

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"**

**DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA E  
PRODUZIONI ANIMALI**



**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA, PATOLOGIA E  
IGIENE AMBIENTALE IN MEDICINA VETERINARIA**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

**“Presenza, distribuzione e possibile ruolo dell’urocortina nella  
ghiandola tiroide di bovino”.**

**Coordinatore del Corso**

**Ch.mo Prof. Giuseppe Cringoli**

**Relatore**

**Ch.mo Prof.**

**Nicola Mirabella**

**Candidato**

**Massimiliano Dr. Ponzi**

**ANNO ACCADEMICO 2014-2015**

## **INDICE**

<b>1. SOMMARIO</b>	pag.3
<b>2. INTRODUZIONE</b>	pag. 4
2.1 Tiroide, anatomia e fisiologia	pag.4
2.2 Urocortina	pag.10
2.3 Corticotrophin releasing hormone receptor 1e 2 (CRHR1 e CRHR2)	pag.11
<b>3. SCOPO DELLA TESI</b>	pag.15
<b>4. RISULTATI OTTENUTI DAL CANDIDATO</b>	
4.1 Immunoprecipitazione e Western-blot	pag.16
4.2 Immunoistochimica	pag.18
4.3 Analisi RT-PCR	pag.20
<b>5. DISCUSSIONE</b>	pag.21
<b>6. MATERIALI E METODI</b>	pag.24
6.1 Animali e tessuti	pag.24
6.2 Immunoprecipitazione e Western-blot	pag.24
6.3 Immunoistochimica	pag.25
6.4 Estrazione dell'RNA, sintesi di cDNA, RT-PCR e sequenziamento	pag.26
<b>7. REFERENZE</b>	pag.28

## **1. SOMMARIO**

Urocortin (UCN), a 40 amino acid peptide is a Corticotrophin-Releasing Hormone (CRH) related peptide. The biological actions of CRH family peptides are mediated via two types of G-protein coupled receptors, CRH type 1 (CRHR1) and CRH type 2 (CRHR2). The aim of the present study was to investigate the expression of UCN, CRHR1, CRHR2 and CRHBP by immunohistochemistry, immunoprecipitation, Western blot and RT-PCR in the bovine thyroid gland. The results showed that UCN, CRHR1 and CRHR2 are expressed in thyroid gland, whereas CRHBP was not expressed. Specifically, UCN-immunoreactivity (IR) and CRHR2-IR were found in the thyroid follicular and parafollicular cells and CRHR1-IR in the smooth muscle of the blood vessels. Immunoprecipitation and Western blot analysis and RT-PCR experiments confirmed the immunohistochemical data. These results suggest that a regulatory system exists in the bovine thyroid gland based on UCN, CRHR1 and CRHR2 and that UCN plays a role in the regulation of thyroid physiological functions through an autocrine mechanism.

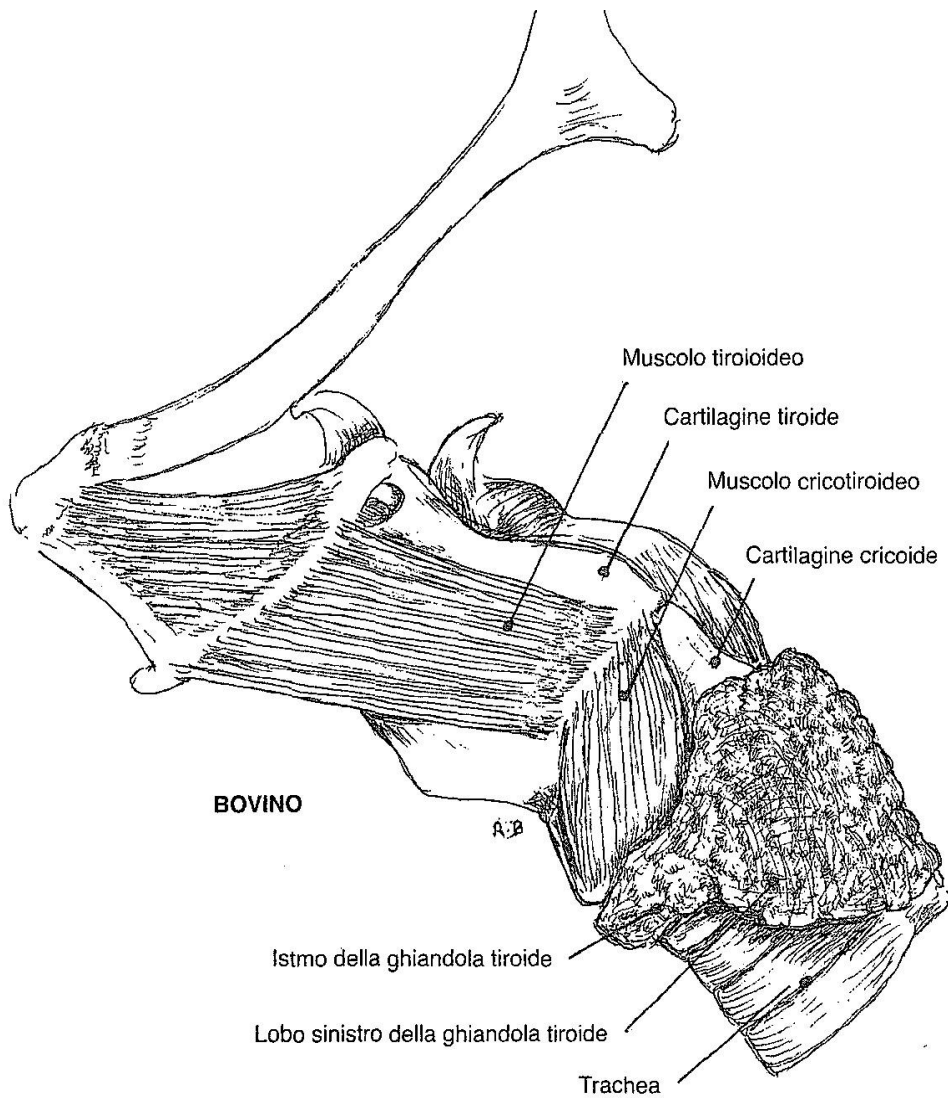
## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 Tiroide, anatomia e fisiologia

La *tiroide* (Glandula thyroidea) è una ghiandola endocrina di derivazione endodermica, in quanto origina come lamina ispessita dell'epitelio faringeo. Propaggini laterali di tali cordoni cellulari formano i lobi della ghiandola, mentre le cellule più mediali originano l'istmo, che permane in alcune specie (uomo, bovino, suino) mentre scompare in altre (cane) (Fig. 1). I lobi hanno una forma diversa da specie a specie (Fig. 2). Le cellule parafollicolari invece derivano dalla cresta neurale e sono disperse nel parenchima tiroideo di ciascun lobo. Terminato il suo sviluppo fetale la ghiandola tiroidea si presenta composta da due lobi a seconda delle specie collegati da un istmo, in posizione ventro-laterale alla laringe in corrispondenza dei primi anelli tracheali.

L'irrorazione avviene in ciascun lobo attraverso l'ilo tramite l'arteria tiroidea craniale, branca della carotide, il drenaggio avviene attraverso la vena tiroidea che affluisce alla giugulare. I vasi linfatici affluiscono al tronco linfatico cervicale senza attraversare linfonodi.

La struttura della tiroide è di tipo follicolare, generalmente rotondeggianti contenenti la sostanza *colloide* prodotta dalle cellule follicolari. Frammiste a quest'ultime, ma molto meno numerose, si distinguono le cellule parafollicolari, il loro apice non è comunicazione con il follicolo e sono deputate alla produzione di tirocalcitonina. Le cellule parafollicolari appartengono al sistema endocrino diffuso; i loro granuli contengono amine biogene, calcitonina e forse somatostatina.



*Fig.1 Laringe e ghiandola tiroidea del bovino in posizione laterale. [R Barone – P Simoens 2012]*

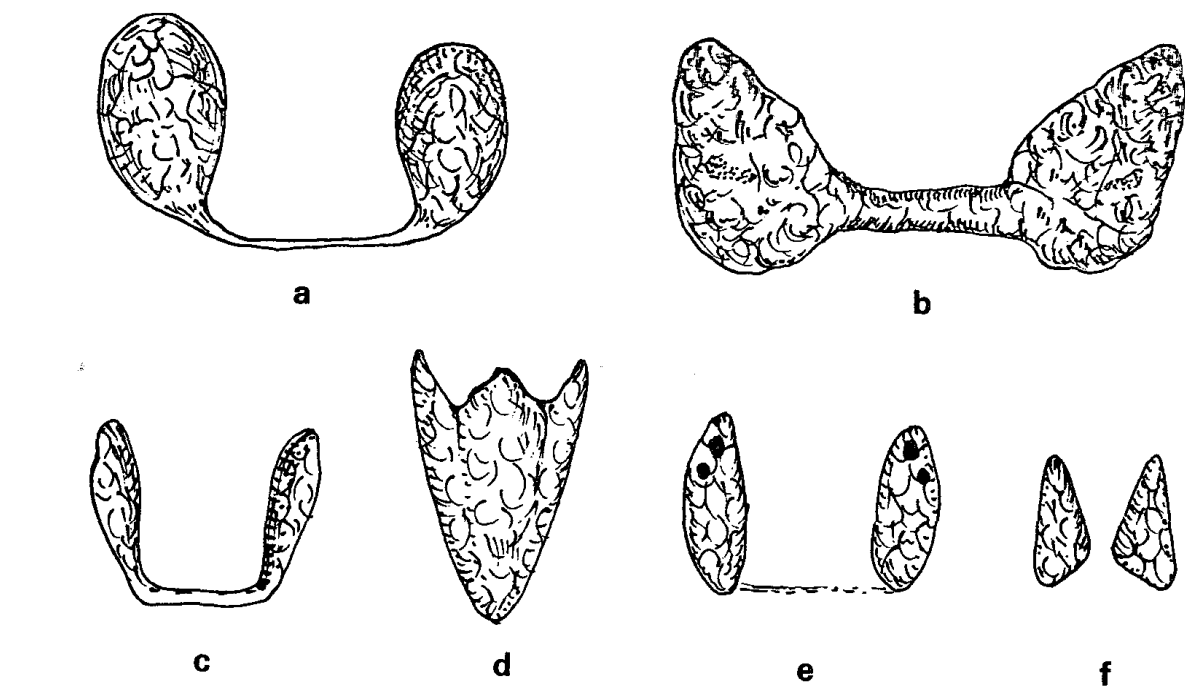


Fig.2 Rappresentazione schematica della morfologia della tiroide di vari mammiferi domestici. 2.a equino, 2.b bovino, 2.c ovino, 2.d maiale, 2.e cane, 2.f coniglio. [GV Pelagalli- V Botte 2003]

