

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

Facoltà di Medicina e Chirurgia



Dipartimento di Medicina Clinica, Scienze Cardiovascolari ed
Immunologiche

Tesi di Dottorato di Ricerca

in

Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale

- Scienze cardiovascolari -

XXI° CICLO

***Effetti cardioprotettivi dell'Urotensina II (U_{II}),
mediati dalla transattivazione dell'Epidermal Growth Factor
Receptor (EGFR), sullo scompenso cardiaco***

Relatore
Ch.mo Prof.
Massimo Chiariello

Candidata
Dott.ssa
Rosalia Guerriero

2005 - 2008

INDICE

Introduzione.	4
--------------------	---

CAPITOLO PRIMO UROTENSINA II

1.1 Cenni storici, struttura peptidica e biosintesi intracellulare. . .	5
1.2 Recettore dell'Urotensina II.	7
1.3 Determinanti funzionali del recettore UT.	9
1.4 UTII e la disfunzione endoteliale.	10
1.5 Ruolo dell'Urotensina II nelle patologie cardio vascolari. . . .	12
1.6 Antagonista recettoriale dell'Urotensina II.	14
FIGURE.	16

CAPITOLO SECONDO LO SCOMPENSO CARDIACO

2.1 Eziologia dello scompenso cardiaco.	21
2.2 Fisiopatologia dello scompenso cardiaco a livello del sistema neuroendocrino.	21
2.3 Fisiopatologia dello scompenso cardiaco a livello del sistema chemorecettoriale e barorecettoriale.	22

CAPITOLO TERZO SCOPO DEL LAVORO DI TESI

pag. 25	
FIGURE.	27

CAPITOLO QUARTO MATERIALI E METODI

4.1 Animali inclusi nello studio.	28
4.2 Analisi ecocardiografica.	29
4.3 Modello murino di ipertrofia miocardia da sovraccarico pressorio.	29
4.4 Modello murino di infarto miocardico acuto.	30
4.5 Impianto di pompe iso-osmotiche per il rilasci cronico di Urotensina II.	31
4.6 Misurazione del gradiente pressorio ed analisi morfometrica.	31
4.7 Analisi biomolecolare:	

4.7.1 Protocollo sperimentale di estrazione tessutale delle proteine	32
4.7.2 Western Blot	33
4.7.3 Immunoprecipitazione	34
4.8 Analisi istologica:	
4.8.1 Valutazione della percentuale di fibrosi	34
4.8.2 Valutazione dell'area infartuata (Infarct Size)	35
4.9 Analisi statistica dei dati	36

CAPITOLO QUINTO RISULTATI

5.1 Valutazione morfologica della risposta ipertrofica.	37
5.2 Valutazione ecocardiografica della funzione cardiaca in animali sottoposti a bendaggio aortico.	37
5.3 Valutazione della percentuale di fibrosi in animali sottoposti a bendaggio aortico.	38
5.4 Valutazione morfofunzionale della funzione cardiaca negli animali sottoposti ad infarto miocardico acuto.	38
5.5 Valutazione della fibrosi negli animali sottoposti ad infarto miocardico acuto.	40
5.6 Effetti del sovraccarico cronico di pressione sui livelli del recettore dell'Urotensina II	40
5.7 Valutazione dell'attivazione della chiansi 1 del recettore β -adrenergico (β ARK1) dopo sovraccarico pressorio ed infarto miocardico acuto.	40
5.8 Effetti dell'Urantide sull'attivazione di ERK dopo sovraccarico pressorio ed infarto miocardico acuto.	41
5.9 Valutazione della transattivazione dell'EGFR dopo infarto miocardico acuto e banding aortico.	41
FIGURE.	43

CAPITOLO SESTO CONCLUSIONI

pag. 53

BIBLIOGRAFIA	56
------------------------	----

INTRODUZIONE

L'infarto del miocardio e lo scompenso cardiaco, che spesso ne consegue per la ridotta capacità del muscolo cardiaco danneggiato a svolgere in modo adeguato la sua normale funzione contrattile, sono le malattie cardiovascolari con più elevato impatto epidemiologico. Le cause che possono giustificare un incremento dell'incidenza dello scompenso cardiaco, possono individuarsi nell'invecchiamento della popolazione generale, nella riduzione della mortalità nelle fasi acute dell'infarto del miocardio, nell'aumento della prevalenza di condizioni cliniche predisponenti come il diabete, l'ipertensione, l'obesità.

L'ipertrofia cardiaca, anche se considerata come forma iniziale compensatoria a patologie quali l'ipertensione o l'infarto miocardio acuto, a lungo andare causa un processo di rimodellamento cardiaco caratterizzato da infiammazione, fibrosi e morte cellulare, che contribuiscono alla patogenesi dello scompenso cardiaco.

Lo scompenso cardiaco dà origine ad una serie di alterazione a livello emodinamico e neuroormonale che includono l'attivazione di molti sistemi neuroendocrini, principalmente il sistema nervoso adrenergico e il sistema renina-angiotensina-aldosterone e altri sistemi vasoattivi, quali quello dell'endotelina e dei peptici natriuretici.

Sebbene numerosi studi hanno dimostrato l'importanza del ruolo dell'UT II nella regolazione del tono vascolare, gli ulteriori effetti di questo peptide sul cuore sono ancora in gran parte sconosciuti. L'Urotensina II è un neuropeptide ciclico di 1388 Da, isolato originariamente nel midollo spinale dei pesci ed estremamente conservato nelle diverse specie, risulta espresso nel sistema cardiovascolare, nervoso ed urogenitale.

Urotensina II.

1.1 Cenni storici, struttura peptidica e biosintesi intracellulare

Fino a pochi anni fa, si riteneva che la pressione sanguigna ed il volume dei fluidi extracellulari fossero regolati esclusivamente dal rene e dal sistema nervoso autonomo in associazione con fattori umorali, come il sistema renina-angiotensina-aldosterone ed arginino-vasopressina. Sebbene, numerose sperimentazioni fisiologiche avessero già da tempo individuato un legame umorale tra l'apparato cardiocircolatorio e quello renale, soltanto nel 1969 Bern et al. isolarono il peptide Urotensina II (UTII), dal midollo spinale del pesce *Gillichthys mirabilis*, come probabile peptide responsabile di alcune funzioni cardiovascolari, quali vasodilatatore, vasocostrittore, potente osmoregolatore, crescita e proliferazione cellulare [1]. Successivamente, omologhi del peptide Urotensina II sono stati identificati negli altri vertebrati, quali i mammiferi, incluso l'uomo.

L'Urotensina II è un neuropeptide di 1388 (Fig.1) strutturalmente simile al fattore di rilascio corticotropinico nei mammiferi, ovvero alla somatostatina-14 [2]. UTII si presenta come un peptide di 12aa, con sequenza amminoacidica Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Val omologa alla somatostatina in posizione 1-2 e 7-9, con Ala-Gly e Phe-Lys, rispettivamente. Il peptide UTII viene codificato nell'uomo dal gene localizzato sul braccio corto del cromosoma 1 banda 36 (1p36), ed è costituito da soli 11aa (a differenza dell'UII della rana e dei pesci che possiede 13aa e 12aa), da una regione variabile N-terminale, formata da quattro amminoacidi (Glu-Thr-Pro-

Asp), e da una regione ciclica C-terminale, formata da sette amminoacidi (Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cy-Val), pienamente conservata dai pesci all'uomo [3] e responsabile della sua attività biologica. Infatti, mediante studi SAR è stato dimostrato che eventuali delezioni o sostituzioni degli amminoacidi W, K o Y, comportano una marcata riduzione dell'attivazione degli effetti biologici svolti dall'Ull, quali marcata riduzione di capacità nella mobilizzazione del Ca^{2+} [4, 5]. In realtà, come sostenuto da diversi lavori Lys⁸ è il più importante residuo per l'attività biologica.

Il precursore dell'UTII umana (pre-hUTII) è presente in due diverse forme costituite rispettivamente da 124 e 139 residui amminoacidici, che differiscono solo nella loro regione amminotermine [6, 7]. In seguito a clivaggio proteolitico, tali precursori possono dare origine a diverse forme mature del peptide, quali le forme di 11aa, 14aa, 16aa e 19aa, tutte contenenti la sequenza ciclica esopeptidica (C-F-W-K-Y-C) [1, 8]. In realtà, l'estremità carbossilica del precursore UTII è sottoposta ad una reazione di lisi al sito KKR⁹³ generando, così, la forma matura dell' UTII di 11aa, mentre la reazione di lisi ai siti monobasici R⁸⁵ o K⁸⁸ genera, rispettivamente, le forme di UTII di 16aa e 19aa.

Inoltre, metodiche di ibridazione in *situ* dimostrano che l'mRNA del per-hUTII è particolarmente espresso nei motoneuroni del midollo spinale e in organi quali la prostata, il timo, lo stomaco, il pancreas, l'ovaio e l'ipofisi, e, mediante metodica RT-PCR, hUTII-mRNA è stato evidenziato anche nei reni, nella placenta e negli atri. Inoltre, mediante studi di immunocitochimica si è evidenziato la presenza di immunoreattività anche in cellule endoteliali di aorta umana[6].

Nei tessuti sopra definiti, il pre-UTII viene convertito e attivato da non ancora ben definiti enzimi di conversione dell'UTII, Urotensin

Convertine Enzymes (UCE) [9]. Recenti studi hanno dimostrato che gli UCE potrebbero appartenere alla famiglia di proteasi intracellulari. La predominanza dell'attività di UCE nei compartimenti intracellulari suggerisce che il processo di attivazione del pre-UTII avviene all'interno delle cellule e che la forma matura del peptide è secreta dalle cellule, come accade per gli enzimi di conversione dell'endotelina. Sebbene il meccanismo di secrezione del pre-UTII non è conosciuto, l'incapacità degli UCE di agire sulla membrana plasmatica delle cellule endoteliali, sui fibroblasti e sulle cellule epicardiche mesoendoteliali, potrebbe suggerire che il processo di secrezione del pre-UTII potrebbe avvenire all'interno del fluido interstiziale o nella circolazione piuttosto che sulla superficie cellulare.

1.2 Recettore dell'Urotensina II.

L'hUTII svolge i suoi effetti biologici mediante l'interazione con un recettore associato alla proteina trimerica G (GPCR) della classe A, avente una sequenza al 75% simile al recettore GPR14 dell'UTII presente nel topo, e recentemente definito recettore UT (rUTII) (Fig.2) [10]. Infatti, Ames et al. nell'investigare sulla probabile presenza di un recettore umano per UTII, isolarono un gene codificante un GPCR umano di 389 amminoacidi. In realtà, il gene del recettore UT è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 17 banda 25.3 (17q25.3) [11] e codifica una proteina di 389 amminoacidi, con una sequenza omologa al 27% al recettore SSTR4 della somatostatina [12]. Infatti, una bassa attività biologica di UTII può derivare dall'interazione della somatostatina con il recettore UT/GPR14, possibile per la loro similitudine strutturale.

Il recettore GPR14, costituito da 86 residui amminoacidici, presenta due siti di glicosilazione nel dominio N-terminale, Asn²⁹ e Asn³³, e due residui di cisterna nel primo e nel secondo loops extracellulare, che intervengono nella formazione del ponte disolfuro. Il dominio intracellulare contiene, invece, il motivo Glu/Asp-arg-Tyr, che è pienamente conservato nei GPCRs, mentre nel dominio citoplasmatico sono presenti i siti di fosforilazione. Diversi studi, eseguiti su *Gillichthys mirabilis*, mostrano che i residui amminoacidici in posizione 6 e 12 dell'UTII, corrispondenti agli amminoacidi in posizione 4 e 11 nell'hUTII, sono sufficienti per il legame del peptide al suo recettore. Recentemente, Flohr et al. [13], mediante ulteriori studi sulla struttura di hUTII, hanno confermato sia l'importanza della sequenza ciclica esopeptidica per l'attivazione del recettore, sia l'importanza dell'intervento dei residui N-terminali nel mediare tale attivazione. Inoltre, Boucard et al. [14], in un loro studio, hanno evidenziato l'importanza della presenza dei residui amminoacidici Met 184 e/o Met 185, presenti nel quarto dominio trans-membrana del recettore UT, come elementi peculiari del legami con i residui amminoacidici dell'UTII. In realtà, diversi studi di NMR hanno dimostrato che le catene degli amminoacidi Phe⁶, Trp⁷ e Val¹¹ dell'UTII sono orientate sullo stesso lato in modo tale da formare un gruppo idrofobico importante per il legame dell'UTII con il suo recettore [15].

Mediante metodiche di RT-PCR, inoltre, è stato possibile osservare che l'mRNA del recettore UT è largamente espresso al livello del sistema cardiocircolatorio, in particolar modo nei cardiomiociti, nelle cellule endoteliali e muscolari lisce vasali, nel pancreas. Inoltre, risulta particolarmente espresso in diversi altri organi, quali il midollo spinale, l'ipotalamo, i reni, la placenta [7, 12] e cellule come i

monociti e i macrofagi, che sono considerati i più grandi produttori di mRNA del recettore UT a differenza dei linfociti che, invece, sono considerati i più grandi produttori di mRNA del pre-UTII [16]. Quindi la vasta distribuzione del recettore GPR14 indica che l'UTII interviene come ormone circolante nella regolazione in diversi processi fisiologici.

1.3 Determinanti funzionali del recettore UT.

Il dettagliato meccanismo molecolare responsabile dell'attivazione dei GPCRs non è ancora realmente conosciuto. Infatti, il passaggio dalla forma inattiva, conservata dall'interazione intramolecolare tra i motivi TMD (third transmembrane domain), alla forma attiva può essere indotto o dai loro agonisti o mediante mutazioni a livello dei TMD, che possono determinare sia una perdita che un aumento della capacità della loro funzione.

