

Evoluzione del sistema renina-angiotensina: dai cordati ai primati

Roberto Fogari¹, Giuseppe Derosa³, Angela D'Angelo³, Alfredo Costa^{1,2}

¹IRCCS Fondazione Mondino, Pavia; ²Dipartimento di Scienze del Sistema Nervoso e Comportamento, Università degli Studi di Pavia; ³Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Università degli Studi di Pavia

Riassunto. Nei vertebrati il mantenimento omeostatico del volume e dell'osmolarità dei liquidi intra ed extravascolari è assicurato quasi esclusivamente dal sistema renina-angiotensina (RAS). Esso lo realizza da un lato agendo a livello renale su escrezione/riassorbimento di acqua e sodio, dall'altro regolando a livello centrale il senso della sete ed infine tenendo sotto controllo lo stato di costrizione arteriolare e quindi della pressione arteriosa. L'analisi dello sviluppo filogenetico del RAS ha messo in luce come alcuni suoi componenti fossero già presenti, sia pure in forma isolata e tra loro non interconnessi, in alcuni invertebrati marini e nell'anfiosso (*Branchiostoma floridae*). Solo con la comparsa dei vertebrati di cui la lampreda è il più antico tuttora vivente, si formò un sistema strutturato ed organico. Questa rassegna fornisce alcune informazioni sullo sviluppo e sulle modificazioni strutturali e funzionali dei vari componenti del RAS (angiotensinogeno, renina, angiotensine, recettori) che hanno avuto luogo nei milioni di anni trascorsi dalla comparsa dei primi vertebrati a quella degli anfibi fino ad arrivare ai mammiferi ed ai primati.

Parole chiave: omeostasi, pressione arteriosa, filogenesi, renina, angiotensina, vertebrati

EVOLUTION OF THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM: FROM CHORDATES TO PRIMATES

Abstract. The renin-angiotensin system (RAS) is the most important physiological system controlling and maintaining the intra and extravascular volume and osmotic homeostasis in vertebrates. It works via the kidney control of water and salt excretion/reabsorption, via the central thirst control and finally via the regulation of arteriolar vasoconstriction and consequently of blood pressure. The phylogenetic analysis of RAS development shows that some of its components were already present in some marine invertebrates and in *Branchiostoma floridae*, but they were not interconnected. It was only with the first vertebrates that a structural system appeared, as is the case of lamprey. This review provides informations about the phylogenetic appearance and the main structural and functional modifications of the RAS components (angiotensinogen, renin, angiotensins and receptors) from the first vertebrates until amphibians, mammals and primates.

Key words: homeostasis, blood pressure, phylogenesis, renin, angiotensin, vertebrates

EVOLUCIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA: DE CORDADOS A PRIMATES

Resumen. El sistema renina-angiotensina (SRA) es el principal sistema responsable del control de la presión arterial y el mantenimiento de la homeostasis intra y extravascular en los vertebrados. Actúa a través del control renal de la excreción de agua y sodio, de la regulación de la sed y de la regulación del calibre arteriolar. El análisis filogenético del desarrollo del SRA muestra cómo sus componentes importantes están presentes en algunos invertebrados marinos y en el *Branchiostoma floridae*, aunque todavía no interconectados. Solo con los primeros organismos vertebrados apareció un sistema estructurado, como en el caso de la lamprea. Esta revisión proporciona información sobre el desarrollo y las modificaciones estructurales de diversos componentes de SRA (angiotensinógeno, renina, angiotensina, receptores) y sobre su función y regulación en primeros vertebrados, anfibio, mamíferos y primates.

Palabras clave: presión arterial, filogenia, renina, angiotensina, vertebrados

Introduzione

In tutti i primati, il sistema renina-angiotensina (RAS) è il principale regolatore del volume e dell'osmolarità del liquido extracellulare (il noto "*milieu interieur*" di Claude Bernard), nonché uno dei principali meccanismi di controllo della pressione arteriosa. Per quanto riguarda il primo punto, esso agisce sia a livello renale, sul riassorbimento del sodio, sia a livello centrale, sul senso della sete e sul rilascio di ormone antidiuretico. Il controllo della pressione arteriosa si esplica mediante un'azione diretta o simpato-mediata di costrizione e/o dilatazione dei vasi di resistenza. La molecola madre di tutto il sistema, è l'angiotensinogeno (ANG), proteina di 452 amminoacidi prodotta dal fegato ed appartenente alle serpine prive di attività antiproteasica. Come noto, l'ANG viene attaccato dalla renina, prodotta dalle cellule iuxtaglomerulari, che ne stacca il decapeptide angiotensina I (Ang I), la quale a seguito dell'azione di svariati enzimi, in primis degli enzimi di conversione ACE e ACE2, ma anche di catepsina G e alcune chinasi, dà origine a numerose angiotensine. Anzitutto l'angiotensina II, che stimola la produzione di aldosterone, ha effetto diretto sul riassorbimento renale del sodio, stimola nel cervello i recettori per la sete, aumenta il tono simpatico e vaso-costringe le arteriole di resistenza. Oltre ad essa, attraverso diversi passaggi enzimatici, si formano anche

altre angiotensine (Fig. 1) che possono o contrastare gli effetti dell'angiotensina II, com'è il caso dell'angiotensina 1-7, o potenziarli, o averne dei propri specifici come avviene per l'angiotensina III, l'angiotensina IV e l'alamandina. Quando il sistema viene stimolato o inibito, quello che ne segue in termini di effetti è il risultato della concentrazione relativa delle molte angiotensine prodotte e quindi delle loro azioni sui rispettivi recettori che sono parte integrante del sistema stesso (1) (Fig. 2). Nel complesso, quindi, il RAS costituisce un affascinante sistema perfetto, che, per semplificare, possiamo definire come formato da quattro elementi fondamentali: ANG, enzimi, angiotensine e recettori.

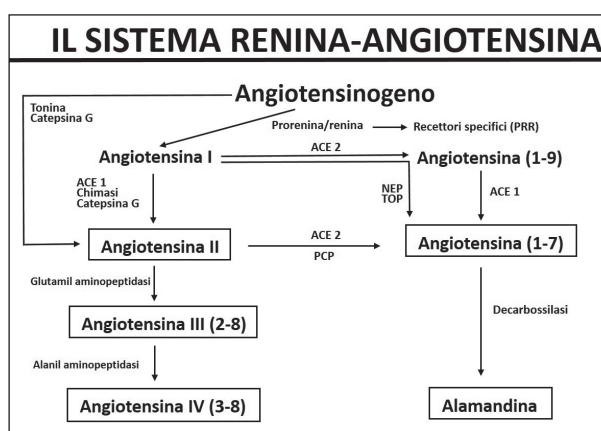


Figura 1. Sistema renina-angiotensina: meccanismi enzimatici di produzione delle varie angiotensine