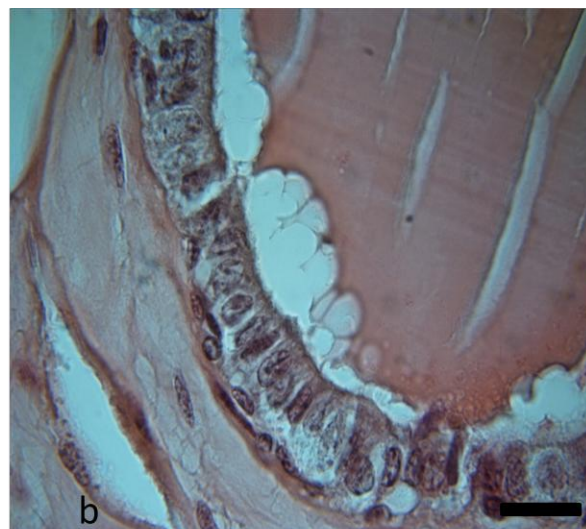
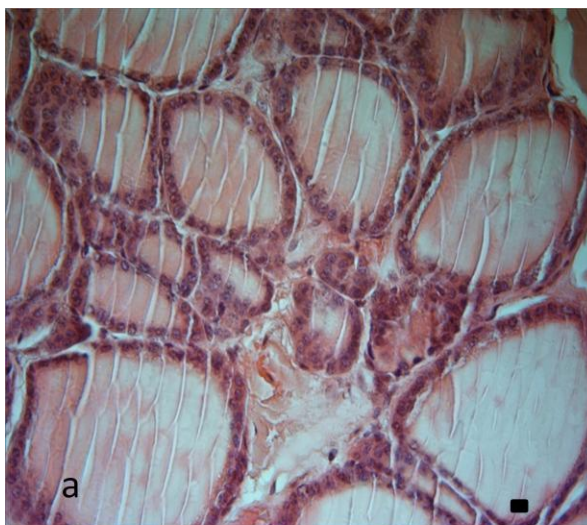


Fig.3 colorazione ematossilina eosina di sezioni di tiroide bovina. Immagine 3.a barra 20 micron. Fig 1.b FL: lume del follicolo.

Negli equini, la tiroide, di colore rosso bruno, comprende i due lobi laterali non sempre congiunti da un istmo piuttosto sottile, formato solo da connettivo fibroso. Nei maiali, la tiroide è collocata appena innanzi all'entrata della gabbia toracica. Ha due lobi di forma irregolare e allungata che si fondono in buona parte lungo la linea mediana; ciascuno di essi è lungo 4-5 cm e pesa 5g circa. Nel coniglio, la tiroide ha lobi relativamente lunghi che si espandono anche per 9 anelli tracheali. Il suo colore è abbastanza chiaro [Pelagalli-Botte, 2003] (Fig. 2). Nel bovino la ghiandola tiroidea si compone di due lobi appiattiti e di forma triangolare uniti da un istmo parenchimoso situato sulla faccia ventrale dei due primi anelli della trachea (Fig. 2). Ciascun lobo misura da 6 a 8 cm di lunghezza e da 4 a 5 cm di larghezza e da 0,75 a 1,5 cm di spessore; il peso varia da 15 a 20 grammi. L'istmo è largo circa 1 cm. I lobi sono in rapporto con la faccia laterale della cartilagine cricoide e, mediante il loro margine caudale, con l'esofago. Il margine craniale, rettilineo, è in rapporto con i muscoli cricofaringeo e cricotiroideo. Infine, il margine ventrocaudale, concavo, è modellato sulla trachea. La faccia laterale dei lobi, irregolarmente lobulata, è coperta dai muscoli sternoioideo e sternocefalico, come pure dall'arteria carotide comune, dalla vena giugulare interna e dal tronco vago simpatico [Barone e Simoens, 2012]. Nel bovino i due lobi presentano una faccia superficiale leggermente granulosa e una faccia profonda. La faccia superficiale è laterale e modellata sulla trachea. Le facce sono delimitate da due margini dei quali, uno è cranio ventrale e convesso, mentre l'altro è dorso mediale e meno convesso; i margini si riuniscono alle due estremità craniale e caudale, quest'ultima unita all'istmo. In alcuni casi l'istmo manca o a volte, come nel bovino, è formato dallo stesso tessuto ghiandolare dei lobi. L'istmo unisce le estremità caudali dei due lobi, modellandosi sulla trachea. Il colore della ghiandola varia a seconda della specie, infatti nel bovino adulto, si presenta rosa chiaro, dalla consistenza dura e compatta. Le dimensioni variano in base al peso dell'animale, negli animali a peso corporeo elevato, il peso relativo della ghiandola è minore rispetto alle razze a peso corporeo inferiore. È maggiore in dimensioni nei bovini allevati in montagna rispetto a quelli cresciuti in allevamenti. Nei piccoli ruminanti, i lodi tiroidei sono di forma ellittica. Nel maiale, i lobi della tiroide sono di forma irregolare e allungata che si fondono in buona parte lungo la linea mediana. Nei Carnivori, la tiroide manca spesso dell'istmo e i lobi hanno forma ellissoidale con estremità posteriore spesso appuntita (Fig. 2).

La ghiandola tiroidea è avvolta in una capsula connettivale sottile derivante dalla lamina pre-tracheale. Da questa capsula originano trabecole e setti che costituiscono lo stroma della ghiandola. Nei ruminanti tale stroma è molto spesso da conferire alla ghiandola un aspetto lobulato. Il parenchima è formato da numerosi follicoli tiroidei, ciascuno dei quali rappresenta un'unità morfo-funzionale (Fig.3). contenente la colloide secreta dalle cellule follicolari.

La sostanza colloide è formata principalmente dalla tireoglobulina, una glicoproteina (650Kd), contenente glucosamina, galattosio mannosio e radicali tirosinici. Nei preparati istologici, la colloide si colora con il PAS (reagente che evidenzia i polisaccaridi) perché contiene esosamine e vari carboidrati [Barone e Simoens, 2012].

Lo iodio assorbito a livello intestinale oppure derivante dal catabolismo degli stessi ormoni tiroidei, circola nel sangue sotto forma di ioduro; quest'ultimo captato dal polo basale delle cellule follicolari viene assorbito da quest'ultime.

Nel citoplasma delle cellule e nel lume del follicolo lo ioduro viene ossidato in ioduro metallico molecolare. Il 90% dello iodio tiroideo è in forma organica. Lo iodio viene legato nella zona apicale delle cellule follicolari; la tireoglobulina così formata viene escretata per esocitosi nel lume follicolare all'interno della colloide. Il colloide viene poi di volta in volta riassorbito dalle cellule follicolare che tramite gli enzimi lisosomiali idrolizzano la globulina e liberano gli ormoni tiroidei (T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>). Quest'ultimi vengono riversati nel torrente ematico legati a globuline o albumine, formando così una riserva prontamente utilizzabile circolante.

La semivita della tiroxina circolante è molto lunga, circa una settimana. Infine gli ormoni tiroidei vengono metabolizzati dal fegato ed escreti con la bile. Altrimenti attraverso le vie urinarie.

Lo iodio contenuto negli alimenti viene velocemente assorbito dall'intestino, giunge alla tiroide che utilizza solo la quantità necessaria per la sintesi degli ormoni, il resto viene escreto fondamentalmente con le urine. Se l'introduzione alimentare è carente la tiroide sintetizza maggiormente T<sub>3</sub> che è sino a sette volte più attivo della forma T<sub>4</sub>. Mentre i prodotti iodati escreti con la bile possono dare vita ad un circolo entero-epatico venendo riassorbiti e reinviati alla tiroide.

L'attività tiroidea è notevolmente influenzata da fattori di origine ambientale, fotoperiodo, disponibilità alimentare, temperatura, e da fattori endogeni, in particolare le richieste energetiche dell'organismo. Queste informazioni vengono elaborate a livello di SNC e



convogliate all'ipotalamo. L'ipotalamo in tal caso può secernere il Fattore Liberante la Tirotropina (FRH) che stimola la ghiandola a liberare Ormone Tireostimolante (TSH) o tirotropina, che a sua volta incrementa l'attività tiroidea. Oppure l'ipotalamo, in caso contrario, può rilasciare somatostatina che ha effetto inibente sul rilascio pituario di TSH. Il rilascio di TSH o somatostatina è regolato da un sistema a feed-back basato sulla concentrazione sierica degli ormoni T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>.

Il TSH agisce aumentando il numero ed il volume delle cellule follicolari, incrementa i microvilli di quest'ultime, inoltre facilita la organizzazione dello iodio.