L'attivazione mediante agonista dei GPCRs è responsabile sia del segnale di trasduzione sia del meccanismo cellulare di desensibilizzazione, internalizzazione e down-regolazione del recettore UT. Come è emerso da alcuni studi in cellule COS-7 [17], in seguito al legame dell'amminoacido Phe, presente nella porzione ciclica di UTII, con i siti Met 184/Met 185 del recettore UT, si ha la rapida fosforilazione di quest'ultimi da GRKs (GPCR kinases) che promuovono il legame con β -arestina. Il complesso recettore UT/ β -arestina, è sottoposto al processo di internalizzazione, mediato da clatrina, in compartimenti endosomiali, che saranno successivamente sottoposti a proteolisi. β -arestina sono sia adattori

multifunzionali nel meccanismo di segnale di MAPKs sia modulatori dell'endocitosi dei GPCRs [18].

1.4UTII e la disfunzione endoteliale.

Le cellule endoteliali producono molti mediatori vasoattivi, generalmente denominati “endothelium-derived vasorelaxant mediators”, che contribuiscono al controllo del tono e della crescita delle cellule muscolari lisce e hanno effetti sulla funzione delle cellule circolanti (globuli bianchi, eritrociti e piastrine). L'alterazione della capacità da parte dell'endotelio di produrre alcuni mediatori in risposta a stimoli patofisiologici (la così definita “disfunzione endoteliale”) sembra sia il principale fattore comune di molte patologie cardiovascolari. I più importanti tra questi mediatori sono la prostaciclina (PGI_2) e il monossido di azoto (NO), ma recentemente è stato descritto anche un nuovo mediatore vasorilassante di origine endoteliale, denominato EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) che esercita un caratteristico effetto di iper-polarizzazione e rilassamento sulle cellule muscolari.

Numerosi studi hanno dimostrato che l'Urotensina II agisce sui letti vascolari (Fig.3). Infatti, il legame dell'Urotensina II al specifico recettore determina l'attivazione della proteina $G_{\alpha q}$ associata e, successivamente, della fosfolipasi C (PLC), con conseguente idrolisi del fosfatidilinositolo-4,5-difosfato (PIP_2) ad inositolo-1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerolo (DAG). IP_3 induce il rilascio di Ca^{2+} dalle riserve intracellulari, ovvero dal reticolo endoplasmatico/sarcoplasmatico, e, successivamente, l'afflusso di Ca^{2+} dall'ambiente extracellulare,

effetto che può essere inibito dall'intervento degli inibitori dei canali voltaggio Ca^{2+} dipendenti e di La^{3+} , un inibitore dei canali cationi non selettivi [19]. L'aumento del Ca^{2+} citosolico innesca l'assemblaggio degli elementi contrattili. In realtà, il Ca^{2+} e il fosfoinositolo agiscono su proteine, quali filamina, profilina e/o calmodulina che, mediante meccanismo MLCK-dipendente o meccanismo MLCP-dipendente, determinano la fosforilazione delle catene leggere di miosina (MLC) e di actina, provocando, quindi, la risposta contrattile, caratterizzata dallo scorrimento dei filamenti sottili di actina, verso il centro del sarcomero, rispetto ai filamenti spessi di miosina (Figura 8). Diversi studi hanno dimostrato che l'Urotensina II può indurre contrazione, sensibilizzando gli elementi contrattili, mediante il meccanismo PLC-dipendente, e che tale risposta contrattile può essere ridotta mediante il meccanismo RhoA/Rho-Kinase dipendente, che è responsabile della fosforilazione della MLCP. L'Urotensina II può anche determinare una risposta di vasodilatazione [20] in piccole arterie di topo precedentemente sottoposte a contrazione [21]. Tale effetto vasodilatativo determinato dall'UT-II è mediato dal rilascio di ossido di azoto (NO) e di prostaciclina (PGL_2) dalle cellule endoteliali. PGL_2 , un metabolita dell'acido arachidonico (AA), e NO, un gas prodotto dalle cellule endoteliali, dai macrofagi e da specifici neuroni, sono dei fattori che, agendo in modo paracrino sulle cellule bersaglio, inducono la produzione di guanosin monofosfato ciclico (GMPc) che, andando ad interagire con gli elementi contrattili defosforilandoli, è responsabile, a sua volta, dell'effetto di rilassamento delle cellule muscolari lisce dei vasi. La prova dell'importanza di e-NO nella risposta vasodilatativa, deriva dall'osservazione che topi, privi del gene che codifica l'enzima ossido di azoto sintetasi (NOS), sono ipertesi. Recenti studi, inoltre,

hanno dimostrato che la risposta contrattile e vasodilatativa sembra essere legata alla presenza di un' endotelio intatto, responsabile della sintesi dei fattori di rilassamento, quali NO e dei fattori iperpolarizzante endotelio-derivato (EDHF).

Comunque, nell'uomo, come nelle altre specie, c'è una grande variazione nella risposta contrattile all'UTII. Infatti, in piccole arterie polmonari, solo il 30% dei vasi testati rispondevano all'UTII e l'efficacia variava dal 14% al 22%, in relazione alla contrazione causata da 50mM KCl e dalla presenza di N^G-nitro-L-arginine (L-NAME), un inibitore di NO sintetasi (NOS).

1.5 Ruolo dell'Urotensina II nelle patologie cardiovascolari.

Allo stato attuale l'UT-II è considerato il più potente peptide vasocostrittore che sia mai stato isolato [22]. Gli effetti dell'UT-II sul tessuto vascolare variano a seconda della specie e del letto vascolare considerato. Ad esempio, gli effetti vasocostrittorici dell'UT-II (30nM) sono molto meglio evidenziabili nell'aorta toracica di ratto, rispetto all'aorta addominale [3]. Tali differenze dipendono essenzialmente dalla distribuzione del recettore che, in seguito all'interazione con il peptide UT-II, diventa il responsabile dell'attivazione degli effetti vasodilatatori e-NO dipendenti, o degli effetti vasocostrittorici [7, 23]. Gli effetti in vivo dell'UT-II sul tono vascolare possono essere osservati mediante iniezione intradermale sull'avambraccio di UT-II, che provoca una riduzione del flusso sanguigno epidermico, indicando una vasocostrizione del microcircolo.

L'Urotensina II sembra svolgere un ruolo rilevante anche in diversi disturbi del sistema cardiovascolare, come ad esempio nell'aterosclerosi. L'aterosclerosi è una malattia cronica caratterizzata da alterazioni delle arterie, con ispessimento ed indurimento delle pareti, alterazioni endoteliali, invasione leucocitaria e proliferazione delle cellule muscolari lisce vasali (VSMCs), e, quindi, riduzione progressiva del lume vasale. Questa patologia inizia quando, in prossimità della tonaca intima, si verifica un accumulo sottoendoteliale di lipidi e cellule schiumose e successiva proliferazione delle fibrocellule muscolari lisce, in quanto stimolate da fattori di crescita, quali VEGF e bFGF. Nelle ultime fasi dello sviluppo dell'aterosclerosi, si può verificare la rottura della placca ateromasica che induce una risposta infiammatoria, con aggregazione piastrinica, trombosi e conseguente rischio di ischemia, dovuta per interruzione del flusso sanguigno. Mediante metodiche RT-PCR, è possibile osservare un aumento dell'espressione dell'mRNA dell'UT-II e del suo recettore nelle placche aterosclerotiche carotidee e aortiche [16]. Il rischio di rottura di una placca aterosclerotica è maggiore quando il rivestimento fibroso, costituito da collagene di tipo I e di tipo III, risulta essere sottile. L'Urotensina II stimola l'espressione genica del pro-collagene di tipo I e di tipo III, e la sintesi di collagene nei fibroblasti [24], attivando, così, una risposta protettiva contro la rottura delle placche aterosclerotiche.

L'identificazione dell'UT-II in fenomeni, quali la formazione delle placche aterosclerotiche, la sintesi del collagene e il controllo del tono vascolare, indica anche il possibile coinvolgimento dell'UT-II nello sviluppo di ipertensione arteriosa. Infatti, studi recenti hanno

dimostrato che i livelli plasmatici di UT-II nei pazienti ipertesi sono sensibilmente più elevati rispetto a quelli non ipertesi [25].

Diversi studi sostenuti da Totsune et al., hanno dimostrato che i livelli di UTII nel plasma sono elevati in pazienti con una clearance della creatinina più bassa di $30\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ e sottoposti a dialisi. Questo aumento potrebbe essere associato alla diminuita escrezione di UTII dai reni anziché da un aumento della sua espressione. Inoltre, è stato evidenziato un'ulteriore elevato livello di UTII anche nei pazienti diabetici, anche se non è stata dimostrata una correlazione tra iperglicemia e gli elevati livelli di UTII.

1.6 Antagonista recettoriale dell'Urotensina II.

Alcuni anni fa, l'Urotensina II è stata identificata come naturale ligando del recettore associato alla proteina G, ovvero il GPCR. Il sistema, costituito da Urotensina II/recettore UT, sembra svolgere un ruolo importante nelle funzioni cardiovascolari, come è stato definito da diversi studi.

Recentemente, in alcuni studi, è stata esaltata la presenza di un valido antagonista recettoriale dell'UTII definito Urantide (Fig.4). Infatti, l'Urantide, potente antagonista recettoriale dell'UT-II finora sintetizzato, si lega con la stessa affinità nanomolare (p_{ki} 7.9-9.0) dell'Urotensina II ai recettori UT nel topo, nel ratto e nell'uomo, e antagonizza gli effetti contrattili dell'UTII nell'aorta di ratto, senza mostrare alcun attività residua antagonista (DOUGLASS et al.). Diversi studi hanno dimostrato che il tratto ciclico dell'UT-II è importante per la sua attività biologica, e che la sequenza $\text{Trp}^7\text{-Lys}^8\text{-Tyr}^9$ è di fondamentale importanza per l'attivazione del recettore UT

[26]. La modificazione chimica di Trp⁷ con D Trp⁷, di Lys⁸ con Orn⁸, e di Cys⁵ con Pen⁵, conduce alla sintesi dell'Urantide (Figura9) [27]. In realtà, Orn⁸ gioca un ruolo fondamentale in tale peptide, poiché fa assumere all'Urantide un comportamento antagonista in campioni di aorta di ratto ed un comportamento agonista nella formazione dell'inositolo fosfato e nel rilascio del Ca²⁺ intracellulare, con conseguente aumento del tono vasale [28]. Quindi, l'Urantide può essere utilizzato come valido strumento per investigare sul ruolo biologico del sistema UTII/recettore UT.

FIGURE

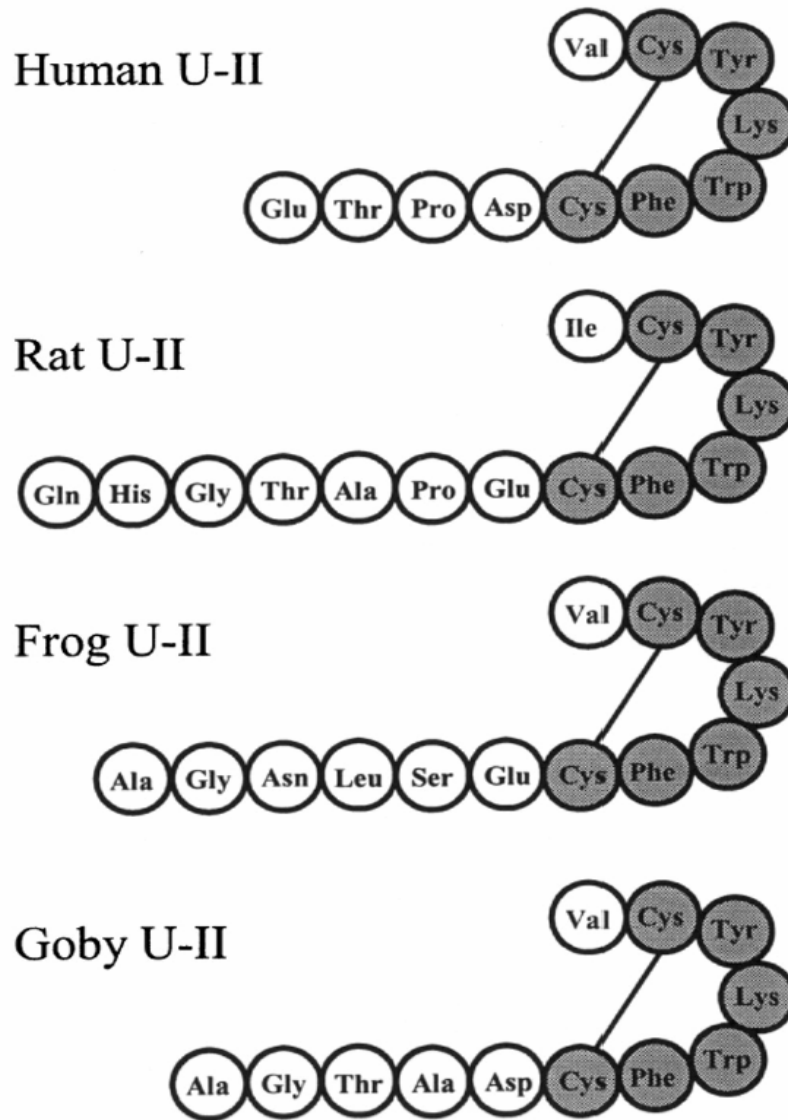


Figura1: Sequenza amminoacidica del neuropeptide Urotensina II nelle varie specie. Il peptide contiene una sequenza ciclica C-terminale pienamente conservata e responsabile della sua attività.

