

Urocortina: biologia molecolare ed effetti sull'apparato cardiovascolare

Riccardo Raddino¹, Claudio Pedrinazzi¹, Gregoriana Zanini¹, Debora Robba¹, Ivano Bonadei¹, Tiziano M. Scarabelli², Livio Dei Cas¹

¹Sezione di Cardiologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Applicata, Università degli Studi, Brescia,

²Division of Cardiovascular Disease, Department of Medicine, Wayne State University, Detroit, MI, USA

Key words:

Heart failure;
Ischemia-reperfusion
injury; Urocortin.

Urocortins and the corticotropin releasing hormone have a long evolutionary history. In the nervous system the corticotropin releasing hormone is responsible of anxiogenic effects associated with stress, while urocortins are concerned with adaptive behavior.

Urocortins are also expressed in the heart, where they may play an autocrine/paracrine role binding to corticotropin releasing hormone-R2 receptors. The expression of endogenous cardiac urocortin is increased by *in vitro* ischemia-reperfusion damage, and the addition of exogenous urocortins is associated with reduction of myocardial cell death during ischemia-reperfusion damage *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. In isolated perfused heart urocortin enhances cardiac contractility and decreases high energy phosphates reduction after ischemia-reperfusion damage. Urocortin is also associated with peripheral and coronary vasodilation and with positive inotropic effect. There are experimental data which suggest a beneficial effect of urocortins in subjects with heart failure and a possible beneficial role of urocortin in preventing the iatrogenic ischemia-reperfusion damage caused by cardioplegic arrest during cardiac surgery. These early observations suggest that assessment of the clinical use of urocortin in heart failure and for the prevention of ischemia-reperfusion damage in cardiac surgery should be actively pursued.

(G Ital Cardiol 2007; 8 (4): 236-245)

© 2007 AIM Publishing Srl

Ricevuto il 9 ottobre 2006; nuova stesura il 10 gennaio 2007; accettato l'11 gennaio 2007.

Per la corrispondenza:

Prof. Riccardo Raddino
U.O. di Cardiologia
Spedali Civili
Piazza Spedali Civili, 1
25123 Brescia
E-mail:
cpedrinazzi@tele2.it

Introduzione

Le urocortine fanno parte di un'ampia famiglia di peptidi che include l'ormone di rilascio corticotropo (CRH) dei mammiferi, l'urotensina I dei pesci e la sauvagina degli anfibi¹. Il CRH fu il primo membro della famiglia delle urocortine ad essere identificato nei mammiferi e fu purificato dall'ipotalamo ovino per la prima volta nel 1981². A livello ipotalamico il CRH coordina le risposte endocrine e comportamentali agli stimoli percepiti come stressanti, incrementando la secrezione ipofisaria dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e conseguentemente promuovendo la produzione di steroidi a livello surrenale^{3,4}. I corticosteroidi a loro volta esercitano un feedback negativo sia sulla secrezione di ACTH sia di CRH, in modo che l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene funzioni in modo equilibrato. Numerosi studi hanno, inoltre, dimostrato l'espressione di CRH in alcune regioni cerebrali al di fuori dell'ipotalamo, dove pare possa agire come neurotrasmettitore influenzando in particolar modo l'attività del sistema nervoso autonomo e le funzioni dell'apparato cardiovascolare⁵. Al contra-

rio, gli studi che avevano evidenziato un'ampia distribuzione periferica del CRH, per esempio a livello del cuore⁶ e dei linfociti⁷, sono stati recentemente messi in discussione. Infatti, è stato dimostrato che almeno alcune delle sonde molecolari e degli anticorpi utilizzati inizialmente per individuare il CRH presentavano una reazione crociata con l'urocortina⁸. Al momento attuale, non è ancora stato possibile clonare una molecola di CRH dalla biblioteca di DNA cardiaco, mentre non può essere esclusa la possibilità che i linfociti siano in grado di produrre sia l'urocortina sia il CRH, nonostante gli studi fino ad ora esistenti abbiano individuato l'espressione della sola urocortina⁹.

L'urocortina fu clonata, per la prima volta, dal cervello del ratto¹⁰ e chiamata così a causa della somiglianza per il 63% con la sequenza dell'urotensina e per il 45% con il CRH. La molecola umana venne successivamente clonata dalla biblioteca genomica¹¹. Recentemente altre due urocortine sono state clonate dalla banca genomica umana: l'urocortina II (stresscopin-related peptide) e l'urocortina III (stresscopin)^{12,13}.