Gli ormoni tiroidei sono in grado di penetrare velocemente all'interno delle cellule attraverso la doppia membrana lipidica data la loro idrofobicità. Una volta penetrati si legano a proteine citoplasmatiche aumentando così la concentrazione intracellulare. A seguito del legame tra la membrana nucleare e la T<sub>3</sub> si deprimono delle catene di DNA determinando così la sintesi proteica cellulare. Inoltre altri recettori specifici per gli ormoni tiroidei si trovano sui mitocondri e determina l'innalzamento dei processi ossidativi. Il potenziamento dei mitocondri corrisponde ad una maggiore sintesi e consumo di ATP, con produzione conseguente di energia e calore.

Per i succitati motivi l'azione degli ormoni tiroidei è rispetto all'organismo ubiquitaria coinvolgendo l'attività metabolica in toto.

Un effetto immediato è l'aumento dell'ingresso cellulare di glucosio ed aminoacidi, che a sua volta incrementa notevolmente il metabolismo basale, portando così ad una produzione di calore ed un aumentato consumo di ossigeno. All'aumento del metabolismo basale corrisponde una maggior disponibilità di metaboliti, dovuto ad un incremento dell'assorbimento intestinale di carboidrati, a glicogenolisi e gluconeogenesi.

Anche il metabolismo dei lipidi risulta notevolmente aumentato, avremo così una diminuzione delle riserve e adipose, e dei tassi plasmatici di trigliceridi, fosfolipidi e colesterolo.

Il metabolismo proteico viene altresì aumentato, in particolare la sintesi enzimatica, ma parimenti viene innalzato anche il loro catabolismo.

Gli ormoni tiroidei innalzano pure l'attività cardiovascolare aumentando la gittata e la frequenza cardiaca. Inoltre anche l'attività riproduttiva risulta essere influenzata da tali ormoni che nella femmina stimolano la sintesi di recettori per le gonadotropine ipofisarie (FSH e LH) e nel maschio sono fondamentali per una corretta spermatogenesi.

## 2.2 Urocortina

L' Urocortina (UCN) è un peptide di 40 amminoacidi ed è un membro della famiglia dei peptidi correlati al "Corticotropin-Releasing Hormone" (CRH) a cui appartengono anche urotensina 1, sauvagine, UCN2 e UCN3. Vaughan e collaboratori (1995) furono i primi ad identificare UCN, che mostrava il 45% di omologia con il CRH. Come il CRH, UCN può stimolare la produzione di ormone adenocorticotropo (ACTH) dall' *ipofisi anteriore*. UCN è più efficace del CRH riguardo gli altri effetti biologici inclusi la soppressione della fame, ma è meno potente nel generare ansia. Qualche anno dopo la scoperta del UCN, furono isolati nei mammiferi altri due peptidi CRH correlati. UCN2 ("stresscopin-related peptide") è un peptide di 38 amminoacidi con un'estremità C-terminale amidata e fu per la prima volta scoperta nel topo da un gene codificante una proteina di 112 amminoacidi. Successivamente fu identificata nell'uomo l'UCN3 che mostrava un' omologia maggiore dell'80% con UCN2. L'UCN è stata trovata espressa in molte regioni del sistema nervoso centrale (SNC), anche in siti in cui risultava assente il CRH [C.Iavazzo et al. 2008]. L'UCN è un potente modulatore dell'attività neuroendocrina e del comportamento relativo a condizioni di stress eccessivo. Alcuni studi hanno dimostrato che CRH e UCN, nonostante siano non sempre presenti negli stessi siti, giocano entrambe un ruolo specifico nei vari processi di adattamento allo stress. [Kozicz et al.2007]. L'UCN è correlata alla condizione di riduzione dell'appetito oltre ad influenzare la pressione arteriosa con aumento della contrattilità cardiaca. Inoltre, è stato visto che UCN è coinvolta nella manifestazione di condizioni come ansia, patologie infiammatorie gastrointestinali, artrite reumatoide, infarto. È stato proposto che l'UCN può avere un ruolo fisiologico anche nell' endometrio, miometrio, placenta e ovaie [Florio et al.2004] e nell'apparato genitale maschile come testicolo e epididimo [Lee et al., 2011; Tezval et al., 2009]. Il gene umano dell'UCN è localizzato a livello del cromosoma 2p23-2p21 ed è costituito da due esoni. L'esone 1 codifica esclusivamente per la regione non tradotta 5', mentre l'intera regione codificante è localizzata nell'esone 2. Questa organizzazione appare analoga a quella del gene che codifica per CRH, avvalorando l'ipotesi che queste due molecole abbiano origine da una duplicazione genica. Una struttura analoga è stata trovata anche a livello di geni codificanti per l'urocortina in altre specie animali, come ad esempio il ratto. Al contrario la struttura dei geni dell'UCN2 e UCN3 non è stata ancora ben

deteterminata nelle diverse specie. Nell'uomo, i geni codificanti per l'UCN2 e UCN3 sono stati identificati rispettivamente a livello del cromosoma 3p21.3 e 10p15.1. sono relativamente poche le informazioni note sulla regolazione trascrizionale di tali geni. A tale proposito, è noto uno studio sul clonaggio di due sequenze di 3.2 e 2.3 kb affiancate alla regione 5' rispettivamente nel topo e nell'uomo e sono stati identificati una TATA box e sequenze consenso per ap1, Brn-2, C/EPB, GATA e cREB con sequenze promoter simili sia nel topo che nell'uomo. Studi di tipo funzionale hanno inoltre dimostrato che l'adenosina monofosfato ciclico è in grado di stimolare l'attività del promoter, attivando il processo di trascrizione genica. Osservazioni in vitro su cardiomiociti di ratto hanno inoltre evidenziato che l'ischemia miocardica costituisce un potente stimolo alla sintesi e al rilascio di UCN, con un notevole incremento della concentrazione intracellulare di RNA messaggero codificante il pro-ormone e un' aumentata concentrazione del peptide maturo nel mezzo di coltura [Brar BK et al.1999].

### **2.3 Corticotrophin-Releasing Hormone Receptor1 e 2 (CRHR1 e CRHR2) e Corticotrophin-Releasing Hormone–Binding Protein (CRHBP )**

L'UCN e i peptidi correlati al CRH esercitano la loro attività biologica legandosi a due tipi di recettori, CRHR1 e CRHR2. Questi recettori appartengono alla superfamiglia di recettori associati a proteine G e con sette domini trans membrana [Perrin et al 1993; Vita et al.1995; Chen et al.; Perrin et al.2006]. Due geni diversi codificano per i recettori del CRH. CRHR1, una proteina di 415 amminoacidi, mostra un'alta affinità verso CRH e UCN ma una bassa affinità verso UCN3. CRHR1 è principalmente espresso nel sistema nervoso centrale (SNC), e nell'ipofisi anteriore. Il CRHR2 presenta il 70% di identità di sequenza con CRHR1 che è espresso principalmente al di fuori del SNC. Il recettore CRHR2 mostra un'alta affinità verso le diverse UCN e non mostra affinità per CRH (Fig. 4). L' attivazione del CRHR2 sopprime molte funzioni metaboliche, includendo il senso di fame, il calore indotto da edema e rallenta lo svuotamento gastrico [Bale et al. 2000; Kishimoto et al 2000]. CRHR1 e CRHR2 sono localizzati rispettivamente sui cromosomi 17q12-q22 e 7p21-p15 ed entrambi sono espressi come numerose isoforme. Tutte le isoforme sono costituite, come detto precedentemente, da recettori associati a proteine G di tipo stimolatorio e possiedono sette domini transmembrana con conformazione ad elica, ma si differenziano per le diverse caratteristiche del legame alle corrispondenti proteine G. Entrambe le classi di recettori sono altamente conservate tra le specie. La regione N-terminale, in entrambe le classi di recettori è importante per il legame

anche se i domini selettivi per il ligando nel CRHR1 e nel CRHR2, sono stati individuati in diverse regioni extracellulari. CRH e UCN legano sia CRHR1 che CRHR2, anche se CRHR2 ha maggiore affinità per l'UCN. Alcune isoforme di CRHR1 mancano di particolari esoni N-terminali e di conseguenza, mostrano una ridotta capacità di legare il CRH. Le UCN2 e 3 legano esclusivamente il CRHR2 anche se l'UCN3 lo fa con un'affinità 10 volte inferiore rispetto all'UCN2 (Fig. 4). Entrambi i recettori trasmettono il segnale attraverso vie di trasduzione che comprendono enzimi ad attività proteinchinasi e il calcio intracellulare [Grammatopoulos 2011]. In generale, CRHR1 e CRHR2 mostrano una diversa distribuzione anatomica, essendo CRHR1 prevalentemente espresso a livello dell'encefalo e dell'ipofisi, mentre le isoforme del CRHR2 si ritrovano sia nelle regioni cerebrali che in alcuni organi periferici con livelli d'espressione diversi. Nell'encefalo la distribuzione di CRHR1 e CRHR2 presenta una parziale sovrapposizione, mostrando una moderata densità a livello dei nuclei dorsale e mediano del rafe, ma solo bassi livelli nei nuclei ipotalamici paraventricolari. I recettori CRHR1 sembrano essere i mediatori esclusivi degli effetti del CRH sulla produzione di ACTH (ormone adrenocorticotropo) [Van Pett et al.2000]. Le isoforme di CRHR2 sono le uniche ritrovate nel sistema cardiovascolare. Esse sono espresse, infatti, sulle cellule endoteliali e sulle cellule muscolari lisce dei vasi, dove la loro attivazione può determinare una riduzione della neoangiogenesi e vasodilatazione. Il CRHR2 è stato ritrovato anche a livello del cuore, dove viene espresso a livello di entrambe atri e ventricoli. Alcune citochine come interleuchina -1, e il fattore di necrosi tumorale- $\alpha$ , così come la condizione di digiuno, sembrano associate ad una riduzione dell'espressione del CRHR2 nel cuore del ratto, mentre l'espressione di CRHR2 risulta incrementata nei cuori di ratti spontaneamente ipertesi. Il ruolo di CRHR2 e dei suoi ligandi nell'ipertensione arteriosa rimane tuttavia da stabilire, in quanto l'induzione di uno stato ipertensivo attraverso un sovraccarico di sodio si associa ad una riduzione inaspettata dell'espressione di CRHR2 [Raddino et al., 2007]. Gli effetti biologici dell'UCN e di altri ligandi relativi a CRH, sono mediati e controllati non solo dai recettori del CRH ma anche dalla CRH-binding protein (CRHBP). La CRHBP è una glicoproteina di 37 kDa identificata non solo nei mammiferi, ma anche in altre categorie di vertebrati come pesci, anfibi e uccelli, facendo avanzare l'ipotesi che questa possa essere una proteina con struttura e funzione conservate nelle varie specie. Essa fu isolata per la prima volta dal plasma umano, e poi, fu trovata in diverse aree del cervello di ratto inclusa l'ipofisi anteriore [Potter et al., 1992; Peto et al., 1999]. Essa si distingue dai recettori del CRH e lega il CRH umano e UCN con uguale o maggiore affinità rispetto agli stessi recettori. La principale funzione di CRHBP è quella di modulare l'accesso di CRH verso CRHRs