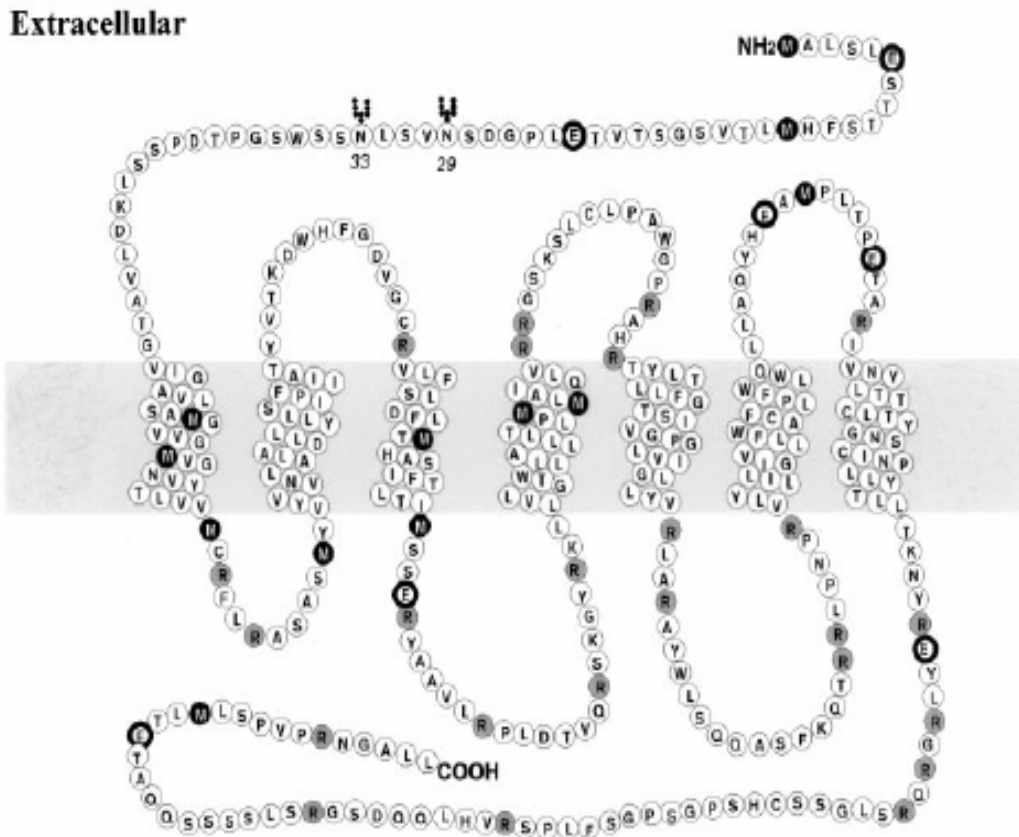


Figura2: Rappresentazione della struttura primaria del recettore UT-II nel topo definito GPR14. Il recettore GPR14, costituito da 386aa, presenta: due siti di glicosilazione nel dominio N-terminale, Asn²⁹ e Asn³³, e due residui di cisteina nel primo e nel secondo loops extracellulare, che intervengono nella formazione del ponte disolfuro; un dominio intracellulare contenente il motivo Glu/Asp-Arg-Tyr, che è pienamente conservato nei GPCR; infine, una porzione trans-membrana costituita da sette domini. L'interazione del peptide UT-II con il suo recettore è mediata dal legame degli amminoacidi in posizione 6 e 12 dell'UT-II con gli amminoacidi Met 184 e/o Met 185, presenti nel quarto dominio trans-membrana del recettore GPR14.

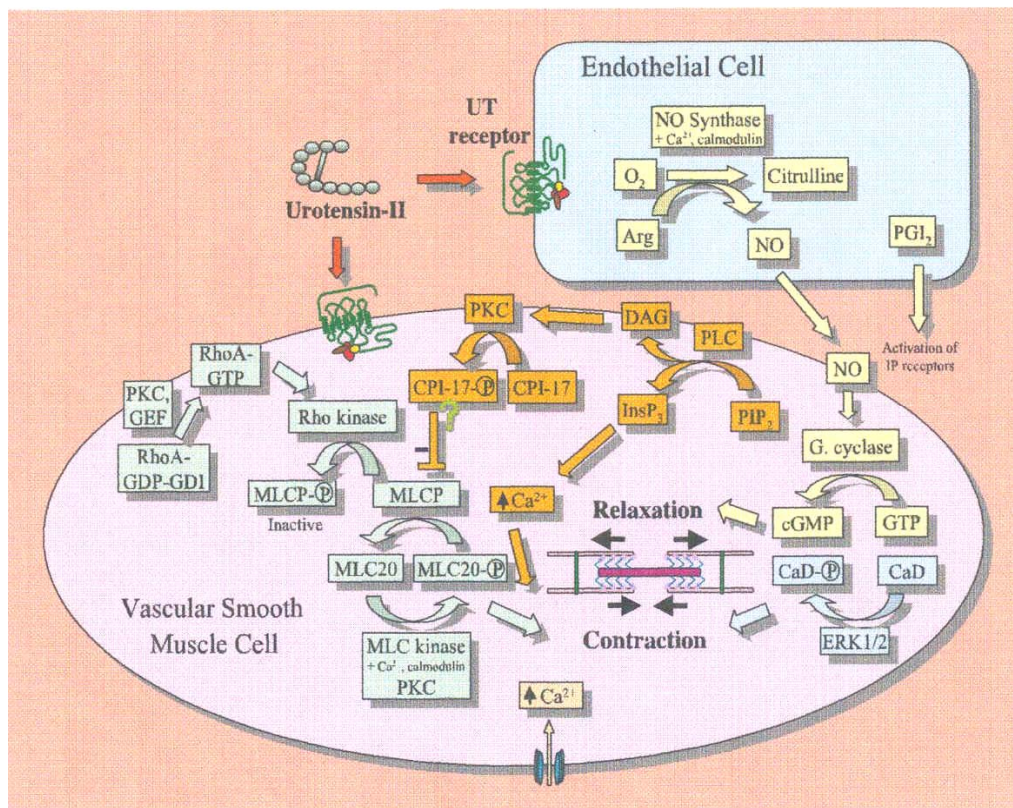
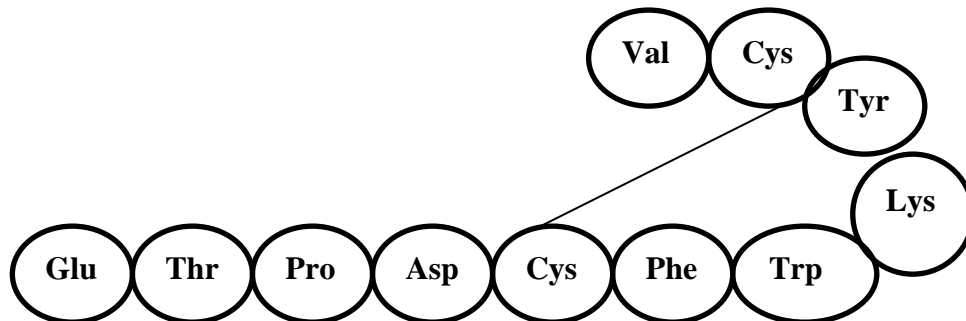


Figura3: Meccanismo di traduzione del segnale nel sistema UTII/recettore UT. Il peptide UTII lega il suo recettore specifico, determinando la dissociazione del complesso della proteina G alla forma attiva responsabile dell'idrolisi fosfatidilinositolo 4,5difosfato (PIP₂) ad inositolo 1,4,5trifosfato (IP₃) e diaglicerolo (DAG) mediante la fosfolipasi c (PLC). IP₃ è responsabile del rilascio del Ca²⁺ dal reticolo sarcoplasmatico, determinando il fenomeno della contrazione. L'aumento del Ca²⁺ intracellulare è anche una conseguenza dell'apertura dei canali sulla membrana plasmatica. Sull'endotelio, l'attivazione del recettore UT culmina nella sintesi e nel rilascio dell'ossido nitrico (NO) e del fattore iperpolarizzante endotelio-derivato (EDHF), responsabile del fenomeno di vasodilatazione.

Urotensina II



Urantide

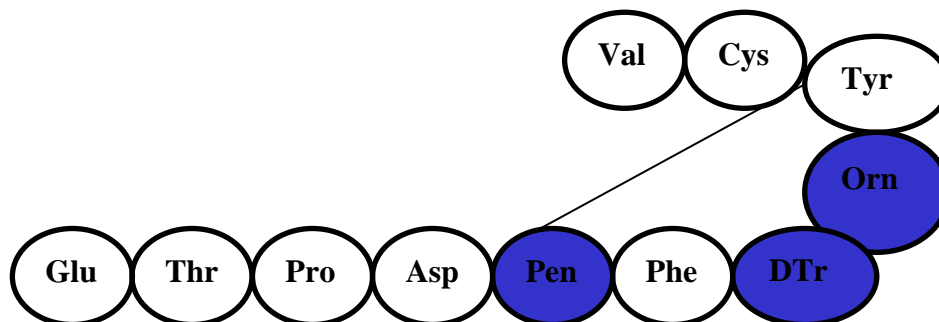


Figura4: Confronto tra le sequenze amminoacidiche dell'hUT-II e dell'Urantide. Il tratto ciclico esopeptidico dell'UT-II è importante per la sua attività biologica, quindi, la sostituzione di Trp⁷ con D Trp⁷, di Lys⁸ con Orn⁸, e di Cys⁵ con Pen⁵, conduce alla sintesi dell'Urantide, il suo antagonista recettoriale.

Lo scompenso cardiaco.

Lo scompenso cardiaco (SC) è la malattia cardiovascolare con più elevato impatto epidemiologico e costo socio sanitario, associata ad una prognosi infausta che solo recenti progressi terapeutici stanno migliorando sensibilmente. Come emerge dal quadro clinico, la risposta alla terapia dipende anche dal coinvolgimento di altri organi e apparati, in particolare il circolo sistemico e polmonare, rene, fegato e apparato locomotore, tanto da indurre a pensare allo scompenso cardiaco come una malattia “multi organo” , ed, ancora, dal livello di attivazione di una serie di sistemi neuroormonali e paracrini, tanto da poter definire il SC come una “malattia dei sistemi di regolazione”.

Oggi giorno, esistono molte definizioni di scompenso cardiaco e la definizione che viene considerata come più appropriata è quella data da Braunwald nel suo trattato:” *Lo scompenso cardiaco si verifica quando un’anomalia della funzione cardiaca fa sì che il cuore non sia in grado di pompare sangue in quantità sufficiente per soddisfare i bisogni metabolici dell’organismo o possa farlo solo a spese di un aumento della pressione di riempimento. L’incapacità del cuore a soddisfare i fabbisogni tissutali può essere dovuta a riempimento inefficace e insufficiente e/o ad una anomala contrazione e successivo svuotamento*” (Braunwald E., 1997).

Frequentemente l’insufficienza cardiaca è determinata da un difetto di contrazione del miocardio, che può essere il risultato di patologie extramiocardiche, come l’aterosclerosi coronaria e le malattie valvolari, o secondario ad anomalie primitive del muscolo cardiaco.

2.1 Eziologia dello scompenso cardiaco.

Lo scompenso cardiaco cronico è il risultato di molteplici concause e fattori scatenanti, ma si può affermare che nel mondo occidentale la cardiopatia ischemica costituisce attualmente il fattore più frequente che facilita l'insorgenza dell'insufficienza cardiaca. Le cause di insufficienza cardiaca possono essere suddivise in: sovraccarichi di pressione o di volume e alterazioni della meccanica cardiaca, malattie del miocardio, alterazioni del ritmo e della conduzione cardiaca, affezioni extracardiache.

Fra le miocardiopatie primitive, che più frequentemente danno origine ad insufficienza cardiaca, sono le forme dilatative, anche se un posto rilevante è occupato dalle forme ipertrofiche e restrittive; fra le manifestazioni della cardiopatia ischemica, la causa principale è rappresentata dall'infarto del miocardio; fra le malattie infettive vanno ricordate le forme reumatiche, da virus HIV, da virus delle epatite C, ecc; inoltre, fra le malattie a carattere sistemico abbiamo il diabete mellito, aumento del rapporto colesterolo totale/colesterolo HDL, obesità.

2.2 Fisiopatologia dello scompenso cardiaco a livello del sistema neuroendocrino.

La catena di eventi che conduce allo sviluppo dell'insufficienza cardiaca è molto complessa e collegata al meccanismo patogenetico. La progressione dell'insufficienza cardiaca è contrassegnata dall'evoluzione del danno miocardico (specialmente quando è conseguenza di un evento ischemico), che si realizza in

un deterioramento progressivo della funzione di pompa del cuore, evidente dapprima in risposta all'esercizio o ad un aumentato carico, poi anche a riposo. La conseguente caduta della portata cardiaca e dell'ossigenazione tessutale periferica comporta un'attivazione del sistema nervoso simpatico e di altri importanti meccanismi, quali il sistema renina-angiotensina, la produzione di aldosterone e di ormone antidiuretico, l'iperproduzione dell'eritropoietina secondaria all'ipossia del tessuto renale. Inoltre, l'incremento progressivo delle pressioni di riempimento cardiache conducono ad iperproduzione ed ipersecrezione dei peptidi atriali natriuretici (ANP, Atrial natriuretic peptide, e BNP, B-type natriuretic peptide), che sebbene svolgano una funzione compensatoria per i loro molteplici effetti biologici, possono concorrere a formare l'edema interstiziale aumentando la permeabilità capillare e il passaggio di fluidi dal compartimento intravascolare a quello extravascolare. L'integrazione dell'attivazione di questi meccanismi neuromonali favoriscono la ritenzione idrosalina e l'instaurarsi di vasocostrizione periferica. D'altra parte, questo adattamento si rivela nel medio-lungo termine controproducente, in quanto conduce ad ulteriore lavoro del cuore, da un lato con aumentato volume circolante e aumentato ritorno venoso, ma dall'altro lato con aumentata impedenza vascolare allo svuotamento cardiaco.

2.3 Fisiopatologia dello scompenso cardiaco a livello del sistema chemorecettoriale e barorecettoriale.

I soggetti affetti da scompenso cardiaco presentano una sintomatologia caratterizzata soprattutto da dispnea e da

intolleranza allo sforzo fisico, che risultano relazionabili al deficit di pompa del cuore e alle modificazioni del sistema neurovegetativo e respiratorio. Studi recenti hanno evidenziato come, associato puramente ad un problema cardiaco, vi sia, rispetto ai soggetti sani, anche una modificazione dell'attività simpatica e vagale ed un'alterazione della funzionalità di alcuni importanti sistemi recettoriali, tra cui barocettori, i chemocettori e gli ergocettori.: i chemocettori centrali e periferici (rispettivamente ubicati a livello bulbare, i primi, e del glomo carotideo e dell'arco aortico, i secondi) presentano un'aumentata sensibilità; le aree barocettive cardiopolmonari (a bassa pressione) e quelle aortiche e carotidee (ad alta pressione) mostrano una diminuita sensibilità; gli ergocettori muscolari, infine, esibiscono un'ipersensibilità ed iperattività [29].

