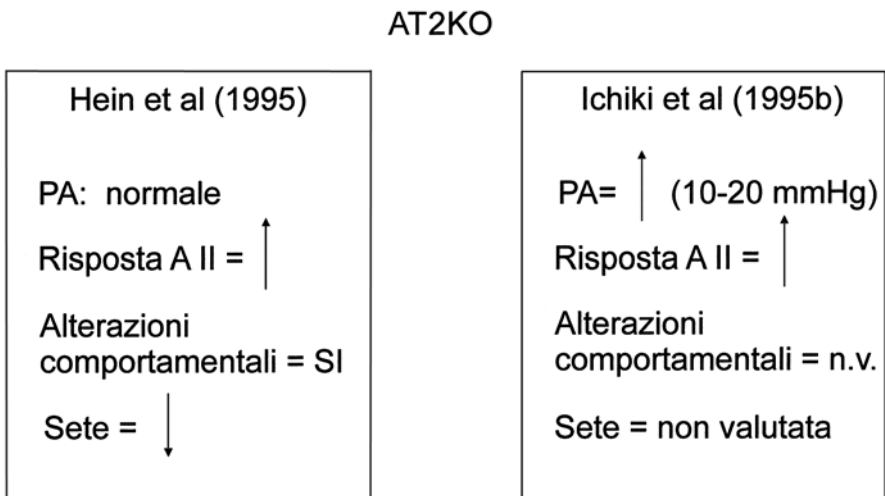


Fig. 17. Il comportamento della PA e della risposta all'angiotensina II nei topi AT2KO



Fig. 18. La cascata vasodilatatrice attivata dai recettori AT2 dopo blocco di quelli AT1

Secondo Touyz (Touyz e coll. 1999b), nei ratti giovani SHR, nei quali l'AT2 mRNA è aumentato, la contrazione delle arterie mesenteriche prodotta dall'Angiotensina II può essere bloccata solo parzialmente dalla somministrazione di AT2RA, mentre è bloccata completamente da un AT1RA. Quindi, in questo ceppo di ratti entrambi i recettori appaiono necessari per il controllo del tono vasale.

Il meccanismo con cui i recettori AT2 provvedono a questo controllo prevede l'intervento di diversi fattori ed, in primo luogo, l'attivazione di una cascata di sostanze vasodilatatrici (BK, NO e cGMP) (Carey e coll. 2000a e b; Katada e coll. 2002) (Fig. 18).

Il punto di partenza è l'inibizione dello scambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  amiloride-sensibile, con conseguente comparsa di un'acidosi intracellulare. Quest'ultima favorisce l'attivazione della kininogenasi (che lavora meglio con un pH basso), la quale libera BK che a sua volta – tramite i recettori BK2 presenti sulle cellule endoteliali – libera NO e GMP (Tsutsumi e coll. 1999; Pulakat e coll. 2005).

La sequenza descritta è riproducibile, persiste anche in presenza di un blocco prolungato degli AT1 e rappresenta, pertanto, un elemento critico anche ai fini della caduta pressoria prodotta dagli AT1RA (Widdop e coll. 2002).

Poiché nei topi privati del gene del recettore BK2 e tenuti a dieta iposodica si verifica egualmente un aumento del NO nel RIF (Renal Interstitial Fluid) (che diventa ancor più significativo dopo blocco dei recettori AT1 e si riduce, invece, dopo blocco di quelli AT2), non si può escludere che questi ultimi siano capaci di stimolare la produzione di NO direttamente ed indipendentemente dal recettore BK2 (Abadir e coll. 2003). L'esistenza di un rapporto recettori AT2/recettori BK2 è comunque confermata anche dalla diminuzione dei livelli basali di BK e di cGMP nel RIF dei topi AT2 KO e dal mancato aumento di questi livelli dopo deplezione sodica (come avviene invece negli animali di controllo) (Carey e coll. 2000a).

Negli animali AT2KO, anche la risposta pressoria all'Angiotensina II e la PA sono aumentate. Quest'ultima rimane tuttavia entro livelli normali, per il contemporaneo aumento nel RIF delle PGE2 e PGI2, stimulate dagli AT1, che non sono più controbilanciati dagli AT2 (Siragy e coll. 1999b).

Risultati simili sono stati ottenuti anche in 2 modelli di ipertensione renale nei quali l'aumento pressorio è mediato dagli AT1, l'ipertensione da *cellophane* 2K-1Wrap e l'ipertensione 2K-1c: in entrambi questi modelli, sia il blocco dei recettori AT2 mediante PD123319, sia quello dei recettori BK2 mediante Icatibant, impediscono l'effetto ipotensivante del Losartan ed aumentano notevolmente i valori pressori. Contemporaneamente, i livelli di BK, NO e cGMP si riducono nel rene ischemico (Siragy e Carey 1999c). Anche il gruppo di Volpe (Gigante e coll. 1998) ha dimostrato che nei ratti a dieta iposodica il blocco dei recettori AT2 neutralizza l'effetto ipotensivante del Losartan o del Valsartan; quindi la stimolazione di questi recettori ad opera dell'Angiotensina II (che è aumentata per effetto del blocco degli AT1) è un elemento determinante ai fini della caduta pressoria prodotta da questi farmaci.

Viceversa, nei topi nei quali in via transgenica l'espressione degli AT2 nelle CML era stata aumentata di circa il 30% rispetto a quella degli AT1 (Carey e coll. 2000a), la PA basale appare simile a quella degli animali WT. Tuttavia, la somministrazione di Angiotensina II dopo Captopril (per eliminare l'Angiotensina II endogena), se effettuata a dosi farmacologiche (0.05–0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), induce un aumento della PA dose-dipendente, viceversa produce un aumento pressorio minore di quello osservato nei topi WT, se le dosi somministrate sono più basse (0.0005–0.005  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Masaki e coll. 1998).

La cascata BK-NO-cGMP non è comunque l'unico meccanismo con cui i recettori AT2 producono una vasodilatazione e riducono i livelli pressori, in quanto altri fattori contribuiscono alla comparsa di questi effetti.

Importante infatti è anche la capacità dei recettori AT2 di inibire tonicamente l'ACE (Hunley e coll. 2000), la cui attività è aumentata in condizioni di ipertrofia ventricolare da sovraccarico, ipossia, malattia coronarica (Diet

e coll. 1996) e, quindi, di ricapitolare gli effetti degli ACEI. Sia nei topi Agtr2 (-/y) che in quelli trattati con un AT2RA, i livelli plasmatici e tissutali di questo enzima sono infatti raddoppiati particolarmente nel polmone, mentre la somministrazione di un AT1RA li riduce. Anche la risposta pressoria all'Angiotensina I – pur essendo di entità simile a quella osservata nell'animale WT – compare più rapidamente, probabilmente perché gli elevati livelli dell'ACE presenti in questi animali Agtr2 (-/y) permettono una conversione più rapida ed efficiente dell'Angiotensina I in Angiotensina II. La risposta vasodilatatrice alla infusione di BK è invece attenuata (Hunley e coll. 2000).

Tra l'ACE ed i recettori AT2 esiste dunque un rapporto inverso, per effetto del quale se questi ultimi diminuiscono, i livelli dell'ACE aumentano e viceversa. Tale rapporto è diventato anche più complesso da quando in numerosi organi (cervello, cuore, polmoni, reni, apparato gastroenterico e testicoli) è stato identificato un omologo dell'ACE, denominato ACE2 (Donoghue e coll. 2000) oppure ACEH (*Angiotensin Converting Enzyme Homologue*) (Tipnis e coll. 2000), che presenta il 42% di omologia con il dominio N- e C-terminale dell'ACE, ma funziona in maniera opposta ad esso. Infatti, mentre l'ACE idrolizza l'Angiotensina I in un octapeptide – l'Angiotensina II, l'ACE 2 idrolizza invece l'Angiotensina I in un nonapeptide – l'Angiotensina (1-9) (Danilczyk e coll. 2003; Danilczyk e coll. 2004) (Fig. 19), i cui livelli sono il doppio di quelli dell'Angiotensina II ed aumentano ul-

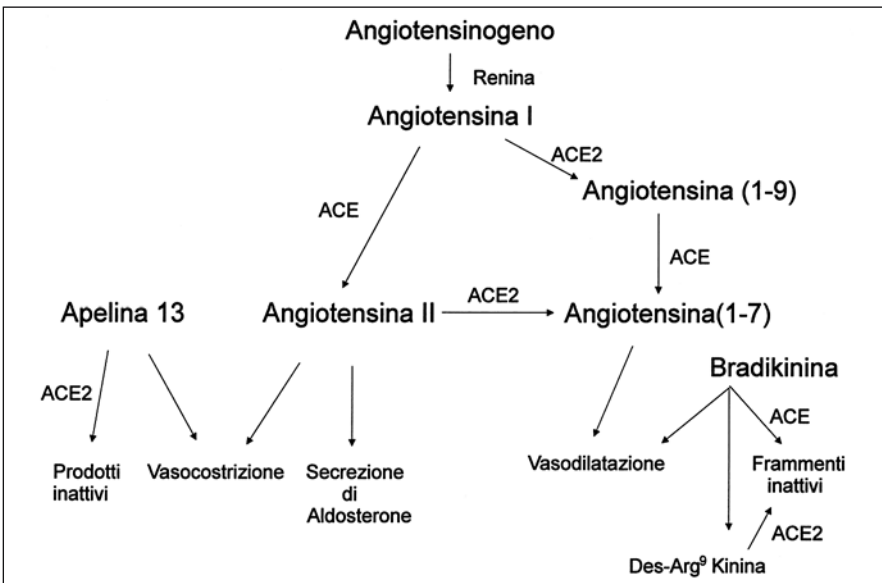


Fig. 19. Gli effetti dell'ACE e dell'ACE2 sulla sintesi dei peptidi del SRA (Da: Danilczyk e coll. 2003, con autorizzazione)

riormente dopo trattamento con un ACE inibitore. Il significato di questa Angiotensina non è stato ancora chiarito (alcuni dati suggeriscono che essa potenzia l'attività della BK, stimolando i recettori BK2: Erdos e coll. 2002), anche perché essa è rapidamente idrolizzata dall'ACE, per effetto del quale perde due aminoacidi e si trasforma in Ang (1-7), cioè in una Angiotensina in grado, con i suoi effetti, di antagonizzare molti di quelli prodotti dall'Angiotensina II (Ferrario e coll. 2004).

Vickers (Vickers e coll. 2002) e Rice (Rice e coll. 2004) hanno dimostrato però che l'attività catalitica dell'ACE2 per la formazione dell'Angiotensina (1-7) è piuttosto bassa per l'Angiotensina I, mentre è di circa 400 volte maggiore per l'Angiotensina II, per cui la sintesi dell'eptapeptide si verifica in via preferenziale a partire da quest'ultima con un meccanismo di *feed-forward* (Ferrario e coll. 2005a; Ferrario 2006a e b) (Fig. 20).

Grazie alla capacità di favorire la sintesi di un peptide vasodilatatore, l'ACE2 espleta dunque una protezione nei confronti dell'apparato cardiovascolare e riduce il danno prodotto da un'eccessiva produzione di Angiotensina II (Danilczyk e coll. 2003). Numerose osservazioni sperimentali confermano questa sua proprietà: in alcuni ceppi di ratti ipertesi (ratti Sabra Na-S, SHR, SHRSP), l'espressione dell'ACE2 è diminuita rispetto agli animali di controllo (ratti Sabra Na-R e ratti WKY); inoltre, nei ratti privati del gene di questo enzima (ACE2-/ACE2-) la PA basale è di circa 10 mmHg più elevata di quella dei ratti normali (ACE2+/ACE2+), la risposta pressoria è più significativa e sono presenti anche alterazioni della contrattilità miocardica (Crackower e coll. 2002; Yagil e Yagil 2003). Infine, nei ratti Lewis, i livelli del suo mRNA cardiaco aumentano per effetto dei farmaci che inibiscono la sintesi dell'Angiotensina II o che bloccano i suoi ef-

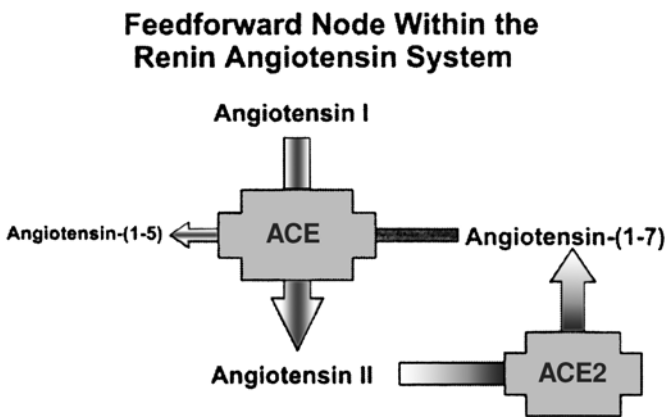


Fig. 20. Il meccanismo di feedforward per la sintesi dell'Ang-(1-7) (Da: Ferrario e coll. 2005b)



fetti a livello del recettore AT1. Questo aumento non è correlato alla riduzione pressoria e si accompagna anche ad un aumento dell'Angiotensina (1-7) (Ferrario e coll. 2005a e b).

L'identificazione dell'ACE2 si è rivelata importante anche per un altro motivo, perché dimostra che – contrariamente al concetto accettato per decenni – all'interno del SRA esistono non uno ma due enzimi, che espletano azioni opposte: l'ACE (che produce una vasocostrizione tramite l'Angiotensina II), e l'ACE2 (che produce, invece, una vasodilatazione tramite l'Angiotensina (1-7)) (Fig. 19), per cui la prevalenza dell'una o dell'altra condizione emodinamica dipende dall'equilibrio esistente tra i due enzimi (Dantas e Sandberg 2005; Ferrario e coll. 2005a).

Numerose evidenze suggeriscono che la vasodilatazione e la riduzione pressoria prodotte dai recettori AT2 si realizzano anche grazie alla sequenza ACE2/Ang (1-7). A sostegno di questa possibilità esiste, innanzitutto, la già descritta capacità dei recettori AT2 di inibire tonicamente l'ACE (Hunley e coll. 2000) e, di conseguenza, di modificare l'equilibrio esistente tra i due enzimi, per cui l'ACE2, non più controbilanciato dal suo omologo, rimane libero di sintetizzare l'Angiotensina (1-7). Inoltre, l'inibizione dell'attività  $\text{Na}^+$ -ATPasi prodotta dall'Angiotensina (1-7) a livello della membrana basolaterale della corticale renale, può essere bloccata da un antagonista dei recettori AT2, ma non da un AT1RA o dall'A799 (De Souza e coll. 2004). Similmente, nei ratti WKY ed in quelli SHR, la riduzione pressoria prodotta dall'Angiotensina (1-7) può essere inibita dalla somministrazione di un AT2RA (Walters e coll. 2005). Infine, nei cuori espantati da pazienti con ipertensione polmonare, è stata evidenziata una stretta correlazione tra presenza di Angiotensina (1-7) e densità di questi recettori AT2 (Zisman e coll. 2003).

Per questi loro effetti, nello schema proposto da Yagil e Yagil (2003) potrebbero dunque trovar posto anche i recettori AT2, che lavorerebbero come braccio terminale della vasodilatazione, in contrapposizione ai recettori AT1, che lavorano nel braccio della vasocostrizione (Fig. 21).

Se si considera che l'ACE2 è stato identificato soltanto da pochi anni, il numero dei lavori dedicato ad esso appare certamente notevole, ma forse non ancora sufficiente per assegnare fin d'ora a questo enzima un ruolo ben definito nell'economia funzionale del SRA, perché ad es. il suo diverso funzionamento nel miocardio e nel lume vasale (Reudelhuber 2006) lascia ancora senza risposte molti interrogativi sul suo ruolo. Inoltre, gli effetti prodotti dall'enzima interessano non solo l'apparato cardiovascolare, ma anche altri apparati: il gruppo di Li (Li e coll. 2003) e quello di Wong (Wong e coll. 2004) hanno dimostrato che esso – presente normalmente nel pol-

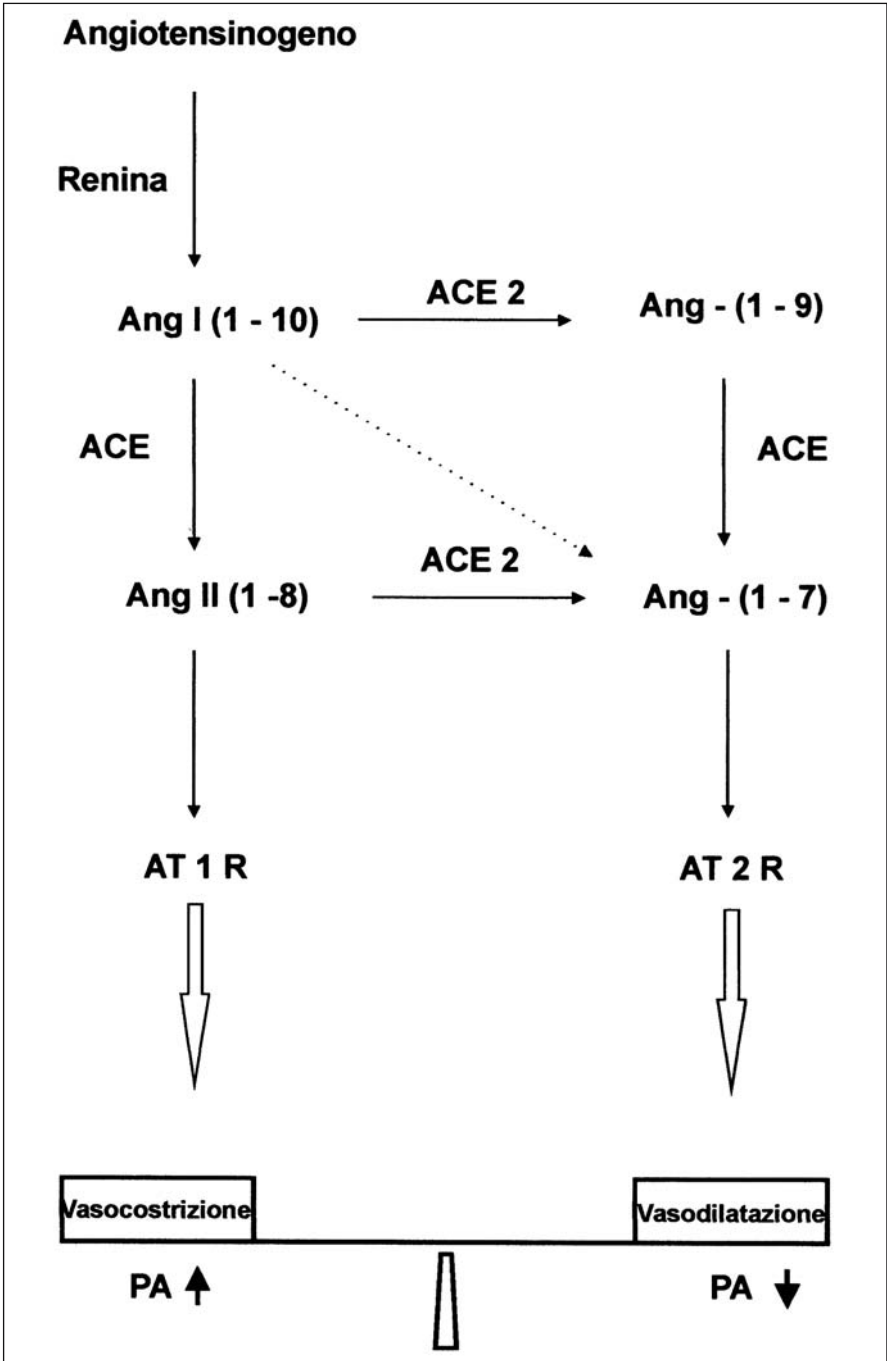


Fig. 21. La partecipazione dei recettori AT2 alla vasodilatazione prodotta dall'Ang-(1-7) (Modificata da: Yagil e Yagil 2003)

mone in quantità significativa – è un recettore funzionale del Coronavirus della SARS (SARS-CoV), del quale aumenta la replicazione, e che un suo inibitore – la NAAE – inibisce la fusione cellulare mediata da questo virus. Inoltre, poiché il danno polmonare prodotto da questo virus può essere impedito o limitato dal pretrattamento con Losartan (Kuba e coll. 2005), non si può escludere un rapporto anche tra l'enzima ACE2 ed il recettore AT1.

## 6.2 - Gli effetti sul cuore

Le ricerche condotte nei topi transgenici hanno dimostrato che, sia nell'animale che nell'uomo, i recettori AT2 contribuiscono anche a modulare la struttura e le funzioni cardiache, perché – in opposizione a quelli AT1 - riducono i processi di crescita e di rimodellamento e contribuiscono a conservare le funzioni globale e regionale del VS (Horiuchi e coll. 1999b; Gross e coll. 2004). Un'attenuazione dell'ipertrofia dei cardiomiociti e della fibrosi interstiziale è stata osservata nei topi transgenici con una maggiore espressione di questi recettori, insieme ad un aumento della kininogenasi a livello cardiaco. A dimostrazione del legame di questi fenomeni con un meccanismo kinino/NO-dipendente, essi possono essere aboliti dal contemporaneo trattamento con HOE 140, antagonista dei recettori BK2 (Kurisu e coll. 2003).

Una maggiore espressione di questi recettori AT2, associata all'inibizione della sintesi AT1-mediata del DNA e di alcune proteine come la fibronectina ed il collagene tipo 1, è stata osservata in fibroblasti provenienti da cuori miopatici di *hamster* (Ohkubo e coll. 1997).

La stimolazione di questi recettori in cardiomiociti di ratti neonati, che esprimono sia i recettori AT1 che quelli AT2, determina inoltre una riduzione dell'ipertrofia cellulare prodotta dall'infusione di Angiotensina II, con una diminuzione del rapporto proteine/DNA ed un aumento della degradazione proteica. Viceversa, il loro blocco con PD123319 aumenta la sintesi di proteine ed amplifica i processi di crescita del VS (Booz e Baker 1996).

In colture di cellule endoteliali di coronarie di ratti, la presenza di tali recettori impedisce anche la comparsa dei fenomeni proliferativi prodotta dall'Angiotensina II (Stoll e coll. 1995). La contrazione di questi vasi può essere impedita da un AT1RA e stimolata da un AT2RA (Batenbourg e coll. 2004).

Un aumento dei fenomeni proliferativi è stato invece osservato nei fibroblasti e nei cardiomiociti dopo blocco dei ricettori AT2. Inoltre, nei ratti con scompenso cardiaco post-infartuale, gli effetti benefici prodotti da un AT1RA scompaiono dopo somministrazione di un antagonista dei recettori AT2 (Liu e coll. 1997). Un aumento significativo del peso del cuore e

del rimodellamento cardiaco, la comparsa di una fibrosi e di una IVS, sono stati osservati anche nei topi *Agtr2*<sup>-/-</sup>, nei quali era stato prodotto un infarto del VS mediante un filo di rame raffreddato con azoto liquido. La diminuzione in questi animali anche dei livelli di cGMP, insieme con il mancato aumento dell'espressione dell'eNOS, conferma inoltre l'esistenza anche a livello miocardico di un rapporto tra recettori AT<sub>2</sub>, BK e NO (Brede e coll. 2003): in ratti Lewis con scompenso per infarto del miocardio, la somministrazione di un BK<sub>2</sub>-antagonista impedisce, infatti, il miglioramento della funzione cardiaca prodotto da un ACEI e, similmente a quanto avviene dopo somministrazione di un AT<sub>2</sub>RA, almeno in parte impedisce quello prodotto da un AT<sub>1</sub>RA, il cui meccanismo d'azione appare pertanto anche kinino-dipendente (Liu e coll. 1997).

Risultati contrastanti sono stati ottenuti, invece, nei ratti con una aumentata espressione miocardica dei recettori in questione.

Secondo Yang (Yang e coll. 2002), l'incremento non si accompagnerebbe ad alterazioni morfologiche o ECGrafiche, ma anzi ridurrebbe la fibrosi interstiziale prodotta da un'infusione di Angiotensina II e conserverebbe la funzione ventricolare globale e segmentaria nell'animale infartuato. Anche la sensibilità alle azioni cronotropa e pressoria dell'Angiotensina II sarebbe diminuita (Masaki e coll. 1998). Secondo altri AA (Yan e coll. 2003), un aumento di questi recettori a livello del VS induce invece uno scompenso, per la comparsa di una cardiomiopatia dilatativa, con ridotta efficienza del VS ed ipertrofia dei cardiomiociti. Queste alterazioni sono tanto più significative quanto maggiore è l'aumento del numero di recettori AT<sub>2</sub>. Egualmente aumentata è l'apoptosi, sia nei cardiomiociti che nelle CML (Goldenberg e coll. 2001).

L'interpretazione dei risultati non è facile in quanto, non essendo ancora ben definite la regolazione e la localizzazione dei recettori AT<sub>2</sub> nel cuore umano malato, non è possibile dire se i livelli recettoriali osservati nel miocardio degli animali transgenici riproducano fedelmente quelli presenti nello scompenso cardiaco dell'uomo. Inoltre, esiste anche la possibilità di uno scambio dei rispettivi ruoli tra recettori AT<sub>2</sub> e AT<sub>1</sub> (v. Cap. 7) e ciò rende anche più difficile l'accertamento delle singole responsabilità.

### 6.3 – Gli effetti sul rene

Questi effetti interessano sia la morfogenesi che le funzioni dell'apparato urinario (Matsubara 1998).

Diverse ricerche hanno dimostrato che la presenza dei recettori AT<sub>2</sub> è necessaria per lo sviluppo dell'apparato urinario: i topi, nei quali il gene di questi recettori era stato eliminato durante la vita fetale, presentano alla

nascita delle anomalie simili a quelle di una sindrome congenita dell'uomo (CAKUT), con stenosi della giunzione uretero pelvica, displasia multicistica, megauretere e reflusso vescico-ureterale (Nishimura e coll. 1999). Le malformazioni sarebbero dovute al fatto che, per la mancanza dei recettori AT2 (che stimolano l'apoptosi - v. Cap. 6.6), durante la vita fetale si verificherebbe un rallentamento dei processi apoptotici che interessano le cellule mesenchimali indifferenziate presenti nel metanefro: esse, infatti, non compaiono se i recettori AT2 sono eliminati oppure bloccati da un AT2RA dopo la nascita, quando cioè il loro numero si riduce rapidamente (Chung e coll. 1998).

Nei topi transgenici AT2R-TG con una nefrectomia di 5/6 (un modello di danno renale ischemico), sono stati osservati, invece, un aumento del numero di recettori AT2, accompagnato da una diminuita escrezione di albumina e da un'aumentata escrezione dei metaboliti del NO (Hashimoto e coll. 2003).

Sui vasi renali gli effetti variano a seconda del loro calibro, perché la stimolazione di questi recettori produce una vasocostrizione in quelli di calibro maggiore, che può essere bloccata dal PD123319 ed invece una vasodilatazione in quelli di calibro minore (che non si verifica però nelle arteriole di ratti giovani SHR), che può essere potenziata dalla somministrazione di un AT2-agonista (CGP42112) (Endo e coll. 1998).

La dipendenza della vasodilatazione dai recettori AT2 e dalla cascata BK-NO-cGMP è dimostrata dalla sua scomparsa o riduzione dopo somministrazione di un AT2RA (PD123319) o di un inibitore della sintesi del NO (L-NAME) nei ratti SD Na-depleti (Siragy e Carey 1997). Una diminuzione di queste sostanze vasodilatatrici nel RIF di ratti SD mononefrectomizzati ed un aumento della PA, sono stati osservati anche dopo eliminazione dei recettori AT2, mediante oligodesossinucleotidi-antisense (AS-ODN) (Moore e coll. 2001).

L'aumentata espressione di recettori in risposta alla Na-deplezione (Ozono e coll. 1997), suggerisce che essi controllino anche l'omeostasi del Na e dell'H<sub>2</sub>O, ma i dati in proposito sono contrastanti. Lo e coll. (1995a) hanno osservato infatti una riduzione della natriuresi dopo somministrazione di un AT2-agonista (CGP41112) ed un suo aumento dopo PD123319; quindi, questi recettori sembrerebbero impedire la escrezione del Na.

L'effetto natriuretico dell'AT2RA non è stato osservato invece da Siragy e coll. (1999a), secondo i quali i recettori AT2 amplificherebbero l'escrezione del Na. Questo effetto sarebbe mediato dal cGMP dell'interstizio renale, tramite una proteinkinasi G (Jin e coll. 2001): nei topi AT2 KO, le curve della natriuresi e della diuresi di pressione sono, infatti, spostate verso destra e questi animali eliminano il Na e l'H<sub>2</sub>O in quantità circa 3 volte minori di quelle eliminate dagli animali WT a parità di pressione di perfusione

(Gross e coll. 2000). Inoltre, il flusso renale a livello corticale e midollare è ridotto.

I recettori AT2 riducono anche la sintesi della R a livello dell'AJG (Siragy e coll. 2005): nei ratti SD a dieta iposodica e già con aumentati livelli dell'enzima, la somministrazione del PD123319 determina un ulteriore significativo aumento di essi e dell'Angiotensina II, cioè una risposta simile a quella osservata dopo somministrazione di un AT1RA (Valsartan).

Questa risposta – inaspettata dal momento che gli effetti prodotti dai 2 tipi di recettori sono generalmente di tipo opposto – suggerisce pertanto la possibilità che, in particolari condizioni, i due tipi di recettori possano anche svolgere le stesse funzioni.

#### 6.4 - Gli effetti a livello del SNC

All'inizio delle ricerche sul SRA cerebrale i recettori AT2 furono considerati di scarso significato, in quanto la loro presenza in alcune strutture del SNC che controllano prevalentemente le funzioni sensoriali (strutture limbiche, alcuni nuclei del talamo e del mesencefalo) (Buoninconti e Buoninconti 2000) sembrava escludere un loro ruolo ai fini dell'omeostasi cardiocircolatoria ed assegnava loro solo una funzione di controllo per alcune attività esplorative ed alcune risposte comportamentali. In topi AT2 KO, Hein (Hein e coll. 1995) aveva, infatti, osservato una diminuzione della sete in risposta alla privazione di acqua ed una certa instabilità emozionale, denunciata dalla diminuzione dei movimenti spontanei e del comportamento esplorativo di questi animali, soprattutto nei periodi in cui le gabbie non erano illuminate. Non era stato osservato, invece, alcun effetto in grado di controbilanciare l'azione centrale degli AT1 sui livelli pressori.

Ricerche successive hanno dimostrato però la presenza di questi recettori anche in colture di neuroni provenienti dall'ipotalamo e dal tronco encefalico di ratti neonati ed in colture di cellule neuronali indifferenziate dell'ibridoma NG108-15 (che esprimono solo recettori AT2); inoltre è stata evidenziata la loro capacità di regolare in queste cellule l'attività di *pacemaker*, mediante l'inibizione dei canali del  $Ca^{2+}$  (che diminuisce) e l'attivazione di quelli del  $K^+$  (che aumenta), con accorciamento del potenziale di azione e del periodo refrattario. Questi fenomeni – che compaiono anche dopo somministrazione di CGP42112 e che possono essere inibiti dal PD123319 – si accompagnano ad un'aumentata attività della fosfolipasi A (PLA2) ed alla generazione di acido arachidonico, e sono mediati da un metabolita di quest'ultimo – l'acido idrossieicosotetranoico (12-HETE) (Zhu e coll. 1998). Poiché l'attivazione delle correnti del  $K^+$  è uno dei fenomeni che precedono l'apoptosi neuronale, è anche possibile che tra i due eventi esista una correlazione (Yu e coll. 1997).

Nei neuroni catecolaminergici, l'Angiotensina II produce invece un effetto sequenziale, mediato da entrambe i recettori, perché prima riduce l'attività dei canali del K<sup>+</sup> tramite gli AT1 e poi la aumenta mediante gli AT2. La presenza su questi neuroni di entrambe i recettori, che producono effetti opposti, riconferma che essi sono legati da un colloquio funzionale, in virtù del quale gli AT1 darebbero inizio alla neuromodulazione, mentre gli AT2 la inibirebbero (Gelband e coll. 1997).

I recettori AT2 inibiscono anche la liberazione di NA prodotta dall'Angiotensina II a livello pre-sinaptico, come dimostra l'aumento sia di questa liberazione che della risposta pressoria alla NA esogena, osservato negli AT2 -/y (Stegbauer e coll. 2005).

L'interazione tra i due recettori sembra importante anche per quanto riguarda la liberazione di AVP e lo stimolo della sete. Pur essendo quelli AT1 i principali modulatori della liberazione di questo ormone (come dimostra la sua inibizione dopo Losartan), alcuni dati sperimentali suggeriscono tuttavia che anche gli AT2 contribuiscano a tale liberazione. Già alcuni anni or sono, mediante lo studio separato di 2 delle componenti che contribuiscono all'aumento della PA prodotta dall'Angiotensina II icv (quella angiotensinergica e quella vasopressinergica), era stato accertato che il Losartan blocca completamente soltanto la prima di esse, ma solo per il 45% la seconda. Quest'ultima poteva essere bloccata completamente solo con la somministrazione dei 2 antagonisti, quindi entrambi i recettori apparivano necessari per la liberazione dell'ormone (Toney e Porter 1993).

Secondo Unger e coll. (Hohle e coll. 1996), la somministrazione di un AT2RA potenzia invece la liberazione dell'AVP prodotta dall'Angiotensina II ed anche Li e coll (2003), dopo somministrazione di Angiotensina II icv nei topi AT2KO, hanno osservato un aumento dei livelli plasmatici dell'ormone più significativo rispetto a quello dei topi AT1KO e AT1/AT2 KO.

Anche per quanto riguarda gli effetti sulla sete prodotti dall'Angiotensina II icv, il ruolo di questi recettori appare incerto. Stando alle ricerche di Hein (Hein e coll. 1995) essi stimolerebbero la dipsogenesi, che infatti si riduce negli animali AT2KO, ma è stato anche dimostrato che la sete può essere inibita sia dagli AT1- che dagli AT2RA e che, nei ratti a dieta ipersodica, l'Angiotensina II icv aumenta la dipsogenesi, stimolando entrambi i tipi di recettori (Camara e coll. 2001). A differenza di quanto avviene per il controllo della PA e similmente a quanto avviene per la escrezione di Na, i due recettori sembrano agire in maniera sinergica sul fabbisogno idrico, che infatti aumenta dopo iniezione icv di Angiotensina II e si riduce di circa il 40% nei topi AT2KO e di circa il 60% in quelli AT1AKO, rispetto ai topi WT. Nei topi AT1AKO/AT2KO, la somministrazione di Angiotensina II è invece priva di effetti sulla dipsogenesi.

La loro presenza nelle arterie cerebrali del ratto, del coniglio e dell'uomo

fa supporre, inoltre, che i recettori AT<sub>2</sub> contribuiscano anche a modulare la risposta del circolo cerebrale all'Angiotensina II.

Normalmente questa risposta è di tipo costrittivo, è mediata dai recettori AT<sub>1</sub> e si accompagna alla liberazione di prostaglandine vasocostrittrici ed alla formazione di trombossano 2. Appare meno significativa nel cane, di maggiore entità nell'uomo, nel gatto e nel coniglio e può essere inibita da un antagonista non selettivo (Naveri 1995).

Se però questi vasi sono pretrattati con la PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , al posto della vasocostrizione compare una vasodilatazione endotelio-dipendente, particolarmente evidente nel coniglio e nel ratto, che si accompagna alla liberazione di PG vasodilatatrici. Questa vasodilatazione è mediata dai recettori AT<sub>2</sub>: negli animali al 14° giorno di vita (quando questi recettori sono più numerosi), è più significativa rispetto agli animali alla 8<sup>a</sup> settimana (quando essi sono notevolmente diminuiti); viceversa, non si verifica negli animali AT<sub>2</sub>KO (Toda e coll. 1990).

## 6.5 - Gli effetti sulla crescita e sui fenomeni proliferativi

In quel complesso programma biologico, che inizia con lo sviluppo embrionale e si realizza attraverso le diverse fasi della differenziazione cellulare, della rigenerazione tessutale e della morte cellulare programmata, i recettori AT<sub>2</sub> si inseriscono con un duplice effetto, perché da un lato inibiscono i processi proliferativi e dall'altro stimolano quelli rigenerativi (Meffert e coll. 1996; Unger 1999). Quindi l'Angiotensina II stimola la crescita, tramite i recettori AT<sub>1</sub>, ma la inibisce tramite gli AT<sub>2</sub> (Unger 1999; Stoll e Unger 2001).

Recentemente è stato dimostrato che questa inibizione si realizza grazie alla interazione della estremità C-terminale del recettore AT<sub>2</sub> con una proteina - AT<sub>1</sub>P, AT<sub>2</sub> receptor-interacting protein - che inibisce l'attivazione dell'ERK2 e la proliferazione cellulare (Nouet e coll. 2004).

Le ricerche condotte sia *in vitro*, su linee cellulari che esprimono soltanto questi recettori (NG108-15, PC12W) (Meffert e coll. 1996), sia *in vivo*, in animali nei quali l'espressione dei recettori AT<sub>2</sub> era stata bloccata o stimolata (Nakajima e coll. 1995), hanno dimostrato che l'inibizione della crescita prodotta da questi recettori - che si realizza mediante l'attivazione della fosfotirosinfosfatasi (PTP) e l'inattivazione delle MAPK (Tsuzuki e coll. 1996) - inizia già durante la vita fetale, come conferma anche il rapporto inverso tra l'AT<sub>2</sub> mRNA e la sintesi del suo DNA, evidenziata nell'aorta del topo e del ratto durante la gestazione (Cook e coll. 1994).

La capacità dei recettori di inibire i processi proliferativi è stata dimostrata anche mediante le ricerche condotte sui topi Agtr2<sup>-</sup>, ai quali era



stato applicato un manicotto in corrispondenza dell'arteria femorale: in questi animali, la formazione della neointima e la proliferazione delle CML sono apparse molto più significative di quelle osservate nei topi Agtr2+ ed anche meno sensibili al trattamento con un AT1RA (Valsartan), quindi gli effetti prodotti da questi farmaci sui fenomeni infiammatori e proliferativi affiorano più facilmente in presenza dei recettori AT2 (Wu e coll. 2001).

In colture di cellule endoteliali di coronarie di ratti SHR, che contengono recettori AT1 ed AT2 nel rapporto di 80/20, anche il gruppo di Unger (Stoll e coll. 1995) ha dimostrato che la mitogenesi prodotta dall'Angiotensina II è inibita dall'AT1RA, ma è stimolata dall'AT2RA, quindi – anche se in minoranza – i recettori AT2 si oppongono all'azione mitogenetica dell'Angiotensina II.

Una maggiore espressione di entrambi i recettori è stata, invece, osservata da Otsuka (Otsuka e coll. 1998) nelle arterie di ratti SHR, tuttavia essi sembrano avere compiti diversi: il trattamento con Losartan (o con Enalapril), oltre a normalizzare i livelli pressori, riduce infatti anche la concentrazione del collagene, mentre il PD123319 è inefficace; quest'ultimo, invece, riduce l'area di sezione del vaso, quindi i recettori AT2 agirebbero sull'ipertrofia del muscolo liscio, mentre quelli AT1 agirebbero sulla matrice extracellulare.

Questa modulazione della crescita cellulare è stata confermata anche in colture di CML di aorta di ratti di 3 mesi nelle quali era stato trasferito il vettore dell'espressione dei recettori AT2: in esse l'Angiotensina II non modifica il numero di cellule in condizioni basali, ma lo aumenta dopo PD123319. *In vivo*, dopo trasferimento del vettore recettoriale in arterie carotidi danneggiate dal passaggio di un palloncino, la neoformazione intimale si riduce di circa il 70% (Nakajima e coll. 1995) ed aumenta dopo somministrazione di un AT2RA (Pratt 1999).

A livello miocardico, l'aumentata espressione dei recettori AT2 attenua il rimodellamento post-infarto e riduce la fibrosi perivascolare delle arterie coronarie. Tali effetti possono essere aboliti dal contemporaneo trattamento con un antagonista del recettore BK2 (HOE140) o con un inibitore della sintesi del NO (L-NAME), quindi sembrano mediati dallo stesso meccanismo BK/NO-dipendente che contribuisce alla vasodilatazione prodotta da questi recettori.

A differenza dei recettori AT1, che la stimolano, gli AT2 inibiscono anche l'angiogenesi, impediscono cioè la formazione di nuovi vasi a partire da quelli preesistenti; questa caratteristica assume una particolare importanza quando si considera che in molte condizioni morbose (tra le quali in primo luogo le neoplasie) un aumento della vascolarizzazione accelera la progressione della malattia (Haendeler e Dimmeler 2004).

Nel ratto, la densità dei microvasi del muscolo cremasterico – che è ridotta dalla co-infusione di Angiotensina II e Losartan – aumenta infatti di circa il 23%, se l'Angiotensina II è infusa insieme con il PD123319, rispetto ai ratti infusi con sola Angiotensina II (Munzenmaier e Greene 1996). Inoltre, nei ratti con ischemia delle estremità, la neoformazione vasale è impedita negli animali privi del gene del recettore AT1, mentre è potenziata in quelli privi del gene di quello AT2 (Sasaki e coll. 2002; Silvestre e coll. 2002).

Il fenomeno dell'angiogenesi ha probabilmente un rapporto anche con l'apoptosi (anch'essa modulata dai recettori AT2: v. Cap. 6.6), che determina la comparsa di "spazi liberi", nei quali più facilmente si verifica la formazione di nuovi vasi (de Gasparo e Siragy 1999). Secondo Walther e coll. (2003), l'angiogenesi sarebbe, invece, regolata da un meccanismo che coinvolge sia i recettori AT1 che AT2, con azioni opposte a quelle evidenziate da altri AA, perché i recettori AT1 inibirebbero, mentre quelli AT2 stimolerebbero la comparsa del fenomeno.

La capacità di questi recettori di produrre effetti di tipo diverso è confermata dall'osservazione che essi, oltre ad inibire i processi proliferativi, stimolano quelli rigenerativi e la differenziazione cellulare (Unger 1999, Gallinat e coll. 2000). Tali effetti sono particolarmente evidenti nel SNC e nella cute.

In due linee di colture cellulari (NG 108-15 e PC12W), l'Angiotensina II, mediante i recettori AT2, inibisce infatti la proliferazione cellulare, ma nello stesso tempo stimola la crescita dei neuriti e regola i neurofilamenti (Meffert e coll. 1996; Laflamme e coll. 1996). Queste modifiche si accompagnano ad un'abnorme espressione di alcune proteine del citoscheletro, in particolare della subunità M del neurofilamento e delle proteine associate al microtubulo (Stroth e coll. 1998; Kaschina e Unger 2003). Gli stessi fenomeni sono stati osservati anche in colture di cellule cerebellari: la stimolazione dei recettori AT2 produce anche in queste cellule un allungamento dei neuriti, una significativa migrazione cellulare ed un'aumentata espressione della proteina neurone-specifica  $\beta$  III-tubulina e delle proteine del microtubulo  $\tau$  e MAP 2 (Cote e coll. 1999). Alla comparsa di questi fenomeni contribuisce anche la liberazione di NO (Kaschina e Unger 2003).

Effetti significativi sono stati evidenziati anche a livello del sistema nervoso periferico, ove i recettori AT2 modulano la produzione di fattori neurotrofici, la degenerazione mielinica e la preparazione delle cellule di Schwann per la sintesi di nuovi involucri mielinici (Unger 1999). Inoltre, la loro espressione è aumentata nelle fibre nervose danneggiate con metodiche diverse. Dopo sezione del n. sciatico, sia nei segmenti del nervo che nei neuroni gangliari della radice dorsale si verifica infatti un aumento del-

l'AT2 mRNA, che si riduce verso il 50° giorno, in parallelo con la rigenerazione nervosa (Gallinat e coll. 1998). Un effetto simile è stato osservato anche nei ratti con schiacciamento del nervo ottico: l'introduzione nel vitreo di questi animali di una schiuma di collagene arricchita con Angiotensina II migliora la rigenerazione assonale delle cellule gangliari retiniche, mentre il trattamento con un AT2RA la peggiora (Lucius e coll. 1998).