[Seasholz et al., 2001]. L'espressione di UCN e dei CRHRs non è limitata solo al cervello, ma, come recenti studi hanno dimostrato, è presente l'mRNA codificante le diverse UCN e i loro recettori, nell'apparato digerente, circolatorio, genitale, immunitario ed endocrino; ciò implica l'ipotesi di un importante ruolo regolatorio di questi peptidi, in tutto l'organismo [Oki and Sesano 2004; Yang et al 2010; Venkatasubranian et al 2012; Squillacioti et al 2011]. UCN e i suoi recettori sono stati ritrovati anche nella ghiandola tiroidea di cavallo [Squillacioti et al., 2012] come tessuto normale mentre UCN e UCN3 sono stati ritrovati espressi nei carcinomi midollari della tiroide. L'immunoreattività al CRH, inoltre, è stata rilevata nelle lesioni autoimmuni e neoplastiche della tiroide come ad esempio nella tiroidite di Hashimoto, nelle neoplasie e nei gozzi, evidenziando che la presenza del CRH può essere direttamente o indirettamente coinvolta nel processo infiammatorio che si sviluppa in questa ghiandola [Scopa et al., 1994].

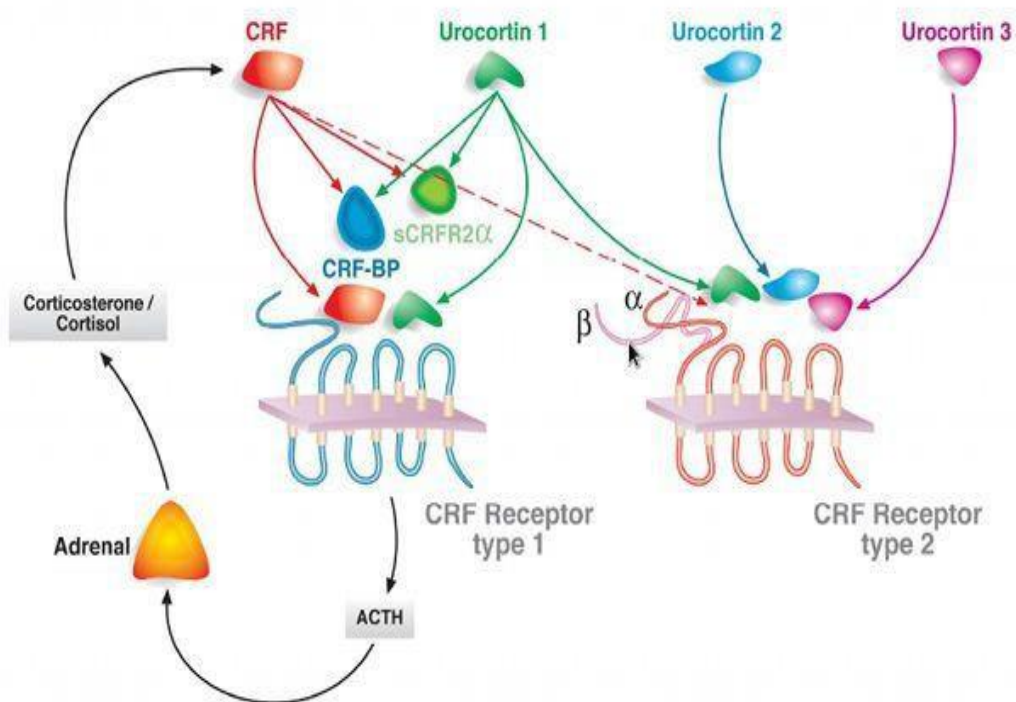


Fig. 4 Rappresentazione schematica delle interazioni tra l'urocortina e i recettori CRHR1 e CRHR2.

### **3. SCOPO DELLA TESI**

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è contribuire alla conoscenza riguardante il ruolo biologico dei peptidi della famiglia del CRH nel circuito locale di regolazione della sintesi ormonale da parte della tiroide. Sistemi di regolazione locale basati sull'UCN e i recettori CRHR1 e CRHR2 sono stati in precedenza osservati nel surrene bovino e nella ghiandola tiroidea di cavallo. Sono, pertanto, necessari studi volti ad individuare l'eventuale presenza di un sistema urocortinergico e una migliore comprensione delle caratteristiche strutturali e funzionali di queste proteine nella ghiandola tiroidea di bovino.

A tale scopo questo lavoro di tesi è stato rivolto alla realizzazione dei seguenti obiettivi:

- 1) Studiare la presenza delle proteine UCN, CRHR1, CRHR2 e CRHBP mediante tecniche di immunoprecipitazione e Western blot;
- 2) Studiare la distribuzione di queste proteine al fine di individuare i tipi cellulari immunoreattivi mediante tecniche di immunistochemica;
- 3) Studiare l'espressione degli mRNA relativi a queste proteine mediante tecniche di RT-PCR.

## **4. RISULTATI OTTENUTI DAL CANDIDATO**

### **4.1 Immunoprecipitazione e Western-Blot**

I risultati dell'analisi di immunoprecipitazione e Western blot sono mostrati nella figura 5. Gli estratti proteici di tiroide e di midollare del surrene di bovino hanno reagito con gli anticorpi anti-UCN, -CRHR1 e -CRHR2. La midollare del surrene è stata utilizzata come controllo positivo del sistema insieme al peptide sintetico. Gli estratti tissutali e il peptide UCN sintetico hanno reagito con l'anticorpo anti-UCN. L'anticorpo ha riconosciuto una banda proteica di circa 16 kDa nel tessuto tiroideo e una banda proteica di circa 6.5 kDa dal peptide sintetico. L'estratto di tessuto tiroideo ha anche reagito con l'anticorpo anti-CRHR1 e l'anti-CRHR2. L'anticorpo ha riconosciuto una banda proteica che misura circa 55 kDa. È stato fatto un'altro esperimento considerando alcuni tessuti di bovino, compresa la tiroide per valutare anche l'espressione della CRHBP. Tuttavia, nel tessuto tiroideo, nel fegato e nel siero bovino non è stata riscontrata nessuna banda. Il controllo positivo della CRHBP è rappresentato dalla corteccia cerebrale bovina, in cui si sa essere espressa la CRHBP ad alti livelli.