Non è tuttavia possibile determinare con certezza se le variazioni funzionali di questi sistemi recettoriali rappresentano la causa od originino successivamente alle alterazioni neuromonali, in quanto esistono rapporti di stretta interrelazioni fra questi sistemi.

Per quanto riguarda i barocettori (responsabili del mantenimento dell'omeostasi cardiocircolatoria, in condizioni normali) la loro ridotta sensibilità potrebbe essere dovuta ad una diminuita distensibilità della parete vascolare, ad un malfunzionamento dell'integrazione riflessa a livello centrale, ad una combinazione di entrambi o, ancora, ad altri meccanismi meno conosciuti.

La disfunzione del baroriflesso impedisce la corretta risposta riflessa di fronte ad una riduzione della portata cardiaca e quindi della pressione arteriosa, al fine di ripristinare l'omeostasi cardiocircolatoria. Normalmente i barocettori esercitano un' azione inibitoria sul sistema nervoso simpatico, ma a causa della loro alterazione funzionale si stabilisce una diminuzione sia della loro

azione inibitoria che della loro influenza eccitatoria sul sistema vagale cardiocircolatorio. Da ciò deriva la comparsa di uno stato di iperattività simpatica e di diminuita attività vagale, con conseguente tachicardia e vasocostrizione periferica.

Diversi sono i fattori che, nello scompenso, concorrono a determinare l'ipersensibilità dei chemocettori. L'aumento del tono simpatico, innanzitutto, è in grado di indurre un aumento della sensibilità dei chemocettori periferici probabilmente provocando, mediante vasocostrizione, una riduzione del flusso sanguigno arterioso a livello centrale e attraverso i glomi carotidei. Anche i cambiamenti neurormonali, che hanno luogo nello scompenso cardiaco cronico, come l'aumento del livello di catecolamine, potrebbero far aumentare la chemosensibilità. Infine, viene meno l'azione inibitoria di barocettori sui chemocettori, a causa del malfunzionamento del baroriflesso. Nei soggetti con scompenso cardiaco, infatti, vi è una ridotta sensibilità ed attività delle aree barocettive, carotidee ed aortica valutata come regolazione riflessa della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca. E' stato tuttavia dimostrato che, in condizioni fisiologiche, la stimolazione baroriflessa è in grado di ridurre significativamente la risposta simpatica alla stimolazione ipossica dei chemocettori periferici. Quindi, risulta pertanto chiaro come nei soggetti con scompenso cardiaco, la diminuzione della sensibilità e dell'attività baroriflessa possa facilitare, attraverso una minore inibizione, l'iperattivazione chemorecettoriale.

Scopo del lavoro di tesi.

L'Urotensina II definita "nuova endotelina", come hanno suggerito diversi studi per la similarità tra i due peptidi, per le sue azioni biologiche potrebbe essere coinvolto in situazioni fisiopatologiche associate a disfunzione endoteliale e a processi di rimodellamento, quali lo scompenso cardiaco.

Scopo di questa tesi è quello di valutare il ruolo dell'Urotensina II nella progressione dello scompenso cardiaco, in due modelli murini di sovraccarico di pressione ed infarto miocardico acuto, attraverso la somministrazione di un antagonista recettoriale selettivo dell'UTII, ovvero l'Urantide.

Inoltre, in questi due modelli sperimentali, saranno valutati gli effetti di UTII sulla transattivazione dell'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), poiché numerosi studi hanno dimostrato che alcuni recettori accoppiati alle proteine G (GPCRs) sono in grado di stimolare la transattivazione di EGFR, attraverso un meccanismo mediato da proteine appartenenti alla famiglia delle metallo proteasi (MMP) (Fig.1). L'EGFR (ErbB1/HER1) appartiene alla superfamiglia dei recettori con attività enzimatica intrinseca, definiti come recettori tirosina-chinasici (RTKs), e svolge importantissime funzioni, quali la crescita e la differenziazione cellulare. Nella transattivazione dell'EGFR, i GPCRs attivano le metallo proteasi (ADAM12 o ADAM17) che processano il precursore transmembrana pro-HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor). In seguito al clivaggio, si ha il rilascio del fattore solubile maturo HB-EGF che interagisce con il dominio extracellulare di EGFR, attivando la via di

trasduzione delle MAPKs, stimolando, quindi, la trascrizione dei fattori di crescita e l'ipertrofia dei cardiomiociti.

Inoltre, al fine di valutare il ruolo dell'UTII sul rimodellamento cardiaco nei due modelli sperimentali saranno considerati gli effetti del peptide sulla struttura e funzione miocardica.

Comunque, nonostante ulteriori studi siano necessari per capire le proprietà patofisiologiche di questo peptide, questo lavoro di tesi potrà essere importante in quanto, analizzando il sistema da più punti di vista contemporaneamente (esecuzione di due modelli murini di sovraccarico di pressione ed infarto miocardico acuto, analisi ecocardiografica, valutazione morfometrica, analisi biomolecolare ed istologica) ci permetterà di capire meglio il ruolo dell'Urotensina II nello scompenso cardiaco.

FIGURE

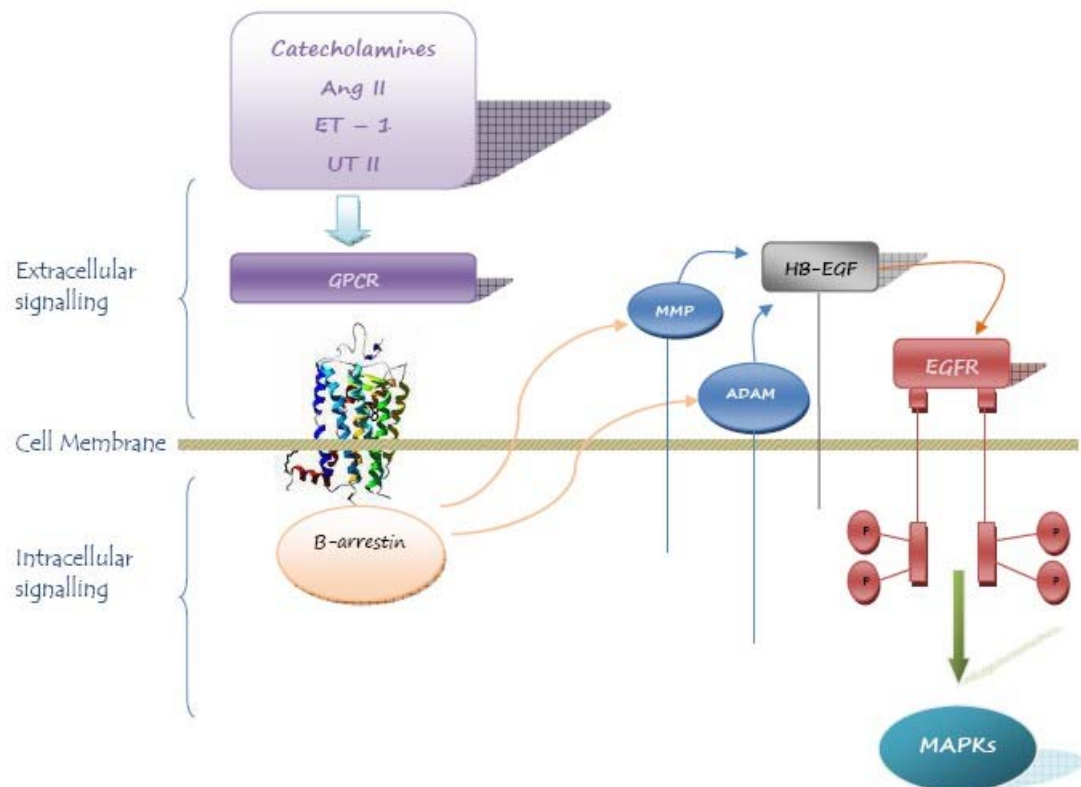


Figura1: Rappresentazione schematica della transattivazione dell'EGFR da parte dei recettori accoppiati alle proteine G, mediata dalle metallo proteasi. Nella transattivazione dell'EGFR, i GPCRs attivano le metallo proteasi (ADAM12 o ADAM17) che processano il precursore transmembrana pro-HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor). In seguito al clivaggio, si ha il rilascio del fattore solubile maturo HB-EGF che interagisce con il dominio extracellulare di EGFR, attivando la via di trasduzione delle MAPKs, stimolando, quindi, la trascrizione dei fattori di crescita e l'ipertrofia dei cardiomiociti.

MATERIALI E METODI.

I protocolli a cui sono stati sottoposti tutti gli animali utilizzati in questo studio sono conformi alle norme proposte dalle linee guida dell'NIH per la cura e l'utilizzo per gli animali da laboratorio (Nih Guide for Care and Use of Laboratory Animal).

4.1Animali inclusi nello studio.

Nello nostro studio sono stati utilizzati topi wild-type (WT) con background genetico C57BL6 di 9 settimane di età e suddivisi in cinque gruppi sperimentali:

1. Un gruppo di animali di controllo (SHAM, n=12).
2. Un gruppo di animali sottoposto solo a legatura dell'aorta toracica trasversa (TAC, n=10).
3. Un gruppo di animali TAC con infusione cronica dell'inibitore dell'UTII ovvero Urantide (TAC + UR, 2 μ M/Kg/die, n=7), mediante l'impianto sottocutaneo di pompe micro-osmotiche (Alzet, USA).
4. Un gruppo di animali sottoposti a legatura dell'arteria coronaria discendente anteriore (IMA, n=9).
5. Un gruppo di animali IMA con infusione cronica dell'inibitore dell'UTII ovvero Urantide (IMA + UR, 2 μ M/Kg/die, n=7), mediante l'impianto sottocutaneo di pompe micro-osmotiche (Alzet, USA).

4.2Analisi ecocardiografica.

Per valutare la funzione cardiaca, gli animali sono stati sottoposti ad ecocardiografia transtoracica mono e bidimensionale prima e sette giorni dopo l'intervento chirurgico. Tale analisi è stata eseguita mediante ecografo SONOS 5500 (Hewelett-Packhard). I parametri ecocardiografici valutati sono stati:

- Dimensioni telediastoliche del ventricolo sinistro (LVEDD);
- Dimensioni telesistoliche del ventricolo sinistro (LVESD);
- Lo spessore della parete posteriore (PWth)
- Lo spessore del setto interventricolare (SEpth);
- Durata dell'eiezione cardiaca (ejection time, ET=msec).

La frazione di accorciamento del ventricolo sinistro (% FS) è stata calcolata mediante la relazione:

$$\%FS = (LVEDD - LVESD) * 100 / LVEDD$$

4.3Modello murino di ipertrofia miocardica da sovraccarico pressorio.

I topi appartenenti ai gruppi TAC e TAC+UR sono stati anestetizzati con soluzione di ketamina (100mg/Kg) e xilazina (2.5mg/Kg), e poi sottoposti, in condizioni sterili, a costrizione aortica mediante posizionamento di una sutura sull'aorta traversa nel tratto compreso fra il tronco anonimo e l'arteria carotide comune di sinistra (FIG:☺). In breve, dopo aver effettuato una toracotomia a livello del secondo spazio intercostale sinistro, l'aorta traversa è stata isolata fra l'arteria anonima di destra e l'arteria carotide di sinistra ed eseguito un bendaggio aortico mediante un filo di sutura di seta 6-0, con un ago

da 25 a 27 Gauge per ottenere una diminuzione del diametro di circa 0.3-0.6mm e determinare, dopo rimozione dell'ago, una stenosi aortica dal 50% all'80%. Nelle ore seguenti, all'animale è stato somministrato un farmaco ad azione analgesica (butorfenolo 0.4mg/kg sottocute per tre giorni) ed un farmaco antibiotico (enofloxacin 4mg/kg per os nell'acqua da bere per sette giorni) Dopo sette giorni, gli animali sono stati anestetizzati e, previa misurazione del gradiente pressorio transtenotico, sono stati sottoposti ad eutanasia.

4.4 Modello murino di infarto miocardico acuto.

I topi appartenenti al gruppo IMA ed IMA+UR sono stati anestetizzati con soluzione di ketamina (100mg/Kg) e xilazina (2.5mg/Kg), e poi sottoposti, in condizioni sterili, ad infarto del miocardio acuto mediante legatura dell'arteria coronaria discendente anteriore. In breve, l'arteria coronaria sinistra è stata legata nel suo tratto prossimale, al di sotto dell'auricola sinistra, attraverso una toracotomia laterale sinistra eseguita in corrispondenza del 5° spazio intercostale sulla linea emiclaveare. Successivamente, è stato applicato un tubo PE50 nel seno costofrenico sinistro per riportare la pressione intratoracica ai normali valori fisiologici. Nelle ore seguenti, è stato somministrato all'animale un farmaco ad azione analgesica (butorfenolo 0.4mg/kg sottocute per tre giorni) ed un farmaco antibiotico (enofloxacin 4mg/kg per os nell'acqua da bere per sette giorni). Dopo sette giorni, gli animali sono stati anestetizzati e sono stati sottoposti ad eutanasia.

4.5 Impianto di pompe iso-osmotiche per il rilascio cronico di Urantide.

I topi appartenenti ai gruppi TAC+UR ed IMA+UR sono stati sottoposti a somministrazione cronica di Urantide mediante l'impianto sottocutaneo di micro-pompe osmotiche a rilascio controllato della durata di sette giorni (micro osmotic pump- Alzet, USA). Il giorno dell'intervento chirurgico, ovvero subito dopo bendaggio aortico e legatura dell'arteria coronaria discendente anteriore, è stato effettuato l'impianto di pompe micro-osmotiche mediante taglio chirurgico in sede sottoscapolare e con successiva sutura, a punti staccati, con filo in materiale riassorbibile.