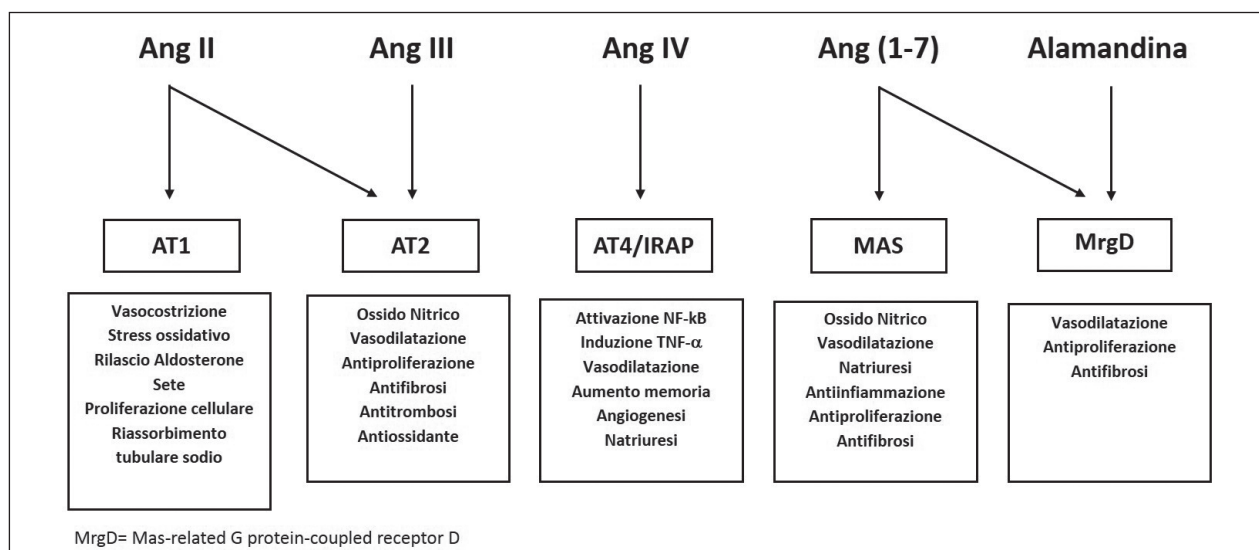


Figura 2. Azione delle angiotensine sugli specifici recettori e principali azioni biologiche

Su come questo sistema si sia formato e completato nel corso della filogenesi, è ora possibile avere, grazie ai progressi metodologici e genetici, una visione abbastanza completa. È noto che l'evoluzione non ha progetti finalistici, ma procede sostanzialmente attraverso mutazioni del tutto casuali ed attraverso la selezione naturale: ciò è avvenuto anche per il RAS, di cui oggi si cominciano a conoscere ed a ricostruire abbastanza completamente i cambiamenti e gli adattamenti evolutivi avvenuti nel corso dei millenni.

Aspetti filogenetici del RAS

L'inizio della storia del RAS si perde nella notte dei tempi, quando all'incirca 750 milioni di anni fa, nel Precambriano, in alcuni invertebrati, quali il moscerino della frutta ed alcuni vermi nematodi, comparvero in forma isolata alcuni di quelli che oggi sappiamo essere componenti essenziali del RAS e cioè i recettori della prorenina e gli omologhi di ACE e ACE2, in assenza però di tutti gli altri elementi, per cui in tali animali svolgono sicuramente altre funzioni (la regolazione del pH intracellulare la prorenina e la regolazione della fertilità gli omologhi dell'ACE) (2). Essi si aggregarono in maniera organica come oggi li conosciamo solo a seguito delle modificazioni evolutive puramente casuali che si verificarono nel corso di centinaia di milioni di anni successivi. È interessante come nell'anfiosso, uno dei primi cefalocordati, comparso circa 520 milioni di anni fa, siano presenti non solo i già citati componenti del RAS, ma anche, sia pur in una forma ancestrale, i recettori dell'angiotensina (3). Ciò rappresenta un forte elemento a sostegno dell'ipotesi che l'anfiosso possa essere il precursore del famoso "protovertebrato" di cui da più di un secolo si è ipotizzata l'esistenza. L'anfiosso, sottile animaletto affusolato lungo meno di 10 cm, che vive quasi sempre affondato nella sabbia dei fondali marini, è stato scoperto sul finire del 1700 e ha subito suscitato grande scalpore presso i biologi di tutto il mondo. Il suo corpo infatti affianca alle caratteristiche tipiche dei cordati primitivi, l'essere cioè completamente percorso dalla colonna dorsale, la presenza allo stato embrionale di caratteri che si svilupperanno appieno nei vertebrati e cioè la disposizione metamERICA di muscoli e nervi. Questo dato anatomico, assieme

alla presenza, sia pure in forma isolata, di ben quattro degli elementi che uniti ad altri formeranno il RAS dei vertebrati, fa sempre più ritenere che esso possa essere il precursore più o meno diretto del "protovertebrato primitivo" cioè di quella specie di araba fenice la cui esistenza è stata proposta e teorizzata da molti ricercatori anche se mai dimostrata (4). Il "protovertebrato" sarebbe un elemento chiave nella storia evolutiva dei vertebrati perché rappresenterebbe il passaggio dal mare all'acqua dolce (Fig. 3). Infatti i primi vertebrati, i ciclostomi, non sono comparsi nel mare, ma nell'acqua dolce dei laghi, delle lagune, delle paludi costiere e delle foci dei fiumi. Il passaggio dal mare fu verosimilmente compiuto da animali molto piccoli simili agli anfiossi che una volta penetrati nelle acque dolci riuscirono a sopravvivere all'insospettabilità del nuovo ambiente dovuta all'assenza di salinità. Ciò avvenne perché da un lato svilupparono un tipo di rivestimento del corpo non soggetto alle leggi osmotiche di membrana, dall'altro dei meccanismi atti a mantenere stabile il loro ambiente interno, caratterizzato, come è noto, da una concentrazione di cloruro di sodio simile a quella del mare. Senza tali meccanismi di adattamento non avrebbero potuto né sopravvivere, né evolversi. Il fatto quindi che il teatro della comparsa dell'evoluzione dei primi vertebrati sia stato l'acqua dolce ebbe notevoli conseguenze perché selezionò coloro che svilupparono un sistema in grado di mantenere stabile l'ambiente interno, sistema rappresentato dal RAS. Questo è

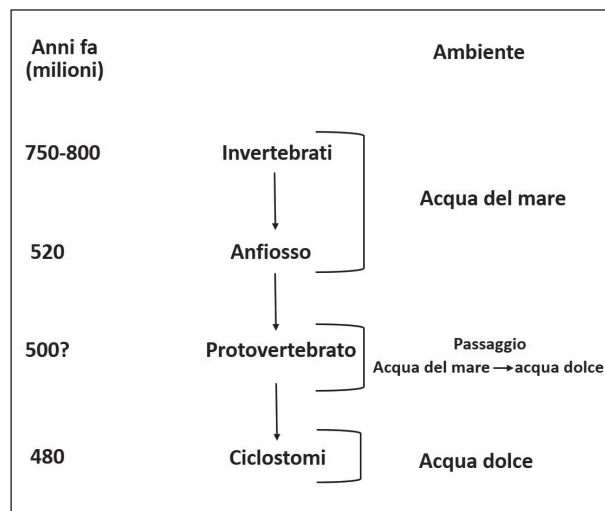


Figura 3. Progressione filogenetica nel passaggio dal mare all'acqua dolce

il punto chiave che permise l'evoluzione dei vertebrati così come oggi li conosciamo. Il RAS mise i vertebrati nella condizione di mantenere stabile la composizione del proprio ambiente interno a prescindere da quello esterno (acquatico o terrestre, secco od umido, fatto di acqua dolce o salata) permettendo anche a taluni di passare da un ambiente all'altro. Ciò si realizzò in quanto il RAS si evolvette in un sistema perfetto di controllo dell'assunzione ed escrezione sia di acqua che di sodio. In realtà, quando esso fece la sua comparsa nei primi ciclostomi, era tutt'altro che perfetto, ma solo un abbozzo di sistema piuttosto primitivo ed incompleto, la cui conoscenza ci permette però oggi di comprendere appieno i passaggi successivi.