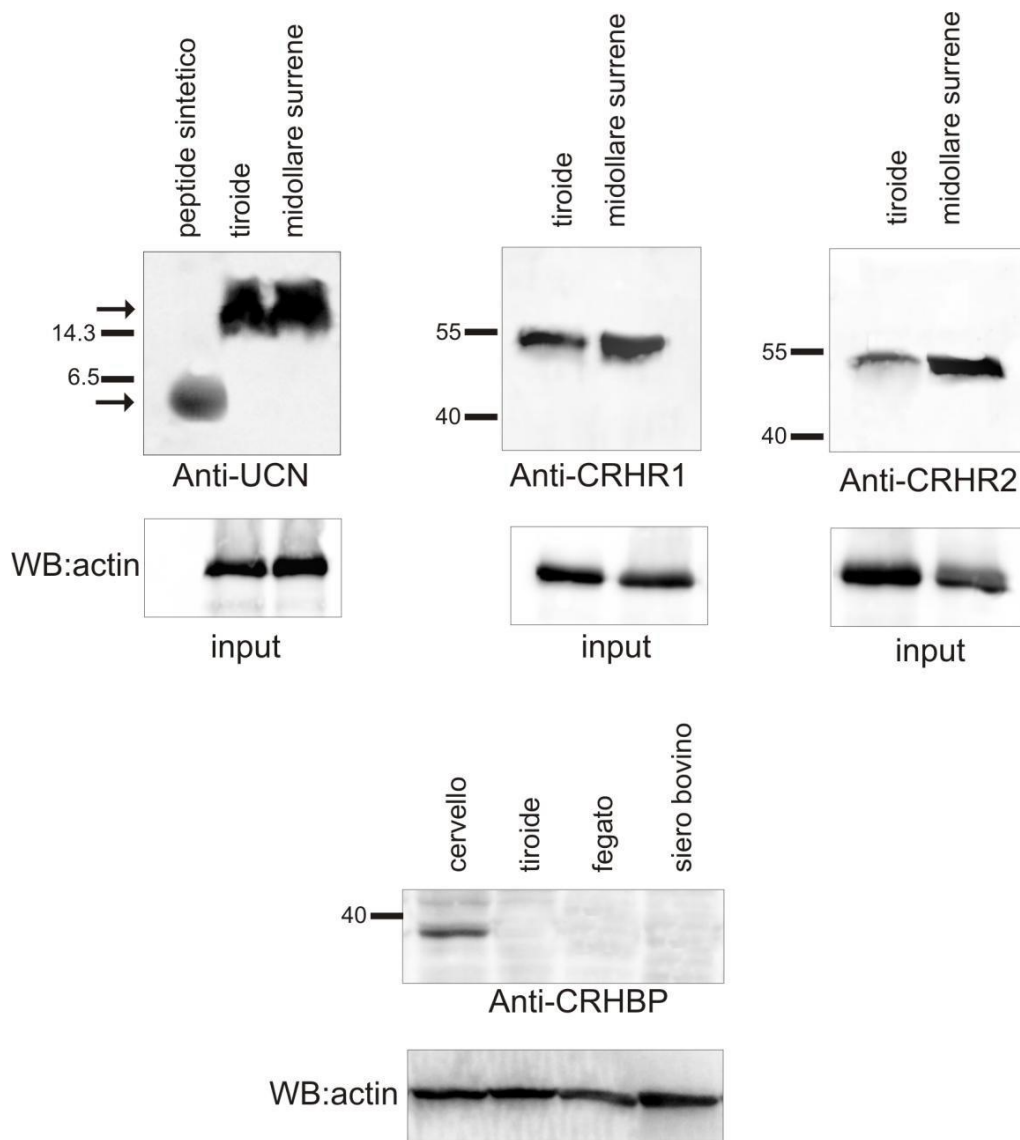
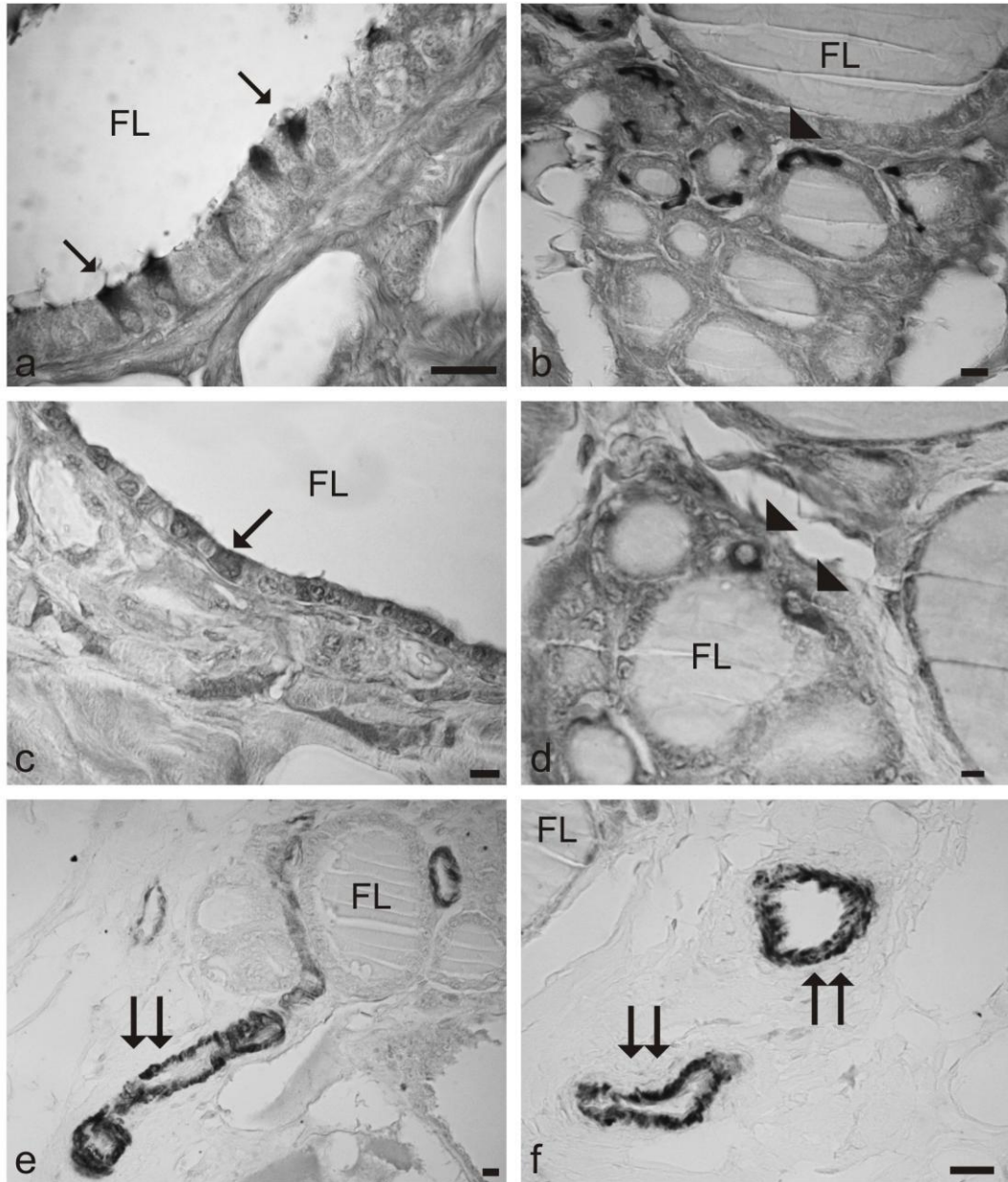


Fig.5 Espressione di UCN, CRHR1, CRHR2 attraverso Western blot. I tessuti estratti sono stati immunoprecipitati e immunoblottati con anti-UCN, -CRHR1, -CRHR2; il peptide sintético UCN e la midollare del surrene bovino, sono utilizzati come controlli positivi.

## **4.2 Immunoistochimica**

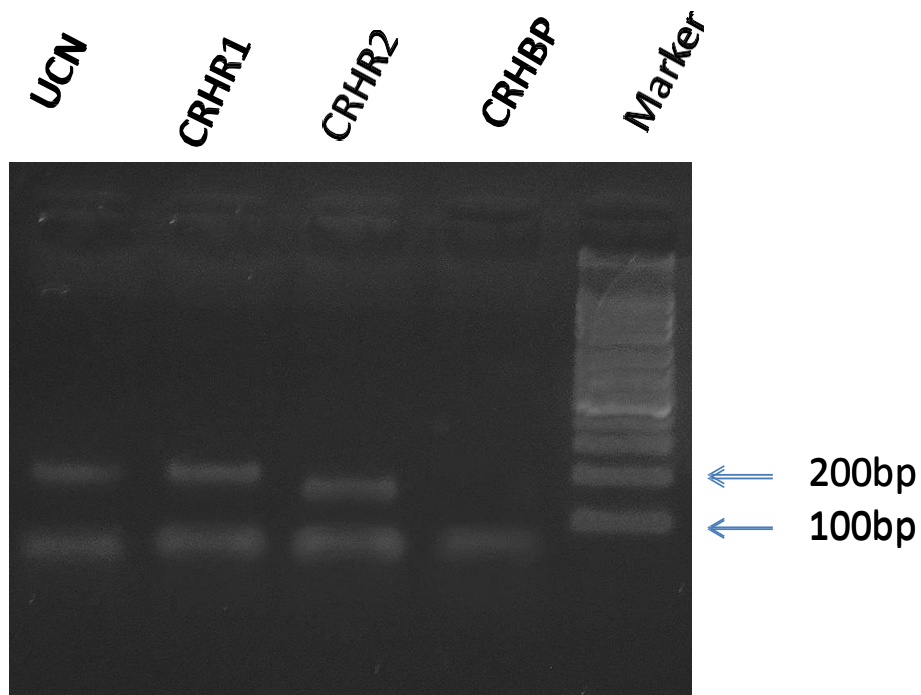
Nella ghiandola tiroidea del bovino, l'immunoreattività (IR) all'UCN è stata trovata nelle cellule follicolari e nelle cellule parafollicolari (Fig. a, b). La distribuzione della CRHR2-IR è simile a quella dell'UCN (Fig. c, d). Le cellule follicolari sono cellule cilindriche e che raggiungono sempre il lume del follicolo, mentre le cellule parafollicolari hanno una morfologia diversa in quanto appaiono più grandi, di forma irregolare e non sempre raggiungono il lume del follicolo. Inoltre, le cellule parafollicolari si possono ritrovare anche negli spazi interfollicolari. La distribuzione dell'CRHR1-IR è completamente diversa in quanto si localizza in modo particolare nella muscolatura liscia dei vasi sanguigni (Fig. e, f). Inoltre, sono stati effettuati diversi esperimenti di immunoistochimica per la CRHBP ma non è stata osservata immunopositività a questa proteina.



*Fig.6 Distribuzione dell' immunoreattività all' UCN(a, b), CRHR1(e, f) e CRHR2(c, d) nella tiroide bovina. UCN e CRHR2 sono espressi nelle cellule follicolari e parafollicolari. CRHR1 è espresso prevalentemente nella muscolatura liscia vascolare. FL Lume del follicolo tiroideo; ↑ cellule follicolare; ▲ cellule parafollicolari; ↑↑ vasi sanguigni. Barra 20µm.*

### 4.3 Analisi RT-PCR

Gli esperimenti di RT-PCR dimostrano che gli mRNA di UCN, CRHR1 e di CRHR2 sono normalmente espressi nella tiroide bovina, mentre l' mRNA di CRHBP non è espresso.



*Fig.7 La prima banda in figura mostra l'UCN con un frammento di 177 bp, la seconda banda mostra CRHR1 con una banda di 200 bp e la terza banda rappresenta CRHR2, amplificato di 230 bp. Il quarto canale è la CRHBP, che non ha dato prodotti di amplificazione e nel quinto canale c'è il marker di peso molecolare 100bp ladder Microtech.. Le bande presenti su i quattro canali al fondo rappresentano i dimeri di primers non annilati.*

## 5. DISCUSSIONE

I risultati del presente studio dimostrano la presenza della proteina e degli mRNA di UCN, CRHR1 e CRHR2 nella tiroide di bovino. Nel presente lavoro sono stati utilizzati diversi approcci sperimentali in modo da dimostrare la presenza della proteina mediante le tecniche di immunoprecipitazione e Western blot, la localizzazione e distribuzione mediante tecniche di immunistochemica. Inoltre, l'espressione dei relativi mRNA è stata analizzata mediante tecniche di RT-PCR.