Un'azione riparatrice è stata evidenziata anche nelle lesioni della cute, nelle quali si verifica un aumento della interleukina-1 $\beta$ , che stimola l'espressione dei recettori AT2, mentre quella dei recettori AT1 si riduce (Viswanathan e coll. 1992).

## 6.6 - I recettori AT2 e l'apoptosi

Secondo la definizione di Kerr (Kerr e coll. 1972) con il termine di apoptosi o di morte cellulare programmata, si intende un particolare tipo di morte cellulare, diverso dalla necrosi, perché in esso la cellula partecipa attivamente alla propria distruzione, dando luogo ad una serie stereotipata di risposte geneticamente programmate, che inizia con il distacco della cellula destinata ad autodistruggersi da quelle vicine e si conclude con la rottura del suo DNA e con la frammentazione del corpo cellulare in piccoli palloncini, i corpi "apoptosici", che sono rapidamente fagocitati dalle cellule circostanti.

Questo fenomeno – che è stato osservato in tutte le specie viventi finora esaminate, dal verme *Caenorhabditis Elegans* all'uomo (Ameisen 1999) – funziona come un orologio interno, che interviene sia durante la vita fetale che in età adulta in particolari momenti del programma biologico (sviluppo embrionale, *turnover* di tessuti vecchi o danneggiati), quando cioè l'organismo deve distruggere quella parte di sé diventata inutile, per poi rigenerarsi nuovamente. Entro questi limiti, l'apoptosi rappresenta pertanto un normale meccanismo di controllo della massa cellulare, anche se per molti aspetti rimane ancora un fenomeno misterioso, con connotazioni anche religiose ed esistenziali (Ameisen 1999).

In alcune condizioni morbose, diverse per eziopatogenesi e quadro clinico (che vanno dal morbo di Alzheimer a quello di Parkinson, alle neoplasie, al diabete, all'aterosclerosi, allo scompenso ed alla IA) (Hamet e coll. 1995), il meccanismo con cui si realizza questo fenomeno può tuttavia alterarsi, determinando la rottura dell'equilibrio esistente normalmente tra i processi pro- e quelli anti-apoptosici, dai quali dipende la sopravvivenza delle cellule o la loro morte programmata (Abdel-Rahman e Siragy 2004), per cui qualche autore si è chiesto se questo fenomeno sia sempre un evento benefico oppure se può essere anche dannoso per l'organismo vivente, che si

trova a dovere scegliere tra la sua sopravvivenza e la morte delle sue cellule (*"the apoptotic dilemma"*) (de Gasparo e Siragy 1999).

Anche se la sua partecipazione alla comparsa dell'apoptosi è stata recentemente messa in dubbio (Kong e coll. 2000), numerosi dati suggeriscono tuttavia che l'Angiotensina contribuisce a questo fenomeno (Cigola e coll. 1997, Diez e coll. 1997, Suzuki e coll. 2002), e che i recettori AT2 hanno un ruolo determinante (Dimmeler e coll. 1997, Horiuchi e coll. 1997, Tea e coll. 2000, Suzuki e coll. 2000).

Già negli anni '90 era stato dimostrato che i fenomeni di condensazione nucleare e frammentazione del DNA che si verificano in colture di cellule PC12W e R3T3 prive di siero, possono essere bloccati da un AT2RA, oppure dal vanadato (che inibisce la tirosinfosfatasi), ma non da un AT1RA (Yamada e coll. 1996). Questo blocco si spiega con la capacità dei recettori AT2 di attivare la MAP-kinasi fosfatasi-1 (MPK-1), con conseguente inibizione della MAPK (de Gasparo e Siragy 1999); tale attivazione, oltre alle ERK1 ed ERK2, riduce anche l'espressione della Bcl-2 (*B-cell leukemia 2 protein*), che è una proteina antiapoptosica, e contemporaneamente determina una *upregulation* della proteina Bax, che invece è una proteina proapoptosica (Fig. 22). Un aumento della Bcl-2 è stato osservato, invece, dopo delezione di questi recettori AT2 (Silvestre e coll. 2002; Suzuki e coll. 2002).

Come hanno dimostrato sia il gruppo di Unger (Gallinat e coll. 1999) che Berry (Berry e coll. 2001), in via alternativa i recettori AT2 possono indurre l'apoptosi anche stimolando la ceramide, che regola la via Jnk-SAPK: dopo stimolazione con Angiotensina II, i livelli di questo sfingolipide aumentano nelle colture di cellule PC12W (Horiuchi e coll. 1998) e, contemporaneamente, si attivano alcune kinasi da stress, le caspasi, in particolare la caspasi 3 (Blume e coll. 2001). La co-incubazione delle cellule PC12W con il PD123319 inibisce la comparsa di questi fenomeni (Gallinat e coll. 1999).

Non ancora definiti sono i rapporti del NO con l'apoptosi. Secondo Pollman (Pollman e coll. 1996), dopo aggiunta di donatori di NO, SNP oppure SNAP, alle colture di CML, l'apoptosi aumenterebbe di ben 4 volte; secondo Dimmeler (Dimmeler e coll. 1997), i donatori di NO antagonizzerebbero invece la capacità dell'Angiotensina II di indurre il fenomeno nelle colture di cellule HUVEC. Questi risultati così diversi potrebbero essere dovuti alla capacità del NO di indurre l'apoptosi a dosi elevate (come quelle usate da Pollman), e di inibirla a dosi più basse.

Affinché questi meccanismi attivati dagli AT2 diventino operanti, è necessario che la III ansa intracellulare di questi recettori si leghi con le proteine  $\text{Gi}\alpha 2$  e  $\text{Gi}\alpha 3$  in corrispondenza della sequenza aminoacidica 240-244 ed, eventualmente, anche con quella 245-249 (Horiuchi e coll. 1998; Lethonen e coll. 1999). Secondo Miura e Karnik (2000) l'apoptosi può verificarsi anche in assenza di questo legame ed in presenza soltanto di un'aumenta-

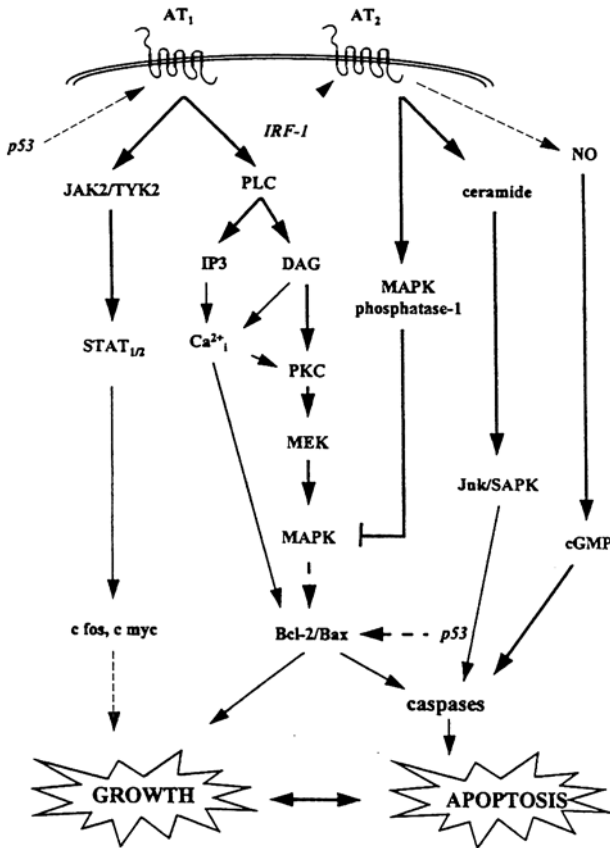


Fig. 22. Gli effetti sull'apoptosi prodotti dai recettori AT2 confrontati con quelli prodotti dai recettori AT1 (Da: de Gasparo e Siragy 1999, con autorizzazione)

ta espressione dei recettori AT2, già di per sé capaci d'inviare un segnale sufficiente (*the source of a death signal*) per la comparsa del fenomeno. È anche possibile che tra la Cys35 e la Cys290 di 2 recettori AT2 si crei un legame, per cui si verifica un fenomeno di omo-oligodimerizzazione a livello della membrana cellulare, capace di dar luogo all'apoptosi indipendentemente dalla conformazione del recettore stesso (Miura e coll. 2005).

Anche gli AT1RA, che riducono l'ipertrofia cardiaca ed aortica, producono un aumento transitorio dell'apoptosi in queste strutture, con un meccanismo che appare tuttavia pressione-indipendente. In ratti SHR trattati con Losartan o Valsartan, Tea e coll. (2000) hanno osservato un aumento della frammentazione del DNA ed una riduzione significativa della massa aortica, del numero delle CML e della sintesi del DNA. Tali effetti potevano essere inibiti da un AT2RA.

Nei ratti SHR, l'induzione dell'apoptosi è particolarmente significativa nelle prime settimane di trattamento con questi farmaci, ma appare cronologicamente dissociata dalla riduzione pressoria, per cui tra i due fenomeni – morte cellulare programmata e diminuzione della PA – esisterebbe una finestra temporale (*time window*) (de Blois e coll. 1997).

## 6.7 - Gli effetti sull'aterogenesi

I recettori AT<sub>2</sub> contribuiscono a ritardare anche lo sviluppo della aterogenesi, agendo anche in questo tipo di patologia in senso opposto ai recettori AT<sub>1</sub>, che invece tendono a favorirla. Negli animali ApoE<sup>-/-</sup> Agtr2<sup>-</sup>, alimentati con una dieta ricca di colesterolo, l'area infiltrata dai macrofagi, dai lipidi e dal colesterolo appare, infatti, di dimensioni significativamente maggiori rispetto agli animali ApoE<sup>-/-</sup> Agtr2<sup>+</sup> (Sales e coll. 2005). Questi fenomeni sono accelerati dalla somministrazione di un AT<sub>2</sub>RA (Daugherty e coll. 2001). Anche nello studio di Hirano (Hirano e coll. 2006), l'infusione di Angiotensina II, insieme con il PD123319, ha prodotto un aumento dei livelli di colesterolo, probabilmente perché l'AT<sub>2</sub>RA impedisce ai recettori AT<sub>2</sub> di legarsi all'Angiotensina II, e favorisce invece il legame di quest'ultima con quelli AT<sub>1</sub>.

Secondo altri AA (Johansson e coll. 2005), nonostante l'aumentata espressione del loro mRNA, questi recettori non avrebbero invece alcun ruolo nella comparsa della malattia aterosclerotica, dal momento che il loro blocco con PD123319 è privo di effetti sull'evoluzione della malattia. Un altro studio molto recente (Ran e coll. 2005) ha dimostrato, invece, che la somministrazione di PD123319 blocca la produzione di trigliceridi a livello epatico, che sembrerebbe quindi mediata da questi recettori.

I motivi in grado di spiegare questi risultati così diversi possono essere di vario tipo: ad es. il ceppo studiato, il sesso di questi animali ed anche la relativa selettività degli AT<sub>2</sub>RA (che quando sono somministrati ad alte dosi possono funzionare anche come degli AT<sub>1</sub>RA), per cui il rapporto di questi recettori con l'eterogenesi rimane ancora incerto.

# Le risposte atipiche dei recettori AT1 ed AT2 – Il *crossstalk* e la dimerizzazione

## 7.1 - Le risposte atipiche

Dopo averli identificati, i fisiologi ed i farmacologi hanno dimostrato che i recettori AT1 ed AT2 funzionano come delle strutture con compiti separati, ciascuno capace di legare ed attivare GPs specifiche e di produrre risposte altrettanto specifiche (Timmermans e coll. 1993; de Gasparo e coll. 2000).

Secondo questo paradigma, i due recettori lavorerebbero in opposizione, nel senso che quelli AT2 – con la loro azione vasodilatatrice, antiproliferativa e pro-apoptosica – sarebbero in grado di bilanciare l'azione vasocostritttrice, proliferativa ed anti-apoptosica espletata dai recettori AT1, in modo da modulare le azioni del SRA sulle funzioni cardiocircolatorie (Unger 1999).

Questa diversità di effetti, che aveva portato alla distinzione tra recettori intrinsecamente “buoni” (quelli AT2) e recettori intrinsecamente “cattivi” (quelli AT1), oggi appare tuttavia meno accettabile in quanto, a seconda del contesto in cui lavora, ciascuno dei due sottotipi può in realtà fornire risposte diverse da quelle “classiche” e simili a quelle prodotte dall'altro recettore, oppure può abdicare al ruolo che esso dovrebbe svolgere (Schneider e Lorell 2001).

Come ha dimostrato il gruppo di Harada (Harada e coll. 1998), i topi privati del gene del recettore AT1 (AT1KO) e con stenosi dell'aorta a vari livelli, 40 giorni dopo l'applicazione del bendaggio aortico presentano un'ipertrofia miocardica ed un aumento pressorio di entità simile a quella osservata nei topi WT. Inoltre, la neoformazione dell'intima prodotta dal passaggio di un catetere in un'arteria carotide di questi animali si verifica in maniera simile nei due ceppi, e non può essere inibita né da AT1 – né da un AT2RA. Anche lo studio di Hamawaki (Hamawaki e coll. 1998) ha dimostrato che, dopo bendaggio aortico, sia il gradiente pressorio che il rapporto peso corporeo/massa ventricolare sinistra nei ratti AT1KO, sono simili a quelli dei ratti WT.

La comparsa delle alterazioni citate anche in assenza degli AT1 suggerisce pertanto due conclusioni: 1) questi recettori non sono indispensabili per il verificarsi dell'ipertrofia da sovraccarico e del danno vascolare e 2)

l'Angiotensina II può indurre modificazioni strutturali utilizzando due vie, una AT1-dipendente e l'altra AT1-indipendente. Quest'ultima sarebbe quella utilizzata dagli animali AT1KO, in quanto in essi, a differenza degli animali WT, il Losartan è inefficace nel prevenire i processi proliferativi.

A conclusioni diverse portano invece i risultati di Ford (Ford e coll. 1998), secondo il quale la presenza dei recettori AT1 sarebbe necessaria per la ripresa funzionale del cuore post-ischemico, in quanto nei ratti SD la somministrazione di Losartan produce un peggioramento del danno da ischemia/riperfusion.

Inoltre, nelle arterie di resistenza isolate dal muscolo gracilis di ratti normotesi SD, la vasodilatazione in risposta all'ipossia, che è abolita da una dieta ipersodica che riduce i livelli di Angiotensina II, può essere ripristinata dall'infusione del polipeptide, da solo o con un AT2RA; mentre la co-infusione dell'Angiotensina II con un AT1RA oppure con entrambi gli antagonisti impedisce la ricomparsa della risposta vasodilatatrice al polipeptide (Weber e Lombard 2001). Questi risultati dimostrerebbero che: 1) l'Angiotensina II circolante migliora la funzione vasale; 2) tale effetto è mediato dai recettori AT1, dal momento che non si verifica dopo somministrazione di un AT1RA; 3) l'aumento pressorio, piccolo ma significativo, che compare dopo infusione per tre giorni di PD123319, indica che l'attivazione del recettore AT2 ha un effetto depressorio.

Nei topi transgenici con aumentata espressione dei recettori AT1 a livello miocardico, pur essendo normali i livelli pressori, fin dalla nascita compaiono ipertrofia degli atri e dei ventricoli e bradicardia, che portano rapidamente a morte questi animali per scompenso (Hein e coll. 1997b; Paradis e coll. 2000). Questi recettori appaiono pertanto capaci di produrre delle alterazioni strutturali e di modificare la conduzione dello stimolo, indipendentemente dal loro effetto sulla PA.

La capacità dei recettori dell'Angiotensina II di lavorare secondo schemi diversi da quelli loro assegnati mediante l'uso di antagonisti specifici è, d'altronde, una caratteristica non solo di quelli AT1 ma anche di quelli AT2 ("AT2, *Judgement Day*": Schneider e Lorell 2001).

Fin dagli anni '90 Levy (Levy e coll. 1996) aveva dimostrato che in ratti normotesi WK il Losartan, somministrato insieme all'Angiotensina II, impedisce l'aumento pressorio prodotto da quest'ultima, ma non riduce in maniera significativa le alterazioni strutturali che compaiono in sede aortica; viceversa, il PD123319 è inefficace nei confronti dell'ipertensione e non modifica i livelli plasmatici del polipeptide e la reattività ad esso, ma impedisce o riduce l'espressione della matrice extracellulare ed i processi di crescita delle CML, che appaiono pertanto mediati dai recettori AT2.

Più recentemente, anche il gruppo di Ichihara (Ichihara e coll. 2001), do-



po somministrazione per tre settimane di Angiotensina II a dosi ipertensivanti in due ceppi di topi (uno con delezione del gene del recettore AT2 (Agtr2 *-/-*) e l'altro WT), ha osservato un eguale aumento pressorio nei due ceppi, ma l'ipertrofia era presente solo nel secondo gruppo ed assente nel primo. Un altro studio (Senbonmatsu e coll. 2000) ha dimostrato che, a differenza di quanto avviene negli animali WT, in quelli AT2KO il bendaggio dell'aorta non si accompagna ad ipertrofia miocardica oppure ad alterazioni della funzione contrattile, pur essendo l'aumento pressorio eguale nei due ceppi. Un miglioramento della ripresa funzionale dopo somministrazione di PD123319 è stato osservato anche nel cuore isolato di ratto sottoposto ad ischemia/riperfusion (Xu e coll. 2002).

I topi transgenici con un aumentata espressione dei recettori AT2 a livello miocardico sviluppano, inoltre, una miocardiopatia dilatativa con ipertrofia dei miociti (Yan e coll. 2003). Un aumento dell'ipertrofia prodotta dall'Angiotensina II è stato osservato anche nei ratti SD nei quali, mediante la tecnica dell'adenovirus ricombinante, era stato prodotto un aumento di questi recettori rispetto a quelli AT1 (D'Amore e coll. 2005).

Nel complesso, questi dati sembrano mettere in dubbio il concetto a lungo accettato, secondo il quale i recettori AT2 si contrappongono al ruolo vasoattivo di quelli AT1, perché dimostrano che essi possono essere anche inefficaci nei confronti dell'aumento pressorio e del danno d'organo prodotto dai recettori AT1, e che, invece di inibire, possono anche stimolare l'angiogenesi e la proliferazione cellulare (D'Amore e coll. 2005).

Questi risultati, a prima vista difficili da spiegare, si comprendono meglio se considerati secondo un'ottica meno rigida, che assegna ad entrambe i recettori la responsabilità del danno cardiovascolare, dell'ipertrofia e dei processi proliferativi: sia le variazioni del Ca<sup>+</sup> nucleare che l'aumento del fattore nucleare di trascrizione prodotti dal polipeptide, appaiono infatti mediati da entrambi i recettori (Munzenmaier e coll. 1995) per cui le alterazioni strutturali prodotte dall'Angiotensina II possono essere attenuate sia da un AT1- che da un AT2RA (Cao e coll. 1999; D'Amore e coll. 2005).

Questa comune responsabilità appare evidente anche per quanto riguarda l'apoptosi, che è generalmente considerata legata ai recettori AT2, ma che può essere prodotta anche da quelli AT1. I dati di Cigola (Cigola e coll. 1997) e di Diep (Diep e coll. 2002) dimostrano che la somministrazione di Losartan blocca la comparsa di questo fenomeno nei miociti ventricolari dopo esposizione all'Angiotensina II, mentre il PD123319 è inefficace. Anche altri AA (Fortuno e coll. 1998; Li e coll. 1999), dopo stimolazione dei recettori AT1, hanno osservato un aumento dell'apoptosi, sia in colture cellulari (HCAEC) che nel ventricolo di ratti normotesi WK, ed una sua diminuzione dopo Losartan. Nessun effetto è stato, invece, osservato dopo PD123319

(Li e coll. 1999). Inoltre, nei topi transgenici, l'aumentata espressione dei recettori AT2 non si accompagna ai fenomeni di frammentazione del DNA caratteristici dell'apoptosi (Sugino e coll. 2001). Quindi, stando a questi risultati, i mediatori del fenomeno sarebbero i recettori AT1 piuttosto che quelli AT2. A conferma di questa possibilità, anche Akishita e coll. (2005) hanno dimostrato che nei ratti l'apoptosi prodotta da uno stress ossidativo (applicazione intracarotidea di una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) può essere inibita da un AT1RA (Olmesartan), mentre l'AT2RA PD123319 è inefficace.

Secondo Berry (Berry e coll. 2001) la capacità dei recettori AT1 di sostituirsi a quelli AT2 o, comunque, di collaborare con essi alla comparsa dell'apoptosi, dimostrerebbe che anche questo fenomeno è il risultato delle azioni combinate di entrambi i recettori. Il fatto che nelle colture di HUVEC l'apoptosi prodotta dalla stimolazione dei recettori AT2 possa essere inibita soltanto dalla somministrazione, insieme all'Angiotensina II, di un AT1- e di un AT2RA (Dimmeler e coll. 1997), sembra avallare questa possibilità; alle stesse conclusioni conducono anche i risultati di Goldenberg (Goldenberg e coll. 2001), che ha osservato l'inibizione del fenomeno dopo somministrazione di Irbesartan più PD123319. Un aumento dell'apoptosi è stato osservato anche in CML di aorta di ratti WK, dopo attivazione sia dei recettori AT1 (mediante PD123319) che di quelli AT2 (mediante Losartan) (Diep e coll. 1999).

## 7.2 - Il *crosstalk* e la dimerizzazione

Tra i diversi meccanismi capaci di modificare la risposta di questi recettori, bisogna considerare anche il colloquio funzionale con il quale essi comunicano fra loro e con i recettori di altri sistemi e che permette loro di lavorare "in maniera concomitante ed interdipendente" (Widdop e coll. 1993).

Gli effetti di questo colloquio variano a seconda delle strutture esaminate: ad es., nel cuore e nelle CML dell'aorta esso permette ai due recettori di controllare sia l'emodinamica che la proliferazione cellulare (Xoriuchi e coll. 1999); invece, nelle cellule neuronali, controlla la differenziazione, la crescita dei neuriti e la *upregulation* della T4-Tubulina (Laflamme e coll. 1996; Stoll e Unger 2001).

Anche le modalità con cui si realizza tale colloquio sono diverse a seconda dell'ambiente in cui esso si verifica.

Infatti, in topi sani a dieta normosodica l'infusione di Angiotensina II dà luogo ad un aumento delle RVP, che può essere attenuato dal trattamento con Losartan, mentre quello con PD123319 è inefficace (Schuijt e coll. 1999). Quindi, in condizioni normali, i recettori AT2 non sembrano parte-

cipare alla regolazione della risposta vascolare (Garcha e coll. 1999) ed il colloquio non sembra operante. Viceversa, lo diventa in condizioni di aumentata attività del SRA: nei ratti a dieta iposodica, l'azione ipotensivante del Valsartan si associa ad un aumento della BK, del NO e del cGMP nel RIF, che può essere inibito dal PD123319 (Siragy e coll. 2000) e che, pertanto, appare mediato dai recettori AT2, che stimolano il sistema delle BK. Oltre che tra i due recettori, esiste dunque un colloquio tra essi e quelli del sistema BK (Fig. 23), come dimostra anche l'ipertensione che compare nei ratti BK2KO (Cervenka e coll. 2001).

L'interazione tra i due recettori interessa anche il controllo della crescita cellulare e la comparsa della ipertrofia: nelle CML, in cui sia stato trasferito il cDNA dei recettori AT2, la fosforilazione della Tirosina e della Serina delle STAT, mediata dai recettori AT1, viene infatti inibita e l'espressione del c-fos ridotta, e ciò suggerisce l'esistenza di un colloquio negativo tra i due recettori (Horiuchi e coll. 1999a e b). L'attivazione dei recettori AT2 a livello intestinale favorisce, invece, una ritenzione di H<sub>2</sub>O e di Na, controbilanciata da quelli AT1 (Jin e coll. 1998). Anche nelle colture di neuroni provenienti dall'ipotalamo e dal tronco encefalico di ratto, l'induzione di ERK1 e 2, mediata dai recettori AT1, avviene sotto il controllo tonico di quelli AT2 (Huang e coll. 1996).

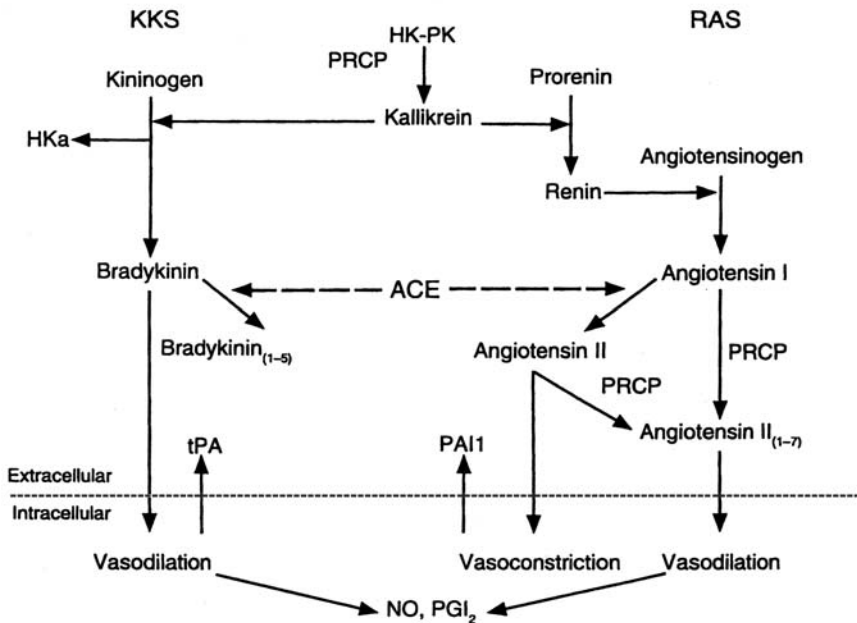


Fig. 23. Il colloquio tra il SRA e quello delle kinine (Da: Schmaier 2003, con autorizzazione)

Dati molto recenti suggeriscono che a questo colloquio contribuisce anche la dimerizzazione. Tale fenomeno – che introduce un nuovo concetto rispetto alle precedenti teorie, basate sui legami tra i ponti disolfuro e sulle interazioni tra i domini intramembranali (Barki-Harrington 2004) – è stato osservato per la prima volta dal gruppo della Quitterer (AbdAlla e coll. 2001a), che in cellule di tipo diverso ed in biopsie di miometrio umano ha dimostrato la capacità del recettore AT2 di legarsi a quello AT1, in modo da stabilizzarlo nella sua struttura, e quindi impedire ad esso di legarsi alle GPs e di attivare la cascata dei segnali.

Questo legame – che per realizzarsi richiede l'intervento della transglutaminasi-XIIIA, il cui principale punto di attacco è la glutamina 315 della terminazione carbossilica del recettore AT1 (AbdAlla e coll. 2004) – fa sì che il recettore AT2 diventi l'antagonista naturale di quello AT1 (AbdAlla e coll. 2001b) e configura il primo esempio di un GPCR in grado di agire come antagonista recettoriale specifico.

Oltre che fra di loro, i recettori AT1 ed AT2 possono anche dimerizzarsi con quelli di altri sistemi biologici (Barki-Harrington 2004), con importanti implicazioni sia per la farmacologia, perché la dimerizzazione modifica le risposte a ciascuno di essi, sia per la fisiopatologia di alcune forme morbose: nell'eclampsia, infatti, si verifica la formazione di eterodimeri stabili tra i recettori AT1 e quelli BK2, accompagnata dal contemporaneo aumento delle proteine  $G\alpha_q$  e  $G\alpha_i$ , che sono quelle utilizzate dai recettori AT1 per l'attivazione del segnale (AbdAlla e coll. 2000). Una eterodimerizzazione è stata osservata anche tra il recettore AT2 e quello B2 (Abadir e coll. 2006). A loro volta AbdAlla e coll. (2004) e Thomas e coll. (2005) hanno dimostrato che la maggior adesione dei monociti all'endotelio vasale – che caratterizza sia i topi dislipidemici che i soggetti ipertesi, si accompagna ad un elevato numero di recettori dimerizzati ed ad un aumento della transglutaminasi-XIIIA, che catalizza questa dimerizzazione.

Come è stato già anticipato nel Capitolo 1, anche il recettore Mas – che è un recettore endogeno per l'Ang(1-7) (Santos e coll. 2003) – è capace di etero-oligodimerizzarsi con il recettore AT1 e di inibire, così, le azioni dell'Angiotensina II mediate da quest'ultimo; per questa sua caratteristica anche il recettore Mas dovrebbe essere considerato pertanto come un antagonista fisiologico del recettore AT1 (Kostenis e coll. 2005).

# Il recettore AT4

### 8.1 - La distribuzione e la farmacologia del recettore AT4

Questo recettore è ampiamente distribuito in numerosi organi (Wright e coll. 1995; Vauquelin e coll. 2002).

Nel cervello, esso è stato identificato sia nei neuroni che negli astrociti, in quantità maggiori dei recettori AT1 ed AT2 (Chai e coll. 2004). Nel topo, nella pecora, nella scimmia macaca e nell'uomo la sua presenza è particolarmente significativa nelle strutture associate alle funzioni cognitive (n. basale di Meynert, cellule piramidali del corno di Ammone, neocortex), nelle quali la sua distribuzione è sovrapponibile a quella dei neuroni colinergici ed alle loro proiezioni. Concentrazioni piuttosto elevate sono state evidenziate anche nelle regioni che controllano l'attività motoria (corteccia motrice, n. talamico-ventrolaterale, n. olivare inferiore, n. rosso, n. oculomotore, sostanza nigra) ed in alcune regioni importanti per le funzioni sensoriali (Chai e coll. 2000).

Recettori AT4 sono presenti anche nel cuore (cardiomiociti, epicardio, endocardio, fibroblasti) e nei vasi (cellule endoteliali delle arterie coronarie e dell'aorta, CML) (Hanesworth e coll.1993). Dopo rimozione dell'endotelio, il loro numero aumenta sia nella media che nella neointima dell'arteria carotide di coniglio (Moeller e coll. 1999).

Nel rene, essi sono stati evidenziati nella porzione più esterna della midollare, ed in quantità minori, anche nella corticale, compresi i tubuli prossimali e distali e nei vasi renali (Handa e coll. 1998). Un aumento del loro numero di circa il 30% è stato osservato nei ratti WKY mantenuti a dieta ipersodica.

Una certa quantità di recettori AT4 è presente anche nella vescica e nella prostata, a livello dell'epitelio ghiandolare, ma – similmente a quanto accade per i recettori AT1 – essi diminuiscono nell'ipertrofia prostatica benigna, probabilmente perché la maggiore stimolazione ad opera dell'Angiotensina IV (che è aumentata), stimola la loro internalizzazione (Dinh e coll. 2001).

Farmacologicamente, questi recettori si differenziano da quelli AT1 ed AT2 perché mostrano una elevata affinità per l'Angiotensina IV e per alcu-

ni suoi analoghi peptidici (Norleucina1-Angiotensina IV e Norleucinal) ed un'affinità molto minore per l'Angiotensina II; inoltre, non riconoscono gli antagonisti dei recettori AT1 ed AT2 (Vauquelin e coll. 2002).

Determinante per il loro legame con l'Angiotensina IV è la presenza nella molecola di quest'ultima della Valina in posizione N-terminale: infatti, la delezione di questo aminoacido, oppure l'aggiunta di Arginina (che prolunga la terminazione) riducono l'affinità del recettore per il ligando (Sardinia e coll. 1993; Bernier e coll. 1995). Una diminuzione dell'affinità è stata osservata anche per effetto dei cationi divalenti  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  (Bernier e coll. 1995).

L'antagonista specifico dell'AT4 è il Divalinal-Angiotensina IV; tuttavia il suo ruolo è ancora controverso, in quanto può comportarsi anche da agonista e dar luogo a risposte simili a quelle prodotte dall'esapeptide (Vauquelin e coll. 2002).

Secondo Moeller (Moeller e coll. 1997), i recettori AT4 potrebbero anche essere gli obiettivi cellulari di altri peptidi, tra cui la LVV-emorfina 7, ottenuta per idrolisi della catena  $\beta$  dell'emoglobina, che dimostra una significativa affinità per essi. Secondo ricerche più recenti, questo recettore si identificherebbe invece con l'IRAP, che ha le stesse dimensioni e la stessa distribuzione ed è anch'esso capace di legare l'Angiotensina IV (Chai e coll. 2004) (v. Cap. 1).

Anche la transduzione del segnale è diversa da quella dei recettori AT1 ed AT2 (Von Bohlen und Halbach 2003): gli AT4 si internalizzano in misura agonista-dipendente, ma non sembrano legati alle GPs e la loro stimolazione non modifica nessuno dei secondi messaggeri (cAMP,  $Ca^{2+}$ , inositolfosfato, acido arachidonico).

## 8.2 - Gli effetti prodotti dai recettori AT4

Questi effetti interessano numerosi organi ed in particolare, il cervello (Mustafa e coll. 2001). L'Angiotensina IV agisce positivamente sulla memoria che, dopo stimolazione degli AT4-R, appare migliorata in diverse specie, dall'uomo al granchio *Chasmagnathus* (Delorenzi e coll. 1997). L'effetto è particolarmente evidente nell'ippocampo, nelle cui cellule piramidali l'Angiotensina IV determina un aumento dell'immunoreattività del cfos, non modificato dagli AT1- e dagli AT2RA, tuttavia esso è stato osservato anche nel SFO, nell'ipotalamo laterale e nell'amigdala (Von Bohlen und Halbach 2003): in queste strutture, l'attivazione dei recettori AT4 si accompagna alla liberazione di acetilcolina, che è potenziata dall'agonista Angiotensina IV e dalla LVV-emorfina-7 ed attenuata dall'antagonista specifico Divalinal (Lee e coll. 2001). In diverse specie animali, l'iniezione di

questa Angiotensina potenzia anche la memoria della *passive avoidance* ed accelera la soluzione dei problemi di orientamento spaziale (*water maze task*) (Delorenzi e coll. 1997). Lo stesso effetto è stato osservato dopo iniezione icv di un omologo dell'Angiotensina IV, la Nle<sup>1</sup>-AngIV, che attenua il *deficit* di apprendimento spaziale che compare dopo lesione della via prefrontale bilaterale. Il trattamento con Divalinal interferisce, invece, negativamente con l'acquisizione di queste strategie del comportamento (Wright e coll. 1999).

A differenza degli AT1, gli AT4-R aumentano anche il flusso cerebrale (Von Bohlen und Halbach 2003) ed a questa vasodilatazione (che può essere bloccata dal Divalinal) contribuisce il NO, di cui l'Angiotensina IV aumenta la sintesi e la liberazione: un aumento del flusso si verifica, infatti, solo dopo un pretrattamento con L-arginina, mentre il pretrattamento con L-NAME impedisce la sua comparsa (Kramar e coll. 1998). Poiché l'Angiotensina IV mobilita anche il Ca<sup>2+</sup> dai depositi intracellulari, non si può escludere che anche questo ione contribuisca alla comparsa del fenomeno (Chen e coll. 2000).

Questi effetti sul flusso sono tuttavia ancora controversi, perché è stato visto che l'Angiotensina IV ad alte dosi può produrre anche una vasocostrizione, particolarmente evidente a livello del circolo mesenterico e del treno posteriore dell'animale. Tale fenomeno appare mediato dai recettori AT1, perché può essere inibito dal Losartan e dal Candesartan, ma coinvolge probabilmente anche quelli AT2, in quanto gli AT2RA aumentano la risposta pressoria al peptide (Loufrani e coll. 1999).

Risultati contrastanti sono stati ottenuti anche per quanto riguarda il rene. Dopo infusione di Angiotensina IV nell'arteria renale, alcuni AA (Von Bohlen und Halbach 2003) hanno osservato, indipendentemente dai livelli pressori, un aumento del flusso, probabilmente legato alla liberazione di NO dalle cellule endoteliali, che può essere bloccato dal Divalinal; altri AA (Fitzgerald e coll. 1999; Hamilton e coll. 2001) hanno osservato, invece, una diminuzione dose-dipendente di esso.

Dopo infusione dell'esapeptide nell'arteria renale, aumenta anche la natriuresi e, con essa, la concentrazione di Na nelle urine, senza modifiche del GFR, del volume urinario e delle concentrazioni plasmatiche di Na; quindi, l'Angiotensina IV produrrebbe una serie di effetti opposti a quelli prodotti dall'infusione di Angiotensina II (Hamilton e coll. 2001).

La stimolazione dei recettori AT4 produce effetti anche sulla mitogenesi e sui processi trofici (Mustafa e coll. 2001). In fibre simpatiche di pollo all'11° giorno di vita embrionale, la loro stimolazione inibisce la crescita dei neuriti (quindi essi potrebbero contribuire anche al controllo dello sviluppo neuronale) ed aumenta di circa l'80% la sintesi del DNA in colture

cellulari di neuroblastoma dell'uomo (Mustafa e coll. 2001). Un'azione trofica è stata osservata anche sulle cellule di anteipofisi del ratto, nei fibroblasti di coniglio e nei confronti dell'atrofia della papilla renale che compare nei ratti AgnKO. Un aumento della mitogenesi per effetto dell'Angiotensina IV è stato osservato nei cardiomiociti di pollo ed un aumento della sintesi di DNA e di RNA nei fibroblasti cardiaci di coniglio e di ratto. L'Angiotensina IV sembra anche opporsi all'apoptosi (Kakinuma e coll. 1997).

La stimolazione dei recettori AT<sub>4</sub> con Angiotensina IV aumenta, in misura dose-dipendente, anche la produzione di PAI e l'espressione del suo mRNA nelle cellule di coronarie dell'uomo (Metha e coll. 2002).



### L'Ang-(1-7) ed il suo recettore

L'ipotesi che l'Ang-(1-7) abbia un suo recettore specifico, capace di attivare segnali diversi da quelli attivati dai recettori AT1 ed AT2, è nata dall'osservazione che le sue numerose azioni sono in linea di massima opposte a quelle espletate dall'Angiotensina II, e quindi devono essere necessariamente mediate da recettori diversi da quelli AT1 ed AT2.

Già negli anni '90 in alcune linee cellulari, come le cellule endoteliali di aorta di bue (BAEC), l'endotelio delle coronarie di cane e l'albero vascolare del ratto (Santos e coll. 1994; Tallant e coll. 1997) erano stati evidenziati dei siti di legame specifici per l'Ang-(1-7), dotati di caratteristiche fisiologiche e farmacologiche sufficienti per essere considerati specifici per questa Angiotensina, perché capaci di legarsi ad essa in maniera selettiva, di mediare tutti i suoi effetti ed insensibili al Losartan ed al PD123319. Questi siti potevano essere bloccati da un antagonista specifico, la D-Ala7-Ang-(1-7) (A-799), che è una forma modificata di Ang-(1-7), nella quale la Prolina in posizione 7 è sostituita dalla D-Alanina (Santos e coll. 1994).

Recentemente l'esistenza di un recettore unico e specifico, in grado di mediare le azioni dell'Ang-(1-7), è stata dimostrata da Santos e coll. (2003), e questo recettore si identifica con il Mas: nelle CHO o HEK, in cui era stato trasferito il suo gene, l'Angiotensina si lega ad esso. Tale legame è impedito dall'A-799. Nei topi privati del gene Mas, il legame con il peptide non si verifica, e sono assenti sia le risposte depressorie sia l'effetto antidiuretico dopo carico idrico (Santos e coll. 2003).

Numerosi dati sperimentali suggeriscono, tuttavia, che le azioni prodotte da questa Angiotensina sono mediate in realtà da più di un recettore, per cui possono essere divise in 3 gruppi (Ferrario e coll. 2004; Diz e coll. 2005): 1) azioni mediate da un recettore non AT1/AT2, che possono essere bloccate soltanto dall'antagonista specifico (attivazione dei sistemi anti-ipertensivi, in particolare prostaglandine e NO); 2) azioni che, pur essendo prodotte da questa Angiotensina, possono essere bloccate, oltre che dal suo antagonista, anche da un AT1- o da un AT2RA; 3) *downregulation* od inattivazione del recettore AT1.

La capacità dell'Ang-(1-7) di stimolare alcuni sistemi anti-ipertensivi (PGE2 e prostaciclina), tramite un suo recettore specifico, è stata dimostrata nelle cellule dello glioma C6, negli astrociti umani, nelle cellule endoteliali di aorta di maiale e nelle CML aortiche di ratto e di maiale (Jaiswal e coll. 1991; Iyer e coll. 2000). A dosi micromolari, l'Ang-(1-7) stimola anche la liberazione di NO e di cGMP nelle cellule endoteliali di aorta di bue (Porsti e coll. 1994); questo effetto può essere bloccato completamente da un BK2-antagonista (l'HOE140) e parzialmente dalla D-Ala7-Ang-(1-7) (Heitsch e coll. 2001) quindi anche i recettori BK2 appaiono importanti per la sua comparsa. L'Ang-(1-7) potenzia inoltre l'azione ipotensivante della BK, inibendo il legame dell'ACE con essa ed aumentando la liberazione di NO (Li e coll. 1997; Chappell e coll. 1998). Il potenziamento si verifica anche dopo somministrazione di un AT1- o di un AT2RA; è invece inibito da un antagonista dei recettori BK2 (Porsti e coll. 1994; Brosnihan e coll. 1996) e diventa più significativo dopo somministrazione di un ACEI, che impedisce l'inattivazione della BK e facilita la formazione dell'Ang-(1-7), a partire dall'Angiotensina I (Santos e coll. 2000). La risposta all'ACEI varia comunque a seconda dell'animale studiato: a differenza di quanto avviene nel ratto normoteso, in quello SHR l'Enalapril non potenzia l'effetto dell'Ang-(1-7) sulla BK e lo inibisce del tutto nei ratti con ipertensione da coartazione aortica (Lima e coll. 1997; Santos e coll. 2000). Questa inibizione è stata osservata anche dopo indometacina o dopo blocco della NO-sintasi (Li e coll. 1997). Anche nel cuore di ratto con infarto per legatura di una arteria coronarica, l'Ang-(1-7) riduce l'area infartuata mediante un suo recettore specifico.

L'intervento del recettore in questione è stato dimostrato anche nel cervello, dove l'Ang-(1-7) è presente in quantità anche maggiori di quelle dell'Angiotensina II nella midolla allungata, nel PVN, nell'eminenza mediana e nell'ipofisi (Santos e coll. 2000). L'aumento del controllo baroriflesso della FC, che compare dopo sua infusione nei ventricoli laterali di ratti sia normotesi che ipertesi, può essere inibito, infatti, soltanto dalla D-Ala7-Ang-(1-7).

Questa inibizione è stata osservata anche nei ratti con IRV 2K-1c, mentre in quelli TGR [(mRen-2) 27], nei quali i livelli di Ang-(1-7) sono più bassi, l'antagonista è privo di effetti sulla sensibilità barocettoriale (Diz e Westwood 2000). La somministrazione dell'antagonista specifico elimina anche il miglioramento del baroriflesso che compare in corso di terapia con un ACEI (Britto e coll. 1997). Nella parte più rostrale del NTS (che è la prima sinapsi del riflesso barocettoriale) e nel dmNX, i siti di legame di tipo 1 sensibili al Losartan, sono inoltre da 10 a 100 volte più sensibili all'Ang-(1-7) ed al PD123319 (Diz e Ferrario 1996).