Esistono pertanto nei mammiferi quattro peptidi correlati tra loro: il CRH e le tre urocortine. Tali peptidi possiedono aspetti molecolari e biochimici simili e funzioni sovrapponibili, anche se stanno iniziando ad emergere sottili differenze nella loro biologia molecolare e funzionale.

Biologia molecolare e biochimica delle urocortine

Organizzazione genomica

Il gene umano dell'urocortina 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 situata nell'esone 2. Questa organizzazione appare analoga a quella del gene codificante per il CRH¹⁴, avvalorando l'ipotesi che queste due molecole abbiano origine da una duplicazione genica. Una struttura analoga è stata individuata anche a livello dei geni codificanti l'urocortina in altre specie animali, come ad esempio il ratto¹⁵. Al contrario, la struttura dei geni dell'urocortina II e III non è ancora stata determinata in nessuna specie.

Attualmente, nell'uomo, i geni codificanti l'urocortina II e III sono stati identificati rispettivamente a livello del cromosoma 3p21.3 e 10p15.1 (Figura 1).

Sono relativamente pochi gli studi che hanno indagato la regolazione trascrizionale dei geni dell'urocortina. A questo proposito, il gruppo di Vale ha clonato approssimativamente 3.2 e 2.3 kb delle sequenze affiancate in 5' rispettivamente nel topo e nell'uomo¹¹. Sono stati identificati un TATA box e sequenze consensuali per ap1, Brn-2, C/EPB, GATA e cREB con sequenze promoter simili sia nel topo sia nell'uomo. Alcune osservazioni sperimentali hanno inoltre suggerito la presenza di un elemento regolatore negativo tra la posizione -395 e -295 simile alla sequenza regolatrice negativa già nota NRSE/RE1. 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 colture di miocardiociti di ratto hanno inoltre evidenziato che l'ischemia miocardica costituisce un potente stimolo alla sintesi e al rilascio di urocortina, con un notevole incremento della concentrazione intracellulare di RNA messaggero codificante il pro-ormone e un'aumentata concentrazione del peptide maturo nel mezzo di coltura¹⁶. Recentemente sono stati clonati tre frammenti di promoter dell'urocortina II ed un

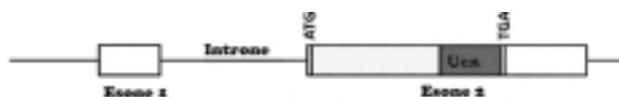


Figura 1. Struttura del gene codificante per l'urocortina. È possibile notare la presenza di due esoni, con l'intera regione codificante la proteina situata a livello dell'esone 2.

elemento regolatore negativo¹⁷. È interessante notare che contrariamente a quanto avviene per il CRH, la cui sintesi viene inibita dai corticosteroidi, l'attività di tutti i tre promoter dell'urocortina II viene stimolata dal desametasone.

Biochimica

Analogamente al CRH, le tre urocortine sono sintetizzate come precursori che poi vengono clivati in modo da dare origine ai peptidi finali maturi. Le dimensioni dei precursori e dei peptidi finali variano da specie a specie. In particolare nell'uomo la pro-urocortina è un peptide di 123 aminoacidi e il peptide maturo di 40 aminoacidi è immediatamente preceduto da un motivo RRGK che probabilmente rappresenta il sito C-terminale di clivaggio e amidazione¹¹.

L'urocortina II e l'urocortina III sono invece costituite rispettivamente da 43 e 38 aminoacidi, e derivano dal clivaggio rispettivamente della pro-urocortina II, costituita da 112 aminoacidi, e della pro-urocortina III, che si compone di 161 o 164 aminoacidi a seconda di quale ATG viene utilizzato come codone iniziale^{12,13}. L'urocortina II sembra essere più strettamente correlata all'urocortina e al CRH rispetto all'urocortina III. Il peptide maturo dell'urocortina II presenta, infatti, un grado di omologia con l'urocortina e il CRH pari rispettivamente al 42 e 34%¹², mentre l'urocortina III presenta il 40% di omologia con l'urocortina II, il 18-21% con l'urocortina e infine il 26-32% con il CRH, a seconda della specie¹³. Numerosi studi suggeriscono che la posizione C-terminale del CRH, implicata nel legame al recettore, assuma una conformazione ad α -elica^{18,19}. E la somiglianza della sequenza C-terminale delle urocortine con il CRH suggerisce che anch'esse abbiano una struttura ad α -elica. Nell'ipotalamo la processazione del precursore del CRH umano sembra essere operata dall'enzima pro-ormone convertasi (PC), nelle sue forme PC1 e PC2^{20,21}, che cliva le proteine a livello di specifiche sequenze nucleotidiche, mentre restano ancora da determinare le proteasi responsabili della formazione delle urocortine a partire dai peptidi precursori.