Gli esperimenti di RT-PCR dimostrano che gli mRNA di UCN, CRHR1 and CRHR2 sono espressi nella tiroide di bovino mentre l'mRNA di CRHBP non è espresso confermando i risultati dello studio immunistochemico. Studi precedenti hanno dimostrato la presenza di un sistema urocortinergico nella tiroide di cavallo [Squillacioti et al., 2012] e in altre ghiandole endocrine come il surrene [Squillacioti et al., 2011; Dermitzaki et al, 2007], l'ovaio [Muramatsu et al, 2001] e il testicolo [Lee et al, 2011].

I risultati dell'immunoprecipitazione e Western blot dimostrano che l'anticorpo anti-UCN utilizzato in questo studio riconosce una banda proteica dal peso molecolare di circa 16 kDa negli estratti di tessuto tiroideo. Questa proteina si può riferire ad un precursore dell'UCN, che è composto da 122 residui amminoacidici [Vaughan et al, 1995; Donaldson et al, 1996; Squillacioti et al, 2011]. Gli anticorpi anti-CRHR1 e -CRHR2 riconoscono una banda proteica dal peso molecolare di circa 55 kDa. Queste proteine si possono riferire ai recettori per il CRH [Perrin et al, 2006; Chen et al, 1993]. Inoltre, l'anticorpo anti-CRHBP non riconosce nessuna banda negli estratti di tiroide, nel fegato e nel siero plasmatico mentre riconosce una banda negli estratti di cervello di bovino. La proteina CRHBP è stata ritrovata nel cervello e nella ghiandola pituitaria di diverse specie di mammiferi [Potter et al. 1992; Baigent and Lowry 2000; Cortright et al. 1995; Behan et al. 1996; Peto et al. 1999] e nel siero plasmatico dell'uomo [Orth & Mount, 1987] mentre è assente nel siero dei roditori e di cavallo [Potter et al. 1991, 1992; Ellis et al. 1994]. CRHBP è un importante modulatore dell'attività del CRH o dell'UCN. Infatti in assenza della CRHBP, CRH ed altri peptidi ad esso correlati non sono legati aumentando quindi la bioattività o biodisponibilità del CRH e dell'UCN. D'altra parte, non si può escludere che nel bovino ci possa essere un altro sistema di modulazione della bioattività dell'UCN indipendentemente dalla CRHBP.

L'analisi immunistochemica dimostra che le immunoreattività all'UCN e al CRHR2 si trovano nelle cellule follicolari e parafollicolari della tiroide di bovino. E' noto che le

cellule follicolari sono responsabili della captazione dello iodio e quindi della sintesi degli ormoni tiroidei. La sintesi di tiroxina e triiodotironina è stimolata dall'ormone ipotalamico TRH (“thyrotropin-releasing hormone”) e da un'ormone ipofisario, il TSH (“ thyroid stimulating hormone”). Le cellule parafollicolari sono responsabili della sintesi della calcitonina, un ormone coinvolto nell'omeostasi del calcio. La principale funzione della calcitonina è l'abbassamento della concentrazione di calcio nel sangue ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e di fosforo contrastando gli effetti dell'ormone paratiroideo paratormone. I risultati del presente studio suggeriscono quindi un coinvolgimento per UCN nella secrezione sia degli ormoni tiroidei da parte dei tireociti e sia nella secrezione di calcitonina da parte delle cellule C mediante un meccanismo di tipo autocrino utilizzando il recettore CRHR2 che è comunque espresso nei due tipi cellulari. Non si può comunque escludere che l'UCN prodotta dai tireociti o dalle cellule C possa interagire mediante un meccanismo paracrino con il CRHR2 dei tireociti o delle cellule C. D'altra parte, altri ligandi del CRHR2 come UCN2 e UCN3 potrebbero anche interagire con questo recettore nella regolazione dell'attività delle cellule follicolari e parafollicolari. Queste ipotesi possono essere supportate da osservazioni che dimostrano che le cellule parafollicolari oltre alla secrezione della calcitonina sono capaci di secernere anche diversi peptidi regolatori di cui alcuni tipo serotonina, “gastrin-releasing peptide” (GRP) , elodermina sembrano essere degli stimolatori locali della funzione tiroidea ed altri come somatostatina, TRH, “calcitonin gene-related peptide” (CGRP) sono invece inibitori [Ahren et al, 1989; Ahren et al, 1991 ]. Le cellule follicolari sono capaci di secernere peptidi regolatori, fattori di crescita che agiscono come fattori autocrini o paracrini come ad esempio l'IGF (“Insulin growth factor”) ed esprimono recettori per diverse sostanze come somatostatina e serotonina [review Eggo et al., 2003; Tamir et al, 1992; Tamir et al, 1996; Ain et al, 1997]. Inoltre GHrelina e TRH, altri due peptide regolatori che intervengono nel controllo ipotalamico della funzione tiroidea attraverso il TSH sono anche espressi dalle cellule parafollicolari [Gkonos et al, 1989; Korbonis et al, 2001; Raghay et al, 2006]. Linee di cellule parafollicolari umane e di ratto esprimono il recettore per il TSH sia la proteina che l'mRNA. Questi dati dimostrano che le cellule parafollicolari sotto la regolazione del TSH sono coinvolte nell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide e suggeriscono un ruolo per queste sostanze nella regolazione locale dell'attività della cellula follicolare [Morillo-Bernal et al, 2009]. Recentemente è stato osservato che esiste un'interazione locale tra cellule follicolari e parafollicolari mediata dal rilascio di ormoni peptidergici o neuropeptidi [Morillo-Bernal et al, 2009, 2011].

L'immunoreattività al CRHR1 è stata osservata nella muscolatura liscia dei vasi sanguigni suggerendo un ruolo per l'UCN nel regolare il flusso sanguigno della ghiandola tiroidea. Questa ipotesi è supportata da altre osservazioni che dimostrano che l'UCN è un fattore vasodilatatore delle arterie sia nel ratto [Adelramanian et al, 2005; Lubomirov et al, 2001] che nel topo [Lubomirov et al, 2006]. Il flusso sanguigno della tiroide insieme al TSH regolano in realtà la captazione di iodio da parte della ghiandola tiroidea [Arntzenius et al, 1991; Ingbar et al, 1986]. Lo iodio è un elemento fondamentale per la produzione degli ormoni tiroidei. Alterazioni, infatti, nella regolazione di questi meccanismi possono causare cambiamenti nella produzione di ormoni tiroidei e la regolazione della captazione di iodio è molto importante per l'attività della ghiandola tiroidea.

In conclusione, i risultati del presente studio dimostrano che UCN, CRHR1 e CRHR2 sono espressi nella ghiandola tiroidea di bovino e che esiste un sistema regolatorio locale delle funzioni tiroidee basato sull'UCN e i recettori per il CRH. L'UCN svolge un ruolo nella regolazione del flusso sanguigno di questa ghiandola mediante il recettore CRHR1 e della sintesi degli ormoni tiroidei (tiroxina, triiodotironina e calcitonina) mediante il recettore CRHR2. Inoltre la biodisponibilità dell'UCN in questo sistema regolatorio sembra non dipendere dalla proteina CRHBP che risulta non essere espressa nella tiroide di bovino.

## **6. MATERIALI E METODI**

### **6.1 Animali e tessuti**

Questo studio è stato condotto su sei bovini adulti, in buona salute, di entrambe i sessi, dalla stessa azienda del Sud Italia. Gli animali sono stati allevati in condizioni naturali. Gli animali sono stati sacrificati in un macello pubblico in accordo con la normativa vigente in Italia. Le ghiandole tiroidee di questi animali sono state prelevate. Inoltre sono stati prelevati anche il surrene e parte della corteccia cerebrale, che sono stati utilizzati come controlli positivi. Per l'analisi di Western-blot ed RT-PCR i campioni immediatamente congelati in azoto liquido e poi sono stati conservati a -80°C. Per l'analisi immunocistochimica i pezzi sono stati immediatamente fissati.

### **6.2 Immunoprecipitazione e Western-blot**

I tessuti congelati sono stati omogenati in un buffer di omogeneizzazione (50mM TRIS-HCl pH 7.0, 150mM NaCl, 2% Triton, 5mM EDTA, 10 µg/ml leupeptina, 0,1 U/ml aprotina, 1mM PMSF-fenil metano suffonilfluoruro) mediante un omogeneizzatore Ultra-Torrax e poi centrifugati a 16.000 rpm per 20 minuti a 4° C. Il surnatante è stato determinato per la rispettiva concentrazione di proteina mediante saggio proteico con metodo di Bradford e reattivo Biorad. La stessa quantità di proteine è stata immunoprecipitata, per ogni campione, con anticorpo anti-UCN -CRHR1 e -CRHR2 (1 µg anticorpo/200 µg di proteina) per tutta la notte a 4° C e con sferette di sefariosio ricoperte di proteina A/G. Un'aliquota di estratti proteici (50 µg) è stata analizzata mediante SDS-PAGE e poi blottata con anticorpo anti-actina come controllo di caricamento. Gli immunoprecipitati sono stati lavati con buffer di omogeneizzazione freddo. Gli immunoprecipitati sono stati risospesi in un buffer con sodio dodecyl solfato (SDS): (2% SDS, 5% L-mercaptoetanol, 66 mM TRIS pH 7.5, 10 mM EDTA) e poi sono stati separati su un gel di poliacilammide al 18% o al 12%. Dopo l'elettroforesi, il gel è stato trasferito su un foglio di nitrocellulosa attraverso l'uso dell'apparato Bio-Rad, per il trasferimento, secondo le istruzioni della casa produttrice. La membrana (blot) è stata incubata per 1 ora a 42° C in albumina sierica bovina al 5% (BSA; Sigma, St. Louis, Mo., USA) in TBST (150mM NaCl, 20 mM TRIS HCl pH 7.4, 0.3% Tween-20). Dopo questa incubazione, la membrana, è stata lavata in TBST e incubata per 2 ore a temperatura ambiente in un anti-siero diluito 1:500 in TBST contenente 1% di BSA. Gli anticorpi usati sono: un anti-UCN policlonale prodotto in capra, (sc-1825; Santa Cruz