Egualeme nte regolati da un recettore specifico, non AT1 o AT2, sono an-

che gli effetti che l'Ang-(1-7) produce a livello della VLM, che regola l'attività intrinseca dei neuroni simpatici mediante il bilanciamento tra circuiti pressori, situati nella porzione rostrale (RVLM) e circuiti depressori, situati nella porzione caudale (CVLM) (Muratani e coll. 1993). Quando è infusa nella RVLM, l'Ang-(1-7) produce sulla PA e sulla FC gli stessi effetti pressori e simpato-eccitatori prodotti dall'Angiotensina II, mentre produce effetti depressori e simpato-inibitori quando è infusa nella CVLM (Silva e coll. 1993). Tuttavia i recettori coinvolti in queste risposte sono di tipo diverso: infatti, mentre l'aumento pressorio prodotto dall'Angiotensina II nella RVLM può essere bloccato dal Losartan (il che dimostra che esso è mediato dal recettore AT1), quello prodotto dall'Ang-(1-7) può essere invece abolito soltanto dal suo antagonista e non da un AT1- o un AT2RA (Fontes e coll. 1994; Santos e coll. 2000). Secondo Potts (Potts e coll. 2000), per verificarsi, questi effetti dell'Ang-(1-7) richiederebbero dosi maggiori di quelle dell'Angiotensina II, e sia quelli prodotti dall'octapeptide, che quelli prodotti dall'eptapeptide potrebbero essere inibiti sia da un AT1RA (Losartan o Candesartan), che dalla D-Ala7-Ang-(1-7). La microiniezione di quest'ultima nella RVLM di ratti ipertesi TGR [(mRen-2) 27], nei quali i livelli di Angiotensina II sono più elevati e quelli dell'Ang-(1-7) più bassi rispetto ai ratti SD, dà luogo ad una riduzione della PA maggiore di quella osservata nei ratti normotesi (Fontes e coll. 2000).

Un aumento della sintesi e della liberazione di AVP è stato osservato dopo microiniezione di Ang-(1-7) nelle aree correlate alla sintesi ed alla liberazione di questo ormone (neuroipofisi e nuclei sovraottico e paraventricolare); tuttavia, poiché esso non si accompagna ad un contemporaneo aumento della PA e della sete, come avviene dopo Angiotensina II, è evidente che anche in queste strutture i due polipeptidi agiscono tramite recettori separati. Nel PVN, l'Ang-(1-7) mostra un'affinità di legame, per quanto modesta, anche per i recettori AT1, maggiore di quella osservata a livello periferico (Rowe e coll. 1995) e che può essere inibita da un AT1RA (Qadri e coll. 1998).

Per quanto riguarda l'apparato cardiocircolatorio, la riduzione della PA che compare dopo infusione di Ang-(1-7) nei ratti SHR ed in quelli Dahl Na-sensibili, può essere bloccata dall'antagonista specifico (Widdop e coll. 1999; Bayorth e coll. 2002). Anche la capacità di questa Angiotensina d'inibire l'angiogenesi si realizza mediante l'intervento di un recettore specifico, dal momento che sia il Losartan che il PD123319 sono senza effetti su questo fenomeno. Anche la riduzione del danno vasale prodotta dall'Ang-(1-7) in una arteria carotide danneggiata dal passaggio di un catetere rimane immodificata dopo somministrazione di un AT1- o di un AT2RA, mentre può essere attenuata dall'indometacina, che riduce la sintesi delle prostaglandine (Strawn e coll. 1999).

Nel rene, l'aumento della natriuresi e della diuresi, prodotto dall'Ang-(1-7), si associa ad una aumentata escrezione urinaria di prostaglandine e può essere attenuato oppure abolito dalla D-Ala7-Ang-(1-7), ma non dal Losartan (Vallon e coll. 1998). Anche la vasodilatazione che compare a livello dell'arteriola afferente, può essere bloccata soltanto dall'antagonista specifico o da un inibitore della NO-sintasi, ma non da un AT1- o AT2RA (Ren e coll. 2002).

Altri effetti dell'Ang-(1-7) sono invece simili a quelli prodotti dall'Angiotensina II e sono probabilmente il risultato di una interazione tra il recettore Mas ed i recettori AT1 o AT2: De Castro e coll. (2005) hanno dimostrato, infatti, che nel cuore isolato e perfuso di topo l'Ang-(1-7) produce una vasodilatazione coronarica in presenza di Losartan, che non compare dopo A-799; quindi, il blocco dei recettori AT1 appare necessario per fare affiorare l'azione vasodilatatrice dell'eptapeptide. Quest'azione è comunque mediata dal recettore Mas, dal momento che non si verifica negli animali MasKO. Similmente, la coespressione in colture cellulari di entrambi i tipi recettoriali, riduce la capacità dell'Angiotensina II di mobilizzare il  $Ca^{2+}$  ic tramite il recettore AT1 (Kostenis e coll. 2005); quindi il Mas si configura come l'antagonista naturale di questi recettori, per un fenomeno di eterodimerizzazione che tende a ridurre la loro attività. Secondo Yoshida e coll. (2002), anche l'aumento del (PAI)-1 e del TPA prodotto dall'Ang-(1-7) in colture di cellule HUVEC risulterebbe dall'interazione tra i due recettori.

La partecipazione dei recettori AT2 agli effetti prodotti dall'Ang-(1-7) è dimostrata, invece, dall'aumento della pressione di perfusione (cioè della vasocostrizione), che compare dopo somministrazione dell'eptapeptide insieme ad un AT2RA e che non si modifica dopo A-799.

Nel rene, gli effetti sul consumo di  $O_2$  possono essere bloccati almeno in parte dal Losartan e completamente dalla Sar1-Thr8-Ang II (Handa e coll. 1996); inoltre, sia la D-Ala7-Ang-(1-7) che il Losartan inibiscono completamente l'azione antidiuretica della Ang-(1-7) nel ratto sottoposto a carico idrico, mentre gli AT2RA sono senza effetto (Baracho e coll. 1998).

Secondo Garcia e Garvin (1994), l'effetto bifasico sul riassorbimento dei liquidi che l'Ang-(1-7) produce a livello dei tubuli prossimali può essere inibito dal Losartan per l'80% e, per il 40% dal PD123319; invece, è inibito dalla D-Ala7-Ang-(1-7) se il peptide è somministrato a dosi piuttosto basse. Non è ancora chiaro se la sensibilità al PD123319 sia l'espressione di una popolazione separata di recettori AT2 oppure se si sovrapponga alla componente sensibile alla Ang-(1-7) o alla D-Ala7-Ang-(1-7); comunque, nell'animale entrambi gli antagonisti invertono l'azione ipotensivante del Losartan (Nakamura e coll. 2002).

Anche se i dati dimostrano che le azioni della Ang-(1-7) a livello renale

sono mediate da vie di legame Losartan- o PD123319-sensibili, questi siti non hanno comunque le caratteristiche proprie dei recettori AT1 e AT2, per cui è possibile che essi rappresentino delle isoforme recettoriali, oppure che i loro antagonisti siano capaci di interagire anche con il recettore Ang-(1-7) (Diz e coll. 2005).

Sia nel SNC che nel rene, l'esposizione acuta o cronica a dosi farmacologiche di Ang-(1-7) riduce anche il numero dei recettori AT1, con un meccanismo ciclossigenasi-dipendente (Clark e coll. 2001; Clark e coll. 2003). Nei preparati di VSMC e di cellule CH-KI, la *downregulation* compare rapidamente soltanto in quelle cellule che contengono i recettori AT1 senza recettori per l'Ang-(1-7), e si accompagna ad una diminuita attivazione della fosfolipasi C. L'esistenza di un rapporto Ang-(1-7)/recettore AT1 (vedi anche Cap. 10) è confermata dalla possibilità di bloccare questa *downregulation* mediante un AT1RA (Diz e coll. 2005).

In conclusione, pur esistendo un recettore specifico per questa Angiotensina, la possibilità di inibire alcune sue azioni, non solo con la D-Ala7-Ang-(1-7), ma anche con gli AT1- ed AT2RA dimostra che anche altri recettori contribuiscono ai suoi effetti e che essa è in grado di controllare le azioni prodotte dall'Angiotensina II con meccanismi di tipo diverso.

# I rapporti dei recettori AT1 ed AT2 con quelli AT4 e dell'Ang-(1-7)

Le ricerche che hanno permesso d'identificare siti di legame specifici per l'Ang IV e per l'Ang-(1-7) hanno condotto anche alla revisione del paradigma – accettato per decenni – che assegnava esclusivamente ai recettori AT1 ed AT2 il compito di modulare le principali azioni dell'Angiotensina II. Come è stato già anticipato nei capitoli sui recettori AT4 e Ang-(1-7), anche questi ultimi contribuiscono, infatti, alla modulazione delle azioni espletate dal SRA, sia con un meccanismo proprio, sia utilizzando i recettori AT1 ed AT2. Gli esempi in proposito sono numerosi.

Gli effetti prodotti dall'Angiotensina IV possono essere inibiti o potenziati, rispettivamente, dagli AT1- o dagli AT2RA: la vasocostrizione che compare dopo somministrazione di questa Angiotensina a dosi elevate nei vasi normali ed in quelli precostretti mediante fenilefrina (Coleman e coll. 1998) può essere impedita dal Losartan o dal Candesartan; quindi essa appare mediata dai recettori AT1 piuttosto che da quelli AT4. Viceversa, è potenziata da un antagonista dei recettori AT2 (Lou-583-84) (Nossaman e coll. 1995).

A livello del tubulo renale prossimale, il recettore AT4 può essere inoltre riconosciuto dall'Ang-(1-7) e legarsi ad essa; tuttavia, affinché questo legame si verifichi, è necessaria prima la metabolizzazione dell'eptapeptide in Ang 3-7, che successivamente va a legarsi al recettore AT4 (Handa e coll. 1999).

A sua volta, l'Ang-(1-7) può legarsi anche al recettore AT1, con un'affinità che nel SNC è maggiore di quella per i recettori AT1 periferici. Quest'affinità è particolarmente evidente nella zona rostrale del NTS e nel NMDV, ove i siti di legame Losartan-sensibili appaiono da 10 a 100 volte più responsivi ad essa rispetto a quelli PD123319-sensibili (Diz e Ferrario 1996).

L'intervento dei recettori AT1 è evidente anche per alcuni effetti che l'Ang-(1-7) produce a livello renale, perché, ad es., l'inibizione del trasporto del Na nel tubulo prossimale può essere impedita completamente dalla D-Ala7-Ang-(1-7) ma, seppure in misura minore, anche dal Losartan (Caruso-Neves e coll. 2000); quindi, alcune delle risposte prodotte dall'eptapeptide appaiono mediate da un recettore che, pur conservando la sua sen-

sibilità nei confronti dell'antagonista specifico, è sensibile anche all'AT1RA (Ferrario e coll. 2004).

Altre risposte prodotte dall'Ang-(1-7) possono essere invece mediate dal recettore AT2, come dimostra la possibilità d'inibire la modulazione che essa esercita sull'attività  $\text{Na}^+$ -ATPasi nello strato interno della corteccia renale di maiale soltanto mediante il PD123319, mentre il Losartan o l'antagonista specifico sono inefficaci (Caruso-Neves e coll. 2000; De Souza e coll. 2004). La liberazione di acido arachidonico nelle CML di coniglio può essere invece impedita parzialmente dalla D-Ala7-Ang-(1-7) o dal PD123319 e completamente dalla contemporanea somministrazione di entrambi. L'Ang-(1-7) sembra quindi capace di attivare due tipi di recettori, uno sensibile al suo antagonista specifico e l'altro all'AT2RA (Muthalif e coll. 1998). Anche la ridotta liberazione di NA prodotta dall'Ang-(1-7) nell'ipotalamo del ratto iperteso per coartazione aortica, può essere inibita da uno di questi due antagonisti, ma non dal Losartan, mentre nell'atrio di ratto essa può essere impedita dagli antagonisti sia degli AT1- che degli AT2-recettori (Gironacci e coll. 2000). Sia gli AT1- che gli AT2RA bloccano anche l'eccitazione dei neuroni nel PVN prodotta dalla ionoforesi con Ang-(1-7); tuttavia, la risposta all'AT1RA è più significativa (Ambuhl e coll. 1992). Sia l'EXP3174 (metabolita del Losartan), che il PD123319 inibiscono anche la liberazione di prostanoidi prodotta dall'Ang-(1-7) nelle CML di maiale (Jaiswal e coll. 1993).

Alla stessa maniera dei recettori AT1 ed AT2, anche quelli AT4 e AT (1-7) hanno dunque un comportamento non facilmente inquadrabile in un programma preordinato in grado di fornire sempre e solamente le stesse risposte, per cui l'immagine di un SRA nel quale ogni sito di legame ha il suo ligando specifico al quale risponde sempre alla stessa maniera, diventa sempre meno accettabile. Il comportamento di questi recettori, se inserito in un contesto che comprende anche le risposte cosiddette "atipiche" dei recettori AT1 ed AT2, suggerisce piuttosto l'immagine di un SRA "flessibile", nel quale cioè ciascuno dei suoi recettori, pur conservando la proprietà di legarsi al proprio ligando, è comunque capace di contrarre legami anche con le altre Angiotensine che fanno parte del sistema (Fig. 24), e di produrre risposte che apparentemente sono atipiche, ma che in realtà sono normali se osservate nell'ottica di un SRA capace di volta in volta di adattarsi alle esigenze dell'omeostasi.

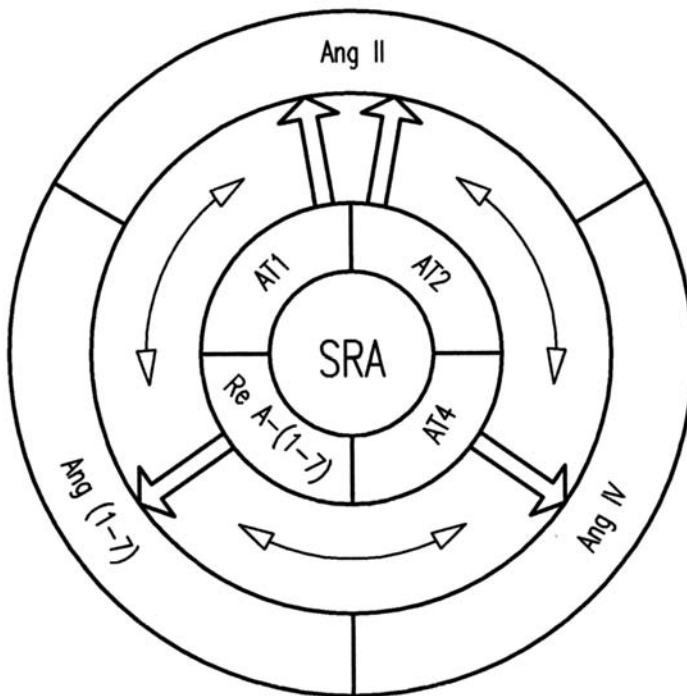


Fig. 24. La "flessibilità" dei recettori del SRA



# **La terapia con gli antagonisti recettoriali**

### Gli antagonisti dei recettori AT1

Nella storia del SRA, la sintesi degli antagonisti dei recettori AT1 può essere considerata nello stesso tempo come un punto di arrivo ed un punto di partenza, perché essa ha sicuramente contribuito a rendere più efficace e razionale il trattamento di numerose patologie, ma – proprio per i risultati ottenuti, spesso inaspettati – ha dato anche il via a nuove ricerche, necessarie per chiarire il meccanismo con cui funzionano realmente questi antagonisti: essi infatti si sono dimostrati efficaci non solo nella IA e nello scompenso cardiaco (cioè in condizioni in cui è sicuramente coinvolto il SRA) (Pitt 2002; Ruddy e Kostis 2005), ma anche in altre patologie, che non appaiono legate in via primitiva ad un disordine di questo sistema, come lo *stroke*, l'aterosclerosi, la nefropatia diabetica, il decadimento delle funzioni cognitive e perfino di quelle sessuali (Koh e coll. 2003; Sierra e de la Sierra 2005).

In realtà, risultati soddisfacenti per il trattamento di alcune di queste patologie erano stati già ottenuti con gli ACEI (Gohlke e Scholkens 2004), ma il proseguire delle esperienze aveva dimostrato che questi farmaci hanno anche delle limitazioni, intrinseche al loro meccanismo d'azione, perché:

- a) riducono la sintesi dell'Angiotensina II, ma non la inibiscono completamente, per l'esistenza di vie alternative ad essa (Urata e coll. 1996);
- b) il blocco competitivo dell'ACE prodotto da questi farmaci può, a lungo andare, essere superato da un aumento dell'Angiotensina I, con conseguente incremento dell'Angiotensina II, per cui i livelli plasmatici di quest'ultima ritornano ai livelli precedenti il trattamento, specie se esso è prolungato nel tempo (Abdel-Ramhan e coll. 1993);
- c) l'ACE non è un enzima specifico ma agisce su diversi substrati, tra i quali la BK, che non essendo più inattivata dall'enzima per effetto dell'ACE-inibizione, aumenta; ciò potenzia la caduta pressoria prodotta da questi farmaci, ma aumenta anche la possibilità di effetti indesiderati, come la tosse e l'edema angioneurotico (Fletcher e Dollery 1993).

Il razionale per la sintesi di nuovi farmaci, capaci di inibire il SRA in maniera più completa degli ACEI e senza produrre i loro effetti collaterali, nasce appunto da queste considerazioni. Nel corso degli anni sono stati così sintetizzati prima gli inibitori della Renina, che per il loro scarso assorbi-

mento orale e per la brevità dell'azione si sono però dimostrati inizialmente poco efficaci (solo recentemente, uno di essi – l'aliskiren – ha dato risultati più promettenti); poi sono stati sintetizzati gli antagonisti peptidici dei recettori AT1, scarsamente maneggevoli perché capaci di agire anche come agonisti ed, infine, gli antagonisti non peptidici di questi recettori, che tuttora restano il mezzo più efficace e meglio tollerato per inibire la maggior parte degli effetti emodinamici e sistemici prodotti dall'Angiotensina II.

Ipotizzata già diversi anni fa da Skeggs e coll. (1956), la possibilità d'inibire i recettori AT1, responsabili della maggior parte di questi effetti, si è concretizzata diversi anni più tardi, con la sintesi di alcuni derivati benzilimidazolici dell'acido-5-acetico, in grado di antagonizzare la contrazione prodotta dall'Angiotensina II in segmenti di aorta di coniglio e di ridurre la PA nei ratti ipertesi (Furakawa e coll. 1982).

Una più attenta valutazione farmacologica di due di questi composti – S8307 e S8308 – condotta negli anni '80 nei laboratori DuPont-Merck, confermò che essi potevano antagonizzare l'Angiotensina II in maniera selettiva; tuttavia, la loro azione era debole e della durata massima di 30 min., in quanto le loro ridotte dimensioni non permettevano di legarsi in modo efficace ai recettori AT1 (Timmermans e coll. 1993).

Partendo dal prototipo S8307, nei laboratori DuPont-Merck furono pertanto sintetizzati numerosi altri composti di dimensioni progressivamente maggiori, fino ad ottenere, attraverso successive modifiche strutturali, prima l'EXP7711, dotato di buona attività anche quando somministrato per via orale, e successivamente un altro composto, di dimensioni appropriate al recettore AT1 e dotato di un maggiore lipofilia, il cui sale potassico fu denominato DuP753 dal gruppo DuPont e MK954 da quello Merck, ed al quale fu dato il nome di Cozaar o Losartan (Timmermans 2001). Come hanno confermato le numerose esperienze condotte sia *in vitro* che *in vivo*, questo farmaco è attivo per via orale, ha per i recettori AT1 un'affinità alcune migliaia di volte superiore a quella del composto S8307, inibisce la maggior parte delle risposte all'Angiotensina II mediate da essi e non ha praticamente alcuna affinità per i recettori AT2 o per quelli di altri sistemi biologici, come dimostra la sua incapacità di modificare la risposta contrattile dell'aorta di coniglio alla NA, alla BK ed alla Serotonina (Wong 1999b) e c); Ruddy e Kostis 2005).

Una volta aperta la strada, in pochi anni al Losartan si sono aggiunti altri antagonisti dei recettori AT1, la maggior parte dei quali nati da modifiche della struttura del farmaco capostipite ed altri con struttura diversa (Fig. 25). Di essi, alcuni sono già commercializzati (Valsartan, Irbesartan, Candesartan, Eprosartan e Telmisartan) ed altri sono in fase di approvazione o di sperimentazione.

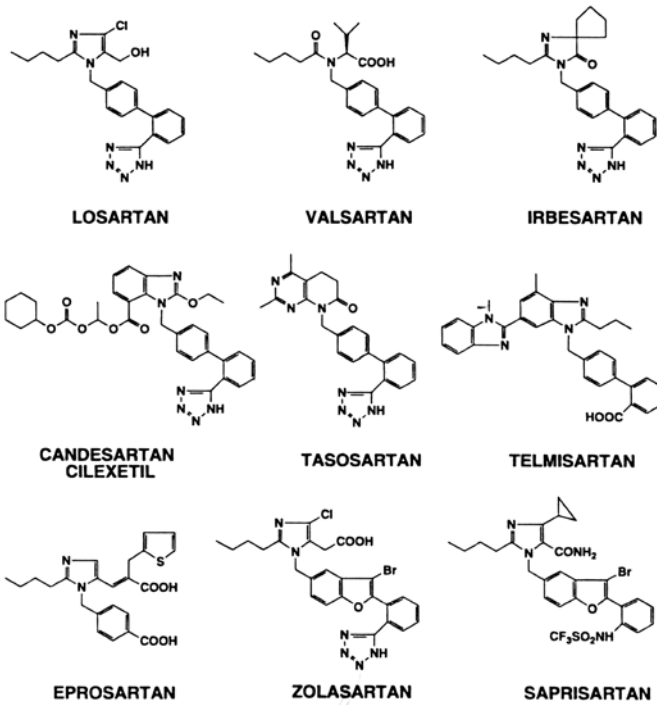


Fig. 25. Gli antagonisti non peptidici dei recettori AT1 (Da: Timmermans 2001, con autorizzazione)

## 11.1 - La farmacocinetica degli AT1-Antagonisti

Il capostipite di questa classe di farmaci e tuttora punto di riferimento per le ricerche su di essi, è il Losartan. Assorbito rapidamente dopo somministrazione orale (il picco della concentrazione plasmatica è raggiunto entro 1 h), esso ha una emivita relativamente breve (da 1.5 a 2.5 h) ed una biodisponibilità di circa il 33%. Esso compete con il legame dell'Angiotensina II per il recettore AT1, con una concentrazione inibitrice media (IC<sub>50</sub>) di 17-20 nmol/L e produce un blocco sormontabile della risposta contrattile al polipeptide (Wong e coll. 1990a; Chiu e coll. 1991).

Dopo essere stato assorbito mediante gli enzimi 2C9 e 3A4 (che determinano la bioossidazione del suo gruppo idrossimetilico localizzato sull'anello imidazolico), circa il 14% del Losartan è metabolizzato in un composto da 10 a 30 volte più attivo, l'EXP3174 (Wong e coll. 1990b; Lo e coll. 1995b; Maillard e Burnier 2004), che blocca in maniera insormontabile la risposta pressoria all'Angiotensina II. Il picco della concentrazione plasmatica di questo metabolita compare nel giro di 3-4 ore, la sua elimina-

zione è lenta (l'AUC è 4-8 volte maggiore di quella del Losartan) e la sua emivita è di 6-9 ore (Lo e coll. 1995b). I suoi livelli raggiungono il picco della concentrazione quando la molecola di origine sta già scomparendo dal plasma e persistono per un tempo più lungo, fino a 24 h. La trasformazione del Losartan in un metabolita più attivo non si verifica in quella piccola percentuale di soggetti che mancano degli enzimi necessari per la conversione (Lo e coll. 1995b).

Entrambi i composti – Losartan ed EXP3174 – presentano un elevato legame proteico (rispettivamente 98.7 e 99.8%), che comunque non impedisce loro di raggiungere concentrazioni plasmatiche farmacologicamente efficaci. Queste concentrazioni non subiscono variazioni significative nell'insufficienza renale lieve o moderata o nell'insufficienza epatica, e soltanto in quest'ultimo caso può essere opportuna una riduzione delle dosi.

Meno del 4% del Losartan è eliminato come tale per via renale, mentre il suo metabolita attivo è eliminato in parti uguali dal rene e dal fegato. Il cibo non sembra interferire con il suo assorbimento. Nessuna interferenza è stata osservata con la farmacocinetica della digossina o del warfarin. La contemporanea somministrazione di cimetidina determina un aumento di circa il 20% dell'AUC per il Losartan, ma nessuna modifica di essa per l'EXP3174 (Ruddy e Kostis 2005).

Il Valsartan – che per espletare la sua azione non ha bisogno di essere convertito in un metabolita attivo (de Gasparo 2004) – è un composto non eterociclico, che per la sua struttura diacidica somiglia all'EXP3174. *In vitro*, blocca il recettore AT1 in maniera insormontabile, con una IC50 di 2.7 nmol/L (Criscione e coll. 1995), ha una biodisponibilità di circa il 25%, un volume di distribuzione piuttosto ridotto (circa 17 L) e raggiunge il picco della concentrazione plasmatica nel giro di 2-4 ore. Questa concentrazione aumenta anche del doppio nella colelitiasi e nelle gravi malattie epatiche, che rappresentano pertanto una controindicazione all'uso del farmaco (Brookman e coll. 1997); si riduce, invece, fino al 50% in caso di somministrazione con il cibo ed è piuttosto variabile nell'anziano. Il suo legame proteico è elevato (95%), la sua eliminazione avviene per l'80% attraverso il tratto gastroenterico in forma immodificata e soltanto un 10% della dose è metabolizzato a Valeril 4-idrossivalsartan. Non sono state evidenziate interazioni con atenololo, cimetidina, digossina o warfarin.

L'Irbesartan, che è un derivato imidazolico con una catena laterale bifenil-tetrazolica, ha una significativa affinità per il recettore AT1, del quale blocca in modo insormontabile il legame con l'Angiotensina II, con una IC50 di 1.7 nmol/L (Cazaubon et al. 1993). Il suo legame proteico è di circa

il 90%, la sua biodisponibilità è relativamente alta (60-80%) e non è compromessa dall'assunzione di cibo; il picco plasmatico è raggiunto nel giro di 1.5-2 h. dopo somministrazione orale e la sua emivita è compresa tra le 11 e le 15 ore (Brunner 1997).

L'Irbesartan è metabolizzato per ossidazione e glicuronazione ad opera dell'isoenzima 2C9, è eliminato con la bile per il 75% circa e, per il resto, per via renale. Non sono stati evidenziati fenomeni di accumulo in caso d'insufficienza epatica o renale, né fenomeni d'interferenza con altri farmaci (digossina, warfarin, nifedipina, idroclorotiazide). Nell'anziano l'AUC e la Cmax sono aumentate di circa il 20-50% (Ruddy e Kostis 2005).

Il Candesartan Cilexetil (TCV-116) è un derivato bifenil-imidazolico che – similmente al Losartan – contiene una molecola tetrazolica, una catena laterale lipofila ed un gruppo carbossilico (Ruddy e Kostis 2005).

È un profarmaco con minima affinità per il recettore AT1, ma durante l'assorbimento intestinale viene convertito in un composto attivo – il Candesartan, che blocca il recettore in maniera insormontabile e si dissocia lentamente da esso (Ojima e coll. 1997). In volontari sani, dopo una dose orale di 4-16 mg, il picco della concentrazione plasmatica compare nel giro di 4-5 h., entro un tempo anche più breve dopo un pasto grasso (Van Lier e coll. 1997). L'emivita è di circa 9 h., ed è più lunga nell'anziano. Il volume di distribuzione dopo una singola dose ev di 8 mg è di circa 0.1 L/kg; tale valore piuttosto basso è dovuto al suo elevato legame proteico (99.4-99.8%). La biodisponibilità del farmaco non appare compromessa dall'ingestione di cibo. La maggior parte di esso è eliminato con le urine come Candesartan e solo il 40% attraverso la bile. Il suo profilo farmacocinetico non appare modificato nell'insufficienza epatica, mentre in caso di compromissione renale, l'AUC, la Cmax e l'emivita tessutale aumentano significativamente, per cui in queste condizioni è opportuno ridurre la dose (de Zeeuw e coll. 1997). Un aumento della biodisponibilità e della Cmax è stato osservato dopo contemporanea somministrazione di idroclorotiazide, mentre la concentrazione di warfarin si riduce in misura non significativa.

L'Eprosartan è l'unico AT1-antagonista non tetrazolico non bifenilico ed è caratterizzato dalla presenza di un acido p-carbossilico sull'anello N-benzenico, da un anello tienilico e da due gruppi acidi (Blum e coll. 1999). *In vitro* si comporta come un antagonista sormontabile, che nelle arterie mesenteriche di ratto inibisce il legame dell'Angiotensina II con il recettore AT1 con una IC50 di 1.5 nmol/L (McClellan e Balfour 1998b). La sua biodisponibilità, minore di quella degli altri antagonisti (13-15%), è limitata da un assorbimento orale incompleto ed aumenta con l'età.

Dopo una dose di 100-800 mg, il picco della concentrazione compare nel

giro di 1-3 h. e si riduce del 25% dopo assunzione di cibo, che determina un ritardo dell'assorbimento di circa 1.5 h. (Tenero e coll. 1998). L'emivita è di circa 5-7 h., per cui secondo qualche autore esso dovrebbe essere somministrato in due dosi quotidiane; tuttavia, uno studio condotto con varie modalità di somministrazione non ha evidenziato alcuna differenza tra una e due dosi giornaliere (Hedner e Himmelmann. 1999).

Essendo un farmaco attivo di per sé, l'Eprosartan non è metabolizzato dal sistema CYP-450 (e, quindi, non interagisce con la somministrazione di warfarin). Il suo legame con le proteine è elevato (98%), ma anche questa caratteristica non interferisce con l'attività anticoagulante del warfarin (Blum e coll. 1999). La sua concentrazione aumenta in caso di grave compromissione renale ed epatica. Circa il 90% della dose è eliminato con le feci e circa il 10-20% è escreto in forma glicuronata (Tenero e coll. 1998).

Similmente all'Eprosartan anche il Telmisartan manca della componente tetrazolica, ma contiene un gruppo benzilimidazolico (Maillard e Burnier 2004). Come il Candesartan, è un antagonista insormontabile, ed essendo più lipofilo degli altri AT1RA, anche la sua penetrazione nei tessuti è maggiore (Wienen e coll. 2000). La biodisponibilità è dose-dipendente e varia dal 30 al 60%, il suo legame proteico è elevato (maggiore del 99.5%) e così pure il suo volume di distribuzione (circa 500 L). Circa la metà della dose somministrata è assorbita e dopo una dose orale di 40 mg la Cmax compare nel giro di 0.5-1 h. La sua emivita è di circa 24 h (Mc Clellan e Markham 1998a). Il cibo riduce la AUC in misura variabile dal 6 al 20%. Non essendo un profarmaco, il Telmisartan va incontro a minime trasformazioni e circa il 97% della dose somministrata viene eliminata immodificata con la bile, per cui la sua somministrazione nei pazienti con insufficienza epatica va fatta con prudenza. Un aumento della digossinemia è stato osservato in caso di contemporanea somministrazione dei due farmaci; viceversa, la concentrazione di warfarin è diminuita (Mc Clellan e Markham 1998a).

L'Olmesartan medoxomil è anch'esso un profarmaco caratterizzato da una molecola esterificata che, dopo l'assorbimento, viene trasformata nel metabolita attivo Olmesartan, che funziona come un antagonista insormontabile. *In vitro* la sua affinità per il recettore AT1 del surrene dei bovini è paragonabile a quella degli altri antagonisti (IC50 80 nmol/L). La sua emivita è simile a quella del Candesartan (Brunner e coll. 2002) e la sua biodisponibilità è di circa il 26%.

## 11.2 - La farmacodinamica degli antagonisti dei recettori AT1

Anche se le differenze strutturali esistenti fra questi farmaci possono dar luogo a risposte farmacocinetiche diverse, le ricerche *in vitro* ed *in vivo* suggeriscono che questi risultati non possono essere trasferiti automaticamente alla farmacodinamica e che, invece, è necessaria una certa prudenza nella loro interpretazione (Gansevoort e de Zeeuw 2000). Altrettanto prudente deve essere anche la valutazione dei dati basati sull'emivita di questi farmaci, di solito considerata un valido parametro per accertare la loro maggiore o minore efficacia, perché numerosi dati dimostrano che in realtà essa ha un valore piuttosto approssimativo e che invece la durata della caduta pressoria prodotta da essi è un mezzo di valutazione più valido. Neanche la concentrazione plasmatica appare d'altronde un elemento attendibile, dal momento che se l'antagonista ha una notevole affinità per il recettore oppure modifica in modo irreversibile la sua struttura e le sue funzioni, i suoi effetti possono essere ancora presenti anche se questa concentrazione si è ridotta (Gansevoort e de Zeeuw 2000).

L'esempio del Losartan è dimostrativo. Se si confronta la sua emivita con quella degli altri AT1RA, essa appare infatti soltanto di 2.1 h., mentre quella del Telmisartan è di circa 20 h.; quindi, stando a questi dati, anche la sua durata d'azione dovrebbe essere molto breve.

La realtà tuttavia è molto più complessa perché, non essendo un farmaco, il Losartan è attivo già di per sé, anche se in misura minore rispetto al suo metabolita EXP3174. La sua emivita andrà quindi sommata a quella del metabolita e la durata dell'effetto risulterà dalla somma di quella relativa a ciascuno dei due composti (Gansevoort e de Zeeuw 2000).

Un altro elemento da tenere presente riguarda la farmacocinetica di questo AT1RA. I dati relativi ad esso sono stati ottenuti, infatti, dopo una singola somministrazione, generalmente *ev*, mentre nella pratica clinica il farmaco è somministrato per via orale e per tempi più lunghi, e ciò fa sì che la formazione del metabolita attivo si verifichi più lentamente, per cui anche la sua emivita sarà più lunga rispetto alla somministrazione *ev*; allo stesso modo, più lunga sarà la durata dell'effetto prodotto da una singola dose (Timmermans e coll. 1995): in ratti infusi con 10 ng/kg di Angiotensina II per 21 gg., che al 17° giorno dell'infusione avevano ricevuto un bolo di Losartan (10 mg/kg), Laragh e coll. (Hu e coll. 1999) hanno osservato, infatti, già 2 h. dopo la somministrazione dell'antagonista, l'azzeramento della risposta pressoria all'agonista e la sua lenta ricomparsa solo nei giorni successivi, con il ritorno ai valori pressori di partenza soltanto al 5° giorno.

Indipendentemente dalle differenze nella loro struttura, tutti gli antagonisti dei recettori AT1 hanno in comune la proprietà di legarsi ad



essi in maniera selettiva e reversibile, mentre mostrano un'affinità ridotta o del tutto assente per i recettori AT2 (Timmermans e coll. 1993).

Lo studio delle risposte vasocostrittrici *in vitro* (aorta di coniglio) e di quelle pressorie *in vivo*, ha dimostrato che in base alle modifiche della curva dose/risposta all'Angiotensina II che essi producono, gli AT1-antagonisti possono essere divisi in due gruppi (Vanderheyden e coll. 1999 e 2000a; de Gasparo 2004):

- a) gli antagonisti sormontabili, così definiti perché il loro legame con il recettore AT1 può essere spiazzato da una dose sufficientemente elevata dell'agonista. I farmaci di questo gruppo producono uno spostamento parallelo verso destra della curva dose/risposta all'Angiotensina II, ma non modificano la risposta massimale e si dissociano più rapidamente dal sito di legame;
- b) gli antagonisti insormontabili, cosiddetti perché il loro legame con il recettore non può essere impedito da un aumento della dose dell'agonista. Essi spostano verso destra in maniera non parallela la curva dose/risposta, attenuano oppure aboliscono la risposta massimale all'Angiotensina II e si dissociano più lentamente dal recettore. Pur essendo di più lunga durata, anche questa interazione è comunque reversibile.

Secondo Vanderheyden (Vanderheyden e coll. 1999), alcuni di questi AT1RA (Valsartan, Telmisartan e Irbesartan) costituirebbero invece un gruppo di tipo misto, per la loro capacità di legarsi al recettore AT1 sia con un'alta affinità ed una lenta dissociazione, sia con una bassa affinità ed una più rapida dissociazione. La proporzione dei siti legati strettamente o labilmente all'antagonista determinerà il tipo di curva dose/risposta: di conseguenza, più alta sarà la costante di dissociazione dei siti legati strettamente all'antagonista, maggiore sarà la diminuzione della risposta massimale (Vanderheyden e coll. 2000a e b).

La riduzione della risposta all'Ang II e della sintesi di IP prodotta dagli antagonisti insormontabili nelle CML può essere, comunque, annullata in misura dose-dipendente dalla contemporanea somministrazione di un antagonista sormontabile (Losartan); quindi, questi ultimi sono capaci di contrastare quelli insormontabili nella inibizione della risposta massimale all'Angiotensina II (Wong e Timmermans 1991).

Poiché la loro efficacia non diminuisce aumentando la concentrazione dell'agonista, gli antagonisti insormontabili dovrebbero avere dei vantaggi rispetto a quelli sormontabili, tuttavia le esperienze precliniche e cliniche dimostrano che in realtà l'efficacia di tutti questi composti è sovrapponibile (Timmermans 2001).

Secondo Vauquelin e coll. (2001), anche i termini di antagonisti competitivi e non competitivi, usati per indicare rispettivamente gli antagonisti sormontabili ed insormontabili, dovrebbero essere evitati, dal momento

che essi si riferiscono a due diverse condizioni sperimentali e, pertanto, non sono sinonimi. Per stabilire se un antagonista è sormontabile o insormontabile, i preparati cellulari vengono infatti prima incubati con l'antagonista e poi esposti all'agonista, per cui la comparsa di una depressione della risposta massimale all'Angiotensina II esprimerà soltanto l'incapacità di quest'ultima di opporsi all'azione dell'antagonista, che sarà definito insormontabile. Viceversa, la natura competitiva o non competitiva di un antagonista è valutata in condizioni diverse, perché il ligando e l'antagonista sono somministrati contemporaneamente, cioè essi sono co-incubati (Vauquelin e coll. 2001).

Le ricerche di Fierens e coll (1999) e di Vanderheyden e coll (2000b), hanno dimostrato che, anche se alcuni AT1RA sono sormontabili ed altri insormontabili, essi sono comunque tutti antagonisti competitivi e competono con l'Angiotensina II a livello del recettore secondo la legge dell'azione di massa.

### 11.3 - Gli effetti prodotti dagli antagonisti del recettore AT1

La maggior parte di questi effetti sono dovuti al blocco dei recettori AT1, ma numerose evidenze dimostrano che alcuni di essi sono prodotti con altri meccanismi, indipendenti da questo blocco e/o dalla riduzione dei livelli pressori (Ohlstein e coll. 1992; de Gasparo 2004) (v. Cap. 12).

A livello del SRA, il blocco dei recettori AT1 determina un aumento dose-dipendente della R, dell'Angiotensina I e dell'Angiotensina II, per la rimozione del *feedback* negativo normalmente esistente tra quest'ultima e la R (Abdel-Rahman e coll. 1993). In uno studio condotto mediante somministrazione di Losartan a dosi diverse (5, 10, 20 e 40 mg) per 8 gg. in volontari sani, Christen e coll. (1991) hanno osservato un aumento della PRA e dell'Angiotensina II già 6 h. dopo la dose di 20 mg, che diventava anche più significativo all'8° giorno (Fig. 26).

A livello sistemico, gli effetti più importanti prodotti da questi farmaci sono:

- a) l'inibizione della risposta pressoria all'Angiotensina II;
- b) la riduzione dei livelli pressori nell'animale e nell'uomo iperteso;
- c) il miglioramento della IVS e delle alterazioni strutturali dei vasi;
- d) il miglioramento della funzione renale.

#### a) L'inibizione della risposta pressoria all'Angiotensina II

La capacità degli AT1RA di inibire la risposta pressoria all'Angiotensina II esogena è stata dimostrata in diverse specie animali (ratti normotesi, ratti SHR, cani normotesi e cani Na-depleti) (Timmermans 2001).

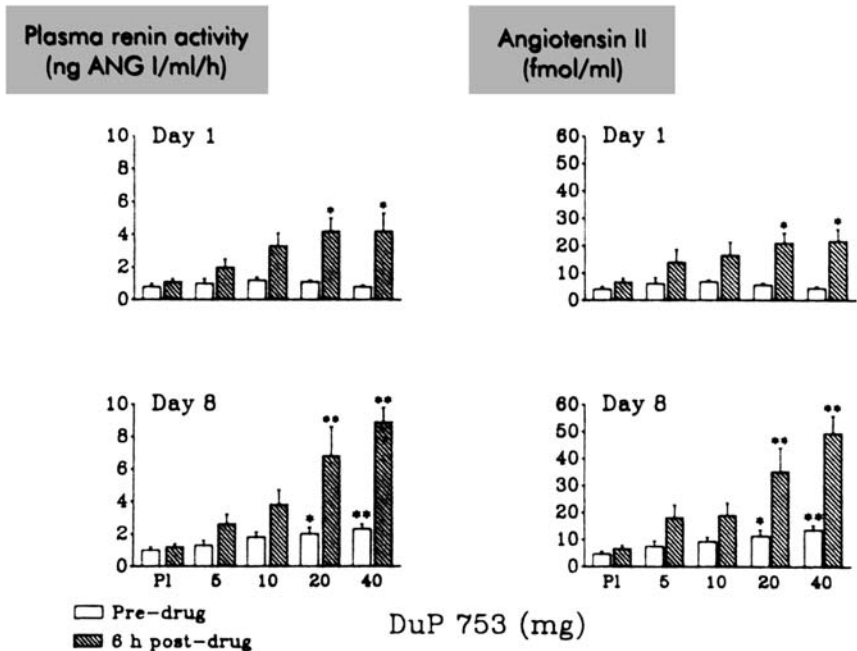


Fig. 26. L'aumento della PRA e dell'Angiotensina II prodotto da dosi crescenti di DuP753 (Modificata da: Christen e coll. 1991)

Nell'uomo (volontari sani a dieta di Na libera), dopo dosi singole di 10, 20 e 40 mg di DuP 753, l'inibizione dell'aumento della PAS prodotto da una dose di Angiotensina I ev, compare rispettivamente 7, 5 e 3 h. dopo la somministrazione del farmaco. Un'attenuazione della risposta al polipeptide è ancora evidente 24 h. dopo una dose singola di 20 e 40 mg (Christen e coll. 1991).

Più recentemente, un confronto tra Losartan (50 mg), Valsartan (80 mg) ed Irbesartan (180 mg) ha dimostrato che, 4 h. dopo la somministrazione di ciascuno di questi farmaci, l'aumento della PA prodotto dall'Angiotensina II era inibito per il 43% dal Losartan, per il 51% dal Valsartan e per l'88% dall'Irbesartan (Mazzolai e coll. 1999). Calcolando, oltre all'entità dello spostamento verso destra della curva dose/risposta all'Angiotensina II, anche la dose necessaria per raddoppiare l'entità di questo spostamento, Belz e coll. (2000) hanno dimostrato che la dose media necessaria per produrre questo effetto era per il Valsartan, l'Irbesartan, il Losartan ed il Candesartan, rispettivamente di 16, di 18, di 19 e 22 mg, quindi non diversa in maniera significativa.

## b) La riduzione dei livelli pressori nell'animale e nell'uomo

La capacità dei diversi AT1RA di ridurre i livelli pressori è stata dimostrata sia nell'uomo iperteso che nell'animale con vari modelli di ipertensione sperimentale (I. renale, genetica, da fruttosio, da freddo), con risultati particolarmente significativi nelle ipertensioni ad alta R (Lacour e coll. 1994; Timmermans e Smith 1996).

Nei ratti con IRV (2K-1c) ed in quelli SHR, il Losartan alla dose di circa 10 mg/kg/die *per os* riduce i livelli pressori già dopo le prime 24 ore (Wong e coll. 1990a e b) e gli stessi risultati sono stati ottenuti anche con il Candesartan Cilexetil. Alla sospensione del trattamento, la pressione di questi animali ritorna lentamente ai livelli di partenza senza fenomeni di *rebound* (Timmermans e Smith 1996). Similmente agli ACEI, anche gli AT1RA appaiono scarsamente efficaci quando il SRA è soppresso o quando il bilancio sodico è positivo (ipertensione DOCA + sale) (Wong e coll. 1990c). Dosi di Losartan comprese tra 1 e 10 mg/kg, somministrate per bolo in ratti normotesi con normale PRA, sono prive di effetti sui livelli pressori oppure producono soltanto una riduzione lieve e transitoria di essi. Se però questi animali vengono pretrattati con Furosemide, il farmaco riduce la componente pressoria legata all'aumento della PRA che si verifica per effetto della deplezione sodica (Timmermans 2001).