Se infatti i più primitivi ciclostomi hanno lasciato solo reperti fossili, i successivi ci hanno lasciato anche il più antico vertebrato tuttora vivente (e quindi studiabile) cioè la lampreda. Essa è ben nota agli storiografi sia perché ne erano ghiotti gli antichi Romani, sia, e soprattutto, perché una scorpacciata di lamprede causò la morte di Enrico I d'Inghilterra. La lampreda fece la sua comparsa circa 480 milioni di anni fa nelle acque dolci, in particolare nei pressi delle foci dei fiumi, dei laghi e soprattutto negli acquitrini paludosi. Forse non è del tutto un caso che il primo tentativo di sistema sia comparso proprio nel primo organismo complesso vivente in acqua dolce, in un ambiente cioè diverso dall'acqua marina in cui tutti i suoi predecessori invertebrati vivevano e al quale quindi doveva adattarsi per difendere e conservare il suo "milieu interieur". Il RAS della lampreda viene definito "abbozzo" e "tentativo" di RAS in quanto ne possiede alcuni elementi, ma con numerose peculiarità: se da un lato infatti esso possiede il substrato fondamentale cioè l'ANG, dall'altro manca però dell'enzima principale, cioè la renina (mancanza cui sembrano in parte supplire altre aminopeptidasi in grado di produrre angiotensina I). L'ANG fa quindi la sua prima comparsa nella lampreda, ma ha caratteristiche particolari che lo differenziano nettamente da quello di tutti i viventi filogeneticamente successivi. Anzitutto l'ANG della lampreda è dotato di attività antiproteasica: esso è infatti anche inibitore della trombina (svolge cioè la funzione dell'antitrombina III dell'uomo). In effetti il gene dell'antitrombina III è assente nella lampreda, il che suggerisce che in essa l'ANG svolga la duplice funzione di serpina con

attività antiproteasica e di substrato per l'Ang I. Con i successivi eventi evolutivisti che portarono alla comparsa degli gnatostomi (pesci dotati di mandibola, praticamente tutti i pesci comparsi successivamente) attorno a 420 milioni di anni fa, l'ANG perde la sua funzione antiproteasica. Al tempo stesso negli gnatostomi compare il gene dell'antitrombina III per cui la funzione antiproteasica viene completamente acquisita dall'antitrombina III in tutti i pesci nonché in tutti i vertebrati successivi (5). La genetica inoltre ci ha evidenziato a livello molecolare un'altra caratteristica peculiare relativa all'ANG della lampreda: mentre in tutti i vertebrati filogeneticamente successivi a livello cromosomico il gene dell'ANG è affiancato da altri geni, sempre gli stessi e ben identificabili (sei da un lato e quattro dall'altro nei mammiferi e nei rettili, sei da un solo lato negli anfibi), nella lampreda il gene dell'ANG è presente da solo all'inizio della struttura genomica, senza alcun gene marcatore vicino (6) (Fig. 4). Ciò conferma che il gene dell'ANG è originato nella primissima fase dell'evoluzione dei vertebrati. Il secondo elemento caratterizzante il RAS della lampreda è l'assenza della renina, ovvero del principale enzima preposto a scindere l'Ang I dall'ANG. Dopo anni di

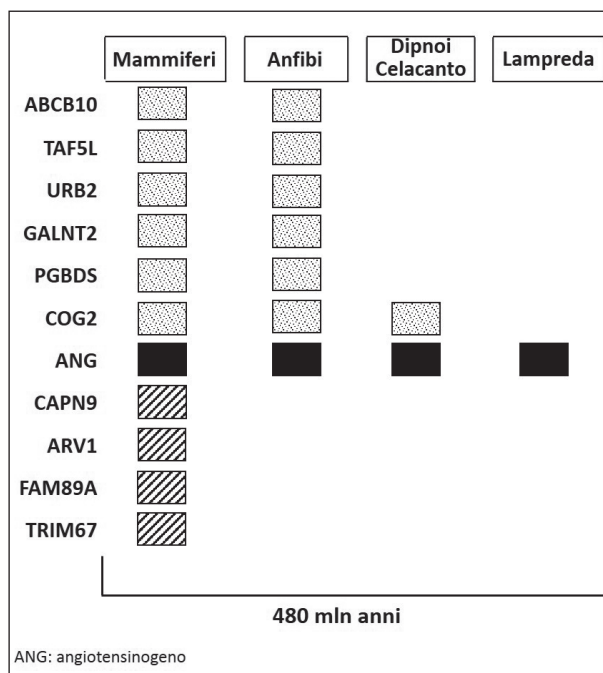


Figura 4. Varianti dell'organizzazione sintenica dei loci per l'angiotensinogeno nei vertebrati. ANG= Angiotensinogeno

studi e di ricerche, con risultati spesso contrastanti circa la sua esistenza o meno, la parola fine venne data dalla genetica che dimostrò che il gene della renina non è presente nel genoma della lampreda (7). In effetti, le cellule epiteliali granulose che sintetizzano la renina non furono mai trovate né nelle arterie e/o arteriole renali della lampreda né nelle loro vicinanze (8). Inoltre, anche la possibilità teorica che possa esistere un analogo della renina è stata praticamente esclusa in quanto l'altissima specificità che la renina possiede per l'ANG dipende esclusivamente dal fatto che nel residuo amminoacidico terminale dell'ANG vi sia tra gli amminoacidi 5 e 9 la sequenza [His⁶-Pro⁷-Phe⁸] (9), sequenza che esiste in tutti i vertebrati evolutivamente successivi alla lampreda, dai pesci fino ai mammiferi, ma non nell'ANG della lampreda stessa ove è sostituita dalla tripletta [Gln⁶-Pro⁷-Phe⁸]. Dato però che nella lampreda è stata trovata e dosata dell'Ang I (10), è evidente che essa debba venire staccata dall'ANG da qualche altro enzima: si attribuisce questa azione ad altre aspartato proteasi ed in particolare alla catepsina G. L'Ang I della lampreda è una sostanza completamente inerte, la cui sequenza amminoacidica è la seguente:

Asn-Arg-Val-Tyr-Val-Gln-Pro-Phe-Thr-Leu

Essa è molto simile a quella dei pesci ossei ed in particolare dei dipnoi. L'Ang I della lampreda viene sottoposta all'azione enzimatica dell'ACE, enzima di cui è stata evidenziata la presenza genomica nonché l'attività sia a livello sistemico sia a livello tissutale, nel cervello, nell'intestino e nei muscoli. L'ACE, sebbene trasformi regolarmente Ang I in Ang II, presenta però qualche differenza, peraltro non ancora chiarita, rispetto all'ACE degli altri vertebrati (11), in quanto la sua inibizione con qualsivoglia ACE inibitore risulta essere molto meno efficace (tra il 10 il 20% di quella degli altri vertebrati). Per quanto riguarda invece l'ACE2, esso non è mai stato identificato nella lampreda, né a livello genomico né a livello di attività. L'Ang II della lampreda, i cui livelli plasmatici sono anche misurabili dal 2011, si caratterizza per un'azione sul sistema cardiovascolare estremamente peculiare ed unica: essa infatti induce vasodilatazione, con conseguente abbassamento della pressione arteriosa (7), ha cioè un effetto esattamente opposto a quello che possiede in tutti i vertebrati successivi. Non è, a tutt'ora, chiarito se questo effetto sia dovuto a specifiche caratteristiche

strutturali dell'Ang II della lampreda oppure a peculiari caratteristiche del recettore per l'Ang II. Oggi si sa con certezza che esistono i recettori AT1, in quanto nel 2014 è stato clonato ed espresso il gene AT1 nel genoma della lampreda. Quando l'Ang II si combina con questo recettore esso si internalizza, ma il segnale usato è tuttora sconosciuto. Dato il tipo di risposta si ipotizza che gli AT1 della lampreda, a differenza di quelli di tutti gli altri vertebrati, utilizzino un secondo messaggero diverso dal Ca⁺⁺ (7).