4.6 Misurazione del gradiente pressorio ed analisi morfometrica.

Dopo sette giorni dall'intervento, tutti i gruppi di animali sono stati anestetizzati e sottoposti ad ecocardiografia (come descritto precedentemente). Nei gruppi TAC e TAC+UR, prima del sacrificio è stata effettuata la misurazione del gradiente pressorio transtenotico, espressione della differenza di pressione tra le due arterie che si trovano rispettivamente a valle ed a monte della stenosi. Gli animali sono stati intubati e ventilati mediante un apposito ventilatore (Harvard Apparatus) regolato con un volume di ossigeno di 0.2ml ed una frequenza respiratoria di 110 per min. Successivamente, entrambi le carotidi comuni, destra e sinistra, sono state incanalate con appositi cateteri preformati (PE50) e connessi a trasduttori di pressione per la determinazione del

gradiente pressorio. Dopo l'ecocardiografia, tutti gli animali sono stati pesati e successivamente sacrificati mediante dislocazione cervicale. I cuori sono stati espianati e le camere cardiache separate e pesate. Quindi, parte del ventricolo sinistro è stata congelata in azoto liquido e poi conservata in ULT Freezer a -80°C; l'altra parte, invece, è stata riservata per gli studi di immunoistochimica, per cui è stata inclusa in formalina.

4.7 Analisi biomolecolare.

4.7.1 Protocollo sperimentale di estrazione tessutale delle proteine.

I cuori, espianati e conservati a -80°C, sono stati lisati a 4°C mediante MIXER in un buffer di lisi contenenti inibitori di proteasi (250mM NaCl, 5mM HEPES, 0.5% Nonidet P-40, 10% Glycerol, 2mM EDTA, 1mM EGTA, 1.2mM MgCl₂, 1mM Sodium orthovanadate, 1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin). Questo strumento permette una rapida ed efficiente frammentazione del campione biologico. Dopo l'omogenizzazione e centrifugazione a 12000giri per 15min a 4°C, si ha la separazione della fase acquosa dalla fase organica, contenente prevalentemente proteine. La concentrazione proteica totale dei campioni è stata determinata con metodo Bradford, usando albumina bovina (ICN) come proteina standard, mediante spettrofotometro (Bio Rad). Una volta misurata l'assorbanza a 595nm, si valuta la concentrazione di proteine attraverso la formula ricavata dalla legge di Lambert-Beer ($A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} * l * c$), dove ϵ_{λ}

rappresenta il coefficiente di estinzione molare, l indica il cammino ottico e c la concentrazione del campione. E' stata così costruita una curva di taratura in base alla quale abbiamo determinato, per interpolazione, il valore della concentrazione proteica totale del campione estratto. Gli estratti proteici sono stati suddivisi in aliquote conservate a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

4.7.2 Western Blot.

Per valutare la presenza delle proteine di nostro interesse, è stata eseguita la metodica del Western Blot. Alla concentrazione proteica ricavata, come descritto precedentemente, è stata aggiunta la soluzione di caricamento, così composta da Blu Bromofenolo, Glicerolo e β -mercaptoetanolo. I campioni sono stati immersi in un bagnetto ad ultrasuoni (Eppendorf), per permettere una migliore risospensione, e, poi, fatti bollire per denaturare le proteine. Successivamente, le proteine sono state frazionate, mediante elettroforesi, su gel di SDS-poliacrilamide (SDS-PAGE) e trasferite su filtro di Polyvinylidene DiFluoride (PVDF, Amersham Biosciences). Dopo trasferimento, le membrane sono state incubate con anticorpi primari per le proteine p-ERK (Cell Signaling, 1:1000 in BSA 5% TBS-Tween 0.1% O.N. $+4^{\circ}\text{C}$) , ERK (Cell Signaling, 1:1000 in BSA (ICN) 5% TBS-Tween 0.1% O.N. $+4^{\circ}\text{C}$), β -ARK1 (Santa Cruz, 1:500 in latte 5% TBS-Tween 0.05%, 1h Tamb), UTR (Cell Signaling, 1:1000 in BSA (ICN) 5% TBS-Tween 0.1% O.N. $+4^{\circ}\text{C}$). Le bande proteiche-immunoreattive sono state visualizzate mediante tecnica di chemiluminescenza (ECL-Plus, Amersham

Bioscences) e le proteine quantificate mediante metodica densitometrica.

4.7.3 Immunoprecipitazione.

Circa 500µg di lisati proteici estratti da tessuto miocardio, sono stati immunoprecipitati per EGFR usando un anticorpo anti-EGFR (Santa Cruz) e per p-Tyr (PY845). In breve, le proteine sono state incubate a 4°C con l'anticorpo anti-EGFR e le proteine A/G. I complessi antigene-anticorpo immunoprecipitati sono stati risospesi in Laemly 4X, denaturati a 95°C e frazionati su gel di SDS-poliacrilammide (SDS-PAGE). Successivamente, dopo il trasferimento su filtro PVDF, le membrane sono state incubate con l'anticorpo primario anti-p-Tyr (Santa Cruz, 1:1000 in latte 5% PBS-T 0.1%). Le bande proteiche-immunoreattive sono state visualizzate mediante tecnica di chemiluminescenza (ECL-Plus, Amersham Bioscences) e le proteine quantificate mediante metodica densitometrica.

4.8 Analisi istologica.

4.8.1 Valutazione della percentuale di fibrosi.

Nei cuori di animali sottoposti a bendaggio aortico (TAC e TAC+UR), è stata valuta la percentuale di fibrosi trattando sezioni trasversali di ventricolo sinistro con colorante Sirius Red 0.1% () in Acido Picrico (Carlo Erba). In breve, le sezioni dello spessore di

4µm dei cuori fissati in paraffina, sono state sottoposte ad una fase di deparaffinizzazione ed idratazione mediante passaggi in Histolemon (Carlo Erba) e serie decrescente di Alcool (Carlo Erba), per essere, poi, incubate per 1h in Sirius Red 0.1%. Successivamente, le sezioni sono state disidratate mediante passaggio in serie alcolica crescente e sottoposte ad una fase di montaggio con coprioggetto (Bio-Optica) mediante montante acquoso (Eukitt, Bio-Optica). Infine, le sezioni sono state acquisite mediante videocamera (JVC) collegata al microscopio (Leica), ad un ingrandimento 25X, e la percentuale di collagene depositata è stata valuta mediante Image J.

4.8.2 Valutazione dell'area infartuata (Infarct Size).

Per la valutazione dell'area infartuata (Infarct Size) nei cuori degli animali sottoposti a legatura della discendente anteriore (IMA e IMA+UR), le sezioni trasversali di ventricolo sinistro sono state sottoposte a colorazione Tricomica di Masson. La colorazione Tricomica di Masson permette di distinguere il tessuto miocardio vitale, con colorazione di fucsia, da quello necrotico, con colorazione di verde. In breve, dopo deparaffinizzazione ed idratazione in Histolemon (Carlo Erba) ed in serie alcolica decrescente (Carlo Erba), le sezioni sono state colorate mediante trattamento per 10min con ematossilina ferrica di Groat e poi con soluzione contenente Ponceau 2R 0.2g, Fucsina acida 0.1g, acqua distillata 300ml. Dopo una serie di lavaggi in acido acetico 1%, le sezioni sono state trattate con Acido fosfomolibdico 3-5g e Orange G 2g e, successivamente, con Verde luce 0.1-0.2g. Infine, dopo

disidratazione mediante passaggio in Etanolo assoluto e Histolemon, le sezioni sono state sottoposte ad una fase di montaggio con coprioggetto (Bio-Optica) mediante montante acquoso (Eukitt, Bio-Optica). Infine, le sezioni sono state acquisite mediante videocamera (JVC) collegata al microscopio (Leica), ad un ingrandimento 1.6X, e la percentuale di area infartuata è stata calcolata dal rapporto tra l'estensione dell'area ischemica e la differenza tra l'estensione dell'area pericardica ed endocardica.

4.9Analisi statistica.

L'analisi statistica utilizzata per l'espressione dei dati è la media \pm errore standard. Per i confronti multipli dei parametri ecocardiografici prima e dopo bendaggio aortico, è stato utilizzato il test di Fischer , dopo analisi della varianza (ANOVA). Per le analisi biochimiche e per i dati relativi al peso delle camere cardiache abbiamo utilizzato il test *t* di Student con la correzione di Bonferroni. Per tutti i parametri era considerato statisticamente significativo un valore della $p < 0.05$.

RISULTATI.

5.1 Valutazione morfologica della risposta ipertrofica.

Nei gruppi di animali TAC e TAC+UR abbiamo osservato un aumento significativo del grado di ipertrofia, espresso come rapporto tra il peso del ventricolo sinistro (LV,mg) ed il peso dell'animale (BW,g), rispetto al gruppo di controllo (SHAM). I risultati del nostro studio dimostrano come gli animali sottoposti a bendaggio aortico e trattati con Urantide (TAC+UR) sviluppavano comunque un grado di ipertrofia cardiaca del tutto sovrapponibile agli animali TAC non trattati (Fig.1, LV/BW: SHAM=4.00±0.5, TAC=6.04±0.5, TAC+UR=5.83±0.5, p<0.05 per TAC e TAC+UR vs SHAM).

5.2 Valutazione ecocardiografica della funzione cardiaca in animali sottoposti a bendaggio aortico.

I gruppi sperimentali SHAM, TAC e TAC+UR sono stati sottoposti ad ecocardiogramma transtoracico mono e bidimensionale allo scopo di valutare la funzione cardiaca prima dell' intervento e sette giorni dopo l' induzione del sovraccarico pressorio. Dopo sette giorni dal bendaggio aortico, le dimensioni dei diametri telediastolico (LVEDD) e telesistolico (LVESD), non mostravano variazioni significative nel gruppo TAC rispetto al gruppo di controllo (SHAM). Al contrario, negli animali sottoposti a bendaggio aortico e trattamento con Urantide (TAC+UR) si osservava un significativo

aumento del diametro telesistolico senza variazione significativa di quello telediastolico. In questo gruppo di animali, quindi, risultava quindi significativamente ridotta la performance cardiaca, valutata come frazione di accorciamento del ventricolo sinistro (Fig.2, %FS: TAC+UR=46±1.5, TAC=52±1.5; p<0.05).

5.3 Valutazione della percentuale di fibrosi in animali sottoposti a bendaggio aortico.

Nel gruppo di animali sottoposti a bendaggio aortico (TAC) è stato osservato un aumento significativo della percentuale di fibrosi rispetto a quella rilevata nel gruppo SHAM. Inoltre, nel gruppo di animali sottoposti a bendaggio aortico e trattati con Urantide (TAC+UR) la percentuale di fibrosi risultava significativamente maggiore rispetto al gruppo TAC (Fig.3, TAC+UR=14±1.3, TAC=9±1.2, p<0.05).

5.4 Valutazione morfofunzionale della funzione cardiaca negli animali sottoposti ad infarto miocardio acuto.

Gli animali dei tre gruppi sperimentali SHAM, IMA e IMA+UR sono stati sottoposti ad ecocardiografia transtoracica mono e bidimensionale allo scopo di valutare la funzione cardiaca prima dell'intervento e sette giorni dopo l'induzione del sovraccarico pressorio. Dall'analisi dei parametri ecocardiografici è risultato che, a sette giorni dalla legatura dell'arteria coronaria, le dimensioni dei diametri telediastolico (LVEDD) e telesistolico (LVESD) degli animali

infartuati (IMA e IMA+UR), si riducevano rispetto al gruppo SHAM. Inoltre, negli animali sottoposti ad infarto del miocardio acuto e trattati con Urantide (IMA+UR) si osservava un significativo aumento del diametro telesistolico senza variazione significativa di quello telediastolico rispetto al gruppo IMA (Tab. 1); quindi, nel gruppo di animali sottoposti ad IMA e trattati con Urantide (IMA+UR) la funzione ventricolare sinistra risultava maggiormente compromessa rispetto agli animali sottoposti ad IMA e non trattati con Urantide, nonostante la percentuale di area infartuata non presentasse alcuna differenza tra i due gruppi (Fig.4, %FS, IMA+UR=34±1.5, IMA=38±1.5, p<0.05; area infartuate, IMA+UR=27±3, IMA=28±4, non significativo).

5.5 Valutazione della fibrosi negli animali sottoposti ad infarto miocardico acuto.

Nel gruppo di animali sottoposti ad infarto del miocardio acuto (IMA) abbiamo osservato una percentuale di fibrosi del ventricolo sinistro significativamente maggiore rispetto a quella rilevata nel gruppo di controllo (SHAM). Inoltre, nel gruppo di animali sottoposti ad infarto miocardio acuto e trattati con Urantide (IMA+UR) la percentuale di fibrosi era significativamente maggiore rispetto al gruppo IMA (Fig.5, IMA+UR=15±1.4, IMA=10±1.5, p<0.05).

5.6 Effetti del sovraccarico cronico di pressione sui livelli del recettore dell'Urotensina II.

Per dimostrare che i livelli di UTII aumentano in risposta al sovraccarico pressorio, abbiamo valutato i livelli del recettore dell'Urotensina II (UT) nel gruppo SHAM e nel gruppo TAC. Questi ultimi presentavano un significativo incremento dell'espressione del recettore rispetto al gruppo di controllo (Fig.6)..

5.7 Valutazione dell'attivazione della chinasi 1 del recettore β -adrenergico (β ARK1) dopo sovraccarico pressorio ed infarto miocardico acuto.

Precedenti studi hanno dimostrato che nello scompenso cardiaco i recettori β adrenergici (β AR) vanno incontro a desensibilizzazione e a down-regolazione, e che la chinasi 1 del recettore β -adrenergico (β ARK1) è coinvolta in tale fenomeno in corso di ipertrofia da sovraccarico pressorio. Dal momento che l'induzione dell'espressione di β ARK1 è associata alla progressione verso lo scompenso cardiaco, abbiamo valutato il livello di tale proteina in tutti i gruppi di animali. Negli animali sottoposti a bendaggio aortico (TAC) ed infarto del miocardio acuto (IMA) è stato riscontrato un incremento significativo dell'attivazione di questa chinasi rispetto al gruppo SHAM. Inoltre, nei gruppi di animali sottoposti a bendaggio e ad infarto del miocardio acuto e trattati con Urotensina II (TAC+UR e IMA+UR) tale incremento risultava ancora maggiore rispetto a quello osservato nei topi sottoposti al solo bendaggio o alla sola legatura dell'arteria coronaria (Fig.7 e8). Questi dati suggeriscono come la somministrazione dell'antagonista selettivo del recettore

dell'UTII abbia effetto deleterio sulla funzione cardiaca in risposta al sovraccarico pressorio ed ad infarto del miocardio acuto.