Una riduzione dose-dipendente della PAS e della PAD è stata osservata in volontari normotesi Na-depleti (40 mml di Na/die) dopo somministrazione di dosi crescenti di Losartan (5, 10, 20, 50 e 100 mg), con una caduta pressoria significativa dopo dosi di 50 e 100 mg; nessun effetto è stato, invece, osservato nei soggetti tenuti a dieta ipersodica (200 mml di Na/die x 6 gg.) (Burnier e coll. 1995). Gli stessi risultati sono stati ottenuti anche con Irbesartan nei ratti iporeninemici con ipertensione DOCA + sale (Lacour e coll. 1994).

Anche se questi risultati sembrano dimostrare che gli AT1RA siano in grado di espletare la loro azione ipotensivante soltanto quando il SRA è attivato, studi più recenti ne confermano però l'efficacia anche nell'ipertensione dell'uomo ed in alcune forme d'ipertensione sperimentale in cui l'attività del SRA è normale, e che quindi sono R-indipendenti.

In ratti normotesi con un PRA normale e con un normale apporto di Na, dopo somministrazione di Losartan (10 mg/kg/die x 10 gg.) fin dal 1° giorno di infusione si verifica una significativa caduta pressoria ( $-12 \pm 2$  mmHg), che invece è assente negli animali a dieta ipersodica (Collister e coll. 1996). L'effetto, che conferma il ruolo del SRA nel controllo della PA anche in condizioni fisiologiche, può essere spiegato in due modi: ammettendo che in questi modelli di Ipertensione la sensibilità dei tessuti all'Angiotensina II è aumentata oppure, come è più probabile, che questi farma-

ci bloccano, oltre all'Angiotensina plasmatica, anche quella tessutale. Secondo questa ipotesi, i livelli della R circolante non rifletterebbero l'attività del SRA nei vasi ed in alcune strutture cerebrali, quindi il dosaggio della PRA non esprimerebbe l'attività del sistema.

Il Losartan potenzia anche la caduta pressoria che compare nel corso della manovra dell'*head up tilt* (Matos de Moura e coll. 2005). A questo potenziamento contribuisce probabilmente anche l'Ang-(1-7), dal momento che esso può essere inibito dall'A799, antagonista specifico di questa Angiotensina.

### c) La riduzione della IVS e delle alterazioni strutturali dei vasi

La capacità degli AT1RA di ridurre queste alterazioni è stata dimostrata in diversi modelli sperimentali, con risultati abbastanza simili per i vari farmaci esaminati.

Nei ratti SHR, il Losartan somministrato per 12 settimane, alla dose di 20 mg/kg/die e di 60 mg/kg/die, oltre a ridurre significativamente i livelli pressori (da  $210 \pm 2$  mmHg a  $181 \pm 1$  mmHg con la dose di 20 mg e da  $210 \pm 2$  mmHg a  $156 \pm 4$  mmHg con la dose di 60 mg/kg) riduce in via dose-dipendente anche lo spessore della media ed il rapporto media/lume nei piccoli vasi dei distretti carotideo, renale, mesenterico e femorale, migliora il loro rilasciamento ed inibisce la loro contrazione dopo stimolazione con Ach. Anche l'ipertrofia miocardica e quella delle grandi arterie (aorta toracica) si riducono in misura significativa. Gli stessi effetti sono stati osservati dopo somministrazione di Losartan per tempi più brevi (2 settimane) e con dosi comprese tra i 20 ed i 50 mg/kg (Li Jin e coll. 1997).

Nel cane, in un modello sperimentale in cui l'intima delle arterie carotidi e femorali era stata danneggiata dal passaggio di un palloncino, la somministrazione di un altro AT1RA (il Candesartan Cilexetil alla dose di 3 mg/kg) o di un ACEI (Enalapril alla dose di 10 mg), ha dimostrato che il secondo riduce l'iperplasia soltanto nella arteria femorale, mentre il primo la riduce in entrambe i distretti vascolari (Miyazaki e coll. 1999).

Una riduzione della PA e della massa ventricolare, in misura maggiore di quella prodotta dall'Enalapril, è stata osservata anche in ratti NZ geneticamente ipertesi, dopo somministrazione di Valsartan (10 mg/kg) (Pham e coll. 1994).

Uno studio condotto su ratti SHR (Igase e coll. 2005) ha dimostrato che dopo somministrazione di un AT1RA (Olmesartan), il rapporto media/lume dell'aorta toracica di questi animali si riduce indipendentemente dalla riduzione della PA, per una diminuzione dello spessore della media. Tale effetto, che non compare dopo somministrazione di Atenololo o Idralazina,

appare legato al blocco degli AT1 ed all'aumento che si accompagna ad esso sia dell'ACE2 che della Ang-(1-7) (fino a 25 volte) (Iyer e coll. 1998; Ferrario e coll. 2005a), per effetto del quale è inibita anche la crescita cellulare stimolata dall'Angiotensina II (Tallant e Clark 2003; Ferrario 2006a).

#### d) Il miglioramento della funzione renale

Anche se in misura diversa, tutti gli antagonisti dei recettori AT1 rallentano o impediscono il progressivo deterioramento della funzionalità renale che si verifica nella IA, nel diabete ed in tutte quelle condizioni morbose che compromettono il rene (Gansevoort e coll. 2001).

Nel ratto e nel cane anestetizzato, questi farmaci dilatano i vasi renali ed aumentano la natriuresi, a fronte di un modesto aumento della GFR (Chan e coll. 1992).

Nel rene isolato e perfuso, il Losartan antagonizza l'aumento delle RVR prodotto dall'Angiotensina II, e nel rene idronefrotico isolato e perfuso esso blocca completamente l'azione dell'Angiotensina II a livello delle arteriole afferenti ed efferenti (Burnier e Brunner, 1994). Una vasodilatazione non accompagnata a variazioni della GFR è stata osservata anche nel rene di ratti SHR. Nel cane normoteso, il Losartan aumenta il RBF, lasciando immutata la GFR, mentre aumenta entrambi i parametri nel cane iperteso (Bovec e coll. 1991).

Nell'uomo normoteso mantenuto sia a dieta iposodica (50 mml/die) che ipersodica (200 mml/die), il Losartan alla dose di 100 mg non modifica la GFR ed il RBF. Quest'ultimo aumenta, invece, nel soggetto iperteso (Burnier e coll. 1993).

Gli AT1RA agiscono anche sul trasporto del Na, di cui aumentano l'escrezione sia nell'animale normoteso che in quello iperteso. Nel soggetto normoteso con dieta a basso (50 mml/die) ed alto contenuto di Na (200 mml/die), il Losartan alla dose di 100 mg produce solo un lieve aumento della diuresi, ma un notevole aumento dell'escrezione sodica (Burnier e coll. 1993).

Nessuna variazione del RBF e della GFR è stata osservata invece in volontari sani dopo somministrazione di Irbesartan, a dosi comprese tra 10 e 50 mg. L'escrezione sodica aumenta in misura dose-dipendente 2 h. dopo la somministrazione del farmaco, ma dopo 8 h. ritorna a livelli simili a quelli del placebo (Burnier e coll. 1995b).

Un aumento della diuresi e della natriuresi, che non si accompagna a modifiche della creatinina e dell'escrezione del K, compare in cani svegli anche dopo somministrazione di Telmisartan *per os* (0.3 – 3.0 mg/kg/die) o *ev* (0.03-0.3 mg/kg/die). Nei ratti transgenici alla dose di 1 e 3 mg/kg/die, il farmaco riduce anche la proteinuria e l'evoluzione della glomeruloscle-

rosi, che rimane invece immodificata negli animali di controllo (Mc Clellan e Markham 1998a).

Somministrato nell'interstizio renale di ratti uninefrectomizzati ed a dieta normosodica, anche il Candesartan aumenta l'escrezione di Na; questo effetto è bloccato dalla somministrazione di PD123319. Un aumento della natriuresi è stato osservato anche negli animali a dieta iposodica. Inoltre, mentre nei ratti nefrectomizzati e non trattati con l'AT1RA l'infusione dell'Angiotensina II nell'interstizio renale non modifica la natriuresi, l'infusione di Angiotensina III l'aumenta. Anche questo effetto può essere bloccato dal PD123319, quindi esso appare mediato dai recettori AT2, attivati però dall'Angiotensina III e non dall'Angiotensina II (Padia e coll. 2006).

## 11.4 - Gli effetti pleiotropi

Questi effetti, che sono stati riconfermati dai numerosi *trials* condotti con gli AT1RA (vedi Cap. 14), vanno dalla riduzione delle lesioni aterosclerotiche e dei *markers* dell'infiammazione (Wu e coll. 2001) all'inibizione della fibrinolisi e del trombossano A2, dello stress ossidativo e dell'aggregazione piastrinica, fino all'induzione dell'attività PPAR- $\gamma$ , al miglioramento delle funzioni cognitive e di quelle sessuali (Koh e coll. 2003; Sierra e de la Sierra 2005).

Essi sono inoltre diversi da farmaco a farmaco (ad es., soltanto il Losartan ha proprietà uricosuriche: vedi dopo) ed in linea di massima appaiono indipendenti dalla riduzione dei valori pressori e dal blocco dei recettori AT1, per cui è stato anche ipotizzato che essi siano dovuti ad un meccanismo non legato a questo blocco (Ohlstein e coll. 1992).

Non legate alla diminuzione della PA appaiono sia la riduzione prodotta dal Losartan (160 mg/die x 6 sett.) delle lesioni (*fatty streaks*), che compaiono nell'aorta di scimmie sottoposte ad una dieta ricca di colesterolo (Strawn e coll. 2000a) (Fig. 27), sia la diminuzione di circa il 50% della placca aterosclerotica osservata nell'aorta di conigli WHHL dopo somministrazione per 6 mesi di Candesartan Cilexetil, alla dose di 2 mg/kg (Papademetriou e coll. 2001). In questi animali, un altro AT1RA - l'Irbesartan - riduce le lesioni soltanto quando è somministrato a dosi capaci di riportare alla norma i valori pressori.

A produrre questi effetti contribuisce anche la capacità degli AT1RA di ridurre la produzione di radicali liberi AT1-dipendente: l'aumento del superossido prodotto dall'endotelio e dell'attività della NADPH ossidasi che si verifica nella ipercolesterolemia può essere prevenuta dal Losartan (Warnholtz e coll. 1999); inoltre, la terapia con questi farmaci aumenta la

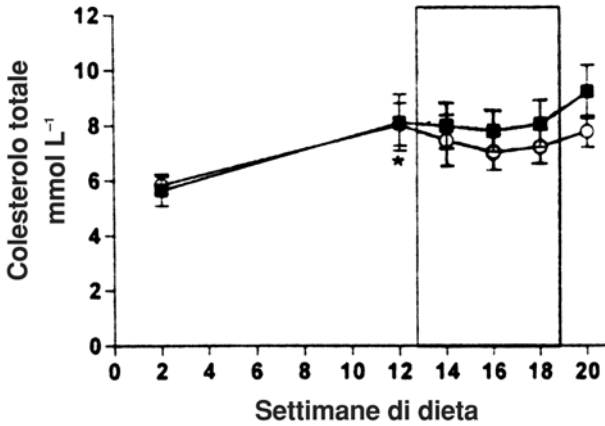


Fig. 27. Gli effetti del Losartan sul colesterolo totale nelle scimmie iperlipemiche

sintesi dell'enzima anti-ossidante superossido-dismutasi nei pazienti con malattia coronarica (Hornig e coll. 2001).

Anche il metabolismo glicidico appare favorevolmente influenzato dagli AT1RA (Kurtz e Pravenec 2004). In ratti obesi Zucker con ridotta sensibilità all'insulina, l'Olmesartan in soluzione allo 0.2% aumenta questa sensibilità e riduce i livelli dei trigliceridi (Ran e coll. 2005). Una riduzione dell'insulino-resistenza ed un aumento degli adipociti sono stati osservati anche dopo somministrazione di Candesartan Cilexetil (8 mg/die), in soggetti ipertesi con resistenza all'insulina ed aumentati livelli di acidi grassi liberi (Schupp e coll. 2004).

Questi effetti appaiono legati alla differenziazione preadipocitica ed all'attivazione del trasporto intracellulare del glucosio e di un recettore nucleare, il PPAR- $\gamma$ , che nei ratti a dieta iperglicidica-iperlipidica riduce il peso corporeo e la resistenza alla insulina e transattiva i geni specifici degli adipociti (Reid 2005). L'attivazione del PPAR- $\gamma$  appare indipendente dal blocco degli AT1, in quanto è stata osservata anche in cellule che mancano di questi recettori (Schupp e coll. 2004).

Recentemente, due gruppi di ricercatori (Schupp e coll. 2004; Watanabe e coll. 2005) hanno dimostrato che anche il Losartan produce questi effetti grazie ad un altro suo metabolita recentemente identificato (Kramer e coll. 2002), l'EXP3179 (Fig. 28), che, a differenza dell'EXP3174, mostra scarsa attività AT1-bloccante, ma attiva la differenziazione degli adipociti 3T3-L1 e stimola l'espressione del PPAR- $\gamma$  (Schupp e coll. 2004). Inoltre, esso stimola la fosforilazione della NO-sintasi endoteliale e sopprime l'apoptosi delle cellule endoteliali prodotta dal TNF, indipendentemente dai segnali che arrivano dal recettore AT1 (Watanabe e coll. 2005). Questi effetti



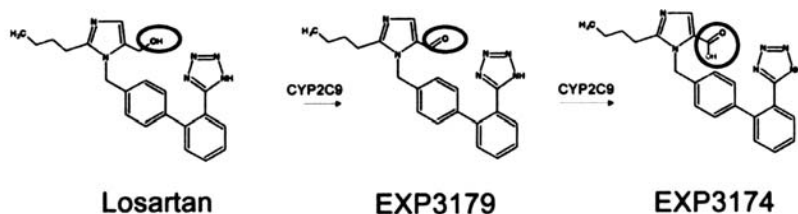


Fig. 28. Il Losartan ed i suoi metaboliti

almeno in parte potrebbero spiegare anche la capacità del Losartan di prevenire l'incidenza e l'evoluzione del diabete evidenziata dallo studio LIFE (v. Cap. 14).

Il blocco dei recettori AT<sub>1</sub> produce effetti favorevoli anche in alcune patologie del polmone, nel quale questi recettori aumentano fino a 5 volte nel corso di processi ostruttivi (Bullock e coll. 2001). *In vitro*, il Losartan impedisce la proliferazione dei fibroblasti provenienti da polmoni umani fibrosclerotici, inibendo la produzione del TGF- $\beta$ ; *in vivo*, nei ratti infettati per via endotracheale con colture di Bordetella Bronchiseptica, alla dose di 20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ , ritarda la comparsa della SARS, nella quale l'Angiotensina II è notevolmente aumentata. Anche il meccanismo di questi effetti appare indipendente dal blocco dei recettori AT<sub>1</sub>, ma legato all'inibizione prodotta dal farmaco del legame tra la fMLP ed il suo recettore (che appartiene al gruppo dei GPCRs a 7 domini) (Raiden e coll. 2002). Il SRA sembra avere dunque un ruolo anche in tale patologia, e questa ipotesi appare anche più probabile se si considera che un altro componente del sistema – l'ACE2 – è un recettore funzionale del coronavirus responsabile della SARS (Li e coll. 2003). Somministrato *ev* in tre dosi successive (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) il Losartan previene anche le complicanze polmonari che compaiono in ratti con pancreatite acuta da ceruleina (Chan e Leung 2006).

Un'azione protettiva degli AT<sub>1</sub>RA è stata dimostrata anche nei disturbi del circolo cerebrale. In ratti SHRSP di 4 settimane infusi con una soluzione all'1% di NaCl, il Losartan, a dosi comprese tra 1 e 10 mg/kg sciolte nell'acqua da bere, previene la comparsa dello *stroke* e prolunga la sopravvivenza anche a dosi che non modificano i livelli pressori (Stier e coll. 1993). Questi effetti persistono anche dopo la sospensione del farmaco, fino alla 26° settimana (Forner e coll. 1993; Saavedra e coll. 2006).

Anche nel gerbillo, caratterizzato da un poligono di Willis privo di circolo collaterale, la somministrazione di Losartan (100 mg/kg) per bolo rapido dopo legatura di una carotide, migliora la sopravvivenza di oltre 48 ore (Fernandez e coll. 1994). Il fenomeno è dovuto con molta probabilità alla stimolazione dei recettori AT<sub>2</sub> ad opera dell'Angiotensina II, dal mo-

mento che può essere impedito dalla contemporanea somministrazione di un ACEI, che blocca la sintesi del polipeptide.

Indipendentemente dalla riduzione dei livelli pressori, un miglioramento del quadro neurologico prodotto da una lesione ischemica focale è stato osservato anche dal gruppo di Unger (Dai e coll. 1999), in ratti ai quali erano stati somministrati per infusione icv Losartan o Irbesartan nei 5 gg. precedenti l'ischemia. Gli stessi risultati sono stati ottenuti anche in ratti WKY ed in ratti SHR con ischemia cerebrale prodotta dall'occlusione dell'arteria cerebrale media e pretrattati con Candesartan Cilexetil (0.5 mg/die), per periodi variabili da 3 a 14 gg. (Nishimura e coll. 2000).

La protezione del circolo cerebrale si accompagna anche ad un miglioramento della qualità di vita e delle funzioni cognitive (Innocenti e coll. 2002). Uno studio multicentrico di confronto tra il Losartan (che attraversa la BEE: Song e coll. 1991) ed un Ca-antagonista, l'amlodipina, condotto in 898 pazienti con IA lieve o moderata, ha dimostrato che il Losartan alla dose di 50mg/die, oltre a ridurre in maniera soddisfacente i livelli pressori, migliora anche la qualità della vita valutata con il PGWB (*Psychological General Well-Being Index*). Nessuna modifica di questo parametro è stata invece osservata con l'amlodipina (Dahlof e coll. 1997b). In un altro studio condotto su 69 ipertesi lievi/moderati, in cui il Losartan (50mg/die x 26 mesi) era confrontato con l'HCTZ, l'AT1RA ha prodotto un miglioramento non solo della qualità di vita ma anche delle funzioni cognitive valutate con due test psicometrici, il MMSE (*Mini Mental State Examination*) e lo SCAG (*Sandoz Clinical Assesment Geriatric*); questi effetti non sono stati osservati con il diuretico (Tedesco e coll. 1999).

Partendo dall'osservazione che nei ratti con stress da isolamento o da immobilizzazione i livelli di Angiotensina II e l'espressione dei recettori AT1 sono aumentati in molte strutture cerebrali, e in particolare nelle aree ipotalamiche, Saavedra e coll. (2005) hanno recentemente dimostrato che la somministrazione in questi animali di Candesartan Cilexetil *per os* (1 mg/kg/die x 2 sett.) riduce il legame dei recettori AT1 con queste strutture e, contemporaneamente, previene l'aumento dei diversi ormoni dello stress (ACTH, corticosterone, catecolamine). Inoltre contrasta la riduzione dei siti di legame con le benzodiazepine presenti in questi animali.

Confrontando tre AT1RA (Losartan, Candesartan e Valsartan), in ratti SHRSP, Jimenez e coll. (2001) hanno constatato, inoltre, che dei tre farmaci soltanto il Losartan (20 mg/kg/die), indipendentemente dagli effetti sulla PA, riduce l'attivazione piastrinica ed il legame dell'U46619 (analogo del Tx2) con le piastrine di questi animali. Anche questi effetti sono dovuti con molta probabilità all'altro metabolita del Losartan, l'EXP3179 (Kramer e coll. 2002), che oltre a migliorare il metabolismo glicidico e lipidico, ha an-

che proprietà antiaggreganti ed anti-infiammatorie perché inibisce l'aggregazione piastrinica, riduce la produzione di  $\text{PGF2}\alpha$  ed impedisce la *upregulation* delle ICAM. Poiché questi effetti compaiono indipendentemente dal blocco dei recettori AT1, il Losartan si configura come un "dual receptor antagonist" (Sadoshima 2002) e questa sua caratteristica è parzialmente condivisa dall'Irbesartan, che presenta una struttura molecolare simile.

Un altro effetto pleiotropo, prodotto soltanto dal Losartan, è l'aumentata escrezione di acido urico con le urine con diminuzione anche della uricemia, osservato sia in volontari sani che in pazienti ipertesi o con malattie renali. Questo effetto è prodotto soltanto dal Losartan e non dal suo metabolita EXP3174 ed è dovuto all'azione inibitrice del farmaco sullo scambio urato/anioni nel tubulo prossimale renale. Il fatto che non si modifichi con le variazioni dell'apporto sodico, dimostra che esso è indipendente sia dal blocco degli AT1 che dall'attivazione del SRA (Nakashima e coll. 1992; Burnier e coll. 1996). Egualmente prodotta soltanto dal Losartan è l'inibizione della contrazione che l'Angiotensina II a basse dosi produce sul muscolo liscio coccigeo, mentre il rilasciamento prodotto da dosi più elevate del polipeptide è inibito dal PD123319 (De Godoy e coll. 2004). Se il fenomeno sia all'origine dei disturbi dell'alvo qualche volta accusati dai pazienti trattati con questo AT1RA, è ancora da dimostrare.

Una metanalisi condotta su circa 12.000 pazienti ipertesi con una storia di cefalea non correlata all'entità dell'aumento pressorio e trattati con 7 diversi tipi di AT1RA in confronto con il placebo, ha dimostrato che gli AT1RA riducono anche la frequenza di questa patologia di circa 1/3 rispetto al placebo, indipendentemente dal loro effetto sulla PA (Etminan e coll. 2002). Il meccanismo con cui si realizza il miglioramento è ancora sconosciuto, ma suggerisce un ruolo del SRA anche nella patogenesi del disturbo (Tronvik e coll. 2006).

In ratti transgenici *m(ren-2)*27 trattati con Losartan, Moravski (Moravski e coll. 2000) ha osservato anche un'inibizione o una riduzione dei fenomeni proliferativi nei vasi retinici dopo esposizione degli animali ad un'alternanza di ipossia ed iperossia. Partendo dall'osservazione che nella retinopatia diabetica i recettori AT1 sono attivati a livello delle cellule endoteliali della retina (Clermont e coll. 2006), uno studio tuttora in corso con il Candesartan, (Studio DIRECT -*Diabetic Retinopathy Candesartan Trial*-), si propone di valutare l'effetto di questi farmaci nella prevenzione di tale complicanza del diabete. Infine, poiché nell'occhio sono presenti tutti i componenti del SRA ed il Captopril si è rivelato capace di ridurre la pressione endoculare in volontari sani ed in pazienti con glaucoma ad angolo aperto, anche il Losartan è stato usato con successo nel trattamento di questa patologia nell'uomo (Costagliola e coll. 1999).

# Il meccanismo d'azione degli antagonisti dei recettori AT1

Di norma il capitolo sul meccanismo d'azione di un farmaco dovrebbe precedere quello sugli effetti che esso produce, tuttavia, nel caso degli AT1RA, questi effetti sono talmente numerosi e diversificati da giustificare una trattazione *a posteriori* dei meccanismi con cui essi agiscono, perché in tal modo è possibile comprendere meglio in che misura essi dipendono non solo dal blocco dei recettori AT1, ma anche dal coinvolgimento di altri componenti del SRA (recettori AT2, ACE2, Ang-(1-7)) e di alcune strutture del SNC.

## 12.1 - Il blocco dei recettori AT1

Sia le ricerche condotte nei ratti con recettori AT1 mutanti, nei quali alcuni aminoacidi erano stati sostituiti da quelli corrispondenti provenienti dai recettori AT1 di anfibi (che non riconoscono gli antagonisti non peptidici) (Ji e coll. 1994), sia quelle condotte su recettori AT1 umani, in cui alcuni aminoacidi erano stati sostituiti da quelli corrispondenti del recettore AT1 dello *Xenopus laevis* (Schambye e coll. 1994), hanno dimostrato che, affinché questo blocco si realizzi, è necessario che l'antagonista si leghi al recettore AT1 in uno spazio compreso tra la III e la VII elica transmembranale, anche se non si può escludere un ruolo per le anse extracellulari (Conchon e coll. 1997). Determinante è la presenza di alcuni aminoacidi, dal momento che un'attenuazione significativa del legame antagonista/recettore AT1 è stata osservata nei recettori mutanti, nei quali erano stati sostituiti gli aminoacidi Val108, Ala163, Thr198, Ser252, Leu300 e Phe301 (Ji e coll. 1994).

Secondo Hunyady (Hunyady e coll. 1996), l'antagonista può legarsi al recettore in due modi: occupando uno spazio intramembranale, in modo da sovrapporsi a quello occupato dall'agonista (e questo sarebbe il meccanismo con cui funzionano gli antagonisti sormontabili) oppure modificando la conformazione del recettore in modo da impedire il suo legame con l'agonista (e questo avverrebbe con gli antagonisti insormontabili).

Per effetto di questo legame la maggior parte delle azioni prodotte dall'Angiotensina II tramite questi recettori sono inibite, ma, per quanto de-

terminante, questo non sembra essere l'unico meccanismo con cui funzionano questi farmaci, in quanto altri componenti del SRA svolgono un ruolo altrettanto importante.

## **12.2 - La partecipazione dei recettori AT2 e degli altri componenti del SRA**

Come avevano già suggerito qualche anno fa le ricerche del gruppo di Volpe (Gigante e coll. 1998) e di Siragy (Carey e coll. 2001), gli AT2 contribuiscono alla diminuzione della PA prodotta dagli AT1RA perché, non potendo più legarsi ai recettori AT1 (bloccati dall'antagonista), l'Angiotensina II si lega ad essi, con conseguente comparsa di una vasodilatazione e di una riduzione dei livelli pressori.

Nel ratto SHR, l'aggiunta al Candesartan di un AT2-agonista, il CGP42112, dà luogo, infatti, ad una vasodilatazione maggiore di quella osservata con il solo AT1RA; tale effetto non compare se l'agonista è somministrato da solo (Barber e coll. 1999). Questo risultato dimostra che: 1) il blocco dei recettori AT1 è necessario per fare affiorare l'azione vasodilatatrice dei recettori AT2 (Schuijff e coll. 1999); 2) l'Angiotensina II, generalmente considerata come un vasocostrittore, produce invece una vasodilatazione dopo il blocco dei recettori AT1, quando cioè è libera di stimolare quelli AT2 (Xiao Li e Widdop 2004).

La vasodilatazione, che interessa prevalentemente i microvasi di resistenza ed in minor misura quelli di capacitanza, si verifica solo nei ratti SHR e non in quelli WKY, quindi appare legata alla presenza dell'aumento pressorio (Horiuchi e coll. 1999b; Barber e coll. 1999).

Alla sua comparsa contribuiscono alcuni autacoidi vasodilatatori, in quanto essa non si verifica dopo L-NAME o Icatibant oppure dopo rimozione dell'endotelio (Carey 2005a). Inoltre, contrariamente a quanto avviene per la vasocostrizione, che si attenua dopo stimolazione prolungata con l'Angiotensina II, essa non si riduce dopo somministrazione prolungata dell'AT1RA, cioè non va incontro al fenomeno della tachifilassi, sia perché l'espressione dei recettori AT2 aumenta dopo blocco di quelli AT1, sia perché, a differenza di questi ultimi, essi non si internalizzano (Widdop e coll. 2002).

Alla vasodilatazione contribuisce anche la capacità dei recettori AT2 di inibire tonicamente l'ACE e di aumentare fino a 5 volte la espressione dell'ACE 2 (Carey 2004) che, a sua volta, stimola la sintesi dell'Ang-(1-7) (Igasé e coll. 2005; Dantas e Santberg 2005). Queste risposte non si verificano nei ratti trattati con Idralazina o Atenololo. A conferma del meccanismo descritto, nei ratti WKY il Candesartan somministrato da solo riduce di poco i valori pressori (< 10 mmHg), mentre li riduce in maniera più signifi-

cativa se è associato all'Ang-(1-7). Quest'ultima, somministrata da sola, è anch'essa priva di effetti sulla PAM (Walters e coll. 2005). Decrementi significativi della PA sono stati osservati anche nei ratti SHR, con la differenza che in questo ceppo il calo pressorio si verifica già dopo Candesartan, anche se in misura ridotta, ma si riduce in misura maggiore dopo aggiunta di Ang-(1-7). Viceversa, i ratti trattati con l'antagonista A799 mostrano una risposta ipotensiva al Losartan ridotta di circa il 25% (Collister e Hendel 2003).

Questi risultati dimostrano che:

- a) la riduzione pressoria che compare dopo blocco dei recettori AT1 è mediata anche dai recettori AT2 e dalla cascata di sostanze vasodilatatrici che essi attivano, come conferma la possibilità di impedire la loro azione ipotensiva con il PD123319 oppure con l'Icatibant o la L-NAME (Walters e coll. 2005);
- b) alla riduzione della PA contribuisce anche l'Ang-(1-7), che è anch'essa aumentata dopo blocco dei recettori AT1 e che partecipa ad essa tramite il recettore AT2 piuttosto che con il suo recettore specifico, come dimostra l'inefficacia dell'antagonista A799 nell'impedire tali fenomeni.

I recettori AT2 contribuiscono, pertanto, all'azione degli AT1RA con un triplice meccanismo (Fig. 29), e cioè:

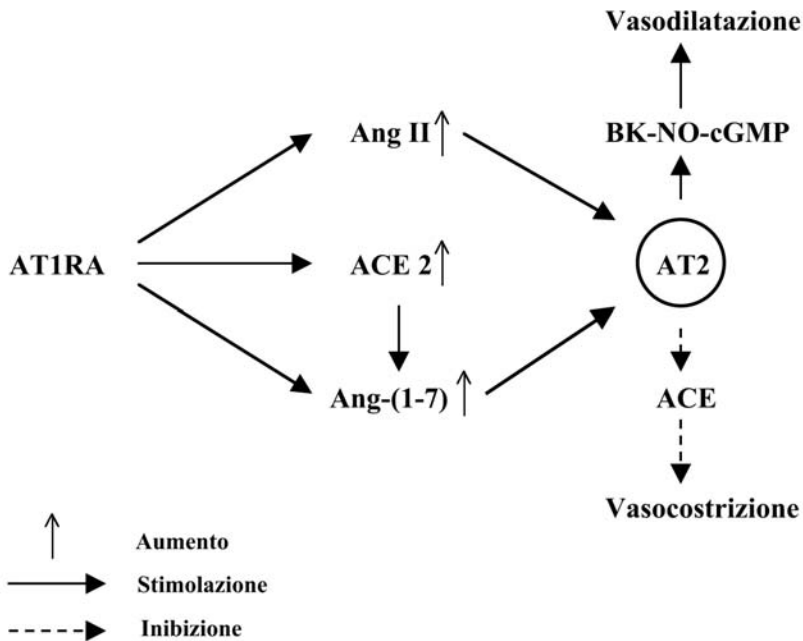


Fig. 29. Il contributo dei recettori AT2 all'azione degli AT1-antagonisti (AT1RA)

- a) aumentando l'espressione di sostanze vasodilatatrici (BK, NO, cGMP);
- b) inibendo tonicamente l'ACE;
- c) stimolando l'attività dell'ACE2 e con essa la sintesi di Ang-(1-7).

Il contributo di questi recettori è stato tuttavia messo in dubbio da Collier e coll. (2002), i quali in due gruppi di ratti SD normotesi e Na-depleti, trattati l'uno con Losartan e l'altro con Losartan + PD123319, hanno osservato che la risposta ipotensiva nel gruppo trattato con entrambi gli antagonisti era maggiore rispetto a quella osservata nel gruppo trattato con il solo AT1RA; quindi, la stimolazione dei recettori AT2 da parte dell'Angiotensina II non sarebbe determinante per la comparsa della caduta pressoria prodotta dal farmaco.

### 12.3 - Gli effetti mediati dal SNC

Poiché la maggior parte degli AT1RA oltrepassano la BEE anche quando somministrati per via sistemica (Song e coll. 1991), è stata presa in considerazione anche l'ipotesi che questi farmaci agiscano bloccando il legame dell'Angiotensina II con i recettori AT1 presenti nelle strutture dell'encefalo deputate al controllo cardiovascolare.

Le ricerche in proposito hanno confermato questa possibilità, ma hanno dimostrato che per motivi legati probabilmente alla loro maggiore o minore lipofilia, i diversi AT1RA bloccano i recettori AT1 centrali in misura variabile da farmaco a farmaco. Rispetto ad altri AT1RA, il Losartan e l'Embusartan inibiscono infatti il legame del recettore AT1 in misura maggiore nelle strutture situate all'interno della BEE (PVN, nucleo sovrachiasmatico, MnPO), rispetto a quelle situate all'esterno (SFO) (Wang e coll. 2003). Inoltre, la somministrazione di questi antagonisti per via sistemica in ratti transgenici ipertesi, modifica l'espressione dei recettori AT1 in alcune strutture importanti per il controllo delle funzioni cardiovascolari, come l'ipotalamo ed il midollo allungato. Queste modifiche vanno di pari passo con la caduta pressoria e si accompagnano ad un aumento locale dell'Ang-(1-7) e ad una diminuzione del tono adrenergico. La riduzione delle risposte simpatiche che compaiono dopo occlusione bilaterale delle carotidi (aumento della PA, della FC e dell'attività simpatica renale) è stata osservata anche dopo somministrazione ev di Losartan in conigli NZW (Kumagai e Reid 1994). Il blocco dell'attività autonoma prodotto dagli AT1RA è dimostrato anche dalla ridotta liberazione di NA a livello presinaptico, che compare dopo somministrazione di tre diversi AT1RA (Losartan, Irbesartan, Telmisartan) (Balt e coll. 2001). Somministrato sia in acuto che in cronico nell'atrio isolato di ratti WKY e SHR, il Losartan inibisce anche la liberazione di NA che compare dopo applicazione di uno stimolo elettrico.

Questo effetto, che probabilmente contribuisce all'efficacia antipertensiva degli AT1RA nei ratti SHR, nei quali la liberazione di catecolamine è maggiore rispetto ai ratti WKY (Foucart e coll. 1996), riconferma l'esistenza di uno stretto rapporto tra il SRA ed il SNS (Mancia e coll. 2006).

Tanto il Losartan che l'Irbesartan, anche quando somministrati *per os* o *ev*, riducono in misura dose-dipendente anche l'aumento della MAP, della sete e della liberazione di vasopressina prodotto dall'Angiotensina II, senza però inibirlo del tutto (Culman e coll. 2002), tuttavia il blocco dei recettori AT1 prodotto dall'Irbesartan ha una durata più breve di quello prodotto dal Losartan. Per la comparsa di questi effetti sembra comunque necessaria la presenza di alcuni CVO che, essendo situati all'esterno della BEE, si trovano nella posizione ideale per "avvertire" l'Angiotensina II che arriva ad essi dal circolo periferico per poi trasferire queste informazioni, tramite numerosi collegamenti, ad altre strutture situate all'interno della BEE (regione periventricolare, PVN, SON, MnPO) coinvolte nel controllo adrenergico (Johnson e Gross 1993).

Tra i CVO, l'AP svolge un ruolo particolare, come dimostra l'aumento dell'attività simpatica e della PA dopo applicazione su di essa di Angiotensina II (Ferguson e Bains 1997). L'aumento è impedito dal Losartan, ma dopo distruzione dell'AP, l'azione del farmaco appare ridotta di circa il 40% (Collister e Osborn 1998). Risultati analoghi sono stati ottenuti anche per quanto riguarda l'aumento pressorio prodotto dall'applicazione di Angiotensina II sul SFO: anche tale incremento può essere ridotto dal Losartan; tuttavia l'azione del farmaco è ridotta di circa un 1/3 dopo distruzione di questa struttura (Collister e Osborn 1998).

L'attenuazione della risposta al Losartan non è però eguale per le due strutture: dopo distruzione del SFO essa compare infatti nel giro di 4 gg. dall'inizio del trattamento ed in circa 8 gg. dopo distruzione della AP, per cui è possibile che in questo intervallo sia coinvolto qualche altro CVO (OVLT) (Collister e Hendel 2003). Il meccanismo alla base di questa risposta non è ancora chiaro, ma l'ipotesi più probabile è che a livello di queste strutture il Losartan agisca bloccando le azioni simpatiche mediate dall'Angiotensina II, dal momento che entrambe inviano proiezioni ai diversi neuroni che si proiettano ai centri del controllo simpatico (Collister e Osborn 1998; Collister e Hendel 2003).



### La tollerabilità e le reazioni avverse

La maggior parte dei dati in proposito si riferiscono al Losartan, che essendo stato il primo AT1RA ad essere commercializzato, è anche quello con il quale sono stati condotti il maggior numero di studi clinici, tuttavia i dati ottenuti con gli altri farmaci della stessa classe (Valsartan, Irbesartan, Candesartan, Telmisartan, Eprosartan) sono in linea di massima sovrapponibili (Mazzolai e Burnier 2001).

Per quanto riguarda il Losartan, l'incidenza complessiva di effetti indesiderati è del 15.3% nei pazienti trattati rispetto al 15.5% di quelli trattati con placebo (Mallion e Goldberg 1996). Di conseguenza, anche il numero dei pazienti che hanno abbandonato il trattamento con il Losartan è basso, grazie anche alla possibilità di somministrare il farmaco in una dose unica. Lo stesso vale per gli altri AT1RA: uno studio retrospettivo su 7 di essi ha dimostrato che, in un periodo di 3 anni, la *compliance* dei pazienti trattati è stata significativamente maggiore di quella osservata nei pazienti curati con altri farmaci anti-ipertensivi, e paragonabile a quella dei soggetti trattati con placebo (Degli e coll. 2002). La sospensione del trattamento non si accompagna a fenomeni di *rebound*, probabilmente per la *downregulation* dei recettori AT1 prodotta da questi antagonisti e per la loro più lunga emivita rispetto a quella dell'Angiotensina II (Mazzolai e Burnier 2001).

Gli effetti indesiderati più frequenti, indipendenti dal sesso, dall'età e dalla razza, sono la cefalea (14.1%), le vertigini (2.4%) ed una sensazione di astenia e di affaticamento (2.0%); tuttavia, il loro rapporto con il trattamento rimane incerto, trattandosi di eventi spesso osservati anche con il placebo (Mallion e Goldberg 1996).

La tosse compare con una frequenza molto minore rispetto agli ACEI (2.3-4.1 vs 8.8%): uno studio di confronto tra Lisinopril, Losartan e Idroclorotiazide ha dimostrato che, dopo 8 settimane di terapia, l'incidenza del disturbo nei pazienti trattati con l'AT1RA era paragonabile a quella osservata nei pazienti trattati con il diuretico, ma molto minore di quella osservata con l'ACEI (Lacourciere e coll. 1994). Una frequenza del sintomo non diversa dal placebo è stata osservata anche in pazienti trattati con Irbesartan, Valsartan o Candesartan (Mazzolai e Burnier 2001). Molto raramente sono comparse reazioni cutanee oppure un angioedema, in genere negli

stessi soggetti che avevano presentato questo disturbo quando trattati con un ACEI (Chiu e coll. 2001).

Nessun effetto è stato osservato sulla crasi ematica (se si eccettua una diminuzione dell'ematocrito nei pazienti con trapianto renale: Julian e coll. 1998), né sui comuni esami di laboratorio. L'iperkalemia è rara, ma il monitoraggio del K è opportuno nei pazienti diabetici o con insufficienza renale (Mallion e Goldberg 1996). Una diminuzione della *clearance* della creatinina può verificarsi nei pazienti trattati contemporaneamente con diuretici e/o mantenuti a dieta iposodica. Una particolare attenzione è necessaria, invece, in caso di somministrazione di questi farmaci in pazienti con stenosi dell'a. renale o nefroangiosclerosi, per il rischio di una insufficienza renale acuta da riduzione della pressione di filtrazione intraglomerulare (Mazzolai e Burnier 2001). Sconsigliabile è la loro somministrazione in gravidanza per la comparsa di una tossicità fetale, ed a donne che allattano, per il passaggio dei farmaci o dei loro metaboliti nel latte materno.

Non vi sono controindicazioni per la somministrazione contemporanea di Warfarin, Cimetidina, Fenobarbital o Digossina (i cui livelli aumentano solo dopo Telmisartan). I FANS aboliscono, invece, la risposta natriuretica prodotta da questi farmaci e contribuiscono a ridurre la loro efficacia anti-pertensiva (Fricker e coll. 1998).

# Le principali indicazioni terapeutiche degli AT1RA – I grandi *trials*

Nel giro di poco più di un decennio l'idea originale di Furakawa (Furakawa e coll. 1982) di un farmaco in grado di antagonizzare i recettori AT1 in modo da impedire all'Angiotensina II di produrre i suoi effetti, ha trovato una valida conferma nella riduzione della morbilità e della mortalità cardiovascolare prodotta dagli AT1RA nel trattamento della IA, dello scompenso cardiaco, della nefropatia diabetica e dello *stroke* (Weber 2003; Ferrario 2006b).

### 14.1 - L'ipertensione arteriosa

L'impiego di questi farmaci nella terapia dell'IA trova il suo razionale nella loro capacità di ridurre le RVP, di inibire la vasocostrizione prodotta dall'Angiotensina II e ridurre il riassorbimento del Na e del H<sub>2</sub>O per una minore secrezione di Aldosterone. Di conseguenza, la PA si abbassa, mentre la FC rimane immodificata, per la contemporanea diminuita liberazione di catecolamine (Burnier e Brunner 1994; Fabiani e Johnston 2001).

La riduzione pressoria – osservata solo negli ipertesi – compare lentamente, dopo 4 o 5 settimane a seconda del farmaco e delle dosi usate (quindi l'ipotensione ortostatica è un evento raro) ed è indipendente dall'età, dal sesso e dalla razza (Argenziano e coll. 1999).

Egualeme<sup>n</sup>te antagonizzati sono gli effetti dell'Angiotensina II a lungo termine, come l'ipertrofia della CML e la stimolazione della matrice cellulare. Un miglioramento di queste alterazioni e della disfunzione endoteliale è stato osservato da Schiffrin (Schiffrin e coll. 2000) in un gruppo di pazienti con ipertensione lieve/moderata trattati per un anno con Losartan (50 mg/die), nei quali l'Atenololo alla stessa dose – a parità di caduta pressoria – non aveva prodotto alcun effetto. Dopo somministrazione dell'AT1RA, gli AA hanno osservato anche una diminuzione della rigidità delle pareti delle piccole arterie, che non si verificava nei pazienti trattati con il  $\beta$ -antagonista. Effetti simili sono stati ottenuti anche con l'Irbesartan (Prasad e coll. 2000).

In pazienti aterosclerotici trattati con Losartan è stato osservato anche

un aumento della dilatazione arteriosa ed un miglioramento della disfunzione endoteliale, per una maggiore biodisponibilità di NO (Prasad e coll. 2000).

Questi risultati, ottenuti mediante ricerche condotte su piccoli gruppi di pazienti e per tempi piuttosto brevi, sono stati confermati dai *trials* placebo-controllati ed in doppio cieco condotti per tempi più lunghi e su un numero molto più ampio di pazienti (Zanchetti 2001) (Tabella 5).

Il primo di questi *trials* – lo studio LIFE (*Losartan Interventions for Endpoint Reduction in Hypertension*) – è stato programmato con lo scopo di verificare se, in un ampio gruppo di pazienti ipertesi, un AT1RA (il Losartan) è più efficace di un betabloccante (l'Atenololo), nel ridurre la loro morbilità e mortalità cardiovascolare.