Pesci

Seguendo la linea evolutiva che dai ciclostomi porta ai primati, dalla lampreda si passa alla grande famiglia dei pesci. I primi pesci che evolvettero dai ciclostomi furono i "placodermi" che, oltre ad avere un corpo ricoperto di placche ossee, possedevano una mandibola articolata e di conseguenza una bocca in grado di aprirsi, chiudersi e masticare. A parte questo, essi non rivestono alcun interesse in quanto già estinti nel Devoniano (420-360 milioni di anni fa). Dai placodermi si staccarono due diverse linee evolutive i cui rappresentanti sono ancora ampiamente presenti, quella dei pesci ossei e quella dei pesci cartilaginei. Questi ultimi sembra siano comparsi 450 milioni di anni fa e si svilupparono nello stesso habitat di acque dolci delle lamprede e dei placodermi fino alla fine del Devoniano, quando ebbero luogo imponenti e drammatici sconvolgimenti geologici che resero tale ambiente difficile alla vita. Essi allora migrarono verso il mare ove però dovettero affrontare il problema dell'alta concentrazione salina che, per le leggi osmotiche di membrana, faceva fuoruscire l'acqua dal corpo. A questo punto la selezione naturale permise la sopravvivenza solo a coloro che riuscirono ad adattarsi al nuovo ambiente. Il modo però in cui ciò si realizzò è piuttosto particolare: i cartilaginei, infatti, affrontarono il problema riducendo drasticamente l'escrezione renale di urea e facendone così aumentare la concentrazione plasmatica e di conseguenza la sua osmolarità portata ad un livello pari a quello del mare (12). I pesci cartilaginei sono dotati di un RAS che, se anche progredito rispetto a quello della lampreda, è ancora piuttosto primitivo (12,13). La loro

Ang II è caratterizzata da una sequenza aminoacidica decisamente inusuale rispetto a quella di tutti gli altri vertebrati (Tab. I) ed il suo effetto è sì vasocostrittivo, ma si manifesta solo in loro stessi tramite degli strani recettori verosimilmente coevoluti con questa Angiotensina (14). Anche il ruolo del RAS sembra piuttosto limitato. Sulla pressione infatti non esercita alcun controllo omeostatico, ma si attiva solo in condizioni di emergenza, come per es. nelle emorragie. L'osmolarità dell'ambiente interno è regolata esclusivamente dall'urea, per cui il ruolo del RAS sembra confinato da un lato al controllo della sete, mediato dai recettori AT centrali (15), dall'altro a regolare il passaggio del sodio attraverso le branchie e la ghiandola rettale, mediato dai recettori AT periferici (14).

Lasciando da parte i pesci cartilaginei, che da un punto di vista evolutivo hanno il mero significato di una strada a fondo chiuso, è più interessante osservare cosa avviene nei pesci ossei che hanno fatto la loro comparsa circa 420 milioni di anni fa. Essi si distinguono in due sottoclassi, i sarcopterigi o pesci a pinne carnose e gli attinopterigi o pesci a pinne raggiate. Questi ultimi rappresentano praticamente tutti i pesci ossei che oggi conosciamo (Fig. 5). Entrambi si originarono nelle acque dolci, le stesse delle lamprede, ma ben presto gli attinopterigi, come avevano fatto in precedenza i cartilaginei, invasero il mare tanto è vero che pressoché tutti i loro discendenti di oggi sono marini, quindi anch'essi da un punto di vista evolutivo sono una strada a fondo chiuso. Come ironizzò Homer Smith "scegliendo il mare decisero di restare pesci per sempre" (4). Essi si adattarono al mare non come fecero i cartilaginei, ma usando il RAS.

Diverso è il discorso per i sarcopterigi, di cui un solo sottogruppo, oggi rappresentato dal Celacanto, scelse il mare, mentre l'altro ben più numeroso, rappresentato dai pesci polmonati o dipnoi, restò nelle acque dolci delle paludi, degli stagni e delle foci dei fiumi. Essi differiscono dagli attinopterigi per avere le pinne pettorali e pelviche sostenute da ossa, le quali in seguito evolveranno negli arti primitivi (16).

Le pozze d'acqua degli acquitrini in cui vivevano i dipnoi spesso si prosciugavano, soprattutto nei periodi di siccità: essi allora per respirare usavano un diverticolo della faringe come polmone. Oggi ne sopravvivono poche specie capaci di respirare sia con le branchie che con il loro primitivo polmone; sono considerati dei "fossili viventi" in quanto conservano le loro caratteristiche primordiali ed hanno permesso di meglio precisare le conoscenze sulla filogenesi dei vertebrati. Per quanto riguarda il RAS qui si assiste ad un

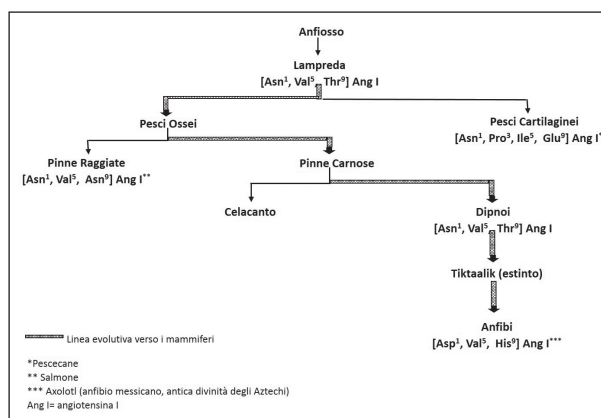


Figura 5. Via evolutiva che dalla lampreda ha portato agli anfibi e caratteristiche dell'angiotensina I in alcuni passaggi. Ang I= Angiotensina I

Tabella 1. Sequenza aminoacidica dell'angiotensina II attraverso diverse specie

	Sequenza aminoacidica							
	1	2	3	4	5	6	7	8
ELASMOBRANCHI								
Pescecanne	Asn	Arg	Pro	Tyr	Ile	His	Pro	Phe
OSTEITTI								
Salmone	Asn	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Phe
ANFIBI								
Rana Toro	Asn	Arg	Val	Tyr	Val	His	Pro	Phe
MAMMIFERI								
Ratto, Uomo, Cane, Cavallo	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe

Asn= Asparagina; Arg= Arginina; Pro= Prolina; Tyr= Tirosina; Ile= Isoleucina; His= Istidina; Phe= Fenilalanina; Val= Valina; Asp= Acido aspartico

imponente salto di qualità: esso diventa un vero sistema, ancorché imperfetto, ma tutti i suoi componenti più importanti sono ora presenti. L'ANG a seguito di una serie di mutazioni si è separato definitivamente dall'antitrombina III ed è diventato la serpina priva di attività antiproteasica che oggi conosciamo anche se con qualche diversità nella sequenza amminoacidica; è comunque da allora sempre presente la tripletta amminoacidica [His⁶-Pro⁷-Phe⁸] che dà la specificità per la renina. L'altro grande evento, verosimilmente il più importante, che ha luogo in tutti pesci, dipnoi compresi, è la comparsa nel rene delle cellule granulose che producono la renina (17). Queste ancora non costituiscono un vero e proprio apparato iuxtaglomerulare come lo conosciamo nei mammiferi, ma sono distribuite lungo la parte finale dell'arteria renale e lungo le sue principali diramazioni (18). Solo col progresso evolutivo si concentreranno nella zona glomerulare e a livello delle arteriole afferente ed efferente (Fig. 6). L'Ang I prodotta dalla renina ha una sequenza amminoacidica molto simile, ma non uguale a quella dei pesci a pinne raggiate mentre è fortissima la similitudine, almeno per quanto riguarda gli amminoacidi in posizione strategica, tra l'Ang I dei dipnoi e quella della lampreda, il che può rappresentare una conferma indiretta dei rapporti di discendenza tra i due (19) (Fig. 5). L'ACE è presente in tutti i dipnoi (20) e l'Ang II che si forma a seguito della sua azione aumenta sia la pressione arteriosa che la produzione di aldosterone in maniera dose dipendente. Sono pure presenti i recettori per l'Ang II con caratteristiche simili a quelle dei mammiferi (compreso il secondo

messaggero) anche se con qualche differenza riguardo alla sensibilità per gli AT1 antagonisti.

L'unico dei sarcopterigi che scelse il mare è il Celacanto. Esso è un enorme pesce di circa 80 Kg di peso che si pensava fosse estinto da milioni di anni; invece nel 1938 se ne pescò un esemplare e allora si scoprì che ancora esiste in alcune regioni tropicali. Il Celacanto, come i dipnoi, ha pinne carnose con ossa interne, ma a differenza di essi non respira aria, ma possiede solo un polmone ancestrale composto prevalentemente di grasso. Il sequenziamento del suo DNA, avvenuto nel 2013, ha dimostrato con assoluta certezza che non è lui il diretto antenato dei primi vertebrati usciti dall'acqua come era stato in precedenza ipotizzato (21). Il Celacanto è comunque per molti versi un essere misterioso: da un lato esso mantiene la sua osmolarità plasmatica pari a quella del mare utilizzando l'urea, come fanno gli elasmobranchi, dall'altro ha una ultrastruttura renale simile a quella della trota di acqua dolce, priva cioè del sistema di concentrazione (22) e infine ha una struttura epatica identica a quella dei mammiferi (23). Il Celacanto ha un RAS simile a quello dei dipnoi con renina prodotta da cellule granulose poste nello spessore delle arterie renali e con un ANG di cui è stata studiata a fondo la struttura chimica nonché quella del suo gene che non solo è stato identificato, ma è stata anche individuata la sua collocazione cromosomica (Fig. 4) (4). Anche gli enzimi di conversione sono stati studiati da un punto di vista genetico e si è visto che mentre il gene dell'ACE possiede lo stesso numero di esoni che hanno tutti gli altri vertebrati, quello dell'ACE2 è invece caratterizzato dall'averne uno in più (19 invece di 18) (24). L'approfondita conoscenza del RAS del Celacanto non ha però chiarito a cosa esso serva.

Da un lato infatti un suo eventuale ruolo sul controllo pressorio non è suffragato da alcun dato, dall'altro una sua eventuale funzione nella gestione dell'equilibrio osmotico non può che essere molto limitata, dato il ruolo fondamentale svolto dall'urea. La regolazione del bilancio sodico ha un'importanza molto minore; è possibile che il RAS eserciti una qualche forma di controllo sulla ghiandola rettale, adibita all'escrezione del sodio, di cui il Celacanto è dotato.

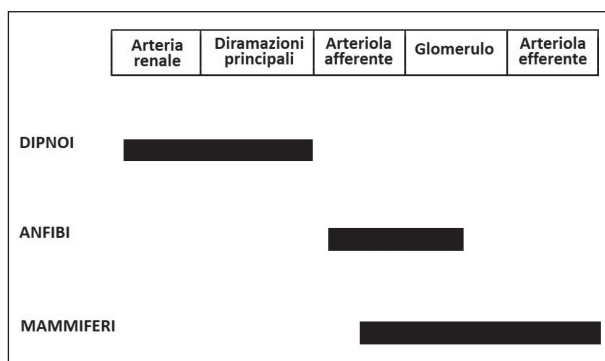


Figura 6. Distribuzione delle cellule granulose che producono renina lungo le arterie e arteriole renali nei vertebrati, col procedere della filogenesi

Tetrapodi

Dopo circa 50 milioni di anni dalla comparsa dei dipnoi in alcuni di essi, probabilmente quelli che vivevano più vicini alle zone costiere, al posto delle pinne anteriori e posteriori comparvero dei rudimentali arti, cosicché cominciarono a poter muoversi sulla terraferma. Ciò inizia 375 milioni di anni fa in un sottogruppo di dipnoi, i cosiddetti tetrapodiformi, il più antico dei quali fu denominato Tiktaalik e i cui reperti fossili, scoperti nel 2004 nell'Artico canadese, evidenziarono come fosse dotato di arti al posto delle pinne anteriori. Di questi "tetrapodi" ci restano solo residui fossili, ma è proprio da questa variante dei dipnoi che si evolvettero gli anfibi, i primi vertebrati che iniziarono la conquista della terra.

È opportuno precisare che i più antichi antenati degli anfibi che potremmo per semplicità riunire sotto il termine di "anfibi primitivo" oggi non esistono più, ma è da essi che discesero da un lato tutti gli anfibi oggi noti, dall'altro l'"amniote primitivo" da cui discesero i mammiferi. Questo avvenne più di 300 milioni di anni fa. Per quanto riguarda il RAS degli anfibi viventi, esso è ben conosciuto ed ampiamente studiato. Noi possiamo per traslazione ritenere che non sia molto dissimile da quello dell'anfibi primitivo. Il RAS degli anfibi si presenta anzitutto come completato rispetto a quello dei dipnoi in quanto qui compaiono anche i recettori per l'Ang 1-7. Esso è molto simile a quella dei mammiferi, anche se con alcune caratteristiche sue proprie. L'ANG degli anfibi, dosabile nel plasma fin dal 1971 (25), si caratterizza per livelli molto bassi, circa il 30% di quelli dei mammiferi. Il suo gene è localizzato sul cromosoma 1, come lo era nella lampreda e nei dipnoi e come lo sarà successivamente nei mammiferi. Quello che lo distingue sono i geni localizzati lateralmente ad esso, che un lato sono gli stessi sei presenti nei mammiferi (più di quelli dei più antichi predecessori), mentre dall'altro non è affiancato da alcuno dei geni presenti in tutti vertebrati successivi (Fig. 4). Per quanto riguarda la renina la sua attività è stata dimostrata fin dal 1985 sia nel plasma che nei reni (26) e nel 2012 è stato anche sequenziato il suo DNA. È interessante notare la localizzazione renale delle cellule granulose che la producono: esse, a differenza di quanto accade nei dipnoi, sono localizzate soprattutto a livello dell'ar-

teriola afferente fino ad interessare parzialmente il glomerulo, avvicinandosi quindi molto a quella che sarà la localizzazione definitiva nei mammiferi (27) (Fig. 6). Sull'Ang I agisce l'ACE che è ampiamente presente, ma negli anfibi è presente anche l'ACE2 (28), il che significa completamento del sistema con produzione anche di Ang 1-7, la quale peraltro può ora spiegare efficacemente la sua azione in quanto tra i recettori dell'angiotensina compare anche il suo recettore specifico, il MAS-1, il che rappresenta una novità assoluta nel campo evolutivo (29). Sono presenti ovviamente anche gli AT1 e AT2 (30). Negli anfibi il RAS è fondamentale nel controllo dell'osmo-regolazione col fine di mantenere l'omeostasi dell'ambiente interno nei passaggi da ambiente acquatico a secco e viceversa: ciò avviene regolando la formazione e l'escrezione di urina, la produzione di aldosterone e controllando la permeabilità osmotica all'acqua della pelle, in particolare di quella addominale, dove sembra rivestano particolare importanza l'Ang 1-7 e i recettori di tipo AT2 (31).