5.8 Effetti dell'Urantide sull'attivazione di ERK dopo sovraccarico pressorio ed infarto miocardio acuto.

Le MAPKs svolgono un ruolo molto importante nello sviluppo dell'ipertrofia cardiaca. Per chiarire il ruolo dell'UTII nell'ipertrofia cardiaca e nella progressione verso lo scompenso, nel nostro studio abbiamo valutato se attraverso l'antagonista recettoriale Urantide si determina l'inibizione dell'attivazione delle MAPKs nelle cellule cardiache. A tale scopo, abbiamo esaminato mediante immunoblotting l'attivazione della forma fosforilata di ERK (p-ERK) nei lisati ventricolari di tutti i gruppi di animali oggetto dello studio. Negli animali TAC ed IMA si evidenziava una maggiore espressione di ERK. Invece, nei gruppi TAC e IMA trattati con Urantide l'induzione di p-ERK risultava significativamente ridotta (Fig.7 e 8). Questi dati suggeriscono che UTII induce una significativa attivazione di ERK nelle cellule cardiache.

5.9 Valutazione della transattivazione dell'EGFR dopo infarto miocardico acuto e banding aortico .

Recenti studi hanno dimostrato che EGFR è coinvolto nell'ipertrofia cardiaca e nel rimodellamento post-ischemico, attraverso l'attivazione delle MAPKs, e che UTII è in grado di transattivare EGFR e di stimolare in questo modo lo sviluppo di ipertrofia

cardiaca. Nel nostro studio, quindi, abbiamo valutato mediante immunoblotting i livelli di fosforilazione di EGFR nei due gruppi di animali sottoposti ad infusione di UR ed ad infarto (IMA ed IMA+UR) ed ad ipertrofia cardiaca (TAC e TAC+UR). I risultati hanno dimostrato che EGFR era maggiormente fosforilato negli IMA e nei TAC rispetto al gruppo SHAM, e tale fosforilazione era significativamente ridotta dal trattamento con UR (Fig.9). Questi dati suggeriscono l'importanza del ruolo dell'UTII nell'attivazione di EGFR, responsabile della conseguente attivazione del pathway delle MAPKs con successiva stimolazione della trascrizione genica, della sintesi proteica e crescita cellulare.

FIGURE

Tabella1. Valutazione ecocardiografica e morfometrica dei 5 gruppi di animali oggetti dello studio.

Abbreviazioni: *LVEDD*, diametro telediastolico del ventricolo sinistro; *LVESD*, diametro telesistolico del ventricolo sinistro; *SEPth*, spessore del setto interventricolare; *PWth*, spessore della parete posteriore; *Vcfc*, velocità di accorciamento circonferenziale media, corretta per la frequenza cardiaca; *circ/s*, accorciamento circonferenziale per secondo; *HR*, frequenza cardiaca; *LV/BW*, heart weight/BW; *%FS*, % di accorciamento del ventricolo sinistro.

	SHAM n=12	TAC n= 10	TAC+UR n= 7	IMA n= 9	IMA+UR n= 7
LVEDD,mm	2.8± 0.1	2.9±0.1	3.2±0.1	3.6±0.1	3.9±0.1
LVESD, mm	1.4± 0.1	1.5±0.1	1.7±0.1	2.3±0.1	2.7±0.1
SEPth, mm	0.8±0.1	1.1±0.1	1.2±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1
PWth, mm	0.7±0.1	1.0±0.1	1.1±0.1	0.9±0.1	1.0±0.1
FS, %	59±0.8	51±0.8	46±0.8	47±0.8	34±0.8
MeanVcfc	7.1±0.1	2.6±0.1	2.2±0.1	1.9±0.1	1.8±0.1
HR, bpm	540±9	616±9	620±9	362±9	423±9
BW, g			19.1±6		

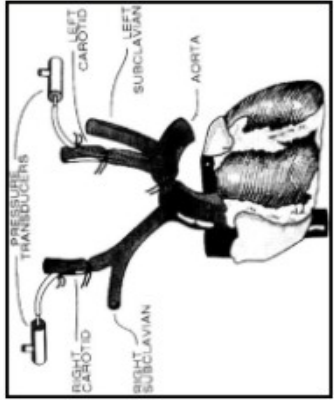
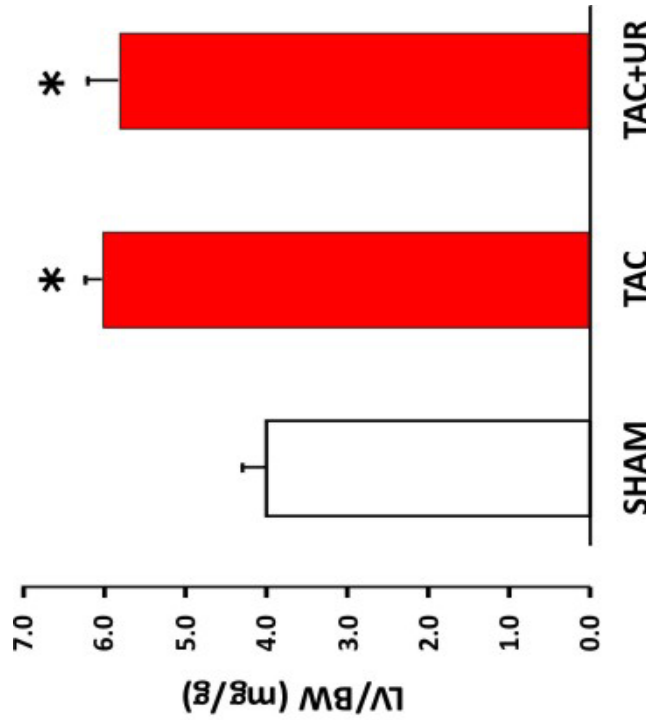


Figura1: Modello sperimentale murino di sovraccarico pressorio. A sinistra, rappresentazione grafica del banding aortico: viene eseguita una sutura dell'aorta trasversa (TAC) nel tratto compreso fra il tronco anonimo e l'arteria carotide comune di sinistra. A destra, il grafico mostra la risposta ipertrofica al sovraccarico pressorio che viene espressa come rapporto tra il peso del ventricolo sinistro espresso in mg ed il peso corporeo espresso in grammi (LV/BW). Nei gruppi di animali TAC e TAC+UR si osserva un incremento significativo dell'ipertrofia rispetto agli animali del gruppo SHAM (* $p < 0.05$ vs. SHAM).

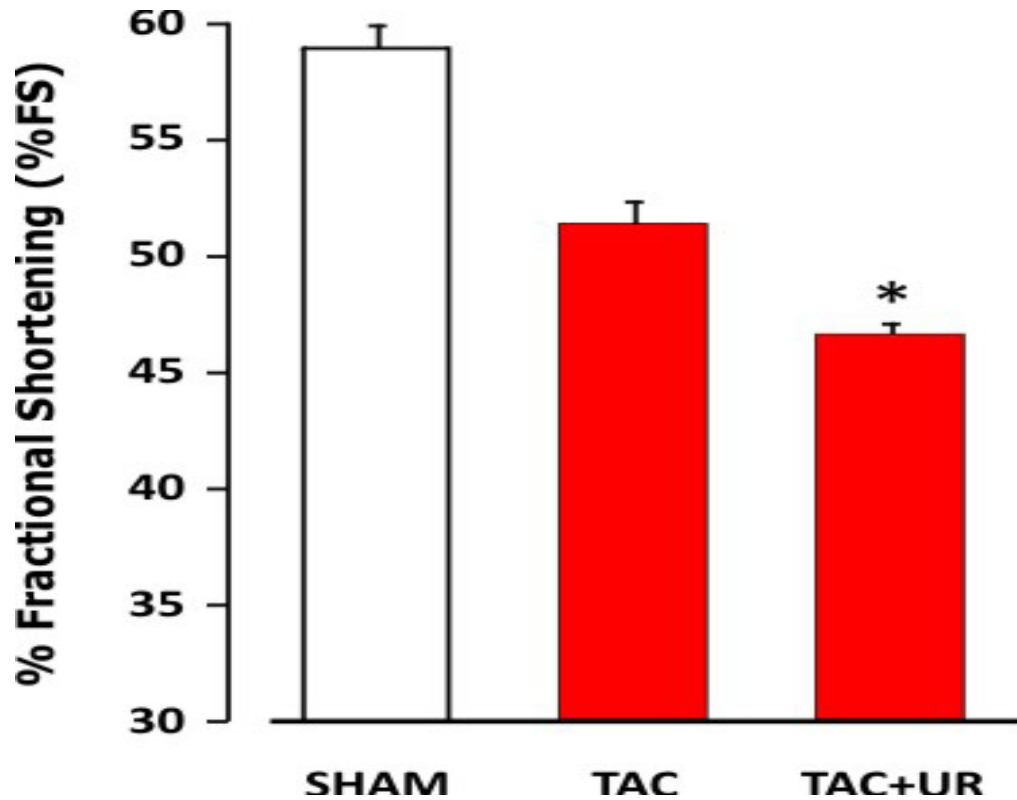


Figura2: Valutazione della funzione ventricolare sinistra in topi sottoposti a sovraccarico di pressione ed inibizione del signaling dell'Urotensina II. La Fractional Shortening (frazione di accorciamento ventricolare sinistra), espressione della funzionalità ventricolare, si riduce in seguito a trattamento con Urotensin II Receptor Antagonist (UR) (FS= VTDVTS/VTD; TAC+UR= 46±1.5; TAC= 52±1.5) nei gruppi di animali sottoposti a banding aortico (*p<0.05 vs SHAM, **p<0.05 vs SHAM and TAC).

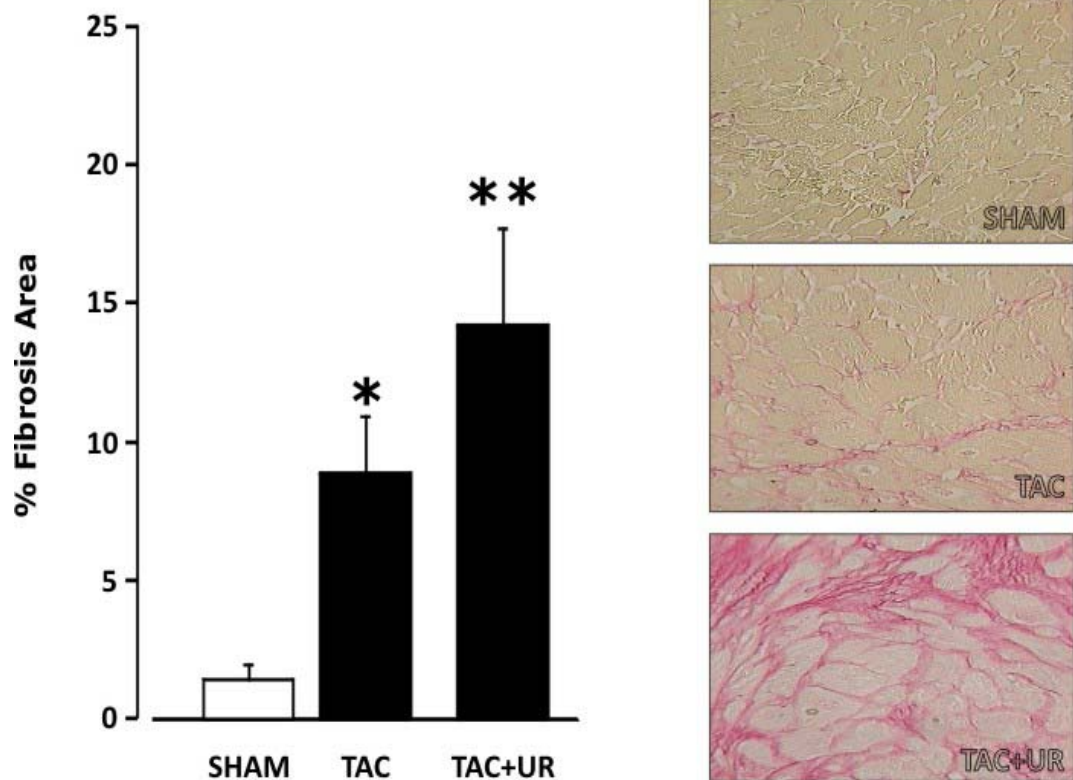


Figura3: Valutazione della percentuale di fibrosi cardiaca, in seguito a somministrazione di Urantide, in topi sottoposti a sovraccarico pressorio. Come è possibile osservare, nel grafico rappresentativo a sinistra, a sette giorni dal banding, la percentuale di fibrosi è maggiore negli animali trattati con Urantide rispetto agli animali del gruppo di controllo e agli animali sottoposti solo al banding aortico. (TAC=9±1.2;TAC+UR=14±1.3; *p<0.05 vs SHAM; **p<0.05 vs SHAM and TAC). A destra, le immagini istologiche mostranti il grado di fibrosi del ventricolo sinistro.