Lo studio (prospettico, multinazionale, della durata minima di 4 anni) è stato condotto su 9123 pazienti di ambo i sessi, di età tra i 55 e gli 80 anni, con una PAD (in posizione seduta) compresa tra 95 e 115 mmHg ed una PAS tra 160 e 200 mmHg (Dahlof e coll. 1997a). Al momento dell'arruolamento, mediante rigidi criteri elettrocardiografici nel 44% di questi pazienti era stata accertata una IVS eccentrica, nel 24% una IVS concentrica, nel 10% un rimodellamento concentrico del VS, e nel 22% una normale geometria ventricolare (Devereux e coll. 2002). Dopo 1–2 settimane di PL in singolo cieco i pazienti erano assegnati in maniera randomizzata ad un trattamento con Losartan (50 mg/die) od Atenololo (50 mg/die), con la possibilità – se dopo 2 mesi la PA era ancora maggiore di 140/90 mmHg – di aggiungere a ciascuno dei due farmaci una dose di HCTZ di 12.5 mg/die. Se al termine del 4° mese di trattamento l'*endpoint* non era stato ancora raggiunto, la dose di ciascuno dei due farmaci era raddoppiata (100 mg/die).

I risultati di questi studio, pubblicati nel 2002 (Dahlof e coll. 2002a), dimostrano che, pur essendo l'entità della riduzione pressoria sovrapponibile nei due gruppi (48% vs. 45%), in quello trattato con il Losartan l'incidenza combinata degli eventi cardiovascolari (morte, infarto del miocardio

Tabella 5. I principali trials condotti con gli AT1-antagonisti

IA	Scompenso ed infarto	Nefropatia	Ictus
LIFE	ELITE 1	IRMA 2	ACCESS
SCOPE	ELITE 2	MARVAL	MOSES
VALUE	Val-HeFT	RENAAL	
	CHARM	IDNT	
	RESOLVD	ABCD-2V	
	OPTIMAAL		
	VALIANT		
	Val-PREST		

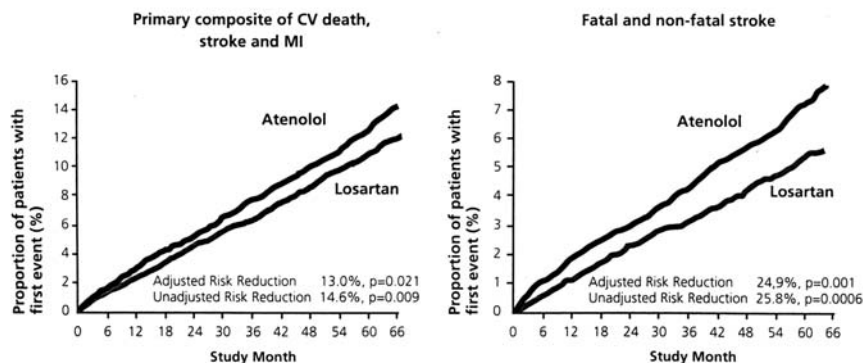


Fig. 30. Gli effetti del Losartan e dell'Atenololo sugli endpoint primari (morte, infarto, stroke fatali e non fatali) (studio LIFE) (Da: Dahlof e coll. 2002a, con autorizzazione)

o *stroke*) è stata del 13% minore di quella osservata nel gruppo dell'Atenololo (508% vs. 588%) (Fig. 30).

Questa sua maggiore efficacia è dovuta alla capacità del Losartan di produrre non solo una diminuzione dei livelli pressori, ma anche altri effetti, a cominciare dalla riduzione della massa ventricolare sinistra: nelle femmine essa si è ridotta infatti da un valore iniziale di  $207 \pm 47$  g ad un valore di  $183 \pm 41$  g dopo 12 mesi, ed a  $177 \pm 39$  g dopo 24 mesi; nei maschi, da un peso iniziale di  $252 \pm 55$  g si è ridotta a  $222 \pm 50$  g dopo 12 mesi, ed a  $208 \pm 43$  g dopo 24 mesi (Devereaux e coll. 2002).

Questi effetti sulla massa ventricolare sono stati confermati anche nello studio REGAAL (*The Losartan LVH Regression Study*) condotto per 36 settimane in doppio cieco con l'Atenololo in pazienti con IA lieve/moderata e con IVS valutata ecocardiograficamente ( $LVMI > 120$  g/m<sup>2</sup> nei maschi e  $> 105$  g/m<sup>2</sup> nelle femmine) (Dahlof e coll. 2002b). Anche in questo gruppo, a parità di riduzione pressoria, il Losartan (50 mg/die) ha ridotto la massa ventricolare sin. in misura superiore all'Atenololo somministrato alla stessa dose ( $-6.56$  g/m<sup>2</sup> vs.  $-3.71$  g/m<sup>2</sup>) e, con essa, i livelli dei peptidi natriuretici cardiaci, *markers* tessutali della IVS e della compromissione cardiaca (Kario e coll. 1998).

La correlazione esistente tra IVS e la comparsa di complicanze cerebrovascolari, confermata recentemente (Verdecchia e coll. 2001), spiega almeno in parte anche la riduzione di circa il 25% degli *stroke* fatali e non fatali osservata nello studio LIFE nel gruppo trattato con il Losartan. È anche ipotizzabile che a questa riduzione il Losartan abbia contribuito con il suo metabolita EXP3179, dotato di proprietà antiaggreganti ed antinfiammatorie (Kramer e coll. 2002) e con i suoi effetti benefici sulla fibrillazione atriale (Watchell e coll. 2005). Rispetto all'Atenololo, infatti esso ha ridotto del

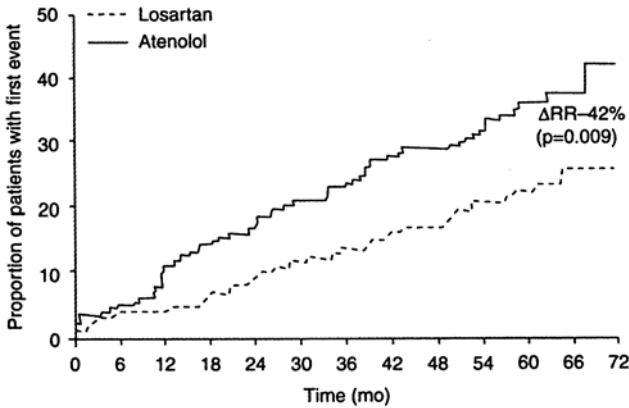


Fig. 31. Gli effetti del Losartan sulla fibrillazione atriale (studio LIFE) (Da:Wachtell e coll. 2005, con autorizzazione)

33% la comparsa di questa aritmia negli 8851 pazienti che all'ingresso nello studio erano in ritmo sinusale (Fig. 31) e del 51% la comparsa dello *stroke*; nei 342 pazienti che all'inizio dello studio erano fibrillanti, l'*endpoint* primario (mortalità cardiovascolare, *stroke* ed infarto) si è ridotto del 42% e lo *stroke* ischemico del 45% (Watchell e coll. 2005). La ridotta incidenza della fibrillazione è dovuta probabilmente a più meccanismi: l'azione del farmaco sulle correnti ioniche e la modulazione del periodo refrattario, la regressione della fibrosi e delle dimensioni dell'atrio, la regressione della IVS e la modulazione dell'attività simpatica (Fogari e coll. 2006).

Un altro effetto emerso da questo studio è la ridotta incidenza del diabete ed il miglioramento delle sue complicanze nei pazienti trattati con Losartan rispetto a quelli trattati con l'Atenololo (Lindholm e coll. 2002). Nel gruppo dei soggetti già diabetici al momento dell'arruolamento (1195 pazienti), la proteinuria si è ridotta dall'11% all'8% nei soggetti trattati con Losartan, mentre è rimasta praticamente immodificata in quelli trattati con l'Atenololo. Nel gruppo di soggetti che hanno sviluppato la malattia nel corso dello studio (562 pazienti), essa è comparsa in 242 pazienti trattati con il Losartan ed in 320 di quelli trattati con l'Atenololo (Lindholm e coll. 2002).

In conclusione, questo studio ha dimostrato che, quando confrontato con un betabloccante, il Losartan:

- 1) determina una riduzione dei livelli pressori in misura sovrapponibile, quindi i suoi effetti sugli *endpoints* primari sono dovuti alla sua capacità di bloccare le azioni prodotte dall'Angiotensina II, indipendentemente dall'entità della riduzione pressoria;

- 2) riduce in misura significativamente maggiore dell'atenololo la IVS, l'incidenza della fibrillazione atriale, del diabete e dello *stroke*: soprattutto per quanto riguarda quest'ultimo, quando i benefici prodotti dal Losartan sono stati trasferiti in quella parte di popolazione della Unione Europea che rientrava nei criteri di eleggibilità dello studio LIFE, è risultato che con l'uso di questo AT1RA è possibile impedire la comparsa di 125.000 *strokes* in un periodo di 5,5 anni (Dahlof e coll. 2004);
- 3) produce gli effetti suddetti praticamente in assenza di eventi avversi.

Un altro studio – lo SCOPE (*Study on Cognition and Prognosis in the Elderly*), anch'esso prospettico e multicentrico, è stato condotto con lo scopo di valutare in un ampio gruppo di pazienti ipertesi (4964) gli effetti sulla morbilità e sulla mortalità CV e sulle funzioni cognitive di un altro AT1RA (il Candesartan Cilexetil), confrontato con il PL (Hansson e coll. 1999b e 2000; Sever 2002). I pazienti arruolati erano più anziani di quelli dello studio LIFE, con un'età compresa tra i 70 e gli 89 anni. Se questi pazienti erano già in trattamento anti-ipertensivo, esso era standardizzato ad una dose di 12.5 mg/die di HCTZ. Ai fini dell'arruolamento e prima della randomizzazione a Candesartan o PL, la PA doveva essere compresa tra i 160 e 179 mmHg per la PAS e tra i 90 ed i 99 per la PAD (media di 2 misurazioni in posizione seduta effettuate a distanza di 14 gg. l'una dall'altra). All'inizio dello studio, a ciascuno dei partecipanti era inoltre somministrato un test di valutazione delle funzioni cognitive (MMSE), il cui *score* non doveva essere inferiore a 24; questo test è stato poi ripetuto a 6, 12, 18 e 24 mesi e, successivamente, ogni 6 mesi, per un *follow up* non inferiore ai 2 anni. Dopo un periodo di *run in* compreso tra 1 e 3 mesi, i pazienti erano assegnati ad un trattamento in doppio cieco con Candesartan Cilexetil alla dose di 8 mg/die, oppure PL 1 compressa/die. Questa dose era raddoppiata se nelle visite successive la PAS era ancora superiore a 160 mmHg e/o la PAD era ancora superiore ai 90 mmHg, oppure se la sua diminuzione era minore di 10 mmHg. Se questi valori erano riconfermati ai successivi controlli, si aggiungeva anche un altro anti-ipertensivo (con esclusione degli ACEI o di altri AT1RA).

I risultati ottenuti dopo 4 anni di trattamento dimostrano che i valori pressori si sono ridotti di 21.7/10.8 mmHg nel gruppo trattato con Candesartan Cilexetil e di 18.5/9.2 mmHg nel gruppo di controllo. Nei pazienti trattati con l'AT1RA sono state osservate una modesta riduzione del rischio cardiovascolare relativo (10.9%), una riduzione del 27.8% degli *ictus* non fatali e del 23.6% di tutti gli *ictus*. In entrambi i gruppi di trattamento (AT1RA o PL), la comparsa del diabete si è verificata in misura simile (3.6% vs. 3.2%) (Lithell e coll. 2003). Le funzioni cognitive non si sono modificate: lo *score* del MMSE si è ridotto da 28.5 a 28.0 nel gruppo del Candesar-

tan, e da 28.5 a 27.9 in quello di controllo (Lithell e coll. 2003; Trenkwalder 2006).

Un altro studio – il VALUE (*Valsartan Antihypertensive Long-Term Use Evaluation Study*), i cui risultati finali sono stati pubblicati nel 2004 (Julius e coll. 2004), è stato condotto invece con lo scopo di valutare se a parità di controllo della PA, il blocco dei recettori AT1 mediante valsartan è più efficace del blocco dei canali del Ca mediante amlodipina nel controllo della morbilità e mortalità cardiovascolare (Julius e coll. 2004; Williams 2004). I pazienti, in numero di circa 14.000, erano di razza e di sesso diverso e la loro età era superiore ai 50 anni. I maschi di età compresa tra i 50 ed i 59 anni avevano almeno 3 fattori di rischio (diabete, fumo e colesterolemia superiore ai 240 mg/dl); le femmine della stessa età, almeno due fattori di rischio. Sia i maschi che le femmine tra i 60 ed i 69 anni avevano almeno due fattori di rischio e quelli d'età superiore ai 70 anni ne avevano uno solo. Ai fini dell'arruolamento e prima della randomizzazione, la PAS (misurata in posizione seduta) doveva essere compresa tra 160 e 210 mmHg e la PAD doveva essere  $\geq 115$  mmHg per i pazienti già trattati; per quelli che non avevano ricevuto ancora una terapia anti-ipertensiva, la PAS e la PAD non dovevano superare, rispettivamente, i 210 ed i 115 mmHg (Mann e coll. 1998). Dopo un periodo di *run in*, i due farmaci erano assegnati in maniera randomizzata, con una dose iniziale di 80 mg/die per l'AT1RA e di 5 mg/die per il Ca-antagonista. Se dopo un mese non era ancora stato raggiunto l'*endpoint* (PA minore di 140/90), il dosaggio dei due farmaci era raddoppiato (160 mg/die e 10 mg/die), se necessario aggiungendo ai successivi controlli (2° e 3° mese) HCTZ alla dose di 12.5 mg/die oppure di 25 mg/die. Al 4° mese, in assenza di una risposta soddisfacente era possibile aggiungere altri farmaci ( $\alpha$ - o  $\beta$ -bloccanti oppure vasodilatatori periferici).

Dopo un mese di trattamento, la PAS si era ridotta di 4 mmHg nel gruppo dell'Amlodipina rispetto a quello del Valsartan. Alla fine del trattamento il controllo della PAS ( $< 140$  mmHg) è stato ottenuto nel 58% dei pazienti trattati con il Valsartan e nel 64% di quello trattato con l'Amlodipina.

Anche se lo scopo di questo studio non è stato raggiunto, esso ha dimostrato comunque l'importanza del controllo pressorio per una protezione ottimale nei confronti degli eventi cardiovascolari nei pazienti ipertesi ad alto rischio (Williams 2004): indipendentemente dal tipo di trattamento, nei soggetti che dopo 6 mesi avevano una PAS  $< 140$  mmHg si è verificata infatti una riduzione del 45% dello *stroke*, del 24% per quanto riguarda l'infarto del miocardio e del 21% per tutte le cause di morte. Più significativo rispetto al Ca-antagonista è stato invece l'effetto dell'AT1RA sulla comparsa del diabete: il numero dei pazienti in trattamento con Valsartan che hanno sviluppato la malattia nel corso dello studio è stato, infatti, più basso (23%) rispetto



ai pazienti trattati con il Ca-antagonista. Come era stato già dimostrato con lo studio LIFE, nei soggetti ipertesi il blocco dei recettori AT1 ha la capacità di ridurre anche la comparsa di queste alterazioni metaboliche.

In sintesi i risultati di questi 3 *trials* dimostrano che:

- 1) a parità di riduzione pressoria, il Losartan è superiore al betabloccante, sia nei soggetti ipertesi che in quelli ipertesi e diabetici, e riduce in misura statisticamente significativa il rischio relativo degli eventi cardiovascolari, del diabete e dello *stroke* (LIFE);
- 2) il Candesartan Cilexetil non è superiore al PL per quanto riguarda gli eventi cardiovascolari, ma lo è invece per quanto riguarda la riduzione di quelli cerebrovascolari (SCOPE);
- 3) il Valsartan è meno efficace dell'Amlodipina nel ridurre i valori pressori, ma riduce comunque l'incidenza delle complicanze cardiovascolari; inoltre, a conferma dei risultati dello studio LIFE, riduce anche la comparsa del diabete tipo 2, mentre l'Amlodipina è inefficace (VALUE).

Come ha dimostrato una rassegna dei risultati ottenuti da 29 *trials* randomizzati e controllati (Turnbull 2003), rispetto agli ACEI gli AT1RA producono i loro effetti benefici anche in presenza di minori riduzioni della PAS e della PAD; quindi essi appaiono capaci di ridurre l'incidenza degli eventi cardiovascolari indipendentemente dall'entità della riduzione pressoria.

Un'altra conclusione emersa da questi *trials* è l'utilità di un'associazione degli AT1RA con un diuretico, in quanto i due tipi di farmaci hanno un meccanismo d'azione complementare, che contribuisce ad amplificare la riduzione pressoria prodotta da ciascuno di essi.

I benefici di questa associazione erano stati già dimostrati negli anni '90: in un confronto tra Losartan e HCTZ condotto su 703 pazienti con ipertensione lieve/moderata, Schoenberger (1995) aveva dimostrato che la riduzione della PAS e della PAD è più significativa nei pazienti trattati con l'associazione dei due farmaci (Losartan 50 mg + HCTZ 12.5 mg), rispetto a quelli trattati con la monoterapia. Un potenziamento della caduta pressoria è stato osservato anche in un successivo studio di confronto a doppio cieco tra dosi diverse di Candesartan (4, 8 e 16 mg/die) e HCTZ (12.5 o 25 mg/die), somministrate da sole oppure in combinazione: la caduta pressoria più significativa è stata ottenuta con dosi di 16 mg di Candesartan + 12.5 mg di HCTZ (Philip e coll. 1997). In un gruppo di 432 ipertesi con PAD compresa tra 95 e 115 mmHg, la riduzione pressoria prodotta dal Losartan e dall'Irbesartan è stata potenziata dall'aggiunta di 12.5 mg di HCTZ (Opamil e coll. 2001).

Ancora controversa è invece l'utilità di un'associazione di questi AT1RA con gli ACEI.

Se si parte dal presupposto, confermato da numerose ricerche, della responsabilità eziopatogenetica del SRA in numerose condizioni morbose, quest'associazione appare indubbiamente come il mezzo più razionale per bloccare in maniera completa questo sistema, sia quello circolante (che agisce a breve termine), sia quello tessutale (che agisce a lungo termine) (Weinberg e coll. 2000): soprattutto quest'ultimo appare bloccato in maniera incompleta dagli ACEI per la coesistenza, oltre all'ACE, di altri enzimi coinvolti nella sintesi dell'Angiotensina II ed in grado, pertanto, di compromettere la totalità e la durata nel tempo di quest'inibizione (Urata e coll. 1996). Inoltre, il blocco a due livelli servirebbe anche a ridurre le risposte controregolatorie che compaiono con entrambe le classi di farmaci: nel momento in cui l'ACEI si dissocia dall'ACE e l'Angiotensina II riappare come conseguenza dell'aumentata produzione di Angiotensina I, la concomitante somministrazione di un AT1RA proteggerebbe il recettore dalla stimolazione prodotta dall'agonista sintetizzato *ex-novo* (Azizi e Menard 2004).

Una recente metanalisi dei diversi *trials* nei quali i due tipi di farmaci erano stati usati in associazione ha dimostrato tuttavia che questa riduce i livelli pressori in misura non significativa (circa 4-3 mmHg) rispetto ai risultati ottenuti con un ACEI o un AT1RA somministrati in monoterapia (Doulton e coll. 2005). La spiegazione dell'effetto modesto sui livelli pressori è da ricercare probabilmente nel fatto che le due classi di farmaci hanno proprietà farmacodinamiche diverse perché, come hanno dimostrato gli studi condotti mediante valutazione del rapporto valle/picco degli AT1RA, questo rapporto è maggiore che per l'ACEI (Meredith 2000): il che, in altri termini, significa che un AT1RA somministrato una volta al giorno riduce in maniera significativa i livelli pressori per 24 h. o più, mentre un ACEI per produrre lo stesso effetto deve essere somministrato come minimo due volte al giorno (Himmelman e coll. 2001).

A conferma di questi dati Forclaz (Forclaz e coll. 2003), in un gruppo di volontari sani, ha dimostrato che il Losartan alle dosi massime raccomandate (100-200 mg/die) produce una inibizione del SRA (valutata con la risposta pressoria all'Angiotensina I) equivalente a quella prodotta dalla combinazione Losartan + Lisinopril.

In un gruppo di 23 pazienti anziani con ipertensione sistolica, anche Morgan e coll. (2004) dopo Candesartan 16 mg + Lisinopril 20 mg hanno osservato una diminuzione della PAS minore di quella ottenuta somministrando ciascuno dei due farmaci in monoterapia.

La proteinuria appare ridotta del 30%, quando l'associazione ACEI + AT1RA è paragonata alla monoterapia con l'ACEI, e del 39% quando è paragonata alla monoterapia con l'AT1RA, ma la possibilità che questa ridu-

zione in soggetti ipertesi e/o con nefropatia diabetica si traduca in una riduzione anche degli *endpoints* clinici deve essere ancora confermata, prima che la somministrazione combinata dei due farmaci sia adottata regolarmente (Doulton e coll. 2005).

Accanto agli effetti sui livelli pressori e sulla funzionalità renale – peraltro modesti – esiste però il rischio che il “rinforzo” del blocco del SRA ad un doppio livello, dia luogo alla neutralizzazione della R e ad un’eccessiva diminuzione del Na, cioè a due conseguenze che possono essere entrambe letali (Griffiths e coll. 2001). Nello studio *Charm-Added Trial* (v. dopo) il 45% dei pazienti che avevano ricevuto il Candesartan al *top* del trattamento con l’ACEI, hanno mostrato una significativa ipotensione, che ha reso necessaria la sospensione del trattamento (McMurray e coll. 2003a) ed un aumento della creatinemia e della potassiemia. Il rischio è tanto maggiore quanto minore è l’apporto sodico, quindi l’associazione potrebbe essere benefica solo in presenza di una dieta Na-libera.

Inoltre, da un lato l’aumento della BK prodotto dall’ACEI rende più probabile la comparsa di effetti indesiderati (tosse), dall’altro la ridotta formazione di Angiotensina II, anch’essa conseguenza dell’ACE-inibizione, non sempre è sufficientemente controbilanciata dall’aumento del polipeptide prodotto dall’AT1RA, per cui una minore quantità di esso va a stimolare i recettori AT2 ed anche l’efficacia del blocco di quelli AT1 è ridotta.

Le diverse opinioni potranno essere chiarite dallo studio ONTARGET (*Ongoing Telmisartan Alone and in Combination with Ramipril Global Endpoint Trial*) (Yusuf 2002), nel quale sono stati messi a confronto tre trattamenti: Telmisartan 80 mg, Ramipril 10 mg e Telmisartan + Ramipril alle stesse dosi in 23.400 pazienti ad alto rischio con una storia di malattia coronarica, *stroke*, vasculopatia periferica o diabete.

In attesa dei risultati, che dovrebbero arrivare nel 2007, l’uso routinario di questo tipo di associazione nel trattamento della IA (e per estrapolazione anche nello scompenso) non appare dunque consigliabile (Sica 2002; Doulton e coll. 2005). D’altronde, pur in assenza di studi comparativi, non si può escludere che risultati simili o anche migliori di quelli ottenuti con queste associazioni, si possano ottenere usando ciascuno dei due tipi di farmaci singolarmente ma a dosi maggiori, soprattutto gli AT1RA, generalmente sottodosati (v. Cap. 15) (Maillard e coll. 2002).

## 14.2 - Lo scompenso cardiaco

Lo scompenso cardiaco rappresenta il punto di arrivo di quel *continuum* cardiovascolare che inizia con l’intervento dei fattori di rischio e – in assenza di una terapia adeguata - si conclude con la morte del paziente. La te-

rapia deve avere pertanto lo scopo di prolungare la sopravvivenza, di ridurre i sintomi, di prevenire l'ospedalizzazione e di migliorare la qualità della vita (Lee e coll. 2004)

Un notevole passo in avanti per raggiungere questo scopo è stato fatto alla fine degli anni '80, quando è stata accertata la responsabilità del SRA nell'eziopatogenesi di questa sindrome ed è diventato possibile inibire questo sistema, prima con gli ACEI e poi in modo più completo con gli AT1RA.

Questi ultimi, com'è apparso evidente fin dalle prime ricerche condotte con il Losartan, producono effetti emodinamici simili a quelli degli ACEI, perché riducono la pressione polmonare *wedge*, l'*afterload* e la IVS ed aumentano la GC (Crozier e coll. 1995). A produrre questi effetti contribuisce anche il riassetto dell'equilibrio normalmente esistente a livello miocardico tra i recettori AT1 e quelli AT2, con un aumento relativo di quelli AT2, e la loro stimolazione ad opera dell'Angiotensina II. Inoltre, la tollerabilità di questi farmaci, maggiore di quella degli ACEI, favorisce anche la *compliance* alla terapia, che è praticamente eguale a quella del PL (de Gasparo 2004).

Un primo studio con questi antagonisti – lo studio ELITE – condotto su un gruppo di 722 soggetti anziani scompensati trattati in maniera randomizzata con Losartan (50 mg/die) o con Captopril (50 mg x 2/die) ha dimostrato che l'AT1RA è più efficace dell'ACEI, perché dopo un anno ha ridotto la morbilità cardiovascolare del 46% ed è anche meglio tollerato (Pitt e coll. 1997).

Uno studio successivo (ELITE II), nel quale 3152 pazienti sono stati trattati con gli stessi farmaci allo stesso dosaggio (Losartan 50 mg/die o Captopril fino a 150/die), ha riconfermato che il numero degli effetti indesiderati prodotti dal Losartan è molto minore rispetto a quelli prodotti dal Captopril, con conseguente minor numero di sospensioni del trattamento (9.4% vs. 14.5%), ma non ha riconfermato la superiorità dell'AT1RA per quanto riguarda la riduzione della mortalità e della morbilità (Pitt e coll. 2000).

A prima vista questi risultati non sembrerebbero dunque concordare con quelli ottenuti nello studio precedente (ELITE I), tuttavia essi devono essere valutati con prudenza, perché l'ELITE II in realtà non era stato programmato per accertare l'eguale efficacia dei due farmaci, ma per dimostrare la superiorità del Losartan rispetto al Captopril, sia per quanto riguarda il blocco dell'Angiotensina II, sia per l'incidenza degli effetti indesiderati. I ricercatori non hanno, tuttavia, tenuto conto di queste premesse ed hanno concluso (forse troppo rapidamente) che gli ACEI dovrebbero essere la terapia standard dello scompenso (Pitt 2002; Maillard e Burnier 2004). Un altro e non meno importante motivo di riserva è la diversità delle dosi usate per i due farmaci, in quanto rispetto ai 150 mg di Captopril, i 50 mg di Losartan sono sicuramente una dose insufficiente per assicurare

una completa inibizione del SRA (Berlowitz e coll. 2001; Maillard e coll. 2002; Pitt 2002) (v. Cap. 15).

Un altro studio, il VAL-HeFT, condotto su 5010 pazienti con scompenso cardiaco classe II – IV NYHA, ha portato infatti nuove conferme all'efficacia degli AT1RA. In questo trial a lungo termine (circa 23 mesi), in doppio cieco e PL-controllato, i pazienti erano assegnati in maniera randomizzata ad un trattamento con PL o con Valsartan (160 mg x 2/die), da solo oppure in aggiunta ad altri trattamenti già in corso (ACEI 93%, diuretici 85%, digossina 67% o betabloccanti 35%) (Cohn e Tognoni 2001). Dei due *endpoints* primari – la mortalità per tutte le cause e la morbidità – la prima è stata simile nei due trattamenti (Valsartan e PL), ma l'incidenza della morbidità e della mortalità combinate è stata più bassa del 13.2% nel gruppo trattato con l'AT1RA.

In questo gruppo, rispetto a quello trattato con il PL, il farmaco ha ridotto in maniera significativa il diametro diastolico, ha aumentato notevolmente la frazione di eiezione e ridotto l'ospedalizzazione (23%); quindi si è dimostrato efficace nel ridurre la progressione della malattia, anche perché i suoi effetti non si sono attenuati durante i 23 mesi di trattamento (Cohn 2003). L'analisi dei due *endpoints* primari, condotta nei sottogruppi di pazienti già in trattamento con altri farmaci, ha dimostrato inoltre che gli effetti più significativi si sono ottenuti nel sottogruppo non in trattamento con un ACEI, perché in esso è stata osservata una diminuzione del 33% della mortalità per tutte le cause e del 44% della combinazione mortalità/morbidità (il che genera ancora altri dubbi sull'utilità dell'associazione tra i due tipi di farmaci). Benefici minori sono stati osservati nel sottogruppo già in trattamento con un betabloccante. Infine, il fatto che gli effetti positivi dell'AT1RA siano stati osservati sia nei soggetti ipertesi che in quelli normotesi, ancora una volta conferma che essi sono indipendenti dalla riduzione pressoria (Cohn 2003).

La riduzione della mortalità e della morbidità prodotta dagli AT1RA nello scompenso cardiaco è stata dimostrata anche dallo studio CHARM, condotto su più di 7000 pazienti scompensati ai quali, in aggiunta alla terapia già in atto, era stata somministrata una dose media di Candesartan di 24 mg/die in confronto al PL. In questo studio i pazienti erano divisi in tre sottogruppi, in base alle loro condizioni cardiache ed alla terapia in atto: un gruppo con frazione d'eiezione (LVEF) minore del 40% già in trattamento con un ACEI (CHARM-*added trial*); un altro gruppo con una LVEF altrettanto bassa ma intollerante all'ACEI (CHARM-*alternative trial*) ed, infine, un terzo gruppo con una LVEF maggiore del 40% e non in trattamento con l'ACEI (CHARM-*preserved trial*) (Swedberg e coll. 1999; McMurray e coll. 2003b).

Nel primo sottogruppo, nel quale il Candesartan era stato aggiunto all'ACEI, è stata osservata una riduzione rispetto al PL del 15% del rischio relativo, per quanto riguarda la mortalità cardiovascolare e l'ospedalizzazione. Il 4.5% dei soggetti trattati con entrambi gli inibitori del SRA accusarono una marcata ipotensione ortostatica che richiese la sospensione del trattamento, un raddoppio della creatininemia ed una iperkalemia, quindi anche in questo studio la doppia associazione si è rivelata più dannosa che utile (McMurray e coll. 2003b). Benefici maggiori, in assenza di effetti indesiderati, sono stati ottenuti invece nel sottogruppo dei pazienti che non erano già in trattamento con l'ACEI (Mc Murray e coll. 2003a). In tutti i pazienti è stata osservata una ridotta incidenza del diabete.

Da valutare attentamente sono anche i risultati ottenuti con lo studio RESOLVD, che comprendeva 768 pazienti scompensati (classe II - IV NYHA e con una LVEF minore del 40%), trattati con Candesartan (4, 8 e 16 mg) oppure con Enalapril (4 o 8 mg) o con entrambi i farmaci (McKelvie e coll. 1999). Nei pazienti trattati con l'associazione, sono stati osservati un miglioramento dei volumi ventricolari e della LVEF e la riduzione delle concentrazioni di Aldosterone e di BNP, ma - nonostante questi benefici - alla 43° settimana fu necessario sospendere lo studio perché la mortalità e l'ospedalizzazione erano aumentate del 14.6% nel gruppo del Candesartan, del 15% in quello Candesartan + Enalapril, e del 6.4% in quello trattato con solo Enalapril.

In un altro studio, l'OPTIMAAL, condotto su 5477 pazienti con insufficienza ventricolare post-infartuale, sono stati confrontati il Losartan (50 mg/die) ed il Captopril (50 mg x 2/die) (Dickstein e Kjekshus 2002). Anche i risultati di questo studio sembrerebbero dimostrare che in realtà l'AT1RA non è superiore all'ACEI nel ridurre la mortalità per tutte le cause, tuttavia ancora una volta, come già per l'ELITE II, è difficile arrivare a delle conclusioni certe, dal momento che anche in questo studio, rispetto a quella del Captopril la dose di Losartan era insufficiente per produrre una efficace inibizione del sistema (Maillard e Burnier 2004).

Nello studio VALIANT condotto su 14.500 pazienti infartuati e ad alto rischio per disfunzione ventricolare sinistra e scompenso, è stato usato il Valsartan a dosi più elevate (fino a 320 mg/die) in confronto al Captopril (50 x 3 mg/die) oppure i due farmaci sono stati associati. Alla fine dello studio si erano verificati 997 decessi nel gruppo del Valsartan, 958 in quello del Captopril e 941 in quello trattato con l'associazione (Pfeffer e coll. 2003).

### 14.3 - La nefropatia

La capacità degli AT1RA di ridurre non solo i livelli pressori ma anche la proteinuria era apparsa evidente già nei *trials* per il trattamento della IA (Gansevoort e coll. 2001) (Tabella 6).

Questi effetti sono stati confermati da *trials* più recenti, fra i quali l'IRMA-2 ed il MARVAL, programmati per valutare la progressione dalla micro- alla macroalbuminuria in pazienti con nefropatia e diabete tipo 2, ed il RENAAL e l'IDNT, intrapresi per analizzare la capacità di questi farmaci di rallentare la progressione della malattia verso lo stadio finale della insufficienza renale.

Sia l'IRMA-2 che il MARVAL sono due ampi studi prospettici condotti rispettivamente con l'Irbesartan (fino a 300 mg/die) confrontato con la terapia convenzionale (Parving e coll. 2001), e con il Valsartan (80 mg/die) confrontato con l'Amlodipina (5 mg) (Viberti e Wheeldon 2002). Questi studi hanno dimostrato che entrambi i farmaci riducono la microalbuminuria, in maniera più significativa il Valsartan, che normalizza del tutto l'escrezione proteica rispetto al Ca-antagonista. Gli effetti compaiono indipendentemente dalla riduzione dei livelli pressori, probabilmente per una maggiore caduta della pressione capillare glomerulare e per un maggiore effetto antifibrotico (de Gasparo 2004).

Lo studio RENAAL (*Reduction in End Points in NIDDM with the Angiotensin II Antagonist Losartan*), è stato programmato per valutare la capacità di questo AT1RA di ritardare l'evoluzione della nefropatia, ed è stato condotto in doppio cieco per una durata media di 3,5 anni in 1513 pazienti diabetici di tipo 2 e nefropatici (Cr compresa tra 1,3 e 3,0 mg/die e proteinuria > 0.5 g/die). I pazienti ricevevano in maniera randomizzata Losartan (50-100 mg/die) o PL, in aggiunta ad eventuali altre terapie già in corso. I risultati dimostrano che, per quanto riguarda l'*endpoint* primario (tempo di raddoppio della Cr, insufficienza renale terminale o morte), il Losartan riduce la proteinuria del 33% ed il rischio di una insufficienza renale in misura significativamente maggiore rispetto al Ca-antagonista, al betabloccante oppure al diuretico, per livelli equivalenti di riduzione pressoria (Brenner e coll. 2001). In accordo con quanto già suggerito dallo studio HOT, che cioè ad una diminuzione della funzionalità renale corrisponde un aumento degli eventi cardiovascolari e viceversa, la percentuale dei ricoveri per scompenso cardiaco si è ridotta del 32% nei pazienti trattati con il Losartan (Maillard e Burnier 2004).

Nello studio IDNT (*Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial*), condotto su 1715 pazienti seguiti per circa 2,5 anni, un altro AT1RA, l'Irbesartan (300 mg/die), è stato confrontato con l'Amlodipina (10 mg/die) o con il PL, in

**Tabella 6.** Studi con gli AT1-antagonisti sul deterioramento della funzione renale in pazienti con IE (Modificata da: Gansevoort e coll. 2001, con autorizzazione)

Autore	N. pazienti	Farmaco (mg/die)	Gg. terapia	Apporto Na (mmol/die)	Carico Idrico (ml)	PAD (%)	GFR (%)	ERPF (%)	UEA/Uprot (%)
Kawabata (1994)	12	Candesartan (4/8)	14	NS	800	-8	-2	+12	ND
Erley (1995)	9	Losartan (50)	28	110	NS	-5	0	+7	-59
Fauvel (1996)	9	Losartan (50)	28	200	120	-9	-4	-1	-30
Nielsen (1997)	9	Losartan (50)	84	NS	0	-9	ND	ND	-30
Chan (1997)	9	Losartan (50/100)	84	125	0	-14	ND	ND	-29
Pechere (1998)	9	Irbesartan	84	200	NS	-11	+7	+22	ND

GFR = filtrazione glomerulare; ERPF = flusso plasmatico renale; UAE = albuminuria; Uprot = proteinuria; NS = non studiato; ND = non effettuato



aggiunta alle altre eventuali terapie già in corso (Lewis e coll. 2001). Tutti i pazienti erano ipertesi (PAS > 135 mmHg e PAD > 85 mmHg) e portatori di diabete tipo 2, la proteinuria era > 900 mg/24 h e la creatinemia era compresa, per le femmine, tra 1.0 e 1.3 mg/die e, per i maschi, tra 1.2 e 3.0 mg/die. Nei pazienti trattati con l'AT1RA l'*endpoint* primario (tempo di raddoppio della creatinemia, insufficienza renale terminale, morte per cause cardiovascolari) è stato minore del 20% rispetto a quelli trattati con PL e del 23% rispetto al gruppo trattato con il Ca-antagonista.

Nello studio CALM, 200 pazienti con diabete di tipo 2 e microalbuminuria sono stati randomizzati ad un trattamento con Candesartan (16 mg/die) o Lisinopril (20 mg/die) per 12 settimane, seguito dall'associazione di entrambi per altre 12 settimane. I due farmaci hanno ridotto in maniera simile sia la PA che la proteinuria; quest'ultima è apparsa comunque ridotta in misura maggiore nel gruppo trattato con l'associazione (Mogensen 2000).

#### 14.4 - Lo stroke

La dimostrazione che anche nelle arterie cerebrali dell'uomo esistono entrambe i tipi di recettori dell'Angiotensina II (McKinley e coll. 2003) e che in condizioni d'ischemia la loro espressione si modifica perché, mentre il numero dei recettori AT1 rimane stazionario, quello degli AT2 aumenta, ha suggerito l'impiego degli AT1RA anche nella terapia dei disturbi cerebrovascolari (Achard e coll. 2001).

I risultati finora ottenuti, pur non essendo ancora numerosi, sono comunque significativi, perché dimostrano che similmente a quanto avviene nell'animale, anche nell'uomo questi farmaci proteggono il circolo cerebrale in misura maggiore di altri farmaci anti-ipertensivi.

Una prima conferma in tal senso è arrivata dallo studio LIFE, che ha dimostrato la maggiore capacità del Losartan rispetto all'Atenololo di ridurre il rischio di *stroke* nel 25% dei pazienti trattati e fino al 40% nel sottogruppo dei pazienti con ISI (Dahlof e coll. 2002a e b).

Anche nello studio SCOPE, nel quale un altro AT1RA, il Candesartan, era confrontato con il PL in un gruppo di 4964 ipertesi, l'84% dei quali era già in trattamento con altri farmaci, gli *stroke* non fatali sono stati 68 (7.4 eventi per 1000 pazienti/anno) nel gruppo trattato con l'AT1RA, e 93 nel gruppo di controllo (10.3 eventi per 1000 pazienti/anno); tutti gli *stroke* – fatali e non fatali – sono stati 89 nei pazienti in terapia con il Candesartan (9.7 eventi per 1000 pazienti/anno) e 115 nel gruppo di controllo (12.8 eventi per 1000 pazienti/anno) (Lithell e coll. 2003)

Anche lo studio ACCESS (*Acute Candesartan Cilexetil Evaluation in*

*Stroke Survivors*) ha dimostrato che nei pazienti ipertesi con ischemia cerebrale acuta gli *endpoints* combinati (mortalità totale, complicanze cerebrali e cardiovascolari) si riducono del 47.5% in quelli trattati con Candesartan, rispetto a quelli trattati con altre terapie anti-ipertensive (Schrader e coll. 2003).

Similmente nello studio MOSES (*Morbidity and Mortality after Stroke – Eprosartan compared with Nitrendipine for Secondary Prevention*) gli eventi cerebrovascolari si sono ridotti del 24% nel gruppo trattato con l'AT1RA, rispetto a quello trattato con il Ca-antagonista (Schrader e coll. 2005).

Questi effetti appaiono indipendenti dalla riduzione dei livelli pressori e si realizzano con un meccanismo complesso, nel quale un ruolo dominante spetta con ogni probabilità alla stimolazione ad opera dell'Angiotensina II dei recettori AT2, che vanno anche incontro ad una *upregulation* (Thöne-Reineke e coll. 2006), con la conseguente comparsa di una vasodilatazione e di una redistribuzione del flusso alle zone ischemiche (“*reverse vascular steal*”) (Achard e coll. 2001), per l'apertura rapida del circolo collaterale di riserva e/o produzione di nuovi vasi (soprattutto a livello della corteccia cerebrale: Munzenmaier e Greene 2006). La curva di autoregolazione si sposta verso sinistra (cioè in direzione di una maggiore vasodilatazione) ed il flusso nelle zone cerebrali interessate aumenta.

La relazione di questi effetti con l'aumento dell'Angiotensina II e la sua stimolazione dei recettori AT2 appare anche più evidente quando gli AT1RA sono confrontati con gli ACEI (o con i betabloccanti: v. studio LIFE), che invece riducono i livelli del polipeptide, e che infatti appaiono poco efficaci o addirittura dannosi (Dalmai e coll. 2001): uno studio condotto sul gerbillo aveva già dimostrato alcuni anni fa che dopo legatura rapida di un'arteria carotide, il Losartan somministrato da solo aumenta significativamente la sopravvivenza di questi animali e che, invece, questa si riduce dopo aggiunta di un ACEI (che inibisce la sintesi di Angiotensina II) (Fernandez e coll. 1994). Anche nello studio CAPP (*Captopril Prevention Project*) gli *stroke* fatali e non fatali sono stati 189 nel gruppo dei pazienti trattati con Captopril, e 148 in quelli trattati con la terapia standard (che comprendeva anche un diuretico, cioè un altro farmaco capace di stimolare l'attività del SRA) (Hansson e coll. 1999a).

Oltre a confermare anche in questo tipo di patologia i vantaggi degli AT1RA rispetto ad altre terapie anti-ipertensive, i risultati dimostrano dunque che l'Angiotensina II è necessaria per la protezione del circolo cerebrale e che, pertanto, in questo settore dell'albero circolatorio la sua diminuzione è un evento dannoso, che può essere però impedito dal blocco dei recettori AT1, che determina un aumento dei suoi livelli (Fournier e coll. 2004; Messerli e Chiadika 2005).

Quest'aumento e la stimolazione dei recettori AT2 non sono comunque

gli unici elementi all'origine della cerebroprotezione prodotta dai farmaci in questione, perché ad essa contribuisce anche la loro capacità di ridurre i fenomeni proliferativi ed infiammatori presenti nell'apparato cardiovascolare sia dell'animale che dell'uomo ipertesi (Ando e coll. 2004; Schulz e Heusch 2006).

Mettendo a confronto gli effetti degli AT1RA con quelli prodotti dagli altri farmaci sugli *endpoints* primari (mortalità cardiovascolare, scompenso, infarto, *stroke*, insufficienza renale), tutti questi *trials* hanno indubbiamente permesso di valutare la efficacia degli antagonisti dei recettori AT1 in maniera molto più ampia di quanto non sia possibile fare nella pratica clinica quotidiana, quindi essi si sono dimostrati un utile mezzo per suggerire come e quando usare tali farmaci nella IA, nello scompenso, nell'insufficienza cerebrovascolare ed in quella renale.

Secondo qualche autore (Volpe e coll. 2006), sarebbe tuttavia auspicabile una certa prudenza nel trasferire automaticamente nei singoli individui i risultati ottenuti con questi *trials* in un grande numero di pazienti senza considerare che i potenziali benefici di un trattamento dipendono, in realtà, soprattutto dal rischio cardiovascolare assoluto dei singoli individui.

Il fatto che questi *trials* siano stati programmati avendo come punto di riferimento gli *endpoints* primari, rappresenta probabilmente un'altra potenziale limitazione, per la minore incidenza di eventi, la mancanza di notizie sulle condizioni precliniche ed anche per l'alto costo richiesto da questo tipo di approccio. Altrettanto utile ed anche più razionale potrebbe essere invece un approccio basato sulla valutazione degli effetti prodotti dai farmaci sugli *endpoints* secondari (IVS, lesioni vascolari aterosclerotiche, microalbuminuria, riduzione della funzione renale, diabete di recente comparsa), perché esso avrebbe il vantaggio di richiedere un minor numero di pazienti ed una minor durata del *trial*, e ciò permetterebbe di concentrare lo sforzo terapeutico su specifici pazienti e di migliorare il rapporto costi/benefici (Morganti 2006).