Come si è detto, dall'anfibi primitivo originarono due linee evolutive: da un lato quella degli anfibi che oggi conosciamo (rane, rospi, salamandre, etc) e di cui si è descritto il RAS, dall'altro quella degli amnioti. Si ritiene che lo sviluppo di questa seconda linea sia da mettersi in rapporto al fatto che a seguito degli imponenti cambiamenti geologici e climatici che caratterizzano l'inizio del Permiano, circa 300 milioni di anni fa, per molti degli anfibi primitivi l'ambiente divenne sfavorevole: alla scarsità di cibo per il clima troppo freddo si associò l'eccessiva aridità dei luoghi a seguito di riduzione delle paludi e degli stagni con conseguente difficoltà a depositare le uova, che deve avvenire in ambiente acquatico. In questo contesto la selezione naturale favorì quelle forme le cui uova erano in grado di sopravvivere e maturare anche fuori dalla acqua. Questo è un punto di svolta epocale nella storia evolutiva verso i mammiferi e l'uomo. Queste uova dovevano avere un guscio di protezione (di cui sono prive quelle degli anfibi) ed avere nel loro interno una riserva di liquido, racchiuso in un sacco membranaceo, l'amnio, nel quale fosse possibile lo sviluppo dell'embrione. Sono le uova amniotiche, di cui quella universalmente conosciuta è l'uovo di gallina. Il sistema amniotico, assieme ad altri annessi, è infatti tipico dei rettili (da cui gli uccelli provengono), ma è presente sia pur in

maniera molto modificata anche nei placentati dove, nell'utero, all'interno dell'amnio, ripieno di liquido amniotico, si sviluppa il feto. L'altra novità di quest'uovo è che esso sia nei rettili che nei più primitivi mammiferi ovipari, come l'ornitorinco, deve venire fecondato nella femmina prima di venire ricoperto dal guscio ed essere espulso. I più antichi esseri dotati di sistema amniotico devono essere comparsi prima che le linee evolutive dei rettili e dei mammiferi divergessero, ma di essi attualmente non esistono tracce. In ogni caso i rettili non sono da considerarsi come diretti antenati dei mammiferi, per cui il loro RAS non ha molto interesse nel divenire evolutivo verso i primati. Come illustrato in figura 7, dagli amnioti primordiali di circa 300 milioni di anni fa, attraverso classi di cui esistono ora solo testimonianze fossili, si arriva, all'incirca 170 milioni di anni fa, alla comparsa dei primi mammiferi di cui i più antichi (a parte l'ornitorinco) sono i marsupiali primitivi. L'unico di essi tuttora vivente è l'opossum comparso 70 milioni di anni fa, nel quale è stata dimostrata l'esistenza di un RAS completo, molto simile a quello umano, in cui la deplezione sodica incrementa la granulosità delle cellule iuxtaglomerulari, e conseguentemente la secrezione di renina (32). L'Ang II che così si forma fa aumentare la pressione arteriosa, la secrezione surrenalica di aldosterone ed ha anche un effetto dipsogenico (33) mediato dalla stimolazione

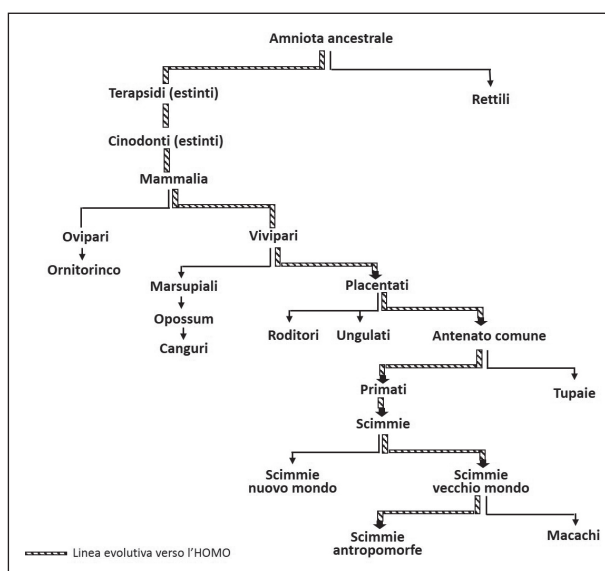


Figura 7. Le principali sequenze evolutive che dall'amniota ancestrale hanno portato ai primati

centrale di recettori per l'angiotensina, di cui l'opossum è molto ricco (34). Oltre che nel cervello essi sono stati identificati anche in numerosi altri tessuti (rene, tubo digerente, etc), e sono caratterizzati da una scarsa sensibilità agli Ang II antagonisti. Proprio per questo motivo sono stati studiati a fondo sia da un punto di vista genetico che strutturale e si è visto che sono lievemente diversi da quelli dei placentati per alcune differenze nella loro sequenza amminoacidica (35). Ovviamente anche nei successori dell'opossum, i moderni canguri, il RAS è completamente presente e tutti i suoi componenti sono stati identificati, quantificati e valutati nelle loro funzioni e nel complesso il sistema si è rivelato molto simile a quello dei placentati con solo una piccolissima differenza nella sequenza amminoacidica dell'Ang I (36-38). Per quanto riguarda l'altra via evolutiva che dall'amniota ancestrale porta ai primati (Fig. 7) si sa poco relativamente ai primi 100 milioni di anni: secondo le più accreditate e recenti teorie i placentati che vissero o meglio "sopravvissero" in questo periodo furono solo mammiferi di piccole dimensioni, in grado cioè di sfuggire agli animali allora prevalenti cioè i grandi rettili ed i dinosauri. A questo proposito uno dei pochi esempi conosciuti è quello delle Tupaie, piccoli mammiferi simili a scoiattoli scoperti nel 1780 nell'Asia sud orientale durante uno dei famosi viaggi del Capitano Cook. Comparse circa 88 milioni di anni fa, quindi in piena epoca dei Dinosauri, e ritenute in un primo tempo come i più antichi primati ne sono poi state distinte ed oggi si considerano solo come i loro più stretti parenti. Esse posseggono un RAS completo perfettamente sviluppato in tutti i suoi componenti sia per quanto riguarda la morfologia e la localizzazione delle cellule iuxtaglomerulari, che per quanto riguarda la funzionalità e la formazione di Ang I e Ang II (39). Sembra che la sua efficacia e centralità nel controllo dell'omeostasi interna sia addirittura maggior di quella dei roditori, comparsi per altro 20 milioni di anni più tardi. Fu solo a seguito dell'estinzione dei dinosauri avvenuta 65 milioni di anni fa che si ebbe l'esplosione dei mammiferi placentati: il padre di tutti loro sembra sia stato definitivamente individuato nel 2015 in un piccolissimo animale a pelo corto, dal peso di 1 o 2 etti, con una lunga coda, che viveva sugli alberi e comparve più o meno in coincidenza con l'estinzione dei Dinosauri (40). Esso fu chiamato Purgatorius dal

nome della regione in cui furono trovati più numerosi i suoi resti fossili (Purgatory Hill nel Montana). Circa 10 milioni di anni dopo (55 milioni di anni fa) nelle foreste della Cina centrale comparve l'antenato di tutti i primati, cioè di scimmie, scimpanzé ed uomini: secondo le più recenti ricerche fossili era anch'esso molto piccolo con caratteristiche completamente diverse da ogni altro primato finora noto, quasi un ibrido con piedi da scimmia ed arti e denti da primate. Il suo ordine è comunque ormai estinto.