Biotechnology, Calif., USA), anti-CRHR1 in capra (sc-12383; Santa Cruz Biotechnology), un anti-CRH2 in capra (sc-1826; Santa Cruz Biotechnology), un anti-CRHBP in coniglio (SAB1300862; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) e un anticorpo monoclonale anti-actina in topo (JLA20 CP01; Calbiochem, San Diego, Calif.; USA). La membrana di nitrocellulosa è stata poi lavata tre volte con TBST e incubata per 1 ora con anticorpo secondario diluito 1:2000 in TBST-1% BSA. Gli anticorpi secondari utilizzati sono: un anti-IgG di capra o un anti-IgG di coniglio o anti-IgG di topo coniugati con per ossidasi. Le proteine sono state visualizzate con un kit di chemiluminescenza (ECL) (Amersham, bucking-hamshire, UK). Le proteine di peso molecolare standard, ossia il marker, (coloured protein molecular weight markers; Prosieve, Lonza) sono state usate per stimare il peso molecolare di ciascuna banda. In questi esperimenti, il tessuto della midollare del surrene e della corteccia cerebrale bovina sono stati utilizzati come controlli positivi. Per il controllo anti-actina del Western blot anti-CRHBP la membrana di nitrocellulosa è stata immersa in una soluzione di “stripping” ( NaCl 0,5 M, Acido acetico 0,5 M ,pH 2 per 5 min a temperatura ambiente) per rimuovere il vecchio segnale antigene-anticorpo e poterla blottare nuovamente. Dopo l’incubazione nella soluzione di stripping, il blot è stato neutralizzato con una soluzione basica e poi lavato in TBST in modo da ricominciare il western blot con l’anticorpo anti-actina.

### **6.3 Immunoistochimica**

Frammenti freschi di tessuto, sono stati fissati in liquido di Bouin (6-24 ore) a temperatura ambiente. I campioni sono stati inclusi in paraffina e poi tagliati al microtomo per ottenere sezioni di 5-6µm. La tecnica immunoistochimica utilizzata si basa sul metodo ABC che sfrutta la tecnologia streptoavidina-biotina. Il metodo ABC è stato eseguito utilizzando il kit “Vectastain Elite ABC reagent”. Le sezioni di tessuto sono state sparaffinate in xilolo ed idratate mediante passaggi in soluzioni a concentrazioni discendenti di alcool etilico. Per eliminare l’attività delle per ossidasi endogene, le sezioni sono state incubate con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo l’incubazione le sezioni sono state lavate con tampone fosfato (PBS), incubate con il siero normale di capra o di coniglio diluito in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente con gli anticorpi primari per tutta la notte a 4°C. Gli anticorpi primari usati sono stati anti-UCN (diluito 1:500; sc-1825; Santa Cruz Biotechnology), un anti CRHR1 in capra (diluito 1:500; sc-12383; Santa Cruz Biotechnology), un anti- CRHR2 in capra (diluito 1:500; sc-1826; Santa Cruz Biotechnology); un anti-CRHBP in coniglio (diluito 1:500; SAB1300826). Successivamente

le sezioni sono state lavate con PBS e poi incubate con anticorpi secondario biotinilato, diluito 1:200 in PBS per 30 minuti a temperatura ambiente. Gli anticorpi secondari sono stati: anti goat o anti-rabbit IgG biotinilati, (diluiti 1:200; Vector). Le sezioni dopo altri lavaggi in PBS, sono state incubate con il reagente ABC preparato secondo le indicazioni della ditta e nuovamente incubate a temperatura ambiente per 30 minuti. La reazione è stata sviluppata incubando le sezioni in un substrato cromogeno, ossia una soluzione di amino benzidina (DAB) per 5 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni così colorate sono state infine lavate con acqua distillata, disidratate mediante passaggi seriali in soluzioni crescenti di alcool etilico e xilolo. La specificità degli anticorpi è stata testata mediante l'omissione dell'anticorpo primario e mediante l'adsorbimento con antigene omologo ed eterologo. In questo caso è stato utilizzato, come controllo il metodo di adsorbimento con antigene omologo, che consiste nel'aver testato l'anticorpo primario, incubandolo con eccesso di antigene che è rappresentato dal peptide immunogeno con cui è stato stimolato l'animale a produrre anticorpi. Generalmente viene usata una quantità di circa 50 volte superiore di antigene rispetto alla quantità in  $\mu\text{g}$  di anticorpo. L'antigene è presente su delle sferette che satureranno i siti di legame dell'anticorpo specifico. Vengono lasciati ad incubare per tutta la notte a  $4^{\circ}\text{C}$  in una eppendorf. Successivamente solo due vetrini sono trattati con questo complesso antigene-anticorpo, che sarà saturo e non legherà alcun antigene simile presente eventualmente sui vetrini trattati. Questo rappresenta un metodo per effettuare il controllo negativo di base, il giorno prima dell'inizio delle reazioni.

#### **6.4 Estrazione dell'RNA, sintesi di cDNA, RT-PCR e sequenziamento**

Campioni di tiroide congelati sono stati omogenizzati separatamente in TRI-reagent (Sigma) mediante un omogenizzatore Ultra-Turrax . Dopo l'estrazione mediante cloroformio, e la precipitazione mediante alcool isopropilico, l'RNA è stato risospeso in acqua trattata con DEPC ( Dietilpirocarbonato). L'RNA totale è stato quantizzato con un Biofotometro (Eppendorf, Basel, Switzerland) effettuando una lettura a 260 e 280 nm. Per la sintesi di cDNA,  $1\mu\text{g}$  di RNA totale è stato retro-trascritto con il kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem, USA) e utilizzando come primers dei random hexamers. Per le reazioni di PCR sono stati disegnati primers specifici di UCN, CRHR1, CRHR2, e CRHBP dalle sequenza geniche di bovino, pubblicate su GENE BANK, banca dati genomica, utilizzando il software specifico Primer Express (PE Applied Biosystems). Le sequenze dei primers forward e reverse per UCN utilizzati sono  $5'-\text{CGACCCTCCCCTGTCCAT}-3'$  e  $5'-$

TTCTGTGCTCCACGTCTCA -3' che hanno amplificato un frammento di 177 bp. I primers forward e reverse per CRHR1 sono 5'- GGGTGTACCTTTCCCATCA -3' e 5'- CCGGAGTTTGGTCATGAGGAT - 3' che amplificano un frammento di 200 bp. I primers per UCN e CRHR1 sono stati disegnati sulle loro rispettive sequenze geniche pubblicate su Pubmed (Bos taurus, mRNA dell'UCN con numero d'accesso alla Genebank, NM\_001032301; Bos taurus, mRNA del CRHR1 con numero d'accesso alla Genebank, NM\_174287). I primers specifici per CRHR2 sono stati disegnati , generando prima una sequenza non nota ma derivante da una serie di allineamenti multipli di sequenze pubblicate nella Genebank; queste sono: mRNA di CRHR2 di mus musculus, numero d'accesso NM\_009953, mRNA di CRHR2 di Homo sapiens, numero d'accesso NM\_001883, mRNA di CRHR2 di Rattus norvegicus numero d'accesso NM\_022714. I primers forward e reverse per CRHR2 sono 5'- GCTGTCTGCGGAACGTGATT -3' e 5'- CGAAGTAGTTGAAGATGGTGGTGAT - 3' con l'amplificazione di un frammento di 230 bp. I primers forward e reverse per CRHBP sono 5'- CAGACCCCAAACGGAAGGTT -3' e 5' -CAGGGCCACGAAAGGGATA - 3' che amplifica un frammento di 230 bp. Inoltre per verificare l'efficienza della RT-PCR ed escludere eventuali contaminazioni di DNA genomico, un frammento di cDNA di  $\beta$ -actina è stato amplificato e sequenziato con primers disegnati per sequenza contenenti un introne; i primers forward e reverse per la  $\beta$ -actina sono 5'-CAGCTCCTCCTCCCTGGAGAAGA - 3' e 5'-CTGCTTGCTGATCCACATCGT -3' che amplificano un frammento di 398 bp. Il profilo termico per l'amplificazione è il seguente: 94° C (30 s), 60° C (30 s), 72° C (1 minuto) per 35 cicli; 72° C (5 minuti). La PCR è stata realizzata mediante il kit AmplyTaq360 Polimerasy (1500U) dell'Applied Biosystem. La reazione di PCR contiene 1  $\mu$ l di cDNA e 2,5  $\mu$ l di buffer, 1,5  $\mu$ l di MgCl<sub>2</sub>, 0,25  $\mu$ l di primers a 25  $\mu$ M, 2  $\mu$ l di dNTPs (nucleotidi trifosfato), 0,25  $\mu$ l di Taq polimerasi, 17,5  $\mu$ l di acqua per portare ciascun campione a volume di 25  $\mu$ l. Un campione privo di cDNA è stato utilizzato come controllo per verificare eventuali contaminazioni della mix. I prodotti della PCR sono stati corsi su gel di agarosio all'1,5% e sono stati visualizzati sotto luce UV. I prodotti di PCR di UCN, CRHR1, CRHR2 di bovino sono stati purificati con l'utilizzo di un kit GFX PCR DNA e Gel (codice 28-9034-70, GE Healthcare) e successivamente sequenziati.