I recettori per i peptidi della famiglia dell'ormone di rilascio corticotropo

Sono state individuate nei vertebrati due classi di recettori per i peptidi della famiglia del CRH^{22,23} (Figura 2). La prima, nota come CRH-R1, fu clonata da cDNA del sistema nervoso centrale di ratto e da una banca di corticotropine derivate da cellule tumorali umane^{24,25}. La seconda, CRH-R2, fu clonata in seguito sia nel ratto che nell'uomo^{26,27}. CRH-R1 e CRH-R2 sono localizzati rispettivamente sui cromosomi 17q12-q22 e 7p21-p15^{28,29} ed entrambi sono espressi come numerose isoforme. Tutte le isoforme sono costituite da recettori accoppiati a proteine G di tipo stimolatorio e possiedono sette domini transmembrana con conformazione a elica, ma si differenziano per le diverse caratteristiche

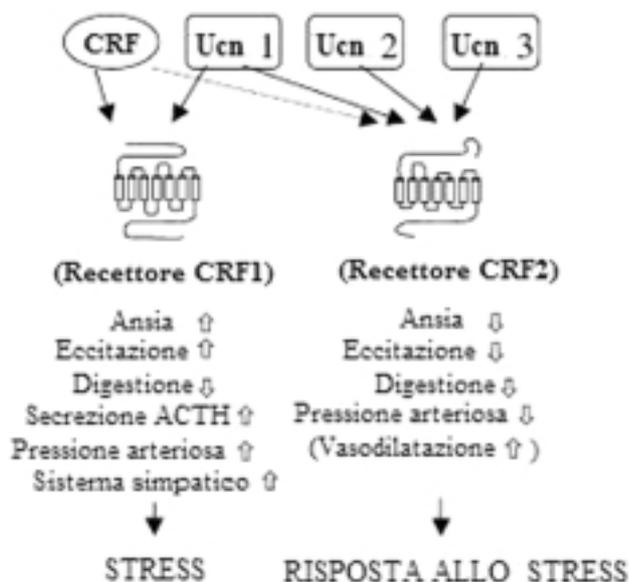


Figura 2. Recettori per i peptidi della famiglia dell'ormone di rilascio corticotropo. Vengono messe in evidenza i differenti effetti conseguenti all'interazione del peptide con i recettori di tipo 1 e di tipo 2. ACTH = ormone adrenocorticotropo.

del legame alle corrispondenti proteine G³⁰. Il CRH-R1 umano presenta il 70% di omologia rispetto al CRH-R2²⁷, ed entrambe le classi di recettori sono altamente conservate tra la 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 CRH-R1 e nel CRH-R2 sono stati individuati in diverse regioni extracellulari³¹.

CRH e urocortina legano sia CRH-R1 che CRH-R2, anche se CRH-R2 ha una maggiore affinità di legame per l'urocortina. Alcune isoforme di CRH-R1 mancano di particolari esoni N-terminali e di conseguenza mostrano una ridotta capacità di legame con il CRH³². Le urocortine II e III legano esclusivamente il CRH-R2, anche se l'urocortina III con affinità circa 10 volte inferiore a quella dell'urocortina II. Entrambi i recettori trasmettono il segnale attraverso vie di traduzione che comprendono enzimi ad attività proteinchinasi e il calcio intracellulare²⁷.

In generale CRH-R1 e CRH-R2 mostrano una diversa distribuzione anatomica, essendo CRH-R1 prevalentemente espresso a livello dell'encefalo e dell'ipofisi, mentre le isoforme del CRH-R2 si ritrovano in discrete quantità sia nelle regioni cerebrali sia in alcuni organi periferici^{33,34}. Nell'encefalo la distribuzione di CRH-R1 e CRH-R2 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 CRH-R1 sembrano essere i mediatori esclusivi degli effetti del CRH sulla produzione di ACTH^{35,36}.