Da questi primati primitivi originarono le scimmie sia del vecchio mondo (all'incirca 30 milioni di anni fa) che del nuovo mondo (24 milioni di anni fa). Tra queste ultime è interessante ricordare il Marmoset perché il suo RAS, che è stato studiato a fondo, è caratterizzato da renina, Ang I e Ang II esattamente identiche a quelle umane ed il suo ANG è formato da una sequenza di 486 aminoacidi per l'86% sovrapponibile a quella dell'uomo (41).

Nostri diretti precursori furono invece, come è noto, le scimmie del vecchio mondo che nella progressione filogenetica 20 milioni di anni fa si divisero nei macachi e nelle scimmie antropomorfe (Fig. 8), dal cui filone evolutivo circa 6-7 milioni di anni fa si separarono Scimpanzé e Homo. Tutte le scimmie studiate dai macachi ai gorilla ed agli scimpanzé hanno un RAS del tutto e per tutto simile a quello umano, sia nella struttura genomica, che in quella molecolare nonché nelle funzioni di controllo osmolare e pressorio (42). Nei macachi è stata addirittura dimostrata anche una

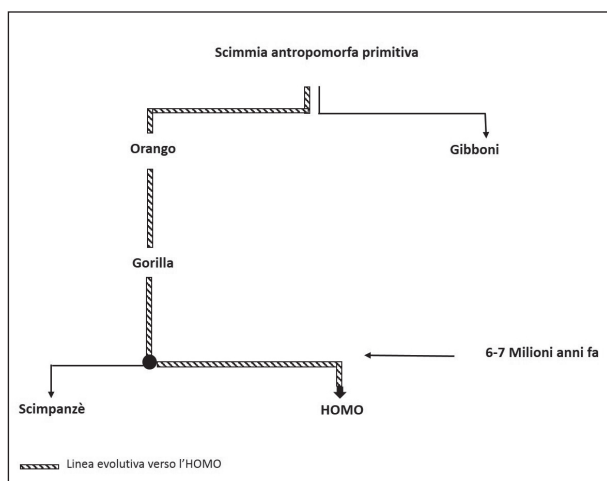


Figura 8. Evoluzione dalle prime scimmie antropomorfe all'HOMO

uguaglianza tra il loro RAS tessutale cerebrale a livello della sostanza nigra e quello umano (43).

Conclusioni

In conclusione, i primi componenti del RAS dei vertebrati apparvero in concomitanza con la comparsa dei più primitivi di essi, come la lampreda, ed avevano aspetti qualitativi, strutturali e funzionali estremamente peculiari e differenti da quelli di tutti vertebrati successivi. Quasi tutti i componenti più importanti erano però presenti già nello stadio evolutivo successivo, quello dei pesci ed in particolare dei pesci polmonati, con la sola eccezione dell'Ang 1-7 e dei recettori MAS-1, che comparvero negli anfibi quando il sistema si completò definitivamente.

L'intero processo si è svolto in circa 150-180 milioni di anni di evoluzione nell'era paleozoica, mentre i successivi 300-400 milioni di anni fino alla comparsa dell'uomo sono stati caratterizzati da una sostanziale stabilità del RAS, con solo qualche modifica specie specifica nelle sequenze aminoacidiche dell'ANG, dell'Ang I e dei recettori dell'angiotensina (3,44,45). Quello che dobbiamo ora aspettarci sia qui che peraltro in tutti i campi biomedici, è un rapido aumento di tutte le nostre conoscenze, anche in tempi relativamente non troppo lunghi, e ciò grazie alle nuove metodiche di ricerca quali la genetica o le tecniche di analisi molecolare. Sarà quindi presto possibile e probabile dover rivedere molte delle ipotesi interpretative fin qui formulate e forse capire quali sono stati gli elementi fondamentali che hanno permesso la sopravvivenza e l'evoluzione. Il RAS è sicuramente uno di essi in quanto ha garantito l'omeostasi dell'ambiente interno (inteso sia come volume dello stesso che come sua concentrazione di sodio) e della pressione arteriosa anche a fronte di enormi se non drammatici cambiamenti dell'ambiente esterno (acqua dolce, acqua salata, vita acquatica, vita terrestre, etc). Che nei tempi più recenti l'Homo Sapiens sottoponga artificialmente il RAS a un nuovo modo di lavorare a seguito di nuovi stili di vita ed in particolare dell'eccessiva introduzione di sale (che talvolta il RAS riesce a compensare, ma altre volte no) è un altro discorso, che riguarda la fisiopatologia dell'ipertensione arteriosa, dello stroke e delle malat-

tie cardiovascolari in generale (46). Comunque, una sempre più approfondita conoscenza dei meccanismi d'azione del RAS, cui da qualche tempo contribuisce anche la Medicina Evolutiva, sarà senz'altro utile per meglio affrontare queste problematiche cliniche.