### **Esistono differenze nell'efficacia clinica dei diversi antagonisti dei recettori AT1 e qual è la dose efficace di questi farmaci?**

Pur avendo in comune lo stesso meccanismo d'azione, gli AT1RA hanno proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche diverse (assorbimento intestinale, legame proteico, volume di distribuzione, emivita), potenzialmente capaci di modificare la loro efficacia e tollerabilità, per cui i risultati ottenuti con essi hanno portato spesso a conclusioni discordanti.

Una metanalisi di qualche anno fa – eseguita su 43 trials per un totale di 11281 pazienti ipertesi (PAD 95 - 115 mmHg) (Conlin e coll. 2000) – ha eliminato tuttavia molte di queste incertezze perché ha dimostrato che, rispetto al Placebo, i 4 AT1RA studiati in questi trials (Losartan, Valsartan, Irbesartan, Candesartan):

- 1) hanno un'efficacia anti-ipertensiva paragonabile quando somministrati alle dosi raccomandate nella scheda tecnica (riduzione PAD tra 8.2 e 8.9 mmHg; PAS tra 10.4 e 11.8 mmHg);
- 2) hanno tutti una curva dose risposta piuttosto piatta che è simile per tutti e 4 i farmaci.

Inoltre la loro combinazione con una bassa dose di diuretico (HCZT 12.5 mg) potenzia la riduzione pressoria che essi producono ed aumenta il numero dei responders. Anche nel caso dell'associazione le differenze tra la risposta pressoria ai 4 farmaci non sono comunque statisticamente significative. Infine, anche l'intervallo raccomandato tra la somministrazione di una dose e l'altra, si è dimostrato ben calcolato per tutti i farmaci studiati, come dimostrano i valori pressori osservati alla fine dell'intervallo di 24 h tra una dose e la successiva.

Anche in uno studio di confronto tra Losartan (100 mg/die) ed Irbesartan (150 mg/die) condotto su 567 soggetti ipertesi, dopo 8 settimane di trattamento è stata osservata una riduzione praticamente sovrapponibile per i due farmaci. In un altro studio condotto su 1369 soggetti ipertesi trattati in maniera randomizzata con Losartan o Valsartan, alle dosi, rispettivamente, di 50 mg/die e 80 mg/die in confronto con placebo, e poi dopo quattro settimane con dosi doppie di ciascuno dei due farmaci, sia alla 4<sup>a</sup> che alla 8<sup>a</sup> settimana di trattamento la caduta della pressione appariva praticamente sovrapponibile nei due gruppi.

Risultati simili sono stati ottenuti anche da una metanalisi più recente, eseguita su 24 trials per complessivi 38080 pazienti con scompenso cardiaco oppure con alto rischio di IMA (Lee e coll. 2004).

L'esistenza di una curva dose risposta piuttosto piatta suggerisce comunque la possibilità che un aumento del dosaggio sia utile soprattutto ai fini degli effetti pleiotropi prodotti da questi farmaci. Le dosi comunemente usate sono infatti quelle stabilite dalle aziende produttrici in funzione esclusivamente dell'efficacia anti-ipertensiva piuttosto che della capacità di bloccare in maniera completa il SRA, per cui esse sono situate nella parte più bassa della curva dose/risposta (Maillard e coll. 2002, Maillard e Burnier 2004).

Le ricerche basate sull'inibizione della risposta pressoria all'Angiotensina in volontari sani e sulle variazioni della PRA dopo somministrazione di un AT1RA (Maillard e coll. 2002) hanno dimostrato infatti che le dosi comunemente utilizzate nella pratica clinica sono talvolta inadeguate a produrre un blocco significativo del recettore AT1 ed a proteggere adeguatamente gli organi bersaglio. Dimostrativo in tal senso è anche uno studio di Berlowitz e coll. (2001) condotto in volontari normotesi. In questi soggetti l'inibizione della risposta pressoria all'Angiotensina II prodotta da una dose di Losartan di 50 mg/die è del 40% alla 6<sup>a</sup> ora, del 33% alla 12<sup>a</sup> ora e del 18% alla 24<sup>a</sup> ora. Viceversa una dose di 150 mg/die inibiva questa risposta per il 73% alla 6<sup>a</sup> ora, per il 65% alla 12<sup>a</sup> ora ed ancora del 62% alla 24<sup>a</sup> ora (Berlowitz e coll. 2001).

L'opportunità di aumentare queste dosi nei casi in cui la PA non sia adeguatamente controllata con la monoterapia è stata confermata anche dai trials condotti per il trattamento della IA, dello scompenso e della nefropatia diabetica (LIFE, ValHeFT, RENAAL), perché anche in questi trials risultati migliori sono stati ottenuti aumentando le dosi dei singoli AT1RA, oppure con un'associazione fissa con un diuretico, secondo quanto previsto anche dalle Linee Guida europee sull'ipertensione. Una simile formulazione fornisce infatti vantaggi sia ai fini della risposta anti-ipertensiva sia della maggiore compliance per il paziente.

## Conclusioni: il passato, il presente ed il futuro

La storia del SRA, iniziata nel 1898 con la scoperta della R, in poco più di un secolo ha percorso un lungo cammino, con risultati quasi sempre stimolanti ma qualche volta anche deludenti, per cui nel corso degli anni i momenti d'interesse per questo sistema si sono alternati a quelli di scetticismo.

Nonostante queste difficoltà, nessuna delle ricerche condotte finora è stata tuttavia inutile, perché ciascuna di esse ha aggiunto qualche nuovo elemento alle nostre conoscenze del SRA e ha migliorato le prospettive terapeutiche di molte condizioni morbose (*"from bench to bedside"*: Schiffrin e Touyz 2004).

La sintesi negli anni '90 degli antagonisti dei recettori AT1 rappresenta l'ultima e finora più importante tappa di questo cammino almeno per due motivi: 1) perché dopo gli ACEI, gli AT1RA hanno migliorato in misura del tutto imprevedibile il decorso e la prognosi di numerose condizioni morbose e 2) perché la constatazione che essi sono efficaci **nonostante** producano anche un aumento dell'Angiotensina II, ha portato inevitabilmente alla revisione del vecchio concetto, secondo il quale ogni aumento di questa sostanza – specie se prolungato nel tempo – è potenzialmente pericoloso (*"from bedside to bench"*: Schiffrin e Touyz 2004).

Grazie a questi antagonisti recettoriali oggi sappiamo infatti che l'Angiotensina II è capace di espletare azioni opposte, alcune dannose ma altre benefiche, e che la comparsa delle une o delle altre dipende dal recettore che essa utilizza: essa produce cioè una vasocostrizione, una stimolazione della crescita cellulare ed una ritenzione di H<sub>2</sub>O e di Na se interagisce con i recettori AT1, ed una vasodilatazione, un'inibizione dei fenomeni proliferativi ed un aumento della diuresi e della natriuresi se interagisce con quelli AT2. Inoltre, è ormai dimostrato che l'Angiotensina II non è l'unico peptide biologicamente attivo del SRA, in quanto alcuni suoi metaboliti (Angiotensina IV, Ang-(1-7)), inizialmente considerati come semplici prodotti di demolizione, sono invece altrettanto importanti sia in fisiologia che in fisiopatologia e sono dotati di recettori specifici che "collaborano" con quelli AT1 ed AT2 (Cesari e coll. 2002).

Quello che all'inizio delle ricerche sembrava un sistema relativamente semplice per i suoi componenti e per le sue funzioni, oggi appare dunque come un

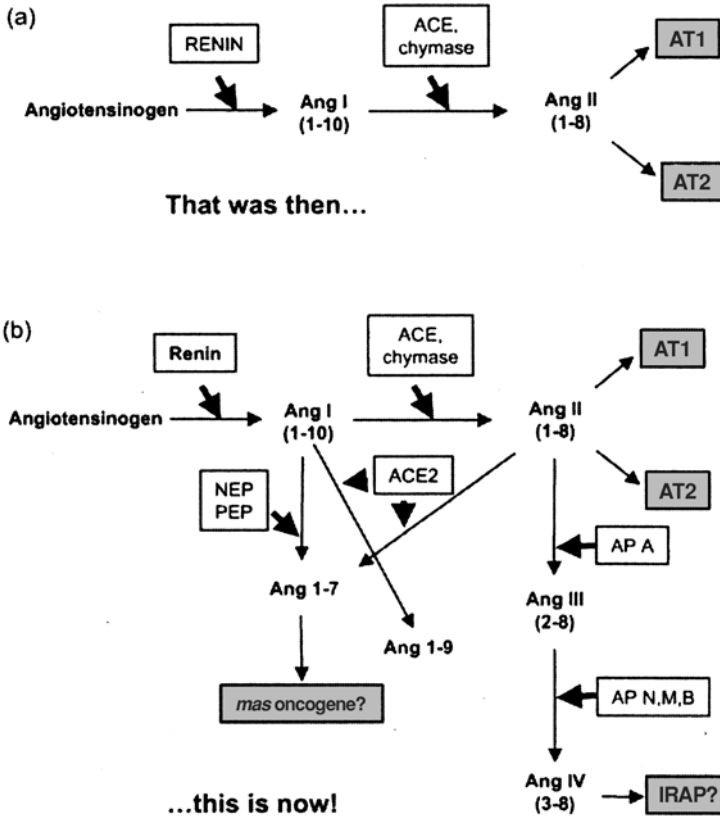


Fig. 32. Il “vecchio” ed il “nuovo” SRA (Modificata da: Reudelhuber 2005, con autorizzazione)

sistema enormemente complesso (Fig. 32), perché costituito da polipeptidi e da recettori diversi, per alcuni dei quali probabilmente ignoriamo ancora tutte le funzioni.

Sicuramente nessuno di questi recettori è “*redundant*” (Davisson e coll. 2000), perché essi sono tutti necessari per l’armonia funzionale del SRA; tuttavia, guardando ai risultati più recenti, la possibilità che nel continuo gioco delle parti che si svolge tra questi recettori il ruolo del protagonista spetti a quello AT2 appare indubbiamente suggestiva. La molteplicità e l’importanza degli effetti che esso produce, grazie ai suoi rapporti con alcuni sistemi vasodilatatori, dei quali rappresenta in pratica la *longa manus* (sistema delle BK e sistema ACE2/ Ang-(1-7)), insieme alla capacità di aumentare o diminuire la propria espressione secondo un preciso disegno funzionale e di colloquiare con altri recettori, sono infatti altrettanti motivi per pensare ad esso come al

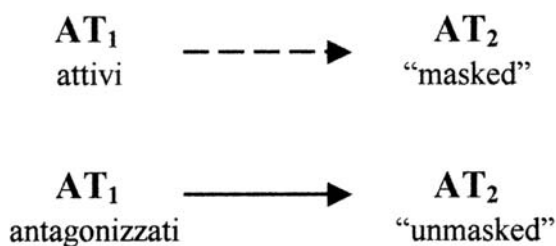


Fig. 33. L'azione modulatrice dei recettori AT<sub>2</sub> compare solo dopo il blocco dei recettori AT<sub>1</sub>

catalizzatore delle funzioni svolte dagli altri, o meglio come al modulatore dei diversi programmi biologici controllati dal SRA (Unger 1999). Nel soggetto adulto ed in condizioni fisiologiche, questa azione modulatrice non appare, perché è mascherata dalle azioni opposte prodotte dai recettori AT<sub>1</sub>, ed invece si manifesta in tutti i suoi effetti quando questi ultimi sono bloccati (Fig. 33) e gli AT<sub>2</sub> diventano i veri controllori della funzionalità del sistema (Schuijijit e coll. 1999; Xiuo Li e Widdop 2004; Steckelings e coll. 2005).

La possibilità di "guidare" tale modulazione mediante farmaci capaci di attivare i recettori AT<sub>2</sub> e nello stesso tempo di antagonizzare quelli AT<sub>1</sub>, potrebbe essere uno degli obiettivi delle future ricerche, perché ciò permetterebbe non soltanto di ampliare l'approccio terapeutico anche ad altre patologie (che pur non essendo correlate in maniera diretta al SRA rispondono favorevolmente alla sua manipolazione farmacologica), ma anche di conoscere meglio come funzionano i recettori del SRA.

Le sintesi di farmaci capaci di espletare questa duplice azione non sarà probabilmente un compito facile, e vi potranno essere ancora risultati promettenti e risultati deludenti, ma questo non sarà certamente un motivo per abbandonare le ricerche: anche Harvey inizialmente si sentì incapace di comprendere i misteri della circolazione corporea (*"I found it so truly difficult that I almost believed that it was to be understood by God alone"*), ma poi riuscì egualmente a svelare questi misteri ed a portare a termine il suo trattato *De motu cordis*.



# Bibliografia

- Abadir PM, Carey RM, Siragy HM et al (2003) Angiotensin AT<sub>2</sub> receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B<sub>2</sub> receptor-null mice. *Hypertension* 42:600-604
- Abadir PM, Periasamy A, Carey RM et al (2006) Angiotensin II type 2 receptor-bradykinin B<sub>2</sub> receptor functional heterodimerization. *Hypertension* 48:316-322
- AbdAlla S, Lother H, Quitterer U (2000) AT<sub>1</sub>-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407:44-48
- AbdAlla S, Lother H, Massiery AE et al (2001a) Increased AT<sub>1</sub> receptor heterodimers in preeclampsia mediates enhanced angiotensin II responsiveness. *Nature Med* 7:1003-1009
- AbdAlla S, Lother H, Abdel-Tawab AM et al (2001b) The angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor is an AT<sub>1</sub> receptor antagonist. *Biol Chem* 276:39721-39726
- AbdAlla S, Lother H, Langer A et al (2004) Factor XIIIa transglutaminase crosslinks AT<sub>1</sub> receptor dimers of monocytes at the onset of atherosclerosis. *Cell* 119:343-354
- Abdel-Rahman AM, Burrell LM, Johnston CI (1993) Blockade of the renin-angiotensin system at different sites: effect on renin, angiotensin and aldosterone. *J Hypertens* 11(S3):S23-26
- Abdel-Rahman AM, Siragy HM (2004) AT<sub>2</sub> Renin Aspects. In: Unger T, Scholkens BA (eds). *Angiotensin*, vol. I, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 423-447
- Achard J-M, Fournier A, Mazouz H et al (2001) Protection against ischemia: a physiological function of the renin-angiotensin system. *Biochem Pharmacol* 62:261-271
- Akishita M, Ito M, Lethonen JY et al (1999) Expression of the AT<sub>2</sub> receptor developmentally programs extracellular signal-regulated kinase activity and influences fetal vascular growth. *J Clin Invest* 103:63-71
- Akishita M, Horiuchi M, Yamada H et al (2000) Inflammation influences vascular remodeling through AT<sub>2</sub> expression and signaling. *Physiol Genomics* 2:13-20
- Akishita M, Nagai K, Xi H et al (2005) Renin-Angiotensin System modulates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. *Hypertension* 45:1188-1193
- Albiston AL, McDowall SG, Matsopoulos D et al (2001) Evidence that the angiotensin IV (AT<sub>4</sub>) receptor is the enzyme-regulated aminoapeptidase. *J Biol Chem* 276:48623-48626
- Ali MS, Schieffer B, Delafontaine P et al (1997) Angiotensin II stimulates tyrosine phosphorylation and activation of insulin receptor substrate 1 and protein-tyrosine phosphatase 1D in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272:12373-12379
- Allen AM, Mac Gregor DP, McKinley MJ et al (1999) Angiotensin II receptors in human brain. *Regul Pept* 79:1-7
- Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FAO (2000) Localization and function of Angiotensin AT<sub>1</sub> receptors. *Am J Hypertens* 13:31S-38S
- Ambuhl P, Felix D, Imboden H et al (1992) Effects of angiotensin analogues and angiotensin receptor antagonists on paraventricular neurones. *Regul Pept* 38:111-120
- Ameisen JC (1999) *La Sculpture du Vivant. Le Suicide cellulaire ou la Mort créatrice*. Editions du Seuil, Paris
- Anborgh PH, Seachrist JL, Dale LB et al (2000) Receptor/ $\beta$ -arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of  $\beta$ <sub>2</sub>-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors. *Mol Endocrinol* 14:2040-2053

- Ando H, Zhou J, Macova M et al (2004) Angiotensin II AT1 receptor blockade reverses pathological hypertrophy and inflammation in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 35:1726-1731
- Ardaillou R, Chansel D (1998) Angiotensin II fragments. Effects and pathways of synthesis. In: Ulfedahl HR, Aurell M (eds) *Renin-Angiotensin*. Portland Press London, pp 47-75
- Argenziano L, Trimarco B et al (1999) Effect of eprosartan and enalapril in the treatment of elderly hypertensive patients: subgroup analysis of a 26-week, double blind, multicentre study. *Eprosartan Multinational Study Group. Curr Med Res Opin* 15:9-14
- Asano K, Dutcher DL, Port JD et al (1997) Selective downregulation of the angiotensin II AT1-receptor subtype in failing human ventricular myocardium. *Circulation* 95:1193-1200
- Aurell M (1998) Robert Tigerstedt - Scientist, Teacher and Critic. In: Ulfedahl HR, Aurell M (eds) *Renin-Angiotensin*. Portland Press London, pp 1-12
- Azizi M, Ménard J (2004) Combined Blockade of the Renin Angiotensin System with ACE Inhibitors and AT1 Receptor Antagonists. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol II, pp 485-516
- Balmforth AJ, Lee AJ, Bajaj BPS et al (1995) Functional domains of the C-terminus of the rat angiotensin AT1A receptor. *Eur J Pharmacol* 29:135-141
- Balmforth AJ, Shepherd FH, Warburton B et al (1997) Evidence of an important and direct role for protein-kinase C in agonist-induced phosphorylation leading to desensitization of the angiotensin AT1A receptor. *Br J Pharmacol* 122:1469-1477
- Balt JC, Mathy M-J, Nap A et al (2001) Effect of the AT1 receptor antagonists Losartan, Irbesartan and Telmisartan on angiotensin II -induced facilitation of sympathetic neurotransmission in the rat mesenteric artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 38:141-148
- Balt JC, Pfaffendorf M (2004) Sympathetic Interactions of AT1 Receptors. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol I, pp 350-372
- Baracho NC, Simoes-e-Silva A, Khosla MC et al (1998) Effect of selective angiotensin antagonists on the antidiuresis produced by angiotensin (1-7) in water-loaded rats. *Braz J Med Biol Res* 31:1221-1227
- Barber MN, Sampey DB, Widdop RE (1999) AT2 receptor stimulation enhances antihypertensive effect of AT1 receptor antagonist in hypertensive rats. *Hypertension* 34:1112-1116
- Barki-Harrington L (2004) Oligomerization of angiotensin receptors: novel aspects in disease and drug therapy. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 5:49-52
- Batenburg W, Garrelds IM, Bernasconi C et al (2004) Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation* 109:2296-2301
- Bayorth MA, Eatman D, Walton M et al (2002) A-799 attenuates angiotensin (1-7) depressor response in salt-induced hypertensive rats. *Peptides* 23:57-64
- Bedecs K, Elbaz N, Sutren M et al (1997) Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J* 325:449-454
- Belz GG, Breithaupt-Grogler K, Butzer R et al (2000) The pharmacological potency of various AT1 antagonists assessed by Schild regression technique in man. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone System* 1:336-341
- Bergsma DJ, Ellis C, Nutulaganti PR et al (1993) Isolation and expression of a novel angiotensin receptor from *Xenopus laevis* heart. *Mol Pharmacol* 44:277-284
- Berk BC (1999) Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: Pathways activated by specific tyrosine kinase. *J Am Soc Nephrol* 10(S 11):S62-S68
- Berlowitz MS, Latif F, Hankins SR et al (2001) Dose-dependent blockade of angiotensin II type 1 receptor with Losartan in normal volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol* 37:692-696
- Berne RM, Levy MN (2000) *Principles of Physiology*. Mosby Inc, St. Louis
- Bernier SG, Servant G, Boudreau M et al (1995) Characterization of a binding site for angiotensin IV on bovine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 291:191-200
- Berry C, Touyz R, Domiczak RC et al (2001) Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology and interactions with ceramide. *Am J Physiol* 281:H2337-H2365

- Blankley CJ, Hodges JC, Klutchko SR et al (1991) Synthesis and structure-activity relationships of a novel series of non-peptide angiotensin II receptor binding inhibitors specific for the AT2 type. *J Med Chem* 34:3248-3260
- Blum RA, Kazierad DJ, Tenero DM (1999) A review of eprosartan: pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interaction studies. *Pharmacotherapy* 19(4 Pt 2):79S-85S
- Blume A, Kaschina E, Unger T (2001) Angiotensin II type 2 receptors: signaling and pathophysiological role. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10:239-246
- Bockaert J, Marin P, Dumuis A et al (2003) The "magic tail" of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett* 546:65-72
- Booz GW, Conrad KM, Hess AL et al (1992) Angiotensin binding sites on hepatocyte nuclei. *Endocrinology* 130:3641-3649
- Booz GW, Baker KM (1996) Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension* 28(4):635-640
- Bottari SP, Taylor V, King IN et al (1991) Angiotensin II AT2 receptors do not interact with guanine nucleotide binding proteins. *Eur J Pharmacol* 207:157-163
- Bovec KC, Wong PC, Timmermans PBMW et al (1991) Effects of nonpeptide angiotensin II receptor antagonist DuP753 on blood pressure and renal functions in spontaneously hypertensive dog. *Am J Hypertens* 4:327S-333S
- Brede M, Roell W, Ritter O et al (2003) Cardiac hypertrophy is associated with decreased eNOS expression in angiotensin AT2 receptor-deficient mice. *Hypertension* 42:1177-1182
- Brede M, Hein L (2004) Knockout Models of the Renin-Angiotensin System. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol I, pp 207-227
- Brenner BM, Cooper ME, De Zeeuw D et al (2001) Effects of Losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 345:861-869
- Britto RR, Santos RAS, Fagundes-Moura CR et al (1997) Role of angiotensin (1-7) in the modulation of baroreflex in renovascular hypertensive rats. *Hypertension* 30:549-556
- Brookman L, Rolan P, Benjamin I et al (1997) Pharmacokinetic of Valsartan in patients with liver disease. *Clin Pharmacol Ther* 62:272-278
- Brosnihan KB, Li P, Ferrario CM (1996) Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* 27:523-528
- Brosnihan KB, Liomar Neves AA, Chappell MC (2005) Does the angiotensin-converting enzyme (ACE)/ACE2 balance contribute to the fate of angiotensin peptides in programmed hypertension? *Hypertension* 46:1097-1099
- Brunner H (1997) The new receptor antagonist Irbesartan: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Am J Hypertens* 10:311S-317S
- Brunner H (2002) The new angiotensin II receptor antagonist olmesartan medoxomil: a concise overview. *J Hum Hypertens* 16:S13-S16
- Buisson B, Laflamme L, Bottari SP et al (1995) A G protein is involved in the angiotensin AT2 receptor inhibition of the T-type calcium current in differentiated NG 108-15 cells. *J Biol Chem* 270:1670-1674
- Bullock GR, Steynert I, Bilbe G et al (2001) Distribution of type-1 and type-2 angiotensin receptors in the normal human lung and in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Histochem Cell Biol* 115:117-124
- Bumpus FM, Catt KJ, Chiu AT et al (1991) Nomenclature of angiotensin receptors. *Hypertension* 17:720-721
- Bunemann M, Lee KB, Pals-Rylaarsdam R et al (1999) Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system. *Ann Rev Physiol* 61:169-192
- Buoninconti R, Buoninconti R (2000) Il Sistema Renina-Angiotensina cerebrale ed il suo Ruolo nel Controllo della Pressione Arteriosa. Springer-Verlag Milano
- Buoninconti R (2005) Il Sistema Renina-Angiotensina Cerebrale: dati clinici e sperimentali. In: Borghi C (ed) *Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone e Rischio Cerebrovascolare*. Primula Multimedia, pp 38-50
- Burnier M, Brunner HR (2000) Angiotensin II receptor antagonists. *Lancet* 355:637-645

- Burnier M, Rutschmann B, Nussberger J et al (1993) Salt-dependent effects of angiotensin II antagonists in healthy subjects. *Hypertension* 22:339-347
- Burnier M, Brunner HR (1994) Angiotensin II receptor antagonists and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3:537-545
- Burnier M, Waeber M, Brunner H (1995) Clinical pharmacology of the angiotensin II receptor antagonist Losartan potassium in healthy subjects. *J Hypertens* 13(S 1):S23-S28
- Burnier M, Roch-Ramel F, Brunner H (1996) Renal effects of angiotensin II receptor blockade in normotensive subjects. *Kidney Int* 46:1787-1790
- Camara AKS, Osborn J (2001) Central AT1 and AT2 receptors mediate chronic intracerebroventricular angiotensin II -induced drinking in rats fed high sodium chloride diet from weaning. *Acta Physiol Scand* 171:195-201
- Campbell DJ (2001) Bioactive Angiotensin Peptides other than Angiotensin II. In: Epstein M, Brunner H (eds) *Angiotensin Receptors Antagonists*. Hanley & Belfus Inc, pp 9-27
- Cao Z, Dean R, Wu L et al (1999) Role of angiotensin receptor subtypes in mesenteric vascular proliferation and hypertrophy. *Hypertension* 34:408-414
- Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM (2000 a) Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 35(pt 2):155-163
- Carey RM, Jin X, Wang Z et al (2000b) Nitric oxide: a physiological mediator of the type 2 (AT2) angiotensin receptor. *Acta Physiol Scand* 168:65-71
- Carey RM, Howell NL, Jin XH et al (2001) Angiotensin Type 2 receptor-mediated hypotension in angiotensin type 1 receptor-blocked rats. *Hypertension* 38:1272-1277
- Carey RM (2004) Angiotensin type-1 receptor blockade increases ACE2 expression in the heart. *Hypertension* 43:943-944
- Carey RM (2005a) Update on the role of the AT2 receptor (circulation and hemodynamics). *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:67-71
- Carey RM (2005b) Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor: The AT2 receptor comes of age. *Hypertension* 45:840-844
- Carini DJ, Duncia JV, Aldrich PE et al (1991) Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: the discovery of a series of n-(biphenylmethyl) imidazoles as potent, orally-active antihypertensives. *J Med Chem* 34:2525-2547
- Caruso-Neves C, Lara SL, Rangel LB et al (2000) Angiotensin-(1-7) modulates the ouabain-insensitive Na<sup>+</sup> -ATPase activity from bilateral membrane of the proximal tubule. *Biochim Biophys Acta* 1467:189-197
- Casini A (2000) Alcohol-induced fatty liver and inflammation: where do Kupffer cells act? *J Hepatol* 32:1026-1030
- Cazaubon C, Gougat J, Bousclet F et al (1993) Pharmacologic characterization of SR 47436: A new nonpeptide AT1 subtype angiotensin II receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 265:826-834
- Cervenka L, Maly J, Karasova L et al (2001) Angiotensin II-induced hypertension in bradykinin B2 receptor knockout mice. *Hypertension* 37:967-973
- Cesari M, Rossi GP, Pessina AC (2002) Biological properties of the angiotensin peptides other than angiotensin II: implications for hypertension and cardiovascular diseases. *J Hypertens* 20:793-799
- Chai SY, Bastias MA, Clune EF et al (2000) Distribution of the angiotensin IV binding sites (AT(4) receptor) in the human forebrain, midbrain and pons as visualized by in vitro receptor autoradiography. *J Chem Neuroanat* 20:339-348
- Chai SY, Mendelsohn FAO, Lee J et al (2004) Angiotensin AT4 Receptor. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004, pp 519-538
- Chaki S, Inagami T (1992) Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastom Neuro-2A cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182:388-394
- Chan DP, Sandok EK, Aarhus LL et al (1992) Renal specific effects of angiotensin II receptor antagonism in the anesthetized dog. *Am J Hypertens* 5(S2):354-360

- Chan YC, Leung PS (2006) AT1 receptor antagonism ameliorates acute pancreatitis-associated pulmonary injury. *Regul Pept* 134:46-53
- Chang RSL, Lotti VJ (1990) Two distinct angiotensin II receptor binding sites in adrenal revealed by new selective non peptide ligands. *Mol Pharmacol* 29:347-351
- Chappell MC, Pirro NT, Sykes A et al (1998) Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin converting enzyme. *Hypertension* 31:362-367
- Chappell MC, Bosch SM, Hansen RC et al (1994) Angiotensin II receptor subtype expression in the primate pancreas. *Am J Hypertens* 4:92A
- Chen X, Li W, Yoshida H et al (1997) Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. *Am J Physiol* 272:F299-F304
- Chen S, Patel JM, Block ER (2000) Angiotensin IV-mediated pulmonary artery vasorelaxation is due to endothelial intracellular calcium release. *Am J Phys* 279:L849-L85
- Chen Y, Joaquim LF, Fara VM et al (2005) Cardiovascular autonomic control in mice lacking angiotensin AT1a receptors. *Am J Physiol* 288:R1071-R1077
- Chiu AT, McCall DE, Nguyen TT et al (1989) Discrimination of angiotensin receptor subtypes by dithiothreitol. *Eur J Pharmacol* 170:117-118
- Chiu AT, McCall DE, Price WAJ et al (1991) In vitro pharmacology of DuP753. *Am J Hypertens* 4:282S-287S
- Chiu AT, Smith RD, Timmermans (1994) Defining Angiotensin Receptors subtypes. In: Saavedra JM, Timmermans PBMWM (eds) *Angiotensin Receptors*. Plenum Press New York, pp 49-65
- Chiu AG, Krowiak EJ, Deeb ZE (2001) Angioedema associated with angiotensin II antagonists: challenging our knowledge of angioedema and its etiology. *Laryngoscope* 111:1729-1731
- Christen Y, Waeber B, Nussberger J et al (1991) Oral administration of DuP753, a specific angiotensin II receptor antagonist, to normal male volunteers. Inhibition of pressor response to exogenous angiotensin I and II. *Circulation* 83:1333-1342
- Chung O, Kuhl H, Stoll M et al (1998) Physiological and pharmacological implications of AT1 versus AT2 receptors. *Kidney Int* 54:Suppl 67:95-103
- Cigola E, Kaistura J, Li B et al (1997) Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res* 231:363-371
- Clark MA, Tallant EA, Diz DI (2001) Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth cell. *Hypertension* 37:1141-1146
- Clark MA, Tommasi EN, Bosch SM et al (2003) Angiotensin-(1-7) reduces renal angiotensin II receptors through a cyclooxygenase-dependent pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 41:276-283
- Clermont A, Bursell S-E, Feener EP (2006) Role of angiotensin type 1 receptor in the pathogenesis of diabetic retinopathy: effects of blood pressure control and beyond. *J Hypertens* 24 (S.1):S73-S80
- Coffman TM, Audoly LP, Oliverio M (2001) Gene targeting studies of angiotensin II type 1 (AT1) receptors. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 2 (SI):S 10-S15
- Cohn JN, Tognoni G for the Valsartan Heart Failure Trial Investigators (2001) A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker Valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 345:1667-1675
- Cohn JN (2003) Val-HeFT: changing the heart failure horizon. *Eur Heart J* 5(S. C):C25-C28
- Coleman JK, Krebs LT, Hamilton TA et al (1998) Autoradiographic identification of kidney angiotensin IV binding sites and angiotensin IV-induced renal cortical blood flow changes in rats. *Peptides* 34:269-277
- Collister JP, Hornfeldt BJ, Osborn JW (1996) Hypotensive response to Losartan in normal rats. Role of Ang II and Area Postrema. *Hypertension* 27(pt 2):598-606
- Collister JP, Osborn JW (1998) Area Postrema lesion attenuates the long-term hypotensive effects of Losartan in salt-repleted rats. *Am J Physiol* 274:R357-R366
- Collister JP, Soucheray SL, Osborn JW (2002) Chronic hypotensive effects of Losartan are not

- dependent on the actions of Angiotensin II at AT<sub>2</sub> receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 39:107-116
- Collister JP, Hendel MD (2003) Role of the subfornical organ in the chronic hypotensive response to Losartan in normal rats. *Hypertension* 41:576-582
- Conchon S, Monnot C, Teutsch B et al (1994) Internalization of the rat AT<sub>1A</sub> and AT<sub>1B</sub> receptors: Pharmacological and functional requirements. *FEBS Lett* 349:365-370
- Conchon S, Barrault MB, Misarey S et al (1997) The C-terminal third intracellular loop of the rat AT<sub>1A</sub> angiotensin receptor plays a key role in G Protein coupling specificity and transduction of the mitogenic signal. *J Biol Chem* 272:25566-25572
- Conchon S, Clauser E (2004) AT<sub>1</sub> Receptor Molecular Aspects. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol 1, pp 269-295
- Conlin PR, Spence JD, Williams B et al (2000) Angiotensin antagonists for hypertension: are there differences in efficacy? *Am J Hypertens* 13:418-426
- Cook MD, Phillips MI, Cook VI et al (1993) Angiotensin II receptor subtypes on adrenal adenoma in primary hyperaldosteronism. *J Am Soc Nephrol* 4:111-116
- Cook CL, Weiser MC, Schwartz PE et al (1994) Developmentally timed expression of an embryonic growth phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circulation Res* 74:189-196
- Correa FMA, de Oliveria AM, Viswanathan M et al (1994) Autoradiographic localization and characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat thymus. *Peptides* 15:821-824
- Correa SAA, Zalberg H, Han SW et al (2002) Aliphatic amino acids in helix VI of the AT<sub>1</sub> receptor play relevant role in agonist binding and activity. *Regul Pept* 106:33-38
- Costagliola C, Verdino M, Iaccarino G et al (1999) Losartan potassium oral administration decreases intraocular pressure in humans. A pilot study. *Clin Drug Invest* 17:329-332
- Cote F, Do T, Laflamme L et al (1999) Activation of the AT<sub>2</sub> receptors of angiotensin II induces neurite outgrowth and cell migration in microexplant cultures of the cerebellum. *J Biol Chem* 274:31686-31692
- Cox SL, Ben A, Story DF et al (1995) Evidence for the involvement of different receptor subtypes in the pre- and postjunctional actions of angiotensin II at rat sympathetic neuroeffector sites. *Br J Pharmacol* 114:1057-1063
- Crackower MA, Sarao R, Oudit GY et al (2002) Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417:822-828
- Criscione L, Bradley W, Buhlmayer P (1995) Valasartan: preclinical and clinical profile of an antihypertensive angiotensin II antagonist. *Cardiovasc Drug Rev* 13:230-250
- Crozier I, Ikram H, Awan N et al (1995) Losartan in heart failure. Hemodynamic effects and tolerability. Losartan hemodynamic study group. *Circulation* 91:691-697
- Cui T, Nakagami H, Iwai M et al (2000) ATRAP, novel AT<sub>1</sub> receptor associated protein, enhances internalization of AT<sub>1</sub> receptor and inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 279:938-941
- Culman J, Blume A, Gohlke P et al (2002) The renin-angiotensin System in the brain: possible therapeutic implications of AT<sub>1</sub> receptor blockers. *J Hum Hypertens* 16:S64-S70
- Curnow KM (1996) Human type-1 angiotensin II (AT<sub>1</sub>) receptor gene structure and function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 3:S67-S73
- Dahlof B, Devereux R, deFaire U et al (1997a) The Losartan Intervention for Endpoint Reduction (LIFE) in hypertension study. Rationale, design and methods. *Am J Hypertens* 10:705-713
- Dahlof B, Lindholm LH, Carney S et al (1997 b) Main results of the Losartan versus amlodipine (LOA) study on drug tolerability and psychological general well-being. *J Hypertens* 15:1327-1335
- Dahlof B, Devereux RA, Kjeldsen SE et al ((2002a) Cardiovascular morbidity and mortality in the Losartan Intervention for Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against Atenolol. *Lancet* 359:995-1003
- Dahlof B, Zanchetti A, Diez J et al (2002b) Effects of losartan and atenolol on left ventricular mass and neurohormonal profile in essential hypertensives with left ventricular hypertrophy. *J Hypertens* 20:1855-1864

- Dahlof B, Burke TA, Krobot K et al (2004) Population impact of losartan use on stroke in the European Union (EU): Projections from the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension (LIFE). *J Hum Hypertens* 18:367-373
- Dai W-J, Funk A, Herdegen T et al (1999) Blockade of central angiotensin AT1 receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. *Stroke* 30:2391-2399
- Dale LB, Seachrist J, Babwah AV et al (2004) Regulation of angiotensin II type 1A receptor intracellular retention, degradation, and recycling by Rab5, Rab7 and Rab11 GTPases. *J Biol Chem* 279:13110-13118
- Dalmay F, Mazouz H, Allard J et al (2001) Non AT(1)-receptor-mediated protective effect of angiotensin against acute ischemic stroke in the gerbil. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 2:103-106
- D'Amore A, Black M Jane, Thomas WG (2005) The Angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize Angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension* 46:1347-1354
- Danilczyk U, Eriksson U, Crackower MA (2003) A story of two ACEs. *J Mol Med* 81:227-234
- Danilczyk U, Eriksson U, Oudit GY et al (2004) Physiological roles of angiotensin-converting enzyme 2. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 61:2714-2719
- Danser AHJ (2004) Renin-Angiotensin System: Plasma versus Tissues. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol.1, pp 129-147
- Dantas AVP, Sandberg K (2005) Regulation of ACE2 and Ang-(1-7) in the aorta: new insights into the renin-angiotensin System in the control of vascular function. *Am J Physiol* 289:H980-H981
- Daugherty A, Manning MW, Cassis LA (2001) Antagonism of AT2 receptors augments angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysms and atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 134:865-870
- Daviet L, Lethonen J, Tamura K et al (1999) Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *J Biol Chem* 274:17058-17062
- Daviet L, Lethonen J, Hayashida W et al (2001) Intracellular third loops in AT1 and AT2 receptors determine subtype specificity. *Life Sci* 69:509-516
- Davisson RL, Oliverio MI, Coffman TM et al (2000) Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. *J Clin Invest* 106:103-106
- de Blois D, Tea B-S, Dam T-V et al (1997) Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 29(pt 2):340-349
- de Castro CH, dos Santos RAS, Ferreira AJ et al (2005) Evidence for a functional interaction of the Angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension* 46(pt 2):937-942
- de Gasparo M, Whitebread S, Bottari SP et al (1994 a) Heterogeneity of Angiotensin Receptor Subtypes. In: Timmermans PBMWM, We/xler RR (eds) *Medicinal Chemistry of the Renin-Angiotensin System*. Elsevier Amsterdam, pp 269-294
- de Gasparo M, Levens NR, Kamber B et al (1994b) The Angiotensin II AT2 Receptor Subtype. In: Saavedra JM, Timmermans PBMWM (eds) *Angiotensin Receptors*. Plenum Press New York London, pp 95-117
- de Gasparo M, Whitebread S, Kalenga MK et al (1994c) Downregulation of angiotensin II receptor subtype AT2 in human myometrium during pregnancy. *Regul Pept* 53:39-45
- de Gasparo M, Bottari S, Levens NR (1995a) Characteristics of Angiotensin II Receptors and their Role. In: Laragh JH, Brenner BM (eds) *Hypertension. Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Raven Press, New York, pp 1695-1720
- de Gasparo M, Husain A, Alexander W et al (1995b) Proposed update of angiotensin receptors nomenclature. *Hypertension* 25:924-939
- de Gasparo M, Siragy HM (1999) The AT2 receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul Pept* 81: 11-24

- de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T et al (2000) International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol Rev* 52:415-472
- de Gasparo M (2004) AT1 Receptor Antagonists: Pharmacology. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol 11, pp 417-451
- Degli EE, Sturani A, Di Martino M et al (2002) Long-term persistence with antihypertensive drugs in new patients. *J Hum Hypertens* 16:439-444
- de Godoy MAF, de Oliveira AM, Rattan S (2004) Angiotensin II-induced relaxation of aortic smooth muscle via desensitization of AT1 receptor, and activation of AT2 receptor associated with nitric-oxide synthase pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 311:394-401
- Delorenzi A, Locatelli F, Romano A et al (1997) Angiotensin II (3-8) induces long-term improvement in the crab chasmagnatus. *Neurosci Lett* 226:143-146
- De Souza AM, Lopes AG, Pizzino CP et al (2004) Angiotensin II and Angiotensin-(1-7) inhibit the inner cortex  $\text{Na}^+$ -ATPase activity through AT2 receptor. *Regul Pept* 120:167-175
- Devereux RB, Palmieri W, Liu JE et al (2002) (The LIFE Study) Progressive hypertrophy regression with sustained pressure reduction in hypertension. *J Hypertens* 20:1445-1450
- de Zeeuw D, Remuzzi G, Kirch W (1997) Pharmacokinetics of Candesartan cilexetil in patients with renal or hepatic impairment. *J Hum Hypertens* 11 (S 2):S37-S42
- Dickstein K, Kjekshus J (2002) Effects of Losartan and Captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomized trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan. *Lancet* 360:752-760
- Diep QN, Li J-S, Schiffrin EL (1999) In vivo study of AT1 and AT2 angiotensin receptors in apoptosis in rat blood vessels. *Hypertension* 34:617-624
- Diep QN, El Mabrouk M, Yue P et al (2002) Effect of AT1 receptor blockade on cardiac apoptosis in angiotensin II-induced hypertension. *Am J Physiol* 282:H1635-H1641
- Diet F, Pratt RE, Berry GJ et al (1996) Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94:2756-2767
- Diez J, Panizo A, Hernandez M et al (1997) Cardiomyocyte apoptosis and cardiac angiotensin-converting enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 30:1029-1034
- Dimmeler S, Ripman V, Weiland U et al (1997) Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells: protective effects of nitric oxide. *Circ Res* 81:970-976
- Dinh DT, Frauman AG, Casley DJ et al (2001) Angiotensin AT4 receptors in the normal human prostate and benign prostatic hypertrophy. *Mol Cell Endocrinol* 184:187-192
- Dinh DT, Frauman AG, Johnston CI et al (2001) Angiotensin receptors: distribution, signaling and functions. *Clin Sci* 100:481-492
- Diz DI, Ferrario CM (1996) Angiotensin Receptor Heterogeneity in the Dorsal Medulla Oblongata as defined by Angiotensin-(1-7). In: Raizada MK, Phillips Mi, Summers C (eds) *Recent Advances in Cellular and Molecular Aspects of Angiotensin Receptors*. Plenum Press New York London, pp 225-235
- Diz DI, Westwood BM (2000) Deficiency of endogenous angiotensin-(1-7) in the nucleus tractus solitarius of (mREN2)27 transgenic rats may account for diminished baroreceptor reflex function. *Hypertension* 36:681
- Diz DI, Chappell MC, Tallant EA et al (2005) Angiotensin-(1-7). In: Oparil S, Weber MA (eds) *Hypertension*. Elsevier Saunders, pp 100-110
- Donoghue M, Hsieh F, Baronas E et al (2000) A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin 1 to angiotensin 1-9. *Circ Res* 87:E1-E9
- Douglas JG (1996) The curtain raises on the Renin-Angiotensin System: AT2 receptors are in the spotlight. *J Clin Invest* 97:1787
- Doulton TWR, He FJ, MacGregor GA (2005) Systematic review of combined angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin receptor blockade in hypertension. *Hypertension* 45:880-886
- Dubey RK, Jackson EK, Rupprecht HD et al (1997) Factors controlling growth and matrix