Le isoforme di CRH-R2 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 vasodilatazione³⁷. Il CRH-R2 è stato ritrovato anche a livello del cuore, dove viene espresso a livello di tutte le quattro camere cardiache. Alcune citochine come l'interleuchina-1 e il fattore di necrosi tumorale- α , così come il digiuno, sembrano associate ad una riduzione dell'espressione del CRH-R2 nel cuore del ratto^{38,39}, mentre l'espressione di CRH-R2 risulta incrementata nei cuori di ratti spontaneamente ipertesi. Il ruolo di CRH-R2 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 "paradossa" dell'espressione di CRH-R2⁴⁰.

Funzione delle urocortine e dei recettori dell'ormone di rilascio corticotropo: osservazioni su topi knockout

Nell'interpretazione di singoli esperimenti su animali *knockout*, è opportuno ricordare che il fenotipo dei singoli geni è spesso condizionato dal contesto genetico globale in cui questi vengono espressi. Sono stati creati finora topi con deficit di urocortina, CRH-R1 e 2, ma non di urocortine II e III.

Da due studi è emerso che gli animali privi di urocortina erano fertili e non presentavano grossolane alterazioni fenotipiche^{41,42}. Tuttavia, essi presentavano deficit uditivo, in accordo con i documentati elevati livelli di urocortina che sono normalmente presenti nelle regioni cerebrali da cui origina l'innervazione per l'orecchio interno⁴³. In uno solo degli studi riportati, gli animali presentavano un incremento dei comportamenti ansiosi. Al contrario, non sono state finora riportate alterazioni a livello cardiovascolare riferibili al deficit di urocortina.

Recentemente sono stati esaminati modelli di topi con deficit di CRH-R1⁴⁴. Come ci si poteva attendere, questi animali hanno mostrato ridotto rilascio di ACTH e corticosteroidi in risposta allo stress, nonostante i livelli basali di ACTH fossero normali a causa del rilascio ipofisario di arginina-vasopressina. Inoltre, gli animali con deficit di CRH-R1 mostravano un'aumentata attività esplorativa e una riduzione dei comportamenti ansiosi⁴⁵. Tale effetto ansiolitico in assenza di CRH-R1 è diverso da quanto visto per gli animali privi di urocortina descritti sopra. Il ridotto apporto di cibo e la perdita di peso che si verifica normalmente in risposta all'infusione intracerebrale di urocortina risultava annullata nei topi *knockout* per CRH-R1⁴⁶, suggerendo una possibile interazione urocortina/CRH-R1. Il significato fisiologico dell'interazione tra urocortina e CRH-R1 resta tuttavia da chiarire, in quanto l'infusione intracerebrale potrebbe favorire il contatto tra l'urocortina e una classe di recettori altrimenti inaccessibile. Anche in questo modello sperimentale non sono state riportate specifiche conseguenze cardiovascolari della delezione del recettore.

La delezione del CRH-R2 è stata presa in considerazione contemporaneamente da due gruppi di stu-

dio^{47,48}. Gli animali *knockout* mostravano un incremento della risposta allo stress, accompagnata da un incremento duraturo nel tempo del livello di corticosteroidi. In questi animali si osservava anche un aumento dell'ansia, in particolare nei maschi. Le osservazioni derivate da modelli di delezione genica suggeriscono pertanto che l'interazione tra CRH e CRH-R1 funga da mediatore per la risposta iniziale allo stress caratterizzata da aumento della vigilanza e dell'attenzione, e che la via urocortina/CRH-R2 sia invece coinvolta nella risposta di adattamento ad uno stress prolungato, favorendo la riduzione dell'attività simpatica e lo sviluppo di comportamenti adattativi.

Gli animali *knockout* per CRH-R2 mostravano anche delle alterazioni a livello dell'apparato cardiovascolare sotto forma di un'umentata vascolarizzazione che aveva inizio circa 21 giorni dopo la nascita ed era mediata da elevati livelli di *vascular endothelial growth factor* (VEGF)⁴⁹. L'urocortina, agendo attraverso il CRH-R2, appare quindi in grado di inibire l'espressione del VEGF, e di conseguenza l'angiogenesi.