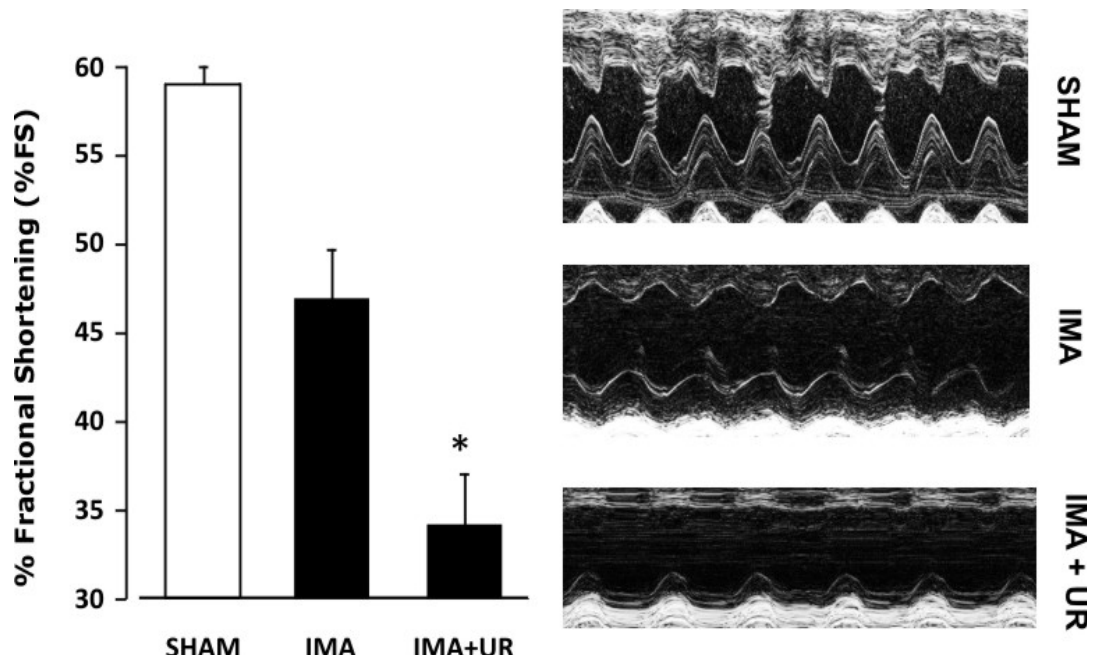


Figura4: Valutazione della funzione ventricolare sinistra in topi sottoposti ad infarto miocardico acuto ed inibizione del signaling dell'Urotensina II. La Fractional Shortening (frazione di accorciamento ventricolare sinistra), espressione della funzionalità ventricolare, si riduce in seguito a trattamento con Urantide (FS= VTDVTS/VTD; IMA=47; IMA+UR=34) nei gruppi di animali sottoposti a legatura dell'arteria coronaria. (*p<0.05 vs SHAM, **p<0.05 vs SHAM and IMA). A destra, tracciati ecocardiografici in Mmode rappresentativi dei diversi gruppi di animali oggetto dello studio.

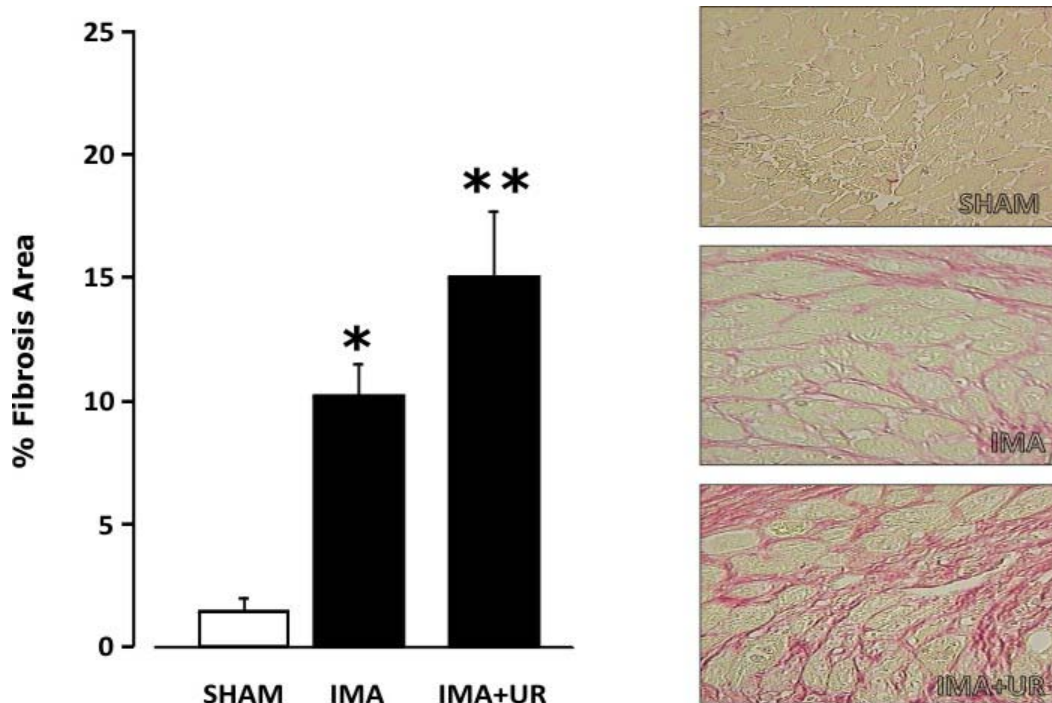


Figura5: Valutazione della percentuale di fibrosi , in seguito a somministrazione di Urantide, in topi sottoposti ad infarto miocardico acuto. Come è possibile osservare, nel grafico rappresentativo a sinistra, la percentuale di fibrosi, a sette giorni dalla legatura della arteria coronaria, è maggiore negli animali trattati con Urantide rispetto agli animali del gruppo di controllo e agli animali sottoposti solo alla legatura. (IMA=10+1.5; IMA+UR=15+1.4; *p<0.05 vs SHAM; **p<0.05 vs SHAM e IMA).

A destra, le immagini istologiche mostranti il grado di fibrosi del ventricolo sinistro.

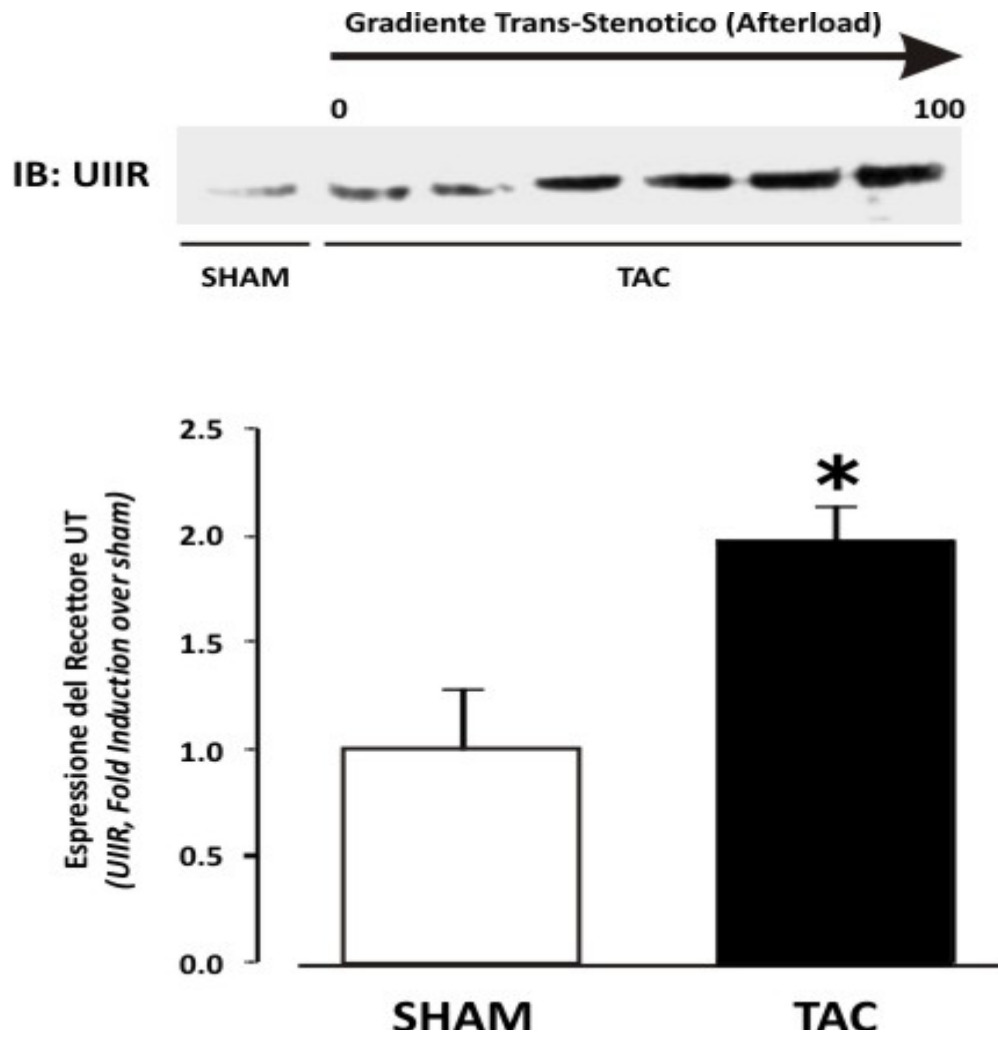


Figura6: Aumento dei livelli dell'UTIIR negli animali sottoposti a banding aortico. I lisati citosolici ventricolari sono stati analizzati per determinare i livelli del recettore dell'Urotensina II (UTIIR), che risultano significativamente aumentati negli animali sottoposti a banding aortico (TAC) rispetto agli animali del gruppo di controllo (SHAM).

In basso, gli istogrammi raffigurano l'aumento dei livelli di UTIIR nei TAC rispetto agli SHAM (* $p < 0.05$ vs SHAM)

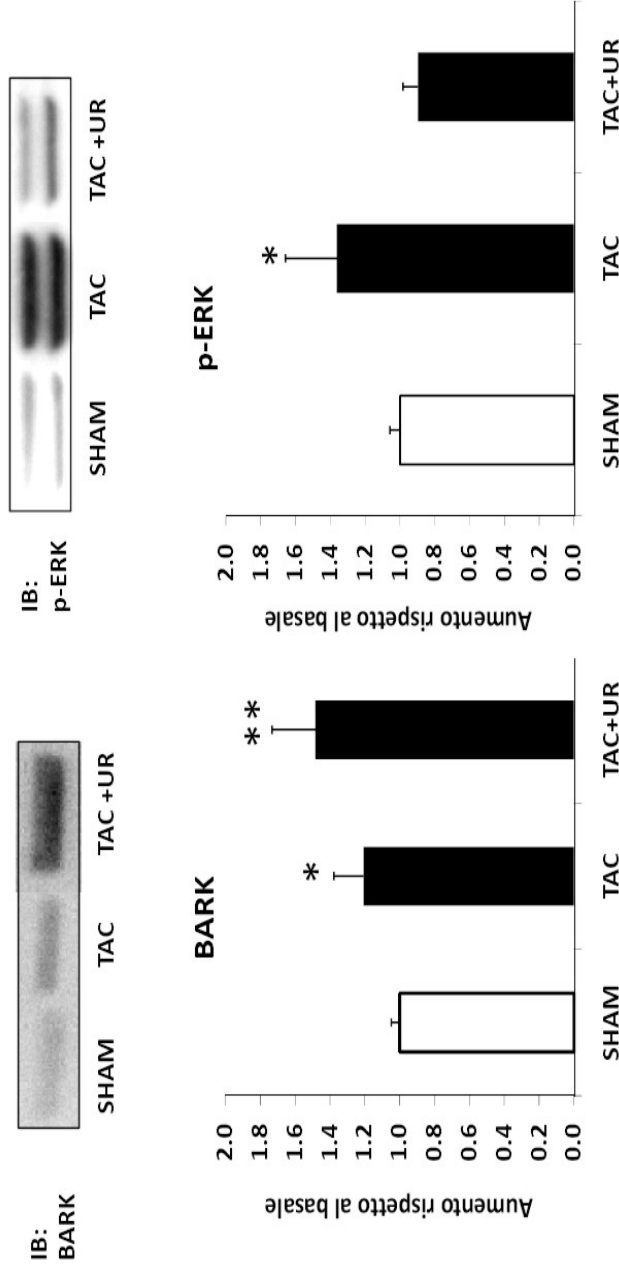


Figura7: Attivazione di β ARK1 e di ERK in risposta al sovraccarico pressorio indotto da banding dell'aorta trasversa, in seguito a trattamento con UR. A sinistra, i lisati miocardici sono stati blottati per l'anticorpo anti β ARK1; I livelli di β ARK1 sono aumentati nei TAC rispetto ai controlli, e significativamente aumentati negli animali TAC in seguito a trattamento con UR. In basso, gli istogrammi raffigurano l'aumento dei livelli di β ARK nei TAC in assenza e in presenza di trattamento con UR. A destra, lisati miocardici sono stati blottati per l'anticorpo anti p-ERK; le analisi di immunoblotting hanno rivelato un aumento della fosforilazione di ERK nei TAC rispetto ai controlli e una riduzione nel gruppo TAC+UR. In basso, gli istogrammi raffigurano la riduzione della fosforilazione di ERK in risposta a stimolazione con UR nel gruppo TAC+UR (* $p < 0.05$ vs SHAM, ** $p < 0.05$ vs SHAM and TAC).

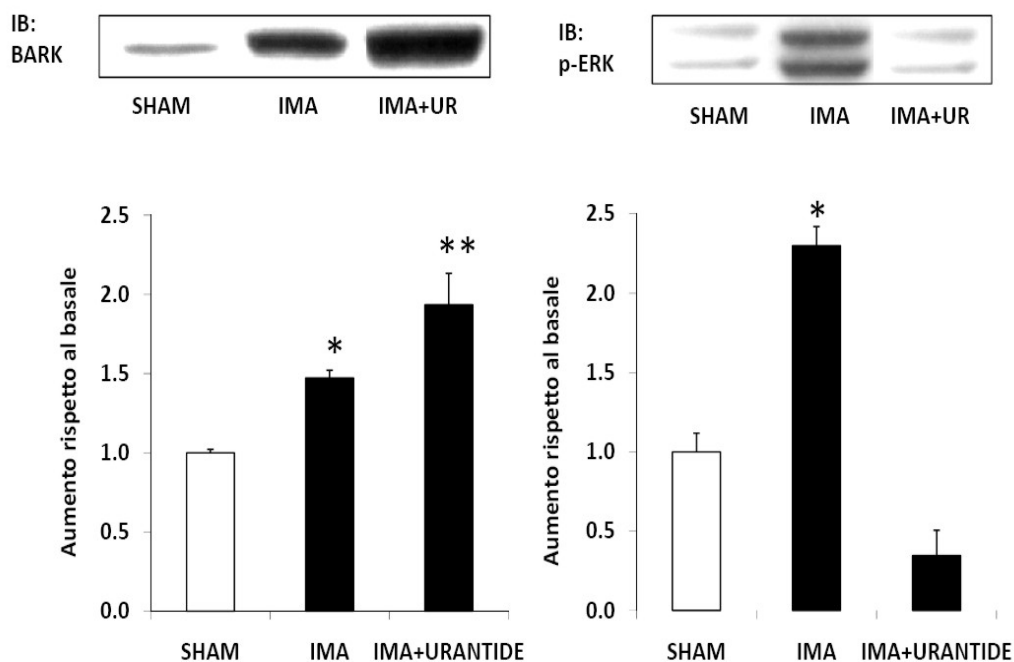


Figura8: Attivazione di β ARK1 e di ERK in seguito ad infarto miocardico acuto e in seguito a trattamento con UR. A sinistra, i lisati miocardici sono stati blottati per l'anticorpo anti- β ARK1; I livelli della proteina β ARK1 sono aumentati nei cuori esposti ad infarto miocardico acuto rispetto agli animali del gruppo di controllo, e significativamente aumentati negli animali IMA in seguito a trattamento con UR. In basso, gli istogrammi raffigurano l'aumento dei livelli di β ARK nei IMA in assenza e in presenza di trattamento con UR. A destra, i lisati miocardici sono stati blottati per l'anticorpo anti p-ERK; le analisi di immunoblotting hanno rivelato un aumento della fosforilazione di ERK negli IMA rispetto al gruppo di controllo e una riduzione nel gruppo IMA+UR. In basso, gli istogrammi raffigurano la riduzione della fosforilazione di ERK in risposta a stimolazione con UR nel gruppo IMA+UR (* $p < 0.05$ vs SHAM, ** $p < 0.05$ vs SHAM and IMA).