## 7. REFERENZE

Abdelrahman AM, Sy Yong HT, Tjahjadi AA, Pang CC (2005) Analysis of the mechanism of the vasodepressor effect of urocortin in anesthetized rats. *Pharmacology* 7:175–179

Ahren B (1989) Effects of calcitonin, katecalcin, and calcitonin gene related peptide on basal and TSH-stimulated thyroid hormone secretion in the mouse. *Acta Physiol Scand* 135:133–137

Ahren B (1991) Regulatory peptides in the thyroid gland—a review on their localization and function. *Acta Endocrinol (Copenh)* 124:225–232

Ain KB, Taylor KD, Tofiq S, Venkataraman G (1997) Somatostatin receptor subtype expression in human thyroid and thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1857–1862

Arntzenius AB, Smit LJ, Schipper J, Heide D van der, Meinders AE (1991) Inverse relation between iodine intake and thyroid blood flow: color Doppler flow imaging in euthyroid humans. *J Clin Endocrinol Metab* 75:1051–1055

Baigent SM, Lowry PJ (2000) Urocortin is the principal ligand for the corticotrophin-releasing factor binding protein in the ovine brain with no evidence for a sauvagine-like peptide. *J Mol Endocrinol* 24:53–63

Ballarin C. Radanelli G. “Istologia e anatomia microscopica dei mammiferi domestici e degli uccelli”. Ed. Piccin

Barone Robert, Simoens Paul “Anatomia comparata dei mammiferi domestici”. (2012)

Behan DP, Linton EA, Lowry PJ (1989) Isolation of the human plasma corticotrophin-releasing factor-binding protein. *J Endocrinol* 122:23–31

Behan DP, Cepoi D, Fischer WH, Park M, Sutton S, Lowry PJ, Vale WW (1996) Characterization of a sheep brain corticotropin releasing factor binding protein. *Brain Res* 732:267

Bogosi Zolt, Csbafi Kisztina, “The effects of corticotropin-releasing factor and the urocortins on hypothalamic gamma amino butyric acid release- the impacts on the hypothalamic pituitary adrenal axis”. (2012) *Neurochemistry International* 60 350-354.

Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW (1993) Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8967–8971

Cortright DN, Nicoletti A, Seasholtz AF (1995) Molecular and biochemical characterization of the mouse brain corticotropin-releasing hormone-binding protein. *Mol Cell Endocrinol* 111:147–157

Dermitzaki E, Tsatsanis C, Minas V, Chatzaki E, Charalampopoulos I, Venihaki M, Androulidaki A, Lambropoulou M, Spiess J, Michalodimitrakis E, Gravanis A, Margioris AN (2007) Corticotropin-releasing factor (CRF) and the urocortins differentially regulate catecholamine secretion in human and rat adrenals in a CRF receptor type-specific manner. *Endocrinology* 148:1524–1538

Ellis MJ, Livesey JH, Donald RA (1994) Horse plasma corticotrophin releasing hormone (CRH): characterisation and lack of a late gestational rise or a plasma CRH-binding protein. *J Endocrinol* 143:455–460

Florio P, Vale W, Petraglia F “Urocortins in human reproduction” (2004) *Peptides* 25:1751-1757. Doi:10.1016/j.peptides.2004.05.026.

Gkonos PJ, Tavianini MA, Liu CC, Roos BA (1989) Thyrotropin releasing hormone gene expression in normal thyroid parafollicular cells. *Mol Endocrinol* 3:2101–2109

Grammatopoulos K Dimitris “Insights into mechanisms of corticotrophin-releasing hormone receptor signal transduction” *British Journal of Pharmacology Review* 166 (2012) 85-97

Gysling K, Forray M, I, Haeger P, Daza C, Rojas R, “Corticotropin-releasing hormone and urocortin: redundant or distinctive functions?” *Brian Research Reviews* 47 (2004) 116-125.

Iavazzo C, Baka S, Malamitsi A, “The role of urocortin in gynecological and obstetrical conditions” *Arch Gynecol Obstet* (2009) 279:613-619 DOI 10.1007/s00404-008-0782-5

Ingbar SH, Braverman LE, Taurog A (1986) Hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In: Ingbar SH, Braverman LE (eds) *The thyroid. Section B: hormone synthesis and secretion*, 5th edn. Lippincott, Philadelphia, pp 53–93

Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, Jordan S, Adams EF, Lowe DG, Kangawa K, Grossman AB (2001) The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:881 887

Kozicz T, “On the role of urocortin 1 in the non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in stress adaptation (2007) *Gen Comp Endocrinolo* 153 (1-3):235-240. Doi:10.1016/j.ygcen.2007.04.005.

Lee S, Braden B, Kang SS, Rivier C. Urocortins are present in the rat testis. *Neuropeptides* 2011; 45: 131-137.

Lubomirov LT, Gagov H, Petkova-Kirova P, Duridanova D, Kalentchuk VU, Schubert R (2001) Urocortin relaxes rat tail arteries by a PKA-mediated reduction of the sensitivity of the contractile apparatus for calcium. *Br J Pharmacol* 134:1564–1570

Lubomirov LT, Reimann K, Metzler D, Hasse V, Stehle R, Ito M, Hartshorne DJ, Gagov H, Pfitzer G, Schubert R (2006) Urocortin-induced decrease in Ca<sup>2+</sup> sensitivity of

contraction in mouse tail arteries is attributable to cAMP-dependent dephosphorylation of MYPT1 and activation of myosin light chain phosphatase. *Circ Res* 98:1159–1167

Morillo-Bernal JM, Fernández-Santos JM, Utrilla JC, Miguel M de, García-Marín R, Martín-Lacave I (2009) Functional expression of the thyrotropin receptor in C cells: new insights into their involvement in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *J Anat* 215:150–158

Morillo-Bernal JM, Fernández-Santos JM, Miguel M de, García-Marín R, Gordillo-Martínez F, Díaz-Parrado E, Utrilla JC, Martín-Lacave I (2011) Ghrelin potentiates TSH-induced expression of the thyroid tissue-specific genes thyroglobulin, thyroperoxidase and sodium-iodine symporter, in rat PC-Cl3 Cells. *Peptides* 32:2333–2339

Oki Yutaka, Sasano Hironobu “Localization and physiological roles of urocortin” *Peptides* 25 (2004) 1745-1749.

Orth DN, Mount CD (1987) Specific high-affinity binding protein for human corticotropin-releasing hormone in normal human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 143:411–417

Pelagalli G.V., Botte C. “Anatomia veterinaria sistematica e comparata” III edizione ERMES (2011)

Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW (1993) Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology* 133:3058–3061

Perrin Marilyn H., Vale Wylie W. “Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family” The Clayton Foundation Laboratories for Peptides Biology, The Salk Institute for Biological Studies, 10010 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, USA.

Perrin MH, Grace CR, Riek R, Vale WW (2006) The three-dimensional structure of the N-terminal domain of corticotropin-releasing factor receptors: sushi domains and the B1 family of G protein-coupled receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1070:105–119

Peto CA, Arias C, Vale WW, Sawchenko PE (1999) Ultrastructural localization of the corticotropin-releasing factor-binding protein in rat brain and pituitary. *J Comp Neurol* 413:241–254

Potter E, Behan DP, Fischer WH, Linton EA, Lowry PJ, Vale WW (1991) Cloning and characterization of the cDNAs for human and rat corticotropin releasing factor-binding proteins. *Nature* 349:423–426

Potter E, Behan DP, Linton EA, Lowry PJ, Sawchenko PE, Vale WW (1992) The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4192–4196

Raddino R, Pedrinazzi c, Zanini G, Robba D, Bonadei , Scarabelli T.M, Dei Cas L “Urocortina: biologia molecolare ed effetti sull’apparato cardiovascolare” *G Ital Cardiol* (2007); 8 (4): 236-245.

Raghu K, García-Caballero T, Nogueiras R, Morel G, Beiras A, Diéguez C, Gallego R (2006) Ghrelin localization in rat and human thyroid and parathyroid glands and tumours. *Histochem Cell Biol* 125:239–246

Scopa CD, Mastorakos G, Friedman TC, Melachrinou M, Merino MJ, Chrousos GP, “Presence of immunoreactive corticotrophin-releasing hormone in thyroid lesions”(1994)

Squillacioti C, De Luca A, Alì S, Paino S, Liguori G, Mirabella N, “Expression of urocortin and corticotrophin releasing hormone in the bovine adrenal gland” *General and Comparative Endocrinology* 172 (2011) 416–422

Squillacioti C, De Luca A, Alì S, Paino S, Liguori G, Mirabella N, “Expression of urocortin and corticotrophin releasing hormone in the Horse thyroid gland” (2012) *Cell Tissue Res* DOI 10.1007/s00441-012-1450-4



Tamir H, Hsiung SC, Yu PY, Liu KP, Adlersberg M, Nunez EA (1992) Serotonergic signaling between thyroid cells: protein kinase C and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the secretion and action of serotonin. *Synapse* 12:155–168

Tamir H, Hsiung SC, Liu KP, Blakely RD, Russo AF, Clark MS, Nunez EA, Gershon MD (1996) Expression and development of a functional plasmalemmal 5-hydroxytryptamine transporter by thyroid follicular cells. *Endocrinology* 137:4475–4486

Tezval H, Merseburger AS, Serth J, Herrmann TW, Becker JU, Jahn o, Kuczyk MA. Differential expression of urocortin in human testicular germ cells in course of spermatogenesis: role of urocortin in male fertility? *Urology* 2009; 73(4): 901-905.

Vaughan j, Donaldson C, Bittencourt J, et al. “Urocortin , a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotrophin-releasing factor. *Nature* (1995) 378: 287-292.

Venkatasubramanian S, Newby D. E, Lang N.N, “ Urocortins in the heart failure” *Biochem Pharmacol* (2010) 80: 289-296.

Yang L, Tovote P, Rayner M, Kockskamper J, Pieske B, Spiess J, “Corticotropin-releasing factor receptors and urocortins, links between the brain and the heart” (2010)