Effetti dell'urocortina sul sistema cardiovascolare

Effetti vasoattivi e inotropi

Numerosi studi hanno evidenziato gli effetti sul sistema cardiovascolare determinati dalla somministrazione esogena di peptidi CRH simili (Figura 3). A questo proposito il gruppo di Vale¹⁰ osservò che la somministrazione di urocortina a ratti coscienti induceva uno stato ipotensivo dose-dipendente, che perdurava per almeno 2 h ed era associato ad aumento della frequenza cardiaca mediato, almeno in parte, da un riflesso barocettivo. Analogamente, Lenz et al.⁵⁰ e Parkes et al.⁵¹ hanno do-

cumentato che in ratti anestetizzati l'infusione di urocortina per via endovenosa portava a caduta della pressione arteriosa e delle resistenze arteriose e ad incremento della frequenza cardiaca, suggerendo che un'azione vasodilatatrice periferica, probabilmente a livello del letto vascolare mesenterico, fosse un importante meccanismo alla base dell'effetto ipotensivo. In aggiunta agli effetti sulla pressione arteriosa e sulla frequenza cardiaca, l'urocortina determinava un aumento del flusso aortico e del rapporto dF/dt, due indici della contrattilità cardiaca. Osservazioni condotte su preparati di cuore isolato di ratto hanno messo in evidenza che l'aggiunta di urocortina esogena in questo modello sperimentale portava ad un aumento della contrattilità cardiaca associato ad un incremento del flusso coronarico. La vasodilatazione coronarica risultava inibita dalla somministrazione contemporanea di indometacina, suggerendo che tale effetto fosse mediato dal rilascio di prostaglandine da parte delle cellule endoteliali. Al contrario, la presenza di N-nitro-L-arginina-metilestere, un inibitore del rilascio di ossido nitrico (NO), non portava sostanziali variazioni della vasodilatazione coronarica, rendendo quindi improbabile un effetto vasodilatatore NO-mediato⁵². Uno studio condotto su pecore coscienti dimostrò, dopo infusione endovenosa di urocortina, un incremento dose-dipendente della frequenza cardiaca, della gittata sistolica e della contrattilità cardiaca così come del flusso coronarico e una riduzione della pressione arteriosa media⁵³. L'incremento contemporaneo della contrattilità e della pressione arteriosa media suggerisce che l'urocortina possa esercitare un effetto inotropo positivo diretto a livello cardiaco, indipendente dai riflessi barocettivi, ma non esclude la possibilità di meccanismi indiretti come il rilascio di peptide natriuretico atriale e cerebrale, la cui secrezione è stimolata dall'urocortina in colture primarie di miociti cardiaci di

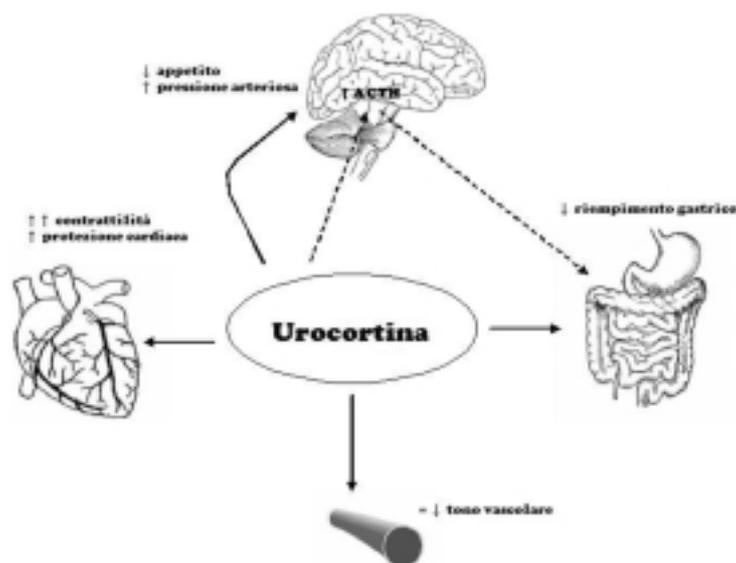


Figura 3. Effetti biologici dell'urocortina a livello del sistema nervoso centrale, dell'apparato gastroenterico e dell'apparato cardiovascolare. ACTH = ormone adrenocorticotropo.

neonati⁵⁴. Inoltre, dal momento che l'incremento di inotropismo viene osservato prima di qualsiasi variazione della pressione venosa centrale, si può concludere che il miglioramento della performance cardiaca non è da imputare a variazioni del precarico attraverso il meccanismo di Starling. Per quanto riguarda l'incremento del flusso coronarico, al momento attuale non esiste alcuna evidenza che sostenga un effetto diretto dell'urocortina sui vasi coronarici. Non può essere escluso quindi che questo fenomeno costituisca una fisiologica risposta dei vasi coronarici all'incremento di consumo di ossigeno dovuto all'aumento della frequenza e della contrattilità cardiaca. È molto importante sottolineare la lunga durata degli effetti emodinamici mediati dall'urocortina, che persistono per almeno 14 h