- production in vascular smooth muscle and glomerular cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6:88-105
- Duff JL, Monia BP, Berk BC (1995) Mitogen-activated protein (MAP) kinase is regulated by the MAP kinase phosphatase (MKP-1) in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270:7161-7166
- Dulin NO, Alexander LD, Harwalkar S et al (1998) Phospholipase A2-mediated activation of mitogen-activated protein kinase by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8098-8102
- Dzau V (2005) Cardiovascular continuum and renin-angiotensin-aldosterone system blockade. *J Hypertens* 23(Suppl 1):S9-S18
- Dzau VJ (1988) Circulating versus local renin-angiotensin System in cardiovascular homeostasis. *Circulation* 77(pt II):15-117
- Dzau VJ, Pratt RE (1993) Local Cardiac, Vascular and Renal Renin-Angiotensin Systems in Physiology and Disease. In: Robertson JIS, Nicholls MG (eds) *The Renin-Angiotensin System*. Gower Medical Publishing London New York, vol 1, pp 42.1-42.11
- Endo Y, Arima S, Yaoita H et al (1998) Vasodilation mediated by angiotensin II type 2 receptor is impaired in afferent arterioles of young spontaneously hypertensive rats. *J Vasc Res* 35:421-427
- Erdos EG, Jackman HL, Brovkovich V et al (2002) Products of angiotensin I hydrolysis by human cardiac enzymes potentiate bradykinin. *J Mol Cell Cardiol* 34:1569-1576
- Etminan M, Levine MAH, Tomlison G et al (2002) Efficacy of angiotensin II receptor antagonists in preventing headache: A systematic overview and meta-analysis. *Am J Med* 112:642-646
- Fabiani ME, Johnston CI (2001) AT1 Receptor Antagonists as Antihypertensive Agents. In: Epstein M, Brunner HR (eds) *Angiotensin II Receptor Antagonists*. Hanley & Belfus, pp 263-278
- Feng YH, Noda K, Saad Y et al (1995) The docking of Arg2 of Angiotensin II with Asp281 of AT1 receptor is essential for full agonism. *J Biol Chem* 270:12846-12850
- Feng YH, Sun Y, Douglas J (2002)  $G_{\beta\gamma}$ -independent constitutive association of  $G_{\alpha_s}$  with SHP-1 and angiotensin II receptor AT2 is essential in AT2-mediated ITIM-independent activation of SHP-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:12049-12054
- Ferguson SSG, Barak LS, Zhang J et al (1996) G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* 74:1095-1110
- Ferguson AV, Bains JS (1997) Actions of angiotensin in the subfornical organ and the area postrema: implications for long-term control of autonomic output. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24:96-101
- Ferguson SSG (2001) Evolving concepts in G-Protein-Coupled Receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53:1-24
- Fernandez LA, Caride VJ, Stromberg C et al (1994) Angiotensin AT2 receptor stimulation increases survival in gerbils with abrupt unilateral carotid ligation. *J Cardiovasc Pharmacol* 24:937-940
- Ferrario CM, Averill DB, Brosnihan KB et al (2004) Angiotensin-(1-7). Its Contribution to Arterial Pressure Control Mechanisms. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol I, pp 477-518
- Ferrario CM, Jessup J, Chappell MC et al (2005 a) Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockers on cardiac angiotensin-converting enzyme 2. *Circulation* 111:2605-2610
- Ferrario CM, Trask AJ, Jessup JA (2005 b) Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in regulation of cardiovascular function. *Am J Physiol* 289:H2281-H2290
- Ferrario CM (2006 a) Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-(1-7). An Evolving Story in Cardiovascular Regulation. *Hypertension* 47(pt 2):515-521
- Ferrario CM (2006 b) Role of angiotensin in cardiovascular disease - Therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 7:3-14

- Fierens F, Vanderheyden O, De Baker JP et al (1999) Insurmountable angiotensin II AT1 receptor antagonists: The role of tight antagonist binding. *Eur J Pharmacol* 372:199-206
- Fischer TA, Singh K, O'Hara DS et al (1998) Role of AT1 and AT2 receptors in regulation of MAPK and MKP-1 by ang II in adult cardiac myocytes. *Am J Physiol* 275:H906-H916
- Fitzgerald SM, Evans RG, Bergstrom G et al (1999) Renal hemodynamic responses to intrarenal infusion of ligands for the putative angiotensin IV receptor in anesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 34:206-211
- Fleming I, Kohlstedt K, Busse R (2006) The tissue renin-angiotensin System and intracellular signaling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15:8-13
- Fletcher AE, Dollery CT (1993) Side Effects Associated with Inhibitors of Angiotensin-Converting Enzyme. In: Robertson JIS, Nicholls MG (eds) *The Renin-Angiotensin System*. Gower Medical Publishing London New York, vol2, pp 99.1-99.15
- Fogari R, Mugellini A, Zoppi A et al (2000) A double-blind, crossover study of the antihypertensive efficacy of angiotensin II-receptor antagonists and their activation of the renin-angiotensin system. *Curr Ther Res* 61:669-679
- Fogari R, Mugellini A, Destro M et al (2006) Losartan and prevention of atrial fibrillation recurrence in hypertensive patients. *J Cardiovasc Pharmacol* 47:46-50
- Fontes MAP, Silva LCS, Campagnole-Santos MJ et al (1994) Evidence that angiotensin-(1-7) plays a role in the central control of blood pressure at the ventrolateral medulla acting through specific receptor. *Brain Res* 665:175-180
- Fontes MAP, Martins Pinge MC, Naves W et al (1997) Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists in the ventrolateral medulla of freely moving rats. *Brain Res* 750:305-310
- Fontes MAP, Baltatu O, Caligiorne SM et al (2000) Angiotensin peptides acting at rostral ventrolateral medulla contribute to hypertension of TGR(mREN2)27 rats. *Physiol Genom* 2:137-142
- Forclaz A, Maillard M, Nussberger J et al (2003) Angiotensin II receptor blockade. Is there truly a benefit of adding an ACE inhibitor? *Hypertension* 41:31-36
- Ford WR, Clanachan AS, Lopaschuk GD et al (1998) Intrinsic Ang II type 1 receptor stimulation contributes to recovery of postischemic mechanical function. *Am J Physiol* 43:H11524-H11531
- Forner P, Richer C, Vacher E et al (1993) Losartan's protective effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats persist durably after treatment withdrawal. *J Cardiovasc Pharmacol* 22:305-313
- Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC et al (1998) Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats. Effects of AT1 blockade with Losartan. *Hypertension* 32:280-286
- Foucarrat S, Patrick SK, Oster L et al (1996) Effects of chronic treatment with Losartan and Enalapril on (3H)-Norepinephrine release from isolated atria of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 9:61-69
- Fournier A, Messerli FH, Achard JM et al (2004) Cerebroprotection mediated by Angiotensin II. A hypothesis supported by recent randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 43:1343-1347
- Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1996) Desensitization of G-Protein-coupled receptors. *Rec Progr Horm Res* 51:319-351
- Fricker A, Nussberger J, Meilenbrock S et al (1998) Effect of indomethacin on the renal response to angiotensin II receptor blockade in healthy subjects. *Kidney Int* 54:2089-2097
- Fridovich I (1997) Superoxide anion radicals, superoxide dismutases and related matters. *J Biol Chem* 272:18515-18517
- Furukawa Y, Kishimoto S, Nishikawa K (1982) Hypotensive imidazole derivatives and hypotensive imidazole-5-acetic acid derivatives. Patents issued to Takeda Chemical Industries Ltd. on July 20, 1982 and October 19, 1982, respectively, U.S. Patents 4,340,598 and 4,355,040, Osaka, Japan, 1982

- Gaborik Z, Szaszak M, Szidonya L et al (2001)  $\beta$ -arrestin and dynamin-dependent endocytosis of the AT1 angiotensin receptor. *Mol Pharmacol* 59:239-247
- Gaborik Z, Jagadeesh G, Zhang M et al (2003) The role of a conserved region of the second intracellular loop in AT1 angiotensin receptor activation and signaling *Endocrinology* 144:2220-2228
- Gallinat S, Yu M, Dorst A et al (1998) Sciatic nerve transection evokes lasting up-regulation of angiotensin AT2 and AT1 receptor mRNA in adult rat dorsal root ganglia and sciatic nerves. *Brain Res* 57:111-122
- Gallinat S, Busche S, Schutze S et al (1999) AT2 receptor stimulation induces generation of ceramides in PC12W cells. *FEBS Lett* 443:75-79
- Gallinat S, Busche S, Raizada MK et al (2000) The angiotensin II type 2 receptor: an enigma with multiple variations. *Am J Physiol* 278:E357-E374
- Gansevoort RT, de Zeeuw D (2000) The antihypertensive and renal effects of angiotensin II receptor antagonists: remaining questions. *Curr Opin Nephrol* 9:57-61
- Gansevoort RT, Mimran A, de Zeeuw D et al (2001) AT1 Receptor Antagonists and the Kidney. In: Epstein M, Brunner HR (eds) *Angiotensin II Receptor Antagonists*. Hanley & Belfus, pp 295-316
- Garcha RS, Sever PS, Hughes AD (1999) Action of AT1 receptor antagonists on angiotensin II-induced tone in human isolated subcutaneous resistance arteries. *Br J Pharmacol* 127:1876-1882
- Garcia-Caballero A, Olivares-Reyes JA, Catt KJ et al (2001) Angiotensin AT1 receptor phosphorylation and desensitization in a hepatic cell line. Role of protein kinase C and Phosphoinositide 3-kinase. *Mol Pharmacol* 59:576-585
- Garcia NH, Garvin JL (1994) Angiotensin 1-7 has a biphasic effect on fluid absorption in the proximal straight tubule. *J Am Soc Nephrol* 5:1133-1138
- Gelband CH, Zhu M, Lu D et al (1997) Functional interaction between neuronal AT1 and AT2 receptors. *Endocrinology* 138:2195-2198
- Gether U, Kobilka BK (1998) G protein-coupled receptors: II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 273:17979-17982
- Gigante B, Piras O, De Paolis P et al (1998) Role of angiotensin II AT2-subtype receptors in the blood pressure lowering effect of Losartan in salt-restricted rats. *J Hypertens* 16:2039-2043
- Gironacci MM, Vatta M, Rodriguez-Fermepin M et al (2000) Angiotensin-(1-7) reduces norepinephrine release through a nitric oxide mechanism in rat hypothalamus. *Hypertension* 35:1248-1252
- Glossmann H, Baukal A, Catt KJ (1974) Properties of angiotensin II in bovine and rat adrenal cortex. *J Biol Chem* 249:825-831
- Gohlke P, Pees C, Unger T (1998) AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a Kinin-dependent mechanism. *Hypertension* 31:349-355
- Gohlke P, Scholkens BA (2004) ACE Inhibitors: Pharmacology. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol II, pp 375-413
- Goldenbergh I, Grossman E, Jacobson KA et al (2001) Angiotensin-induced apoptosis in rat cardiomyocyte culture: a possible role of AT1 and AT2 receptors. *J Hypertens* 19:1681-1689
- Gomez-Cambronero J, Kiere P (1998) Phospholipase D: A novel major player in signal transduction. *Cell Signal* 10:387-397
- Goodfriend TL, Lin SY (1970) Receptors for Angiotensin I and II. *Circ Res* 26 and 27 S.1:1-163
- Goodfriend TL (2000) Angiotensin receptors: History and mysteries. *Am J Hypertens* 13:442-449
- Gorelik G, Carhini LA, Scicli AG (1998) Angiotensin-(1-7) induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *J Pharmacol Exp Ther* 286:403-410
- Grady EF, Sechi LA, Griffin CA et al (1991) Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88:921-933

- Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B et al (1997) Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. *New Concepts. Hypertension* 29(pt 2):366-373
- Griendling KK, Ushio-Fukai M (2000) Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 91:21-27
- Griffin SA, Brown WCB, MacPherson F et al (1991) Angiotensin II causes vascular hypertrophy in part by a non-pressor mechanism. *Hypertension* 17:626-635
- Griffiths CD, Morgan TO, Delbridge LM (2001) Effects of combined administration of ACE inhibitor and angiotensin II receptor antagonist are prevented by a high salt intake. *J Hypertens* 19:2087-2095
- Grone HJ, Simon M, Fuchs E (1992) Autoradiographic characterization of angiotensin receptor subtypes in fetal and adult kidney. *Am J Physiol* 262:F32-F331
- Gros R, Benovic JL, Tan CM et al (1997) G-protein-coupled receptor kinase is increased in hypertension. *J Clin Invest* 99:2087-2093
- Gross V, Schunk WH, Honeck H et al (2000) Inhibition of pressure natriuresis in mice lacking AT2 receptor. *Kidney Int* 57:191-202
- Gross V, Obst M, Luft FC (2004) Insights into angiotensin II receptor function through AT2 receptor knockout mice. *Acta Physiol Scand* 181:487-494
- Haendeler J, Berk BC (2000) Angiotensin II-mediated signal transduction. Important role of tyrosine kinases. *Regul Pept* 95:1-7
- Haendeler J, Dimmeler S (2004) Regulation of Angiogenesis by Angiotensin II. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol I, pp 99-109
- Hamawaki M, Coffman TM, Lashus A et al (1998) Pressure-overload hypertrophy is unabated in mice devoid of AT1A receptors. *Am J Physiol* 274:H868-H873
- Hamet P, Richard L, Dam TV et al (1995) Apoptosis in target organs of hypertension. *Hypertension* 26:642-648
- Hamilton TA, Handa RK, Harding JW et al (2001) A role for the angiotensin IV/ AT4 System in mediating natriuresis in the rat. *Peptides* 22:935-944
- Handa RK, Ferrario CM, Strandhoy JW (1996) Renal actions of angiotensin-(1-7): in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol* 270:F141-F147
- Handa RK, Krebs LT, Harding JW et al (1998) Angiotensin IV AT4-receptor System in the rat kidney. *Am J Physiol* 274:F290-F299
- Handa RK (1999) Angiotensin-(1-7) can interact with the rat proximal tubule receptor System. *Am J Physiol* 277:F75-F83
- Handa RK (2001) Characterization and signaling of the AT(4) receptor in the human proximal tubule epithelial (HK-2) cells. *J Am Soc Nephrol* 12:440-449
- Hanesworth JM, Sardinia MF, Krebs LT et al (1993) Elucidation of a specific binding site for angiotensin II(3-8), angiotensin IV, in mammalian heart membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 46:1510-1512
- Hanley MR (1991) Molecular and cell biology of angiotensin receptors subtypes. *J Cardiovasc Pharmacol* 18(S 2):S7-S13
- Hansen J, Servant G, Baranski T et al (2000) Functional reconstitution of the angiotensin II type 2 receptor and G(i) activation. *Circ Res* 87:753-759
- Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L et al (1999 a) Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomized trial. *Lancet* 353:611-616
- Hansson L, Lithell H, Skoog I et al (1999 b) Study on Cognition and Prognosis 1n the Elderly (SCOPE). *Blood Press* 8:177-183
- Hansson L, Lithell H, Skoog I et al (2000) Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): baseline characteristics. *Blood Press* 9:146-151
- Harada K, Komuro I, Shiojima I et al (1998) Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. *Circulation* 97:1052-1059
- Harada K, Sugaya T, Murakami K et al (1999 a) Angiotensin type 1A receptor knockout mi-

- ce display less ventricular remodelling and improved survival after myocardial infarction. *Circulation* 100:2093-2099
- Harada K, Komuro I, Sugaya T et al (1999 b) Vascular injury causes neointimal formation in angiotensin II type 1a receptor knockout mice. *Circ Res* 84:179-135
- Harris RC (2001) Signaling and Cellular Effects of Angiotensin II. In: Epstein M, Brunner HR (eds) *Angiotensin II Receptor Antagonists*. Hanley & Belfus, pp 49-53
- Harrison-Bernard LM, Navar LG, Ho MM et al (1997) Immunohistochemical localization of Ang II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. *Am J Physiol* 273:F170-F177
- Hashimoto N, Maeshima Y, Satoh M et al (2003) Overexpression of angiotensin type-2 receptor ameliorates glomerular injury in a mouse remnant kidney model. *Am J Physiol* 286:F516-F525
- Haulica I, Bild W, Serban DN (2005) Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 6:121-131
- Hayashida W, Horiuchi M, Dzau VJ (1996) Intracellular third loop domain of angiotensin II type 2 receptor. *J Biol Chem* 271:21985-21992
- Heagerty AM (2005) Influence of changes of blood pressure on vascular angiotensin II receptor subtype expression. *Circulation* 111:956-957
- Hedner T, Himmelmann A (1999) The efficacy and tolerance of one or two daily doses of eprosartan in essential hypertension. The Eprosartan Multinational Study Group. *J Hypertens* 17:129-136
- Hein L, Barsh GS, Pratt RE et al (1995) Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 377:744-747
- Hein L, Meinel L, Pratt RE et al (1997 a) Intracellular trafficking of angiotensin II and its AT1 and AT2 receptors: Evidence for selective sorting of receptor and ligand. *Mol Endocrinol* 11:1266-1277
- Hein L, Stevens ME, Barsh GS et al (1997 b) Overexpression of the AT1 receptor transgene in the mouse myocardium produces a lethal phenotype associated with myocyte hyperplasia and heart block. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6391-6396
- Heitsch H, Brovkovich S, Malinsky T et al (2001) Angiotensin-(1-7)-stimulated nitric oxide and superoxide release from endothelial cells. *Hypertension* 37:72-76
- Henderson IN, Deacon CF (1993) Phylogeny and comparative Physiology of the Renin-Angiotensin System. In: Robertson JIS, Nicholls MG (eds) *The Renin-Angiotensin System*. Gower Medical Publishing London, vol 1, pp 2.01-2.28
- Henrion D, Kubis N, Levy BL (2001) Physiological and pathophysiological functions of the AT2 subtype receptor of angiotensin II. From large arteries to microcirculation. *Hypertension* 38:1150-1157
- Herdling J, Hines J, Fluharty S et al (2001) Identification and function of disulfide bridges in the extracellular domains of the angiotensin II type 2 receptor. *Biochemistry* 40:8369-8377
- Heuser JE, Anderson RG (1989) Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit. *J Biol Chem* 108:389-400
- Himmelmann A, Keinanen-Kiukaanniemi S, Wester A et al (2001) The effect duration of candesartan cilexetil once daily, in comparison with enalapril once daily in patients with mild or moderate hypertension. For the EFFECT Study Group. *Blood Press* 10:43-51
- Hines J, Heerding J, Fluharty S et al (2001) Identification of angiotensin II type 2 (AT2) receptor domains mediating high-affinity CGP 42112A binding and receptor activation; *J Pharmacol Exp Ther* 298:665-673
- Hirano T, Ran J, Adachi M (2006) Opposing actions of angiotensin II type 1 and 2 receptors on plasma cholesterol levels in rats. *J Hypertens* 24:103-108
- Hoffmann S, Krause T, Pinto Y et al (1996) Cardiac-specific expression of the human AT1 receptor in transgenic rats. *Hypertension* 28:P76 (abstract)
- Hohle S, Culman J, Boser M et al (1996) Effect of angiotensin AT2 and muscarinic receptor blockade on osmotically induced vasopressin release. *Eur J Pharmacol* 300:119-123

- Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T et al (1997) Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase Phosphatase-1 and induces apoptosis. *J Biol Chem* 272:19022-19026
- Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ (1998) Molecular and cellular mechanism of angiotensin II-mediated apoptosis. *Endocr Res* 24:307-314
- Horiuchi M, Hayashida W, Akishita M et al (1999 a) Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT1 and AT2 receptors, regulates STAT activation by negative cross-talk. *Circ Res* 84:876-882
- Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ (1999 b) Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular System. *Hypertension* 33:613-621
- Hornig B, Landmesser U, Kohler C et al (2001) Comparative effect of ACE inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: role of superoxide dismutase. *Circulation* 103:799-805
- Hu L, Catanzaro DF, Laragh JH et al (1999) Delayed recovery of hypertension after single dose of Losartan in angiotensin II-infused conscious rats. *J Hypertens* 17:1443-1450
- Huang X-C, Richards EM, Sumners C (1996) Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptor and inhibited by angiotensin II type 2 receptor. *J Biol Chem* 271:15635-15641
- Humphrey PPA, Bernard EA (1998) International Union of Pharmacology. The IUPHAR receptor code: a proposal for an alphanumeric classification System. *Pharmacol Rev* 50:271-277
- Hunyady L, Baukal AJ, Balla T et al (1994a) Independence of type 1 angiotensin II receptor endocytosis from G protein coupling and signal transduction. *J Biol Chem* 269:24798-24804
- Hunyady L, Bor M, Balla T et al (1994b) Identification of a cytoplasmic Ser-Thr-Leu motif that determines agonist-induced internalization of the AT1 angiotensin receptor. *J Biol Chem* 269:31378-31382
- Hunyady L, Balla T, Catt K (1996) The ligand binding site of the angiotensin AT1 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 17:135-140
- Hunyady L (1999) Molecular mechanisms of angiotensin II receptor internalization. *J Am Soc Nephrol* 10:S47-S56
- Hunyady L, Catt KJ, Clark AJL et al (2000) Mechanisms and functions of AT1 angiotensin receptor internalization. *Regul Pept* 91:29-44
- Hunyady L, Gaborik Z, Vauquelin G et al (2001) Structural requirements for signaling and regulation of AT1-receptors. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 2 (S1):S16-S23
- Hunley TE, Tamura M, Stoneking BJ et al (2000) The angiotensin type II receptor tonically inhibits angiotensin converting enzyme in AT2 null mutant mice. *Kidney Int* 57:570-577
- Ichihara S, Senbonmatsu T, Price E jr et al (2001) Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation* 104:346-351
- Ichiki T, Kambayashi Y, Inagami T (1995 a) Multiple growth factors modulate messenger RNA expression of angiotensin II type 2 receptor in R3T3 cells. *Circ Res* 77:1070-1076
- Ichiki T, Labosky PA, Shiota C et al (1995 b) Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature* 377:748-750
- Igase M, Strawn WB, Gallagher PE et al (2005) Angiotensin II AT1 receptors regulate ACE2 and angiotensin-(1-7) expression in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 289:H1013-H1019
- Inagami T (1995) Recent progress in molecular and cell biological studies of angiotensin receptors. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 4:47-54
- Inagami T (1999 a) Molecular biology and signaling of angiotensin receptors. An overview. *J Am Soc Nephrol* 10:S2-S7
- Inagami T, Eguchi S, Numaguchi K et al (1999 b) Cross-talk between angiotensin II receptors and the tyrosine kinases and phosphatases. *J Am Soc Nephrol* 10:S57-S61
- Inagami T, Mizukoshi M, Guo Den-Fu (1994) Angiotensin II Receptor: Molecular Cloning,

- Functions, and Regulation. In: Saavedra JM, Timmermans PBMWM (eds): *Angiotensin Receptors*. Plenum Press, Newyork and London pp 1-15
- Innocenti AD, Elmfeldt D, Hansson L et al (2002) Cognitive function and health-related quality of life in elderly patients with hypertension – baseline data from the Study on Cognition and Prognosis in the Elderly. *Blood Press* 11:157-162
- Inoue Y, Nakamura N, Inagami T (1997) A review of mutagenesis studies of angiotensin II type 1 receptor, the three-dimensional receptor model in search of agonist and antagonist binding site and the hypothesis of a receptor activation mechanism. *J Hypertens* 15:703-714
- Ishizaka N, Griendling KK, Lassegue B et al (1998) Angiotensin type 1 receptor Relationship with caveole and caveolin after initial agonist stimulation. *Hypertension* 32:459-466
- Ito M, Oliverio MI, Mannon PJ et al (1995) Regulation of blood pressure by the type 1A angiotensin receptor gene. *Proc Ntl Acad Sci USA* 92:3521-3525
- Iyer SN, Ferrario CM, Chappell MC (1998) Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin System. *Hypertension* 31:356-361
- Iyer SN, Yamada K, Diz DI et al (2000) Evidence that prostaglandins mediate the antihypertensive action of angiotensin-(1-7) during chronic blockade of the renin-angiotensin system. *J Cardiovasc Pharmacol* 36:109-117
- Jackson TR, Blair LA, Marshall J et al (1988) The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature* 335:437-440
- Jaiswal N, Diz DI, Tallant EA et al (1991) Characterization of angiotensin receptors in mediating prostaglandins synthesis in C6 glioma cells. *Am J Physiol* 260:R1000-R1006
- Jaiswal N, Tallant EA, Jaiswal RK et al (1993) Differential regulation of prostaglandins synthesis by angiotensin peptides in porcine aortic smooth muscle cells: Subtypes of angiotensin receptors involved. *J Pharmacol Exp Ther* 265:664-673
- Ji H, Leung M, Zhang Y et al (1994) Differential structural requirements for specific binding of nonpeptide and peptide antagonists to the AT<sub>1</sub>angiotensin receptor. *J Biol Chem* 269:16533-16536
- Jimenez AM, Monton M, Garcia R et al (2001) Inhibition of platelet activation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: Comparison of Losartan, Candesartan, Valsartan. *J Cardiovasc Pharmacol* 37:406-412
- Jin XH, Wang ZQ, Siragy HM et al (1998) Regulation of jejunal sodium and water absorption by angiotensin subtype receptors. *Am J Physiol* 275:R515-R523
- Jin XH, Siragy HM, Carey RM (2001) Renal interstitial cGMP mediates natriuresis by direct tubule mechanism. *Hypertension* 38:309-316
- Johansson ME, Wickman A, Fitzgerald SM et al (2005) Angiotensin II type 2 receptor is not involved in the angiotensin II-mediated pro-atherogenic process in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *J Hypertens* 23:1541-1549
- Julian BA, Brantley RR, Barker CV et al (1998) Losartan, an angiotensin II type 1 antagonist, lowers hematocrit in post-transplant erythrocytosis. *J Am Soc Nephrol* 9:1104-1108
- Johnson AK, Gross PM (1993) Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J* 7:678-686
- Julius S, Kjeldsen SE, Weber M et al (2004) Outcomes in hypertensive patients at high cardiovascular risk treated with valsartan or amlodipine-based regimens: VALUE, a randomized trial. *Lancet* 363:2021-2031
- Kai H, Alexander RW, Ushio-Fukai M et al (1998) G-Protein binding domains of the angiotensin AT<sub>1A</sub> receptors mapped with synthetic peptides selected from the receptor sequence. *Biochem J* 332:781-787
- Kakinuma Y, Hama H, Sugiyama E et al (1997) Anti-apoptotic action of angiotensin fragments to neuronal cells from angiotensinogen knockout mice. *Neurosci Lett* 232:167-170
- Kakuchi J, Ichiki T, Kiyama S et al (1995) Developmental expression of renal angiotensin receptor gene in the mouse. *Kidney Int* 47:140-147
- Kalenga MK, de Gasparo M, de Hertogh M et al (1991) Angiotensin II receptors in the placenta are type 1. *Reprod Nutr Dev* 31:257-267

- Kambayashi Y, Takahashi K, Bardhan S et al (1994) Molecular structure and function of angiotensin type 2 receptor. *Kidney Int* 46:1502-1504
- Kang J, Posner P, Sumners C (1994) Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K<sup>+</sup> currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol* 267:C1389-C1397
- Kario K, Nishikimi T, Yoshihara F et al (1998) Plasma levels of natriuretic peptides and adrenomedullin in elderly hypertensive patients: relationships to 24h blood pressure. *J Hypertension* 16:1253-1259
- Karnik SS, Husain A, Graham RM (1996) Molecular determinants of peptide and non peptide binding to the AT1 receptor. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (S3):S58-S66
- Kaschira E, Unger T (2003) Angiotensin AT1/AT2 receptors: Regulation, signaling and function. *Blood Press* 12:70-88
- Kassler-Taub K, Littlejohn T, E11iott W et al (1998) Comparative efficacy of two angiotensin II receptor antagonists, irbesartan and losartan in mild-to-moderate hypertension. Irbesartan/Losartan Study Investigators. *Am J Hypertens* 11:445-453
- Katada J, Majima M (2002) AT2 receptor-dependent vasodilation is mediated by activation of vascular kinin generation under flow conditions. *Br J Pharmacol* 136:484-491
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257
- Kimura B, Sumners C, Phillips MI (1992) Changes in skin angiotensin II receptors in rats during wound healing. *Biochem Biophys Res Commun* 187:1083-1090
- Koh KK, Ahn JY, Han SH et al (2003) Pleiotropic effects of angiotensin II receptor blockers in hypertensive patients. *J Am Coll Cardiol* 42:905-910
- Koike G, Horiuchi M, Yamada T et al (1994) Human type 2 angiotensin II receptor gene: cloned, mapped to X chromosome and its mRNA is expressed in human lung. *Biochem Biophys Res Commun* 203:1842-1850
- Kong JY, Rabkin SW (2000) Angiotensin II does not induce apoptosis but rather prevents apoptosis in cardiomyocytes. *Peptides* 21:1237-1247
- Kostenis E, Milihan G, Christopoulos D et al (2005) G-Protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 111:1806-1816
- Kramar EA, Krishnan R, Harding JW et al (1998) Role of nitric oxide in angiotensin IV-induced increases in cerebral blood flow. *Regul Pept* 74:185-192
- Kramer C, Sunkomat J, Witte J et al (2002) Angiotensin II receptor-independent antiinflammatory and antiaggregatory properties of Losartan. Role of the active metabolite EXP 3179. *Circ Res* 90:770-776
- Kuba K, Imai Y, Rao S et al (2005) A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med* 11:875-879
- Kule CE, Karoor V, Day JNE et al (2004) Agonist-dependent internalization of the angiotensin II type one receptor (AT1): role of C-terminus phosphorylation in recruitment of B-arrestins. *Regul Pept* 120:141-148
- Kumagai K, Reid IA (1994) Losartan inhibits sympathetic and cardiovascular responses to carotid occlusion. *Hypertension* 23 (pt 2):827-831
- Kurabayashi M, Yazaki Y, (1997) Down-regulation of angiotensin II receptor type 1 in heart failure: A process of adaptation or deterioration? *Circulation* 95:1104-1107
- Kurusu S, Ozono R, Oschima T et al ((2003) Cardiac angiotensin II type 2 receptor activates the kinin/NO System and inhibits fibrosis. *Hypertension* 41:99-107
- Kurz TW, Pravenec M (2004) Antidiabetic mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptors antagonists: Beyond the renin-angiotensin System. *J Hypertens* 22:2253-2261
- Lacour C, Canals F, Galindo G et al (1994) Efficacy of SR 47436 (BMS-186295), a non-peptide angiotensin AT1 receptor antagonist in hypertensive models. *Eur J Pharmacol* 264:307-316
- Lacourcière Y, Brunner H, Irwin R et al (1994) Effects of modulators of the renin-angiotensin-aldosterone System on cough. Losartan Cough Study Group. *J Hypertens* 12:1387-1393



- Laflamme L, de Gasparo M, Gallo JM et al (1996) Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT<sub>2</sub> receptors in NG108-15 cells. Effect counteracted by the AT<sub>1</sub> receptors. *J Biol Chem* 271:22729-22735
- Lassegue B, Alexander RW, Nickenig G et al (1995) Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT<sub>1</sub> receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol* 48:601-609
- Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z et al (1997) Role of superoxide in angiotensin-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 95:588-593
- Leclerc PC, Auger Messier M, Lanctot PM et al (2002) A polyaromatic caveolin-binding-like motif in the cytoplasmic tail of the type 1 receptor for angiotensin II plays an important role in receptor trafficking and signaling. *Endocrinology* 143:4702-4710
- Le MT, Vanderheyden P, Szaszak M et al (2002) Angiotensin IV is a potent agonist for constitutive active human AT<sub>1</sub> receptors: distinct role of the N- and C-terminal residues of angiotensin II during AT<sub>1</sub> receptor activation. *J Biol Chem* 277:23107-23110
- Lee J, Chay SY, Mendelsohn FA et al (2001) Potentiation of cholinergic transmission in the rat hippocampus by angiotensin IV and LVV-hemorphin-7. *Neuropharmacology* 40:618-623
- Lee VC, Rhew DC, Dylan M et al (2004) Meta-analysis: Angiotensin Receptor blockers in chronic heart failure and high-risk acute myocardial infarction. *Ann Intern Med* 141:693-704
- Lefkowitz RJ (1998) G-protein-coupled receptors. III: New roles for receptor kinases and  $\beta$ -arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem* 273:18677-18680
- Lethonen JYA, Daviet L, Nahmias C et al (1999) Analysis of functional domains of angiotensin II type 2 receptor involved in apoptosis. *Mol Endocrinol* 13:1051-1060
- Leung PS, Sernia C (2003) The renin-angiotensin System and male reproduction: new functions for old hormones. *J Mol Endocrinol* 30:263-270
- Levy BI, Benessiano J, Henrion D et al (1996) Chronic blockade of AT<sub>2</sub>-subtype receptors prevents the effect of angiotensin II on the rat vascular structure. *J Clin Invest* 98:418-425
- Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR et al (2001) Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345:851-860
- Li Jin-S, Sharif AM, Schiffrin EL (1997) Effect of AT<sub>1</sub> angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:75-83
- Li P, Chappell MC, Ferrario CM et al (1997) Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension* 29(pt 2):394-400
- Li DY, Yang BC, Philips MI et al (1999) Proapoptotic effects of Ang II in human coronary artery endothelial cells: role of AT<sub>1</sub> receptor and PKC activation. *Am J Physiol* 276:H786-H792
- Li WL, Moore MJ, Vasilieva N et al (2003) Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 426:452-454
- Li Z, Iwai M, Wu L et al (2003) Role of AT<sub>2</sub> receptor in the brain in the regulation of blood pressure and water intake. *Am J Physiol* 284:H116-H121
- Lima CV, Paula RD, Resende FL et al (1997) Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 30 (pt 2):542-548
- Lindholm LH, Ibsen H, Borch-Johnsen K et al (2002) Risk of new-onset diabetes in the Losartan Intervention for Endpoint reduction in hypertension study. *J Hypertens* 20:1879-1886
- Lithell H, Hansson L, Skoog I et al for the SCOPE Study Group (2003) The Study on Cognition and Prognosis in the Elderly (SCOPE): principal results of a randomized double-blind intervention trial. *J Hypertens* 21:875-886
- Liu Y-H, Yang X-P, Sharov VG et al (1997) Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest* 99:1926-1935

- Lo M, Liu K-L, Lantelme P et al (1995 a) Subtype 2 of angiotensin II receptors control pressure-natriuresis in rats. *J Clin Invest* 95:1394-1397
- Lo M, Goldberg MR, McCrea JB et al (1995 b) Pharmacokinetics of Losartan, an angiotensin receptor antagonist and its active metabolite EXP 3174 in humans. *Clin Pharmacol Ther* 58:641-649
- Loufrani L, Henrion D, Chansel Q et al (1999) Functional evidence for an angiotensin IV receptor in rat resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 291:583-588
- Lucius R, Gallinat S, Rosenstiel P et al (1998) The angiotensin II type 2 (AT2) receptor promotes axonal regeneration in the optic nerve of adult rats. *J Exp Med* 188:661-670
- Maillard MP, Wurzner G, Nussberger J et al (2002) Comparative angiotensin II receptor blockade in healthy volunteers: The importance of dosing. *Clin Pharmacol Ther* 71:68-76
- Maillard M, Burnier M (2004) Clinical Pharmacology of Angiotensin II Receptor Antagonists. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol II, pp 453-484
- Mallion JM, Goldberg AI (1996) Global efficacy and tolerability of Losartan an angiotensin II subtype 1-receptor antagonist in the treatment of hypertension. *Blood Press* 5 (S 2):82-86
- Mancia G, Dell'Oro R, Quarti-Treviso F et al (2006) Angiotensin-sympathetic interactions in cardiovascular and metabolic disease. *J Hypertens* 24 (S 1):S51-S56
- Mann J, Julius S (1998) The Valsartan Antihypertensive Long-Term Use Evaluation (VALUE) trial of cardiovascular events in hypertension. Rationale and design. *Blood Press* 7:176-183
- Marrero M, Venema V, Ju H et al (1998) Regulation of angiotensin-induced JAK2 tyrosine Phosphorylation; roles of SHP-1 and SHP-2. *Am J Physiol* 275:C1216-C1223
- Masaki H, Kurihara P, Yamaki A et al (1998) Cardiac-specific overexpression of Angiotensin II AT2 receptor causes attenuated response to AT1-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest* 101:527-535
- Matos de Moura M, Santos RAS, Peliky Fontes MA (2005) Evidence for a functional cardiac interaction between losartan and angiotensin-(1-7) receptors revealed by orthostatic tilting test in rats. *Br J Pharmacol* 144:755-760
- Matsubara H (1998) Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal disease. *Circ Res* 83:1182-1191
- Matsusaka T, Nishimura H, Utsunomiya H et al (1996) Chimeric mice carrying "regional" targeted deletion of the angiotensin type 1A receptor gene: evidence against the role for local angiotensin in the in vivo feedback regulation of renin synthesis in juxtaglomerular cells. *J Clin Invest* 98:1867-1877
- Mazzolai L, Maillard M, Rossat J et al (1999) Angiotensin II receptor blockade in normotensive subjects: a direct comparison of three AT1 receptor antagonists. *Hypertension* 35:850-855
- Mazzolai L, Burnier M (2001) Angiotensin Receptor Antagonists: Safety and tolerability Profile. In: Epstein M, Brunner HR (eds). *Angiotensin II Receptor Antagonists*. Hanley & Belfus Phi., pp 339-350
- McClellan KJ, Markham A (1998 a) Telmisartan. *Drugs* 56:1039-1046
- McClellan KJ, Balfour JA (1998 b) Eprosartan. *Drugs* 55:713-718
- McKelvie RS, Yusuf S, Pericak D et al (1999) Comparison of candesartan, enalapril and their combination in congestive heart failure: randomized evaluation of strategies for left ventricular dysfunction (RESOLVD) pilot study. The RESOLVD Pilot Study Investigators. *Circulation* 100:1056-1064
- McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM et al (2003) The brain renin-angiotensin system: location and physiological role. *Int J Biochem Cell Biol* 35:901-918
- McInness GT (2005) Lowering blood pressure for cardiovascular risk reduction. *J Hypertens* 23 (Suppl 1):S3-S8
- McMurray JJV, Ostergren J, Swedberg K et al (2003 a) Effects of Candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left ventricular systolic function taking angiotensin-converting enzyme inhibitors: the CHARM-added trial. *Lancet* 362:767-771

- McMurray JJV, Ostergren J, Pfeffer M et al (2003 b) Clinical features and contemporary management of patients with low and preserved ejection heart failure: baseline characteristics of patients in the Candesartan in Heart failure-Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) programme. *Eur J Heart Fail* 5:261-270
- Meffert S, Stoll M, Steckelings UM et al (1996) The angiotensin AT<sub>2</sub> receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Mol Cell Endocrinol* 122:59-67
- Menard J, Azizi M (2004) Renin angiotensin System blockade: to what extent? *J Hypertens* 22:459-462
- Meredith PA (2000) ACE inhibition and AT<sub>1</sub> receptor blockers: efficacy and duration in hypertension. *Heart* 84 (S 1):139-141
- Messerli FH, Chiadika SM (2005) Stroke prevention: not all antihypertensive drugs are created equal. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 6 (S 1):S4-S11
- Metha JL, Li DY, Yang H et al (2002) Angiotensin II and IV stimulate expression and release of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human coronary artery endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 39:789-794
- Meszáros JG, Raphael R, Lio FM et al (2000) Protein kinase C contributes to desensitization of angiotensin II signaling in adult rat cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 279:C1978-C1985
- Meyer P, Papadimitriou A, Worcel M (1970) Possible existence of different types of angiotensin receptors. *Br J Pharmacol* 40:541P
- Miyazaki Y, Wada T, Shiota N et al (1999) Effects of an angiotensin II receptor antagonist, Candesartan cilexetil, on canine intima hyperplasia after balloon injury. *J Hypertens* 13 (S 1):S21-S25
- Miyazaki Y, Ichikawa I (2001) Role of the angiotensin receptor in the development of the mammalian kidney and urinary tract. *Comp Biochem Physiol A, Mol Integr Physiol* 128:89-97
- Miura S, Karnik SS (1999) Angiotensin II type 1 and type 2 receptors bind angiotensin through different types of epitope recognition. *J Hypertens* 17:397-404
- Miura S, Karnik SS (2000) Ligand-independent signals from angiotensin II type 2 receptor induce apoptosis. *EMBO J* 19:4026-4035
- Miura S, Karnik SS, Saku K (2005) Constitutively active homo-oligomeric angiotensin II type 2 receptor induces cell signaling independent of receptor conformation and ligand stimulation. *J Biol Chem* 280:18237-18244
- Moeller I, Lew RA, Mendelsohn FAO et al (1997) The globin fragment LVV-hemorphin-7 is an endogenous ligand for the AT<sub>4</sub> receptor in the brain. *J Neurochem* 68:2530-2537
- Moeller I, Clune EF, Fennessy PA et al (1999) Up regulation of AT<sub>4</sub> receptor levels in carotid arteries following balloon injury. *Regul Pept* 83:25-30
- Mogensen CE, Neldam S, Tikkanen I et al (2000) Randomized controlled trial of dual blockade of renin-angiotensin System in patients with hypertension, microalbuminuria and non-insulin dependent diabetes: the candesartan and lisinopril microalbuminuria (CALM) study. *BMJ* 321:1440-1444
- Monnot C, Weber V, Stinnakre J et al (1991) Cloning and functional characterization of a novel mas-related gene, modulating intracellular angiotensin II actions. *Mol Endocrinol* 5:1477-1487
- Moore AF, Heiderstadt NT, Huang E et al (2001) Selective inhibition of the renal angiotensin type 2 receptor increases blood pressure. *Hypertension* 37:1285-1291
- Moravski CJ, Kekky DJ, Cooper ME et al (2000) Retinal macrovascularization is prevented by blockade of the renin-angiotensin System. *Hypertension* 36:1099-1104
- Morgan T, Anderson A, Bertram D et al (2004) Effect of candesartan and lisinopril alone and in combination on blood pressure and microalbuminuria. *J Renin—Angiotensin-Aldosterone Syst* 5:64-71
- Morganti A (2006) Randomized clinical trials on surrogate endpoints: Are they useful for evaluating cardiovascular and renal disease protection in hypertension? The case for yes. *J Am Soc Nephrol* 17:S141-S144
- Moriuchi R, Shibata S, Himeno A et al (1998) Molecular cloning and pharmacological cha-

- racterization of an atypical gerbil angiotensin II type-1 receptor and its mRNA expression in brain and peripheral tissues. *Mol Brain Res* 60:234-246
- Moroi M, Fukarawa M, Ishikawa M et al (1997) Stimulation of angiotensin subtype 2 receptor reduces basal cGMP levels in the neointima of rat aorta after balloon injury. *Gen Pharmacol* 28:113-117
- Morris M, Means S, Oliverio MI et al (2001) Enhanced central response to dehydration in mice lacking angiotensin AT1A receptors. *Am J Physiol* 280:R1177-R1184
- Moulik S, Speth RC, Rowe BP (2000) Differential loss in function of angiotensin receptor subtypes during tissue storage. *Life Sci* 66:PL233-PL237
- Mukoyama M, Nakajima M, Horiuchi M et al (1993) Expression cloning of type 2 angiotensin receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J Biol Chem* 268:24539-24542
- Munzenmaier DH, Greene AS (1995) Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension* 27:760-765
- Munzenmaier DH, Greene AS (2006) Chronic angiotensin II AT1 receptor blockade increases cerebral cortical microvessels density. *Am J Physiol* 290:H512-H516
- Muratani H, Ferrario CM, Averill DB (1993) Ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats: role of angiotensin II. *Am J Physiol* 264:R388-R395
- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK et al (1991) Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351:233-236
- Mustafa T, Lee JH, Chay SY et al (2001) Bioactive angiotensin peptides: focus on Angiotensin IV. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 2:205-210
- Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR et al (1998) Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cell. *J Pharmacol Exp Ther* 284:388-398
- Nahmias C, Boden C (2004) Molecular Aspects of AT2 Receptor. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol 1, pp 375-397
- Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M et al (1995) The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad USA* 92:10663-10667
- Nakamura S, Averill DB, Chappell MC et al (2002) Contribution of angiotensin receptor subtypes to blood pressure regulation in salt depleted spontaneously hypertensive rats. *FASEB J* 1284:R164-R173
- Nakashima M, Uemats T, Kosuge K et al (1992) Pilot study of the uricosuric effect of DuP 753, a new angiotensin receptor antagonist, in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 42:333-335
- Nasjletti A (1998) The role of eicosanoids in angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension* 31 (pt 2):194-200
- Naveri L (1995) The role of angiotensin receptor subtypes in cerebrovascular regulation in the rat. *Acta Physiol Scand* 155 (S 630):1-48
- Nickenig G, Baumer AT, Temur Y et al (1999) Statin-sensitive dysregulated AT1 receptor function and density in hypercholesterolemic men. *Circulation* 100:2131-2134
- Nishimura H, Tsuji H, Masuda H et al (1997) Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor-1 and tissue factor mRNA expression without changing that of tissue plasminogen activator or tissue factor pathway inhibitor in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Haemost* 77:1189-1195
- Nishimura H, Yerkes E, Hohenfellner K et al (1999) Role of the angiotensin type 2 receptor gene in congenital anomalies of the kidney and urinary tract, CAKUT, of mice and men. *Mol Cell* 3:1-10
- Nishimura Y, Ito T, Saavedra JM (2006) Angiotensin II AT1 blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 31:2478-2486
- Nishimura H (2004) Phylogeny and Ontogeny of the Renin-Angiotensin System. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol 1, pp 31-70

- Noda K, Saad Y, Karnik SS (1995) Interaction of Phe<sup>8</sup> of angiotensin II with Lys<sup>199</sup> and His<sup>256</sup> of the AT<sub>1</sub> receptor in agonist activation. *J Biol Chem* 270:28511-28514
- Noda K, Feng YH, Liu Xp et al (1996) The active state of the AT<sub>1</sub> angiotensin receptor is generated by angiotensin II induction. *Biochemistry* 35:16435-16442
- Nora EH, Munzenmaier DH, Hansen-Smith FM et al (1998) Localization of the ANG II type 2 receptor in the microcirculation of skeletal muscle. *Am J Physiol* 275:H1395
- Nossaman BD, Feng CJ, Kaye AD et al (1995) Analysis of responses to Ang IV: Effects of PD123319 and DuP 753 in the pulmonary circulation of the rat. *Am J Physiol* 268:L303-L308
- Nouet S, Amzallag N, Li J-M et al (2004) Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel Angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem* 279:28989-28997
- Nouet S, Nahmias C (2000) Signal transduction from the angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor. *Trends Endocrinol Metab* 11:1-6
- Nuyt AM, Lenkei Z, Palkovits M et al (1999) Ontogeny of angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in fetal and neonatal rat brain. *J Comp Neurol* 407:193-206
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA et al (1999) Association of  $\beta$ -arrestin with G Protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem* 274:32248-32257
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA et al (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor- $\beta$ -arrestin complexes after receptor endocytosis. *J Biol Chem* 276:19452-19460
- Ohlstein EH, Gellai M, Brooks DP et al (1992) The antihypertensive effect of the angiotensin II receptor antagonist DuP 753 may not be due solely to angiotensin receptor antagonism. *J Pharmacol Exp Ther* 262:595-601
- Ohyama K, Yamano Y, Sano T et al (1995) Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type 1A. *Regul Pept* 57:141-147
- Ohyama K, Yamano Y, Sano T et al (2002) Role of the conserved DRY motif on G protein activation of rat angiotensin II receptor type 1A. *Biochem Biophys Res Commun* 292:362-367
- Ojima M, Inada Y, Shibouta Y et al (1997) Candesartan (CV 11974) dissociates slowly from the angiotensin AT<sub>1</sub> receptor. *Eur J Pharmacol* 319:137-146
- Ohkubo N, Matsubara H, Nozawa Y et al (1997) Angiotensin type 2 receptors are reexpressed by cardiac fibroblasts from failing myopathic hamster hearts and inhibit cell growth and fibrillar collagen metabolism. *Circulation* 96:3954-3962
- Olivares-Reyes JA, Smith RD, Hunyady L et al (2001) Agonist-induced signaling, desensitization and internalization of a phosphorylation-deficient AT<sub>1A</sub> angiotensin receptor. *J Biol Chem* 276:37761-37768
- Oliverio MI, Best CF, Kim H-S et al (1997) Angiotensin II responses in AT<sub>1A</sub> receptor-deficient mice: a role for AT<sub>1B</sub> receptors in blood pressure regulation. *Am J Physiol* 272:F515-F520
- Oliverio MI, Madsen K, Best CF et al (1998 a) Renal growth and development in mice lacking AT<sub>1A</sub> receptor for angiotensin II. *Am J Physiol* 274:F43-F50
- Oliverio MI, Kim H-S, Ito M et al (1998 b) Reduced growth, abnormal kidney structure and type 2 (AT<sub>2</sub>) angiotensin receptor-mediated blood pressure regulation in mice lacking both AT<sub>1A</sub> and AT<sub>1B</sub> receptors for angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15496-15501
- Oliverio MI, Coffman TM (2000) Angiotensin II receptor physiology using gene targeting. *News Physiol Sci* 15:171-175
- Oparil S, Williams D, Chrysant SG et al (2001) Comparative efficacy of olmesartan, losartan, valsartan and irbesartan in the control of essential hypertension. *J Clin Hypertens* 3:283-291
- Oppermann M, Freedman NJ, Alexander RW et al (1996 a) Phosphorylation of the type 1A angiotensin II receptor by G protein-coupled receptor kinases and protein kinase C. *J Biol Chem* 271:13266-13272

- Oppermann M, Diversé-Bierluissi H, Drazner MH et al (1996 b) Monoclonal antibodies reveal receptor specificity G-protein-coupled receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7649-7654
- Otsuka S, Sugano M, Makino N et al (1998) Interaction of mRNAs for angiotensin II type 1 and type 2 receptors to vascular remodelling in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 32:467-472
- Ozono R, Wang Z-Q, Moore AF et al (1997) Expression of the subtype-2 angiotensin receptor protein in rat kidney. *Hypertension* 30:1238-1246
- Padia SH, Howell NL, Siragy HM et al (2006) Renal angiotensin type 2 receptors mediate natriuresis via angiotensin III in the angiotensin II type 1 receptor—blocked rat. *Hypertension* 47 (Pt 2):537-544
- Papademetriou V, Mammillot P, Redman R et al (2001) Prevention of atherosclerosis by specific AT1-receptor blockade with Candesartan cilexetil. *J Renin—Angiotensin-Aldosterone Syst 2 (S 1)* :S77-S80
- Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW et al (2000) Overexpression of angiotensin II type 1 receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodelling. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:931-936
- Parving HH, Lehnert H, Brochner-Mortensen J et al (2001) The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 345:870-878
- Patel MK, Betteridge LJ, Hughes AD et al (1996) Effect of angiotensin II on the expression of the early growth response gene c-fos and DNA synthesis in human vascular smooth muscle cells. *J Hypertens* 14:341-347
- Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB et al (2003) Effect of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet* 362:759-766
- Pham LTY, Ledingham JM, Cross MA et al (1994) A comparison of the effects of valsartan and enalapril on blood pressure and LV mass in New Zealand GH-rats. (abstract). 28th Annu Sci Meet ASCEPT, December 1997
- Philipp T, Letzel H, Arens H-J (1997) Dose-finding study of candesartan cilexetil plus hydrochlorothiazide in patients with mild to moderate hypertension. *J Hum Hypertens* 11 (S2):S67-S68
- Philip MI, Schmidt-Otto KM (1999) The discovery of Renin 100 years ago. *News Physiol Sci* 14:271-274
- Pinheiro H, Moura D, Albino-Teixeira A et al (2002) A comparison of AT1 angiotensin antagonists on pre- and post-junctional angiotensin II receptor of the rat tail artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366:537-542
- Pitt B, Segal R, Martinez FA et al on behalf of ELITE Study Investigators (1997) Randomized trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of Losartan in the Elderly Study, ELITE). *Lancet* 349:747-752
- Pitt B, Poole-Wilson PA, Segal R et al (2000) Effect of losartan compared with captopril on mortality in patients with symptomatic heart failure: randomized trial - the Losartan Heart Failure Survival Study ELITE II. *Lancet* 355:1582-1587
- Pitt B (2002) Clinical trials with angiotensin receptor blockers in heart failure: what do we know and what will we can? *Am J Hypertens* 15:22S-27S
- Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M et al (1996) Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 79:748-756
- Porsti I, Bara AT, Busse R et al (1994) Release of nitric oxide by angiotensin-(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *Br J Pharmacol* 111:652-654
- Potts PD, Horiuchi J, Coleman MJ et al (2000) The cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) in the rostral and caudal ventrolateral medulla of the rabbit. *Brain Res* 877:58-64
- Prasad A, Tupas-Habib T, Schenke WH et al (2000) Acute and chronic angiotensin-1 recep-

- tor antagonism reverses endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 101:2349-2354
- Pratt RE (1999) Angiotensin II and the control of cardiovascular structure. *J Am Soc Nephrol* 10:S120-S128
- Pulakat L, Cooper S, Knowle D et al (2005) Ligand-dependent formation between the angiotensin II receptor subtype AT2 and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE6 in mammalian cells. *Peptides* 26:863-873
- Qadri F, Wolf A, Waldmann T et al (1998) Sensitivity of hypothalamic paraventricular nucleus to C- and N-terminal angiotensin fragments - vasopressin release and drinking. *J Neuroendocrinol* 10:275-281
- Quián H, Pipolo L, Thomas WG (2001) Association of  $\beta$ -arrestin 1 with the type 1A angiotensin II receptor involves phosphorylation of the receptor carboxyl terminus and correlates with receptor internalization. *Mol Endocrinol* 15:1706-1719
- Raiden S, Nahmod K, Nahmod V et al (2002) Non peptide antagonists of AT1 receptor for angiotensin II delay the onset of acute respiratory distress syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 303:45-51
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T et al (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97:1916-1923
- Ran J, Hirano T, Adachi M (2005) Angiotensin II infusion increases hepatic triglyceride production via its type 2 receptor in rats. *J Hypertens* 23:1525-1530
- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP (2002) Caveole: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54:431-467
- Reagan LP, Yee DK, He PF et al (1996) Heterogeneity of angiotensin type 2 (AT2) receptors. *Adv Exp Med Biol* 396:199-208
- Reid JL (2005) Molecular-specific effects of angiotensin II antagonists: clinical relevance for treating hypertension? *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 6:15-24
- Ren Y, Garvin JL, Carretero OA (2002) Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension* 39:799-802
- Reudelhuber TL (2006) A place in our hearts for the lowly angiotensin 1-7 peptide? *Hypertension* 47:811-815
- Reudelhuber TL (2005) The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond Angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:155-159
- Rice GI, Thomas DA, Grant PJ et al (2004) Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J* 383:45-51
- Robertson AL jr, Khairallah PA (1971) Angiotensin II: rapid localization in nuclei of smooth and cardiac muscle. *Science* 172:1138-1139
- Rowe BP, Saylor DL, Speth RC et al (1995) Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain. *Regul Pept* 56:139-146
- Ruddy MC, Kostis JB (2005) Angiotensin II Receptor Antagonists. In: Oparil S, Weber MA (eds) *Hypertension*. Elsevier Saunders Phi., pp 705-724
- Saavedra JM, Viswanathan M, Shigematsu K (1993) Localization of angiotensin AT1 receptors in the rat heart conduction system. *Eur J Pharmacol* 235:301-303
- Saavedra JM (1999) Emerging features of brain angiotensin receptors. *Regul Pept* 85:31-45
- Saavedra JM, Ando H, Armando I et al (2005) Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Regul Pept* 128:227-238
- Saavedra JM, Benicky J, Zhou J (2006) Angiotensin II: multitasking in the brain. *J Hypertens* 24 (S.I):S131-S137
- Sadoshima J (2002) Novel AT1 receptor-independent functions of losartan. *Circ Res* 90:754-756
- Sales VL, Sukhova GK, Lopez-Illasaca MA et al (2005) Angiotensin type 2 receptor is expressed in murine atherosclerotic lesions and modulates lesion evolution. *Circulation* 112:3328-3336

- Sano T, Ohyama K, Yamano Y et al (1997) A domain for 6 protein coupling in carboxyl-terminal tail of rat angiotensin II receptor type 1A. *J Biol Chem* 272:23631-23636
- Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Baracho NCV et al (1994) Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the action of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull* 35:293-298
- Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP (2000) Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept* 91:45-62
- Santos RAS, Simoes e Silva AC, Maric C et al (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8258-8263
- Sardinia MF, Hanesworth JM, Krebs LT et al (1993) AT4 receptor binding characteristics: D-aminoacid- and glycine substituted peptides. *Peptides* 14:949-954
- Sasaki K, Yamaho Y, Bardhan S et al (1991) Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin type 1 receptor. *Nature* 351:230-233
- Sasaki K, Murohara T (2002) Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 109:603-611
- Sayeski PP, Showkat Ali M, Semeniuk DJ et al (1998) Angiotensin II signal transduction pathways. *Regul Pept* 78:19-29
- Schachter M (2000) ACE inhibitors, angiotensin receptor antagonists and bradykinin. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 1:27-29
- Schambye HT, Hjorth SA, Bergsma DJ et al (1994) Differentiation between binding sites for angiotensin II and nonpeptide antagonists on the angiotensin II type 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7046-7050
- Scheuer DA, Perrone MH (1993) Angiotensin type 2 receptors mediate depressor phase of biphasic pressure response to angiotensin. *Am J Physiol* 264:R917-R923
- Schiffirin EL, Park JB, Jntengan HD et al (2000) Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin antagonist losartan. *Circulation* 101:1653-1659
- Schiffirin EL, Hayoz D (2001) Role of AT1 Angiotensin Receptors in vascular Remodelling in Hypertension. In: Epstein M, Brunner HR (eds) *Angiotensin II Receptor Antagonists*. Hanley & Belfus Phi., pp 279-294
- Schiffirin EL (2002) Vascular and cardiac benefits of angiotensin receptor blockers. *Am J Med* 113:409-418
- Schiffirin EL, Touyz RM (2004) From bedside to bench to bedside: role of renin-angiotensin-aldosterone System in remodelling of resistance arteries in hypertension. *Am J Physiol* 287:H435-H446
- Schmaier AH (2003) The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multi-layered interaction. *Am J Physiol* 285:R1-R13
- Schmid C, Castrop H, Reitbauer J et al (1997) Dietary salt intake modulates angiotensin II type 1 receptor gene expression. *Hypertension* 29:923-929
- Schmid SL, McNiven MA, De Camilli P (1998) Dynamin and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol* 10:504-512
- Schneider MD, Lorell BH (2001) AT2, Judgment day. Which angiotensin receptor is the culprit in cardiac hypertrophy? *Circulation* 97:1952-1959
- Schnermann JB, Traynor T, Yang T et al (1997) Absence of tubuloglomerular feedback responses in AT1A receptor-deficient mice. *Am J Physiol* 273:F315-F320
- Schoenberger JA (1995) Losartan with hydrochlorothiazide in the treatment of hypertension. *J Hypertens* 13 (S.I):S43-S47
- Schrader J, Luders S, Kulschewski A et al (2003) The ACCESS study: evaluation of Acute candesartan cilexetil therapy in stroke survivors. *Stroke* 34:1699-1703
- Schrader J, Luders S, Kulschewski A et al (2005) Morbidity and mortality after Stroke, Eprosartan compared with Nitrendipine for Secondary Prevention: principal results of a prospective randomized controlled study (MOSES). *Stroke* 36:1218-1226
- Schuijijt MP, Ishida T, Ishida M et al (1999) No vasoactive role of the angiotensin II type 2 receptor in normotensive Wistar rats. *J Hypertens* 17:1879-1884



- Schulz R, Heusch G (2006) Angiotensin II type 1 receptors in cerebral ischemia-reperfusion: initiation of inflammation. *J Hypertens* 24 (S.1):S123-S129
- Schupp M, Janke J, Clasen R et al (2004) Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity. *Circulation* 109:2054-2057
- Schupp M, Lee LD, Frost N et al (2006) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activity by Losartan metabolites. *Hypertension* 47 (p 2):586-589
- Seachrist J, Laporte SA, Dale LB et al (2002) Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion. *J Biol Chem* 277:679-685
- Sealey JE, Laragh JH (1995) The Renin-Angiotensin-Aldosterone System for normal Regulation of Blood Pressure and Sodium and Potassium Homeostasis. In: Laragh JH, Brenner BM (eds) hypertension. Pathophysiology, Diagnosis and Management. Raven Press New York, vol II, pp 1763-1796
- Sechi LA, Griffin CA, Grady EF et al (1992) Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. *Circ Res* 71:1482-1489
- Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E jr et al (2000) Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest* 106:R25-R29
- Servant G, Dudley DT, Escher E et al (1996) Analysis of the role of N-glycosylation in cell surface expression and binding properties of angiotensin II type-2 of rat pheochromocytoma cells. *Biochem J* 313:297-304
- Servant G, Laporte S, Leduc R et al (1997) Identification of angiotensin II-binding domains in the rat AT2 receptor with photolabile angiotensin analogs. *J Biol Chem* 272:8653-8659
- Seshiah PN, Weber DS, Rocic P et al (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity. Upstream mediators. *Circ Res* 91:406-413
- Sever P (2002) The SCOPE trial. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 3:61-62
- Shanmugam S, Llorens-Cortes C, Clauser E et al (1995) Expression of angiotensin II AT2 receptor mRNA during development of rat kidney and adrenal gland. *Am J Physiol* 268:F922-F930
- Sibley DR, Lefkowitz RJ (1985) Molecular mechanisms of receptor desensitization using the B-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase System as a model. *Nature* 317:124-129
- Sica DA (2002) The practical aspects of combination therapy with angiotensin receptor blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 3:66-71
- Sierra C, de la Sierra A (2005) Antihypertensive, cardiovascular and pleiotropic effects of angiotensin-receptor blockers. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14:435-441
- Silva LCS, Fontes MAP, Campagnole-Santos MJ et al (1993) Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensin-(1-7) in vasopressor and vasodepressor sites of the ventrolateral medulla. *Brain Res* 613:321-325
- Silvestre JS, Tamarat R et al (2002) Antiangiogenic effect of angiotensin II type 2 receptor in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res* 90:1072-1079
- Siragy HM, Carey RM (1996 a) The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine in conscious rats. *J Clin Invest* 97:1978-1982
- Siragy HM, Jaffa AA, Margolius HS et al (1996 b) Renin-angiotensin System modulates renal bradykinin production. *Am J Physiol* 271:R1090-R1095
- Siragy HM, Carey RM (1997) The subtype 2 (AT2) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest* 100:264-269
- Siragy HM, Inagami T, Ichiki T et al (1999 a) Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype -2 (AT2) angiotensin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6506-6510
- Siragy HM, Senbonmatsu T, Ichiki T et al (1999 b) Increased renal vasodilator prostanoids prevent hypertension in mice lacking the angiotensin subtype 2 receptor. *J Clin Invest* 104:181-188
- Siragy HM, Carey RM (1999 c) Protective role of angiotensin AT2 receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension* 33:1237-1242

- Siragy HM, de Gasparo M, Carey RM (2000) Angiotensin type 2 receptor mediates valsartan-induced hypotension in conscious rats. *Hypertension* 35:1074-1077
- Siragy HM, Xue C, Abadir P et al (2005) Angiotensin subtype-2 receptors inhibit renin biosynthesis and angiotensin II formation. *Hypertension* 45:133-137
- Skeggs LT, Lentz KE, Kahn JR (1956) The aminoacid sequence of hypertensin II. *J exp Med* 104:193-197
- Smith RD (1996) Atypical (Non-AT1, Non-AT2) angiotensin receptors. In: Raizada MK, Phillips MI, Summers C (eds) *Recent Advances in Cellular and Molecular Aspects of Angiotensin Receptors*. Plenum Press New York, pp 237-245
- Smith RD, Hunyady L, Olivares-Reyes JA et al (1998) Agonist-induced phosphorylation of the angiotensin AT1A receptor is localized to a Serine/threonine-rich region of its cytoplasmic tail. *Mol Pharmacol* 54:935-941
- Song K, Zhuo J, MendeIsohn FAO (1991) Access of peripherally administered DuP 753 to rat brain angiotensin II receptors. *Br J Pharmacol* 104:771-772
- Stec DE, Sigmund CD (2001) Physiological insights from genetic manipulation of the renin-angiotensin System. *News Physiol Sci* 16:80-84
- Steckelings UM, Kaschina E, Unger T (2005) The AT2 receptor - A matter of love and hate. *Peptides* 26:1401-1409
- Stegbauer J, Vonend O, Habel S et al (2005) Aurigiotensin II modulates renal sympathetic neurotransmission through nitric oxide in AT2 receptor knockout mice. *J Hypertens* 23:1691-1698
- Stier CT jr, Adler LA, Levine S et al (1993) Stroke prevention by losartan in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 11 (S.3):S37-S42
- Stoll M, Steckelings UM, Bottari PM et al (1995) The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J Clin Invest* 95:651-657
- Stoll M, Unger T (2001) Angiotensin and its AT2 receptor: new insights into an old System. *Regul Pept* 99:175-182
- Strawn WB, Ferrario CM, Tallant EA (1999) Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. *Hypertension* 33:207-211
- Strawn WB, Chappell MC, Dean RH et al (2000 a) Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. *Circulation* 101:1585-1593
- Strawn WB, Dean RH, Ferrario CM (2000 b) Novel mechanisms linking angiotensin II and early atherogenesis. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 1:11-17
- Strehlow K, Nickenig G, Roeling J et al (1999) AT1 receptor regulation in salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol* 277:H1701-1707
- Stroth U, Meffert S, Gallinat S et al (1998) Angiotensin II and NGF differentially influence microtubule proteins in PC12W cells: role of the AT2 receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 53:187-195
- Sugaya T, Nishimatsu S, Tanimoto K et al (1995) Angiotensin II type 1A receptor-deficient mice with hypotension and hyperreninemia. *J Biol Chem* 270:18719-18722
- Sugino H, Ozono R, Kurisu S et al (2001) Apoptosis is not increased in myocardium overexpressing type 2 angiotensin receptors in transgenic mice. *Hypertension* 37:1394-1398
- Suzuki J, Iwai M, Nakagami H et al (2002) Role of angiotensin II-regulated apoptosis through distinct AT1 and AT2 receptors in neointima formation. *Circulation* 106:847-853
- Suzuki J, Kanazawa T, Iwai M et al (2004) Angiotensin II AT2 Receptors and Cardiac Function. In: De Mello WC (ed) *Renin Angiotensin System and the Heart*. J Wiley & Sons, Chichester, pp 85-99
- Swedberg K, Pfeffer M, Granger C et al (1999) For the Charm-programme investigators. Can-desartan in heart failure- assessment of Reduction in Mortality (CHARM): rationale and design. *J Cardiac Failure* 5:276-282
- Tallant EA, Lu X, Weiss RB et al (1997) Bovine aortic endothelial cells contain an angiotensin-(1-7) receptor. *Hypertension* 29:388-393
- Tallant EA, Clark MA (2003) Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension* 42:574-579

- Tang H, Guo DF, Porter JP et al (1998) Role of cytoplasmic tail of the type 1A angiotensin II receptor in agonist and phorbol ester-induced desensitization. *Circ Res* 82:523-531
- Tea B-S, Der Sarkissian S, Touyz RM et al (2000) Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats in vivo. *Hypertension* 35:1069-1073
- Tedesco MA, Ratti G, Mennella S et al (1999) Comparison of losartan and hydrochlorothiazide on cognitive function and quality of life. *Am J Hypertens* 12:1130-1134
- Tenero D, Martin D, Ilson B et al (1998) Pharmacokinetics of intravenously and orally administered eprosartan in healthy males: absolute bioavailability and effect of food. *Biopharm Drug Dispos* 19:351-356
- Thomas WG, Thekkumkara TJ, Motel TJ et al (1995 a) Stable expression of a truncated AT1A receptor in CHO.K1 cells. *J Biol Chem* 270:207-213
- Thomas WG, Baker KM, Motel TJ et al (1995 b) Angiotensin II receptor endocytosis involves two distinct regions of the cytoplasmic tail. A role for residues on the hydrophobic phase of a putative amphipathic helix. *J Biol Chem* 270:22153-22159
- Thomas WG, Thekkumkara TJ, Baker KM (1996) Molecular mechanisms of angiotensin II (AT1A) receptor endocytosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23 (S.3):S74-S80
- Thomas WG, Motel TJ, Kule CE et al (1998) Phosphorylation of the angiotensin II (AT1A) receptor carboxyl terminus: A role in receptor endocytosis. *Mol Endocrinol* 12:1513-1524
- Thomas WG (1999) Regulation of angiotensin II type 1 (AT1) receptor function. *Regul Pept* 79:9-23
- Thomas WG (2000) Control of Angiotensin Action through Receptor Regulation. In: Husain A, Graham RM (eds) *Drugs, Enzymes and Receptors of the Renin-Angiotensin System*. Harwood Acad Publs, Amsterdam, pp 137-152
- Thomas WG (2005) Double trouble for type 1 angiotensin II receptors in atherosclerosis. *N Engl J Med* 352:506-508
- Thone-Reineke C, Steckelings U, Unger T (2006) Angiotensin receptor blockers and cerebral protection in stroke. *J Hypertens* 24 (S.I):S115-S121
- Tigerstedt R, Bergman PG (1898) Niere und kreislauf. *Scand Arch Physiol* 8:223-271
- Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT et al (1993) Angiotensin II receptors and Angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev* 45:205-251
- Timmermans PBMWM, Wong PC, Chiu AT et al (1995) The preclinical basis of the therapeutic evolution of losartan. *J Hypertens* 13 (S.I):SI-SI 3
- Timmermans PBMWM, Smith R (1996) The diversified pharmacology of angiotensin -receptor blockade. *Blood Press* 5 (S.2):53-61
- Timmermans PBMWM (2001) Development of Nonpeptidic angiotensin II Receptor Antagonists. In: Epstein M, Brunner HR (eds) *Angiotensin II Receptor Antagonists*. Hanley & Belfus Phi., pp 89-103
- Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R et al (2000) A human homolog of angiotensin-converting enzyme. *J Biol Chem* 275:33238-33243
- Toda N, Ayaziki K, Okamura T (1990) Modification by endogenous prostaglandins of angiotensin II-induced contraction in dogs and monkeys cerebral and mesenteric arteries. *J Pharmacol Expt Ther* 252:374-379
- Toney GM, Porter JP (1993) Functional roles of brain AT1 and AT2 receptors in the central angiotensin II pressor response in conscious young spontaneously hypertensive rats. *Brain Res Dev Brain Res* 71:193-199
- Touyz RM, He G, Deng LY et al (1999 a) Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation* 99:392-399
- Touyz RM, Endemann D, He G et al (1999 b) Role of AT2 receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR. *Hypertension* 33:366-372
- Touyz RM, Schiffrin EL (2000) Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 52:1639-672

- Trenkwalder P (2006) The Study on Cognition and prognosis in the Elderly (SCOPE) - recent analyses. *J Hypertens* 24 (S.I):S107-S114
- Tronvik E, Stovner LJ, Schrader H et al (2006) Involvement of the renin-angiotensin System in migraine. *J Hypertens* 24 (S.I):S139-S143
- Tsuchida S, Matsusaka T, Chen X et al (1998) Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. *J Clin Invest* 101:755-760
- Tsutsumi K, Saavedra JM (1992) Heterogeneity of angiotensin AT2 receptors in the rat brain. *Mol Pharmacol* 41:290-297
- Tsutsumi Y, Matsubara H, Ohkubo N et al (1998) Angiotensin II type 2 receptor is upregulated in human heart with interstitial fibrosis and cardiac fibroblasts are the major cell type for its expression. *Circ Res* 83:1035-1046
- Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H et al (1999) Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilatation. *J Clin Invest* 104:925-935
- Tsuzuki S, Matoba T, Eguchi S et al (1996) Angiotensin II type-2 receptor inhibits cell proliferation and activates tyrosine phosphatase. *Hypertension* 28:916-918
- Turnbull F (2003) Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. Effects of different blood pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet* 362:1527-1535
- Unger T (1999) The angiotensin type 2 receptor: variations on an enigmatic theme. *J Hypertens* 17:1775-1786
- Unger T (2002) The role of the renin-angiotensin System in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 89 (2A):3A-10
- Urata H, Nishimura H, Ganten D (1996) Chymase-dependent angiotensin II forming System in humans. *Am J Hypertens* 9:277-284
- Ushio-Fukai M, Griendling KK, Akers M et al (1998) Temporal dispersion of activation of phospholipase C- $\beta$ 1 and  $\gamma$  isoforms by angiotensin II in vascular smooth muscle cells: Role of  $\alpha$ q/11,  $\alpha$ 2 and  $\beta$ γ G protein units. *J Biol Chem* 273:19772-19777
- Vallon V, Heyne N, Richter K et al (1998) 7-D-ALA -angiotensin-1-7 blocks renal actions of angiotensin-1-7 in the anesthetized rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 32:164-167
- Vanderheyden PML, Fierens FLP, De Backer Jp et al (1999) Distinction between surmountable and insurmountable selective AT1 receptor antagonists by use of CHO-K1 cells expressing human angiotensin II AT1 receptors. *Br J Pharmacol* 126:1057-1065
- Vanderheyden PML, Fierens FLP, Vauquelin G (2000 a) Angiotensin II type 2 receptor antagonists. Why do some of them produce insurmountable inhibition? *Biochem Pharmacol* 60:1557-1563
- Vanderheyden PML, Fierens FLP, Backer JP et al (2000 b) Reversible and syntopic interaction between angiotensin receptor antagonists on Chinese hamster ovary cells expressing human angiotensin II type 1 receptors. *Biochem Pharmacol* 59:927-935
- Van Lier JJ, Van Heiningen PNM, Sunzen M (1997) Absorption, metabolism and excretion of C-Candesartan and C-candesartan cilexetil in healthy volunteers. *J Hum Hypertens* 11(S.2):S27-S28
- Vauquelin G, Fierens F, Vanderheyden P (2001) Distinction between Surmountable and Insurmountable Angiotensin II Receptor Antagonists. In: Epstein M, Brunner HR (eds) *Angiotensin II Receptor Antagonists*. Hanley & Belfus Phi., pp 105-118
- Vauquelin G, Michotte Y, Smolders I et al (2002) Cellular targets for angiotensin II fragments: pharmacological and molecular evidence. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 3:195-204
- Vauquelin G, Vanderheyden P (2004) AT1 Receptor interactions. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol I, pp 297-315
- Verdecchia P, Porcellati C, Reboldi G et al (2001) Left ventricular hypertrophy as an independent predictor of acute cerebrovascular events in essential hypertension. *Circulation* 104:2039-2044

- Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS et al (2002) AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science* 296:2401-2403
- Vibert G, Wheelton NM (2002) Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 106:672-678
- Vickers C, Hales P, Kaushik V et al (2002) Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* 277:14838-14843
- Viswanathan M, Tsutsumi K, Correa FM et al (1991) Changes in expression of angiotensin receptor subtypes in the rat aorta during development. *Biochem Biophys Res Commun* 179:1361-1367
- Viswanathan M, Selby DM, Ray PE (2000) Expression of renal and vascular angiotensin II receptor subtypes in children. *Pediatr Nephrol* 14:1030-1036
- Volpe M, Musumeci B, De Paolis P et al (2003) Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? *J Hypertens* 21:1429-1443
- Volpe M, Tocci G, Pagannone E (2006) Fewer mega-trials and more clinically oriented studies in hypertension research? The case of blocking the renin-angiotensin-aldosterone System. *J Am Soc Nephrol* 17:S36-S43
- Von Bohlen und Halbach O, Albrecht D (1998) Mapping of angiotensin AT1 receptors in the rat limbic system. *Regul Pept* 78:51-56
- Von Bohlen und Halbach O (2003) Angiotensin IV in the central nervous System. *Cell Tissue Res* 311:1-9
- Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE (2005) Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension* 45:960-966
- Walther T, Simoes e Silva A, Maric C et al (2002) Cardiovascular active angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Circulation* 106:SII-S49
- Walther T, Menrad A, Orzechowski H-D et al (2003) Differential regulation of in vivo angiogenesis by angiotensin II receptors. *FASEB J* 17:2061-2067
- Wang C, Jayadev S, Escobedo JA (1995) Identification of a domain of the angiotensin II type 1 receptor determining Gq coupling by the use of receptor chimeras. *J Biol Chem* 270:16677-16682
- Wang ZQ, Moore AF, Ozono R et al (1998) Immunolocalization of subtype 2 angiotensin II (AT2) receptor protein in rat heart. *Hypertension* 32:78-83
- Wang JM, Tan J, Leenen FHH (2003 a) Central nervous system blockade by peripherally administration of AT1 receptor blockers. *J Cardiovasc Pharmacol* 41:593-599
- Wang C-H, Li S-H, Weisel RD et al (2003) C-Reactive Protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation* 107:1783-1790
- Wang HW, Gallinat S, Li H-W et al (2004) Elevated blood pressure in normotensive rats produced by "knockdown" of the angiotensin type 2 receptor. *Exp Physiol* 89:313-322
- Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E et al (1999) Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for the involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99:2027-2033
- Wassmann S, Nickenig G (2004) AT1 Receptor Regulation. In: Unger T, Scholkens BA (eds) *Angiotensin*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol 1, pp 317-333
- Wassmann S, Nickenig G (2006) Pathophysiological regulation of the AT1-receptor and implications for vascular disease. *J Hypertens* 24 (S1):S15-S21
- Watanabe T, Suzuki J, Yamawaki H et al (2005) Losartan metabolite EXP3179 activates Akt and endothelial nitric oxide synthase via vascular endothelial growth factor receptor-2 in endothelial cells. Angiotensin II type 1 receptor-independent effects of EXP3179. *Circulation* 112:1798-1805
- Wachtele K, Lehto M, Gerdtts E et al (2005) Angiotensin II receptor blockade reduces new-onset atrial fibrillation and subsequent stroke compared to atenolol: the Losartan Intervention for End Point Reduction in Hypertension (LIFE) study. *J Am Coll Cardiol* 45:712-719
- Weber DS, Lombard JH (2001) Angiotensin II AT1 receptors preserve vasodilator reactivity in skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol* 280:H2196-H2202

- Weber MA (2003) Angiotensin II blockers and cardiovascular outcomes: what does the future hold? *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 4:62-73
- Weinberg MS, Weinberg AJ, Zappe DH (2000) Effectively targetting the renin-angiotensin-aldosterone system in cardiovascular and renal disease: rationale for using angiotensin II receptor blockers in combination with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst* 1:217-233
- Werner N, Nickenig G (2003) AT1 receptors in atherosclerosis: biological effects including growth, angiogenesis and apoptosis. *Eur Heart J* 5 (S.A):A9-A13
- Wharton J, Morgan K, Rutherford RAD et al (1998) Differential distribution of angiotensin AT2 receptors in the normal and failing human heart. *J Pharmacol Exp Ther* 284:323-336
- Whitebread SE, Mele M, Kamber B et al (1989) Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun* 165:196-203
- Widdop RE, Gardiner SM, Kemp PA et al (1992) Inhibition of the hemodynamic effects of angiotensin II in conscious rats by AT2 receptor antagonists given after the AT1 receptor antagonist EWP3074. *Br J Pharmacol* 107:873-880
- Widdop RE, Gardiner SM, Kemp PA et al (1993) Central administration of PD13319 or EXP3174 inhibits effect of angiotensin II. *Am J Physiol* 264:H117-H125
- Widdop RE, Sampey DB, Jarrott B (1999) Cardiovascular effects of angiotensin-(1-7) in conscious spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 34:964-968
- Widdop RE, Matrougui K, Levy BL et al (2002) AT2 receptor-mediated relaxation is preserved after long-term AT1 receptor blockade. *Hypertension* 40:516-520
- Widdop RE, Jones ES, Hannan RE et al (2003) Angiotensin AT2 receptors: cardiovascular hope or hype? *Br J Pharmacol* 140:809-824
- Wienen W, Entzeroth M, Van Meel JCA et al (2000) A review on telmisartan: a novel, long-acting angiotensin II receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev* 18:127-156
- Williams B (2004) VALUE and supremacy of blood pressure control for cardiovascular protection. *J Hypertens* 22:1435-1437
- Wong PC, Price WA, Chiu AT et al (1990 a) Non peptide angiotensin receptor antagonists. IX. Antihypertensive activity in rats of DuP753, an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 252:726-732
- Wong PC, Price WA, Chiu AT et al (1990 b) Hypotensive action of DuP753, an angiotensin II antagonist, in spontaneously hypertensive rats. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: X. *Hypertension* 15:459-468
- Wong PC, Price WA, Chiu AT et al (1990 c) Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. XI. Pharmacology of EXP3174, an active metabolite of DuP753 - an orally active antihypertensive agent. *J Pharmacol Exp Ther* 255:726-732
- Wong PC, Timmermans PBMWM (1991) Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists: insurmountable angiotensin II antagonism of EXP3892 is reversed by the surmountable antagonist DupP753. *J Pharmacol Exp Ther* 258:49-57
- Wong PC, Hajj-ali AF (1994) Functional Correlates of Angiotensin Receptor Stimulation. In: Timmermans PBMWM, Wexler RR (eds) *Medicinal Chemistry of the Renin -Angiotensin System*. Elsevier Amsterdam, pp 313-346
- Wong SK, Li W, Moore MJ et al (2004) A 193-aminoacid fragment of the SARS coronavirus S protein efficiently binds angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem* 279:3197-3201
- Wright JW, Krebs LT, Stobb JW et al (1995) The angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinol* 16:23-52
- Wright JW, Stubbley L, Pederson ES et al (1999) Contribution of the brain angiotensin IV-AT4 receptor subtype System to spatial learning. *J Neurosci* 19:3952-3961
- Wruck C, Stoll M, Unger T (2004) AT2 Functions and Target Genes. In: Unger T, Scholkens BA (eds): *Angiotensin*. Springer-Verlag Heidelberg, Newyork, vol. I, pp 449-475
- Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T et al (2005) Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:57-64

- Wu L, Iwai M, Nakagami H et al (2001) Role of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. *Circulation* 104:2716-2721
- Xiao C Li, Widdop RS (2004) AT2 receptor-mediated vasodilatation is unmasked by AT1 receptor blockade in conscious SHR. *Br J Pharmacol* 142:821-830
- Xiong H, Marshall KC (1994) Angiotensin II depresses glutamate depolarization and excitatory postsynaptic potentials in locus coeruleus through angiotensin II subtype 2 receptors. *Neuroscience* 62:163-175
- Xoriuchi M, Hamai M, Cui TX et al (1999) Cross talk between angiotensin II type 1 and type 2 receptors; cellular mechanisms of angiotensin type 2 receptor-mediated cell growth inhibition. *Hypertens Res Clin Exp* 22:67-74
- Xu Y, Kumar D, Dick JRB et al (2002) AT1 and AT2 receptor expression and blockade after acute ischemia-reperfusion in isolated working rat hearts. *Am J Physiol* 282:H1206-H1215
- Yagil Y, Yagil C (2003) Hypothesis: ACE2 modulated blood pressure in the mammalian organism. *Hypertension* 41:871-873
- Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ (1996) Angiotensin type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:156-160
- Yamano Y, Ohyama K, Kikyo M et al (1995) Mutagenesis and the molecular modeling of the rat angiotensin II receptor (AT1). *J Biol Chem* 270:14024-14030
- Yan X, Price RL, Nakayama L et al (2003) Vascular specific expression of angiotensin II type 2 receptors causes dilated cardiomyopathy and heart failure in transgenic rats. *Am J Physiol* 285:H2179-H2187
- Yang Z, Bove CM, French BA et al (2002) Angiotensin II type 2 receptor expression preserves left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation* 106:106-111
- Yee D, Heering J, Krichavsky M et al (1998) Role of the aminoterminal in ligand binding domains of the rat AT2 receptor with photolabile angiotensin analogs. *Brain Res Mol Brain Res* 57:325-329
- Yoshida H, Kakuchi J, Guo D et al (1992) Analysis of the evolution of angiotensin II type 1 receptor gene in mammals (mouse, rat, bovine and human). *Biophys Res Commun* 186:1042-1049
- Yoshida M, Naito Y, Urano T et al (2002) L158-809 and (D-Ala (7)-angiotensin I/II (1-7) decrease PAI-1 release from human umbilical vein endothelial cells. *Res* 105:531-536
- You D, Loufrani L, Baron C et al (2005) High blood pressure reduction reverses angiotensin II type 2 receptor-mediated vasoconstriction into vasodilation in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 111:1006-1011
- Yu SP, Yeh CH, Sensi SL et al (1997) Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278:114-117
- Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K et al (2003) Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-preserved trial. *Lancet* 362:777-781
- Zanchetti A (2001) Morbidity and Mortality Trials with Angiotensin Receptor Antagonists in Hypertensive Patients. In: Epstein M, Brunner HR (eds) *Angiotensin II Receptor Antagonists*. Hanley & Belfus Phil., pp 351-360
- Zhang J, Pratt RE (1996) The AT2 receptor selectively associates with G $\alpha$ 2 G $\alpha$ 3 in the rat fetus. *J Biol Chem* 271:15026-15033
- Zhang JH, Hanesworth JM, Sardinia M et al (1999 a) Structural analysis of angiotensin IV receptor (AT4) from selected bovine tissues. *J Pharmacol Exp Ther* 289:1075-1083
- Zhang J, Barak LS, Anborgh PH et al (1999b) Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/ $\beta$ -arrestin endocytic complexes. *J Biol Chem* 274:10999-11006
- Zhang M, Zhao X, Chen HC et al (2000) Activation of the AT1 angiotensin receptor is dependent on adjacent apolar residues in the carboxyl terminus of the third cytoplasmic loop. *J Biol Chem* 275:15782-15788
- Zhu M, Gelband CH, Moore JM et al (1998) Angiotensin II type 2 receptor stimulation of

- neuronal delayed-rectifier potassium current involves phospholipase A2 and arachidonic acid. *J Neurosci* 18:679-686
- Zhuo J, Alcorn D, Harris PJ et al (1997) Angiotensin II receptor subtypes in the kidney: Distribution and functions. *Nephrology* 1:511-525
- Zhuo J, Moeller I, Jenkins T et al (1998) Mapping angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. *J Hypertens* 16:2027-2037
- Zisman LS, Keller RS, Weaver B et al (2003) Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles. Evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme homologue ACE2. *Circulation* 108:1707-1712
- Zisman LS (2004) ACE2: Its Role in the Counter-regulatory Response to Heart Failure. In: De Mello WC (ed) *Renin Angiotensin System and the Heart*. J. Wiley & Sons, Chichester UK, pp 119-135



## Sigle a singola lettera ed a tre lettere per gli aminoacidi

Aminoacido	Una lettera	Tre lettere
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Acido aspartico	D	Asp
Cisteina	C	Cys
Glutamina	Q	Gln
Acido glutamico	E	Glu
Glicina	G	Gly
Istidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Trp/Try
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val
Non specificato o non noto	X	Xaa

# Indice analitico

- ACCESS 145  
ACE2 e antagonisti AT1 (AT1RA) 124-125  
ACE2 e recettori AT2 67 segg.  
ACE2 e SARS 69  
Ang- (1-7) e recettori AT2 69, 125  
Ang 1-9 67  
Antagonisti competitivi e non competitivi 112  
Antagonisti sormontabili ed insormontabili 112  
Associazione AT1RA/ACEI 138  
AT1P 76  
ATRAP 37
- Beta arrestine 34 segg.
- CAKUT 72  
CALM 145  
Caveole 36-37  
CHARM 141
- Dimerizzazione 86  
Dinamina 35  
DIRECT 122
- ELITE 1 e 2 140 segg.  
EXP 3179 119
- “Flessibilità” dei recettori del SRA 101
- IDNT 143
- IRAP 5  
IRMA2 143
- LIFE 132 segg.
- “Magic tait” 14  
MARVAL 143  
Mas Oncogene e recettori AT1 88  
Mas Oncogene e recettore Ang- (1-7) 7  
MOSES 146
- ONTARGET 139  
OPTIMAAL 142
- PPAR- $\gamma$  119  
Proteina ATBP 50 58
- Rab 5a 36  
Rab 7 36  
Recettore AT1 e apoptosi 85  
Recettore AT2 e cascata vasodilatatrice 65  
Recettori AT2 e inibizione ACE 66  
RENAAL 143  
ROS 49
- SCOPE 135
- VAL-HEFT 141  
VALIANT 142  
VALUE 136

Finito di stampare nel mese di marzo 2007