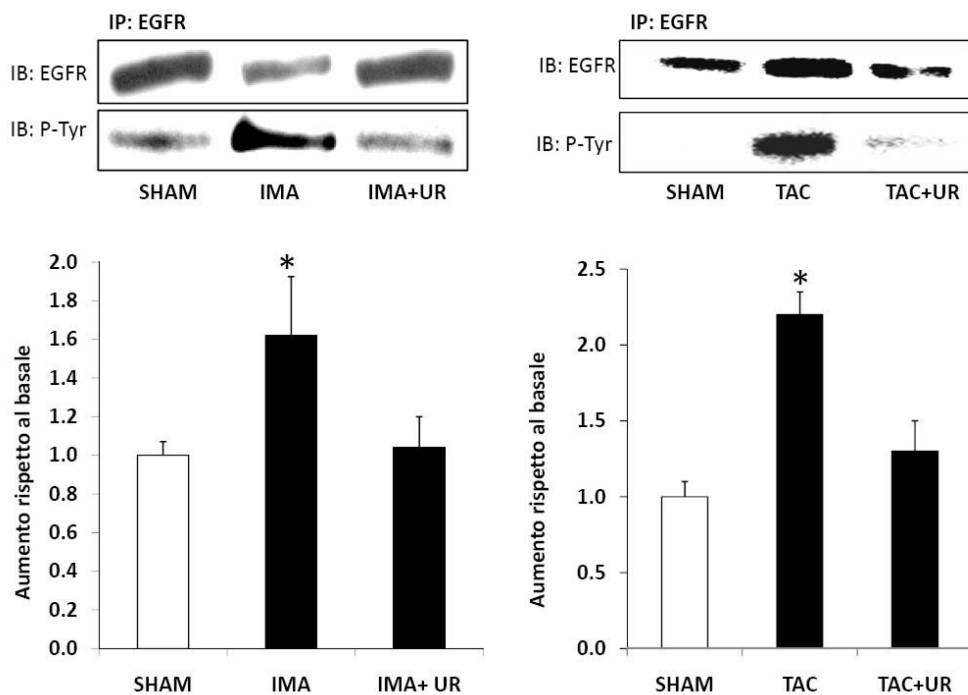


Figura9: L'attivazione di EGFR è ridotta in seguito a trattamento con Urantide. A sinistra, i lisati miocardici dei topi appartenenti ai gruppi SHAM, IMA e IMA+UR sono stati immunoprecipitati per anti EGFR e blottati per anti p-Tyr (PY20); i livelli della fosforilazione di EGFR sono significativamente ridotti in seguito a trattamento con UR nei topi sottoposti a legatura dell'arteria coronaria. In basso, gli istogrammi raffigurano l'aumento dei livelli di p-Tyr negli IMA e IMA+UR. A destra, i lisati miocardici degli animali appartenenti ai gruppi SHAM, TAC e TAC+UR sono stati immunoprecipitati per anti EGFR e blottati per anti-Tyr (PY20); i livelli della fosforilazione di EGFR sono significativamente ridotti in seguito a trattamento con Urantide nei topi sottoposti a banding aortico. In basso, gli istogrammi raffigurano l'aumento dei livelli di p-Tyr negli IMA e IMA+UR (* $p < 0.05$ vs SHAM, $p < 0.05$ vs SHAM and IMA (TAC)).

Conclusioni.

Lo studio svolto in questa tesi è rivolto a caratterizzare la biosintesi ed il meccanismo di azione dell'Urotensina II e le sue azioni autocrine/paracrine sia in condizioni normali che in condizioni patologiche. Il modello animale utilizzato ci ha permesso di valutare il ruolo dell'UTII nella fisiopatologia dello scompenso cardiaco in maniera più completa di quanto sia possibile effettuare sull'uomo, proprio grazie alla quantità di materiale biologico disponibile e alla versatilità del modello.

Come è ormai noto, l'Urotensina II svolge un ruolo importante nella patogenesi e nello sviluppo delle malattie cardiovascolari e l'Urantide, uno dei più potenti antagonisti recettoriali peptidici del recettore dell'Urotensina II, inibisce *in vitro* il segnale dell'UTII. Il nostro studio dimostra il ruolo protettivo dell'UTII nel rimodellamento cardiaco patologico indotto dal sovraccarico di pressione o dall'ischemia miocardica. Infatti, in topi sottoposti a bendaggio aortico od infarto miocardico acuto, il trattamento con UR riduceva la funzione cardiaca, aumentava la fibrosi, i livelli di β ARK1 e riduceva la transattivazione dell'EGFR e la fosforilazione di ERK.

La stimolazione del recettore da parte dell'Urotensina II attiva diverse vie di segnalazione intracellulare compresa quella delle MAPKs, che mediano la crescita cellulare attraverso la stimolazione di fattori di crescita nucleari. Studi precedenti hanno dimostrato che EGFR svolge un ruolo importante nel rimodellamento e nel processo di ipertrofia cardiaca attraverso l'attivazione delle MAPKs, e che l'Urotensina II è in grado di mediare la transattivazione di EGFR attraverso il rilascio del Fattore HB-EGF da parte delle proteine metallo proteasi (MMP), *in vitro*. Tuttavia, gli effetti *in vivo*

dell'inibizione del pathway dell'UTII erano fino ad ora sconosciuti. I nostri dati dimostrano che UTII è responsabile della transattivazione dell'EGFR in vivo e che l'inibizione di questa via di trasduzione del segnale è associata ad un peggioramento della funzione cardiaca e di parametri biochimici e strutturali miocardici.

Gli animali sottoposti a bendaggio aortico (TAC) e trattati con Urantide, pur sviluppando un grado di ipertrofia simile a quello osservato negli animali sottoposti a TAC ma non trattati, andavano incontro ad una significativa riduzione della frazione di accorciamento del ventricolo sinistro ed ad un aumento del diametro telesistolico ventricolare rispetto agli animali non trattati, ma sottoposti soltanto a TAC. Questo dato dimostra che l'Urotensina II non influenza significativamente l'aumento della massa ventricolare in risposta al sovraccarico di pressione. In modo analogo, gli animali sottoposti ad infarto del miocardio (IMA) e trattati con Urantide, pur sviluppando la stessa area infartuate degli animali IMA ma non trattati, andavano incontro ad una significativa riduzione della funzione ventricolare rispetto a questi ultimi. Ciò dimostra che, a parità di area infartuate, la progressione verso lo scompenso cardiaco è comunque più rapida negli animali trattati con Urantide, dimostrando l'azione cardioprotettiva del pathway indotto dall'Urotensina II.

Nel gruppo di animali sottoposti a TAC ed ad IMA e trattati con Urantide si osservava una riduzione significativa dell'espressione di ERK-MAPKs ed un incremento significativo dei livelli di β ARK1 rispetto al gruppo di animali sottoposti a TAC ed IMA ma non trattati con UR. L'inibizione del signaling dell'Urotensina II, aumentando l'espressione di β ARK1, determina l'alterazione del signaling β -adrenergico coinvolto nella progressione verso lo scompenso

cardiaco. L'attivazione di β ARK1 svolge, infatti, un ruolo fondamentale nella downregolazione e nella desensibilizzazione di tali recettori, fenomeni alla base dei meccanismi fisiopatologici che determinano la progressione verso lo scompenso cardiaco.

Il blocco del recettore dell'UTII mediante Urantide riduceva in questi gruppi sperimentali l'attivazione di EGFR. Infatti, nei gruppi TAC ed IMA, trattati con UR, la fosforilazione di tale recettore era significativamente ridotta rispetto agli animali sottoposti a TAC ed IMA ma non trattati con UR. Questi dati sono in accordo con la crescente convinzione che gli effetti mediati dall'UTII sono, almeno in parte, dovuti alla transattivazione dell'EGFR. Un altro dato, invece, rilevante, che conferma quanto detto finora, è che il blocco recettoriale dell'Urotensina II comportava lo sviluppo di una maggiore percentuale di fibrosi rispetto a quella osservata nei gruppi di controllo ed in quelli sottoposto a TAC ed IMA.

In conclusione, i nostri dati dimostrano pertanto un ruolo protettivo del signaling dell'Urotensina II nella transizione verso lo scompenso cardiaco in due diversi modelli animali in risposta al sovraccarico di pressione o ad ischemia cardiaca. L'inibizione del signaling mediato dal recettore dell'Urotensina II ha effetti deleteri sulla morfologia miocardia e sulla funzione cardiaca, determinando una più facile progressione verso lo scompenso cardiaco nonostante lo sviluppo di ipertrofia compensatoria.

BIBLIOGRAFIA.

1. Bern, H.A. and K. Lederis, *A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts*. J Endocrinol, 1969. **45**(1): p. Suppl:xi-xii.
2. Pearson, D., et al., *Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(8): p. 5021-4.
3. Itoh, H., D. McMaster, and K. Lederis, *Functional receptors for fish neuropeptide urotensin II in major rat arteries*. Eur J Pharmacol, 1988. **149**(1-2): p. 61-6.
4. Kinney, W.A., et al., *Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model*. Angew Chem Int Ed Engl, 2002. **41**(16): p. 2940-4.
5. Brkovic, A., et al., *Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **306**(3): p. 1200-9.
6. Coulouarn, Y., et al., *Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15803-8.
7. Ames, R.S., et al., *Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14*. Nature, 1999. **401**(6750): p. 282-6.
8. Coulouarn, Y., et al., *Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors*. FEBS Lett, 1999. **457**(1): p. 28-32.

9. Russell, F.D., et al., *Urotensin-II-converting enzyme activity of furin and trypsin in human cells in vitro*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **310**(1): p. 209-14.
10. Marchese, A., et al., *Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors*. Genomics, 1995. **29**(2): p. 335-44.
11. Protopopov, A., et al., *Assignment of the GPR14 gene coding for the G-protein-coupled receptor 14 to human chromosome 17q25.3 by fluorescent in situ hybridization*. Cytogenet Cell Genet, 2000. **88**(3-4): p. 312-3.
12. Liu, Q., et al., *Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **266**(1): p. 174-8.
13. Flohr, S., et al., *Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II*. J Med Chem, 2002. **45**(9): p. 1799-805.
14. Boucard, A.A., et al., *Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 3): p. 829-38.
15. Bhaskaran, R., A.I. Arunkumar, and C. Yu, *NMR and dynamical simulated annealing studies on the solution conformation of urotensin II*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1199**(2): p. 115-22.

16. Bousette, N., et al., *Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta*. *Atherosclerosis*, 2004. **176**(1): p. 117-23.
17. Proulx, C.D., et al., *Involvement of a cytoplasmic-tail serine cluster in urotensin II receptor internalization*. *Biochem J*, 2005. **385**(Pt 1): p. 115-23.
18. Claing, A., et al., *Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins*. *Prog Neurobiol*, 2002. **66**(2): p. 61-79.
19. Tasaki, K., et al., *Mechanism of human urotensin II-induced contraction in rat aorta*. *J Pharmacol Sci*, 2004. **94**(4): p. 376-83.
20. Katano, Y., et al., *Vasodilator effect of urotensin II, one of the most potent vasoconstricting factors, on rat coronary arteries*. *Eur J Pharmacol*, 2000. **402**(1-2): p. R5-7.
21. Bottrill, F.E., et al., *Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries*. *Br J Pharmacol*, 2000. **130**(8): p. 1865-70.
22. Maguire, J.J., R.E. Kuc, and A.P. Davenport, *Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1*. *Br J Pharmacol*, 2000. **131**(3): p. 441-6.
23. Douglas, S.A., et al., *Differential vasoconstrictor activity of human urotensin-II in vascular tissue isolated from the rat, mouse, dog, pig, marmoset and cynomolgus monkey*. *Br J Pharmacol*, 2000. **131**(7): p. 1262-74.
24. Tzanidis, A., et al., *Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy*. *Circ Res*, 2003. **93**(3): p. 246-53.

25. Cheung, B.M., et al., *Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension*. J Hypertens, 2004. **22**(7): p. 1341-4.
26. Flohr, S., et al., *Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II*. J Med Chem, 2002. **45**(9): p. 1799-805.
27. Grieco, P., et al., *A new, potent urotensin II receptor peptide agonist containing a Pen residue at the disulfide bridge*. J Med Chem, 2002. **45**(20): p. 4391-4.
28. Camarda, V., et al., *A new ligand for the urotensin II receptor*. Br J Pharmacol, 2002. **137**(3): p. 311-4.
29. Floras, J.S., *Clinical aspects of sympathetic activation and parasympathetic withdrawal in heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1993. **22**(4 Suppl A): p. 72A-84A.