Bibliografia

1. Fogari R, Perlini S. Controversial aspects of renin-angiotensin system. *Intern Emerg Med* 2013; 8:S120-S125.
2. Salzet M, Deloffre L, Breton C, Vieau D, Schoofs L. The angiotensin system elements in invertebrates. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 36(1):35-45.
3. Fournier D, Luft FC, Bader M, Ganten D, Andrade-Navarro MA. Emergence and evolution of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J Mol Med (Berl)* 2012; 90(5):495-508.
4. Smith HW. *Dal pesce al filosofo*. Torino: Boringhieri 1961.
5. Wang Y, Ragg H. An unexpected link between angiotensinogen and thrombin. *FEBS Lett* 2011; 585(14):2395-2399.
6. Kumar A, Sarde SJ, Bhandari A. Revising angiotensinogen from phylogenetic and genetic variants perspectives. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 446(2):504-518.
7. Wong MKS, Takei Y. Molecular and evolutionary perspectives of the renin-angiotensin system from lamprey. *Gen Comp Endocrinol* 2018; 257:137-142.
8. Brown JA, Cobb CS, Frankling SC, Rankin JC. Activation of the newly discovered cyclostome renin-angiotensin system in the river lamprey *Lampetra fluviatilis*. *J Exp Biol* 2005; 208(Pt 2):223-232.
9. Nakagawa T, Akaki J, Satou R, et al. The His-Pro-Phe motif of angiotensinogen is a crucial determinant of the substrate specificity of renin. *Biol Chem* 2007; 388(2):237-246.
10. Rankin JC, Watanabe TX, Nakajima K, Broadhead C, Takei Y. Identification of angiotensin I in a cyclostome, *Lampetra fluviatilis*. *Zoolog Sci* 2004; 21(2):173-179.
11. Cobb CS, Frankling SC, Rankin JC, Brown JA. Angiotensin converting enzyme-like activity in tissues from the river lamprey or lampern, *Lampetra fluviatilis*, acclimated to freshwater and seawater. *Gen Comp Endocrinol* 2002; 127(1):8-15.
12. Hazon N, Tierney ML, Takei Y. Renin-angiotensin system in elasmobranch fish: A review. *J Exp Zool* 1999; 284(5):526-534.
13. Lacy ER, Reale E, Luciano L. Immunohistochemical localization of renin-containing cells in two elasmobranch species. *Fish Physiol Biochem* 2016; 42(3):995-1004.
14. Anderson WG, Cerra MC, Wells A, et al. Angiotensin and angiotensin receptors in cartilaginous fishes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 128(1):31-40.
15. Anderson WG, Takei Y, Hazon N. The dipsogenic effect of the renin-angiotensin system in elasmobranch fish. *Gen Comp Endocrinol* 2001; 124(3):300-307.
16. Amaral DB, Schneider I. Fins into limbs: Recent insights from sarcopterygian fish. *Genesis* 2018; 56(1). doi: 10.1002/dvg.23052. Epub 2017 Sep 6.
17. Blair-West JR, Coghlan JP, Denton DA, et al. Plasma renin activity and blood corticosteroids in the Australian lungfish *Neoceratodus forsteri*. *J Endocrinol* 1977; 74(1):137-142.
18. Masini MA, Napoli L, Sturla M, Uva B. The kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in the kidney of an African lungfish, *Protopterus annectens*. *Gen Comp Endocrinol* 1996; 103(1):93-100.
19. Joss JM, Itahara Y, Watanabe TX, Nakajima K, Takei Y. Teleost-type angiotensin is present in Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Gen Comp Endocrinol* 1999; 114(2):206-212.
20. Olson KR, Lipke D, Datta Munshi JS, et al. Angiotensin-converting enzyme in organs of air-breathing fish. *Gen Comp Endocrinol* 1987;68(3):486-491.
21. Amemiya CT, Alföldi J, Lee AP, et al. The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature* 2013; 496(7445):311-316.
22. Jarial MS, Gattone VH, Wilkins JH. Ultrastructural study of the kidney in the coelacanth *Latimeria chalumnae* (Rhpidistia: Coelacanthini). *Zoolog Sci* 2014; 31(5):283-291.
23. Shiojiri N, Tanaka S, Kawakami H. The hepatic architecture of the coelacanth differs from that of the lungfish in portal triad formation. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2019; 96(1):1-11.
24. Lv Y, Li Y, Yi Y, Zhang L, Shi Q, Yang J. A Genomic Survey of Angiotensin-Converting Enzymes Provides Novel Insights into Their Molecular Evolution in Vertebrates. *Molecules* 2018; 23(11). pii: E2923.
25. Nolly H, Fasciolo JC. Renin-angiotensin system and sodium homeostasis in *Bufo arenarum*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1971; 39(4):833-841.
26. Lamers AP, Stadhouders AM, Verhofstad AA, Michelakis AM. Immunoelectron microscopic localization of renin in the juxtaglomerular cells of the amphibian *Bufo bufo*. *Gen Comp Endocrinol* 1985; 60(3):380-389.
27. Nishimura H. Renin-angiotensin system in vertebrates: phylogenetic view of structure and function. *Anat Sci Int* 2017; 92(2):215-247.
28. Quassinti L, Maccari E, Murri O, Bramucci M. Comparison of ACE activity in amphibian tissues: *Rana esculenta* and *Xenopus laevis*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; 146(1):119-123.
29. Ji Y, Zhang Z, Hu Y. The repertoire of G-protein-coupled receptors in *Xenopus tropicalis*. *BMC Genomics* 2009; 10:263. doi:10.1186/1471-2164-10-263
30. Sandberg K, Ji H, Millan MA, Catt KJ. Amphibian myocardial angiotensin II receptors are distinct from mammalian AT1 and AT2 receptor subtypes. *FEBS Lett* 1991; 284(2):281-284.
31. Maejima S, Konno N, Matsuda K, Uchiyama M. Central angiotensin II stimulates cutaneous water intake behavior via an angiotensin II type-1 receptor pathway in the Japanese tree frog *Hyla japonica*. *Horm Behav* 2010; 58(3):457-464.

32. Mukhopadhyay AK, Leavitt L. Evidence for an angiotensin receptor in esophageal smooth muscle of the opossum. *Am J Physiol* 1978; 235(6):E738-E742.
33. Findlay AL, Elfont RM, Epstein AN. The site of the dipso-genic action of angiotensin II in the North American opossum. *Brain Res* 1980; 198(1):85-94.
34. Johnston CI, Davis JO, Hartroft PM. Renin-angiotensin system, adrenal steroids and sodium depletion in a primitive mammal, the American opossum. *Endocrinology* 1967; 81(3):633-642.
35. Nistala R, Andresen BT, Pulakat L, et al. Angiotensin type 1 receptor resistance to blockade in the opossum proximal tubule cell due to variations in the binding pocket. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 304(8):F1105-F1113.
36. Simpson PA, Blair-West JR. Renin levels in the kangaroo, the wombat and other marsupial species. *J Endocrinol* 1971; 51(1):79-90.
37. Best JB, Blair West JR, Coghlan JP, Cran EJ, Fernley RT, Simpson PA. A novel sequence in kangaroo angiotensin I. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1974; 1(2):171-174.
38. Young CE, McDonald IR. The effect of intravenous infusion of angiotensin II on drinking in the Australian marsupial *Trichosurus vulpecula*. *J Physiol* 1978; 280:77-85.
39. Taugner R, Forssmann WG, Ganten D, Schiller A. Studies on the juxtaglomerular apparatus. VI. Sympathetic innervation, catecholamines and the renin-angiotensin-system in rats and tree-shrews (*Tupaia belangeri*). *Cell Tissue Res* 1980; 212(3):375-382.
40. Chester SGB, Bloch JI, Boyer DM, Clemens WA. Oldest known euarchontan tarsals and affinities of Paleocene *Purgatorius* to Primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112(5):1487-1492.
41. Valdenaire O, Breu V, Giller T, Bur D, Fischli W. Cloning and characterization of marmoset renin: comparison with human renin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34(6):893-897.
42. Mavoungou D, Nowaczynski W, Cooper RW, Collet JY, Fung K. Renin angiotensin aldosterone axis, including aldosterone binding globulin and blood pressure in three species of nonhuman primates. *J Med Primatol* 1987; 16(4):211-227.
43. Garrido-Gil P, Valenzuela R, Villar-Cheda B, Lanciego JL, Labandeira-Garcia JL. Expression of angiotensinogen and receptors for angiotensin and prorenin in the monkey and human substantia nigra: an intracellular renin-angiotensin system in the nigra. *Brain Struct Funct* 2013; 218(2):373-388.
44. Chappell MC, Brosnihan KB, Diz DI, Ferrario CM. Identification of angiotensin-(1-7) in rat brain. Evidence for differential processing of angiotensin peptides. *J Biol Chem* 1989; 264(28):16518-16523.
45. Ferrario CM, Ahmad S, Nagata S, et al. An evolving story of angiotensin-II-forming pathways in rodents and humans. *Clin Sci (Lond)* 2014; 126(7):461-469.
46. Fogari R, Cotta Ramusino M, Lepore F, Costa A. Il sistema renina-angiotensina: aspetti filogenetici. *Confinia Cephalalgica et Neurologica* 2019; 29(2):95-104.