

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).

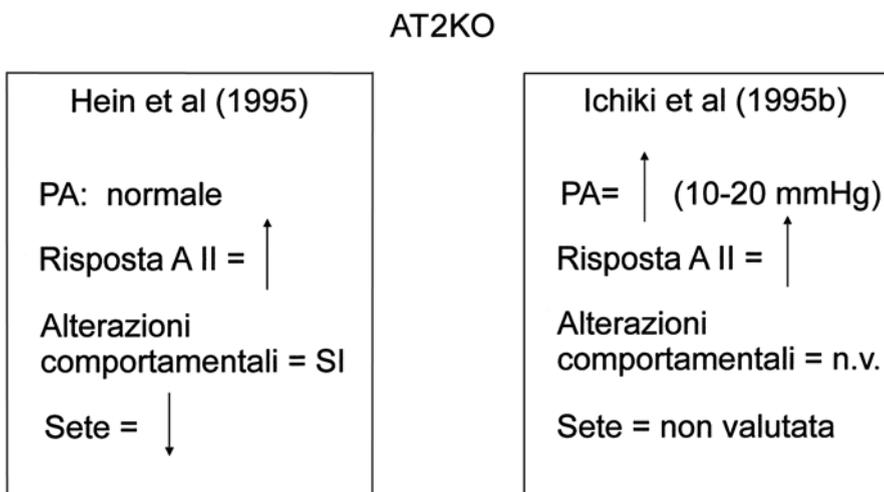


Fig. 17. Il comportamento della PA e della risposta all'angiotensina II nei topi AT2KO



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 Na^+/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 µg/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 µg/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-

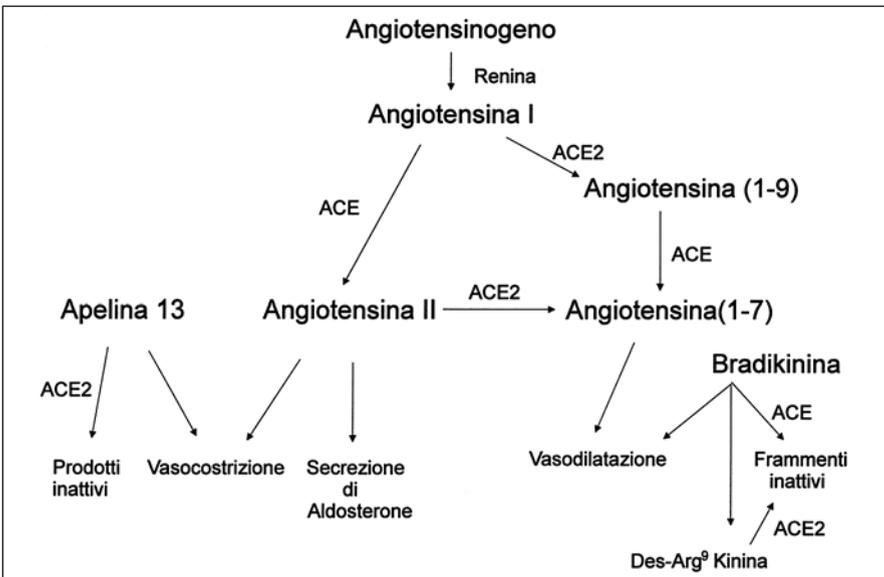


Fig. 19. Gli effetti dell'ACE e dell'ACE2 sulla sintesi dei peptidi del SRA (Da: Danilczyk e coll. 2003, con autorizzazione)

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-

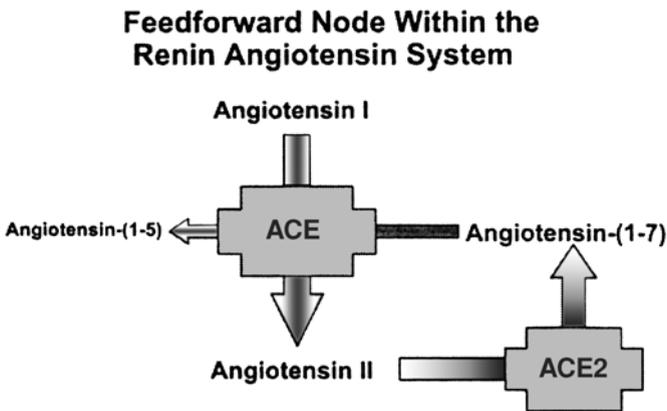


Fig. 20. Il meccanismo di feedforward per la sintesi dell'Ang-(1-7) (Da: Ferrario e coll. 2005b)

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 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-

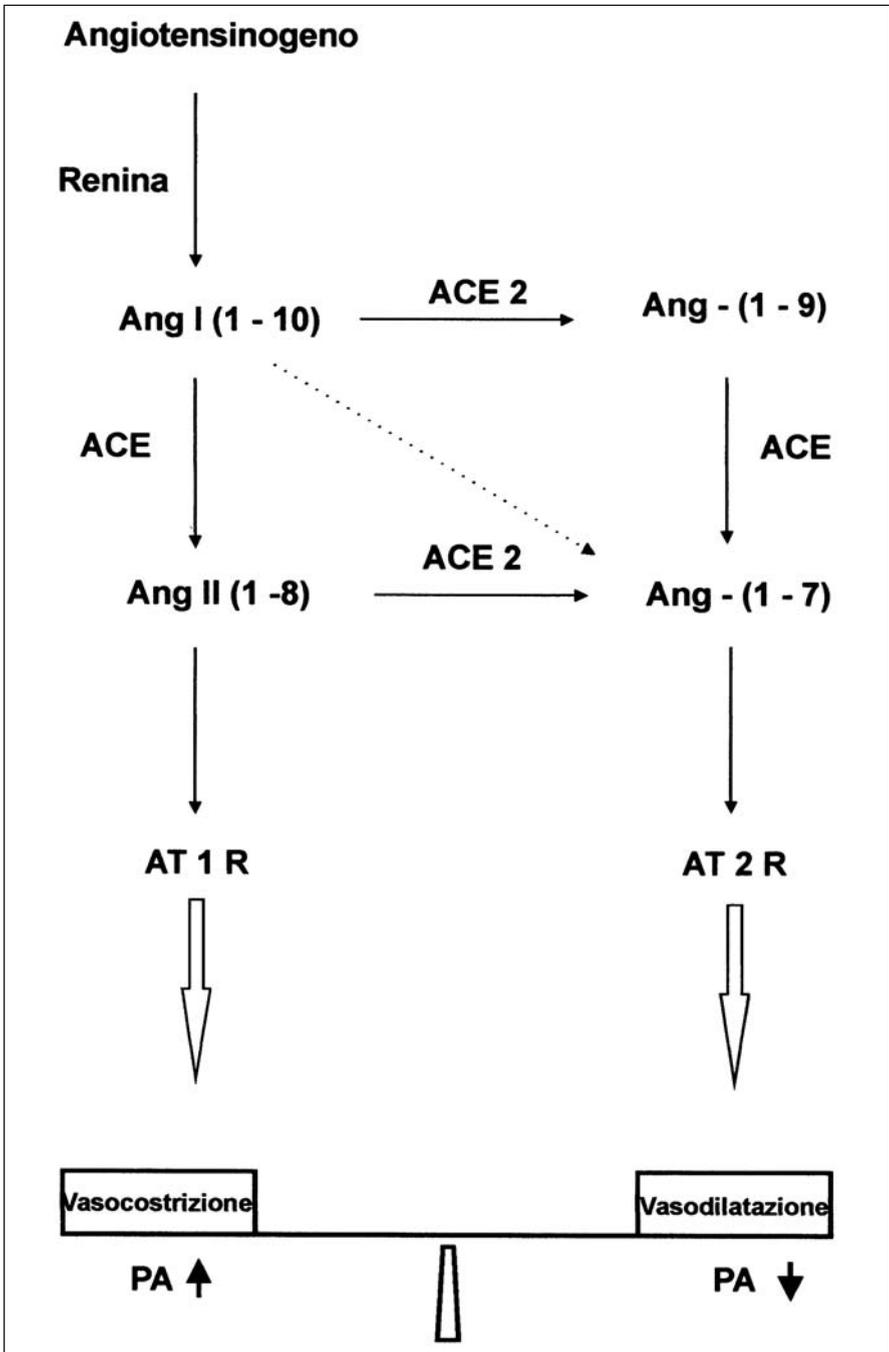


Fig. 21. La partecipazione dei recettori AT2 alla vasodilatazione prodotta dall'Ang-(1-7) (Modificata da: Yagil e Yagil 2003)

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 (Kuris 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 $-/-$, 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 AT2, BK e NO (Brede e coll. 2003): in ratti Lewis con scompenso per infarto del miocardio, la somministrazione di un BK2-antagonista impedisce, infatti, il miglioramento della funzione cardiaca prodotto da un ACEI e, similmente a quanto avviene dopo somministrazione di un AT2RA, almeno in parte impedisce quello prodotto da un AT1RA, 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 AT2. 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 AT2 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 AT2 e AT1 (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 AT2 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'augmentata 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'augmentata espressione di recettori in risposta alla Na-deplezione (Ozono e coll. 1997), suggerisce che essi controllino anche l'omeostasi del Na e dell'H₂O, 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'H₂O 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⁺ 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 AT2 contribuiscano anche a modulare la risposta del circolo cerebrale all'Angiotensina II.

Normalmente questa risposta è di tipo costrittivo, è mediata dai recettori AT1 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 $\text{PGF2}\alpha$, 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 AT2: negli animali al 14° giorno di vita (quando questi recettori sono più numerosi), è più significativa rispetto agli animali alla 8^a settimana (quando essi sono notevolmente diminuiti); viceversa, non si verifica negli animali AT2KO (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 AT2 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 AT1, ma la inibisce tramite gli AT2 (Unger 1999; Stoll e Unger 2001).

Recentemente è stato dimostrato che questa inibizione si realizza grazie alla interazione della estremità C-terminale del recettore AT2 con una proteina - AT1P, AT2 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 AT2 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'AT2 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-, 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 β III-tubulina e delle proteine del microtubulo τ 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 β , 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-

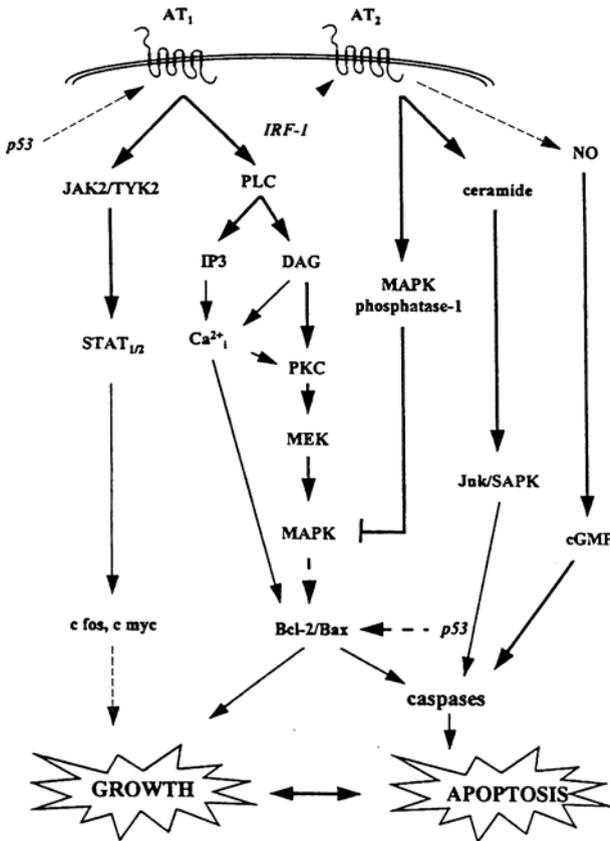


Fig. 22. Gli effetti sull'apoptosi prodotti dai recettori AT2 confrontati con quelli prodotti dai recettori AT1 (Da: de Gasparo e Siragy 1999, con autorizzazione)

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 AT₂ contribuiscono a ritardare anche lo sviluppo della aterogenesi, agendo anche in questo tipo di patologia in senso opposto ai recettori AT₁, che invece tendono a favorirla. Negli animali ApoE^{-/-} Agtr2⁻, 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^{-/-} Agtr2⁺ (Sales e coll. 2005). Questi fenomeni sono accelerati dalla somministrazione di un AT₂RA (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'AT₂RA impedisce ai recettori AT₂ di legarsi all'Angiotensina II, e favorisce invece il legame di quest'ultima con quelli AT₁.

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 AT₂RA (che quando sono somministrati ad alte dosi possono funzionare anche come degli AT₁RA), per cui il rapporto di questi recettori con l'eterogenesi rimane ancora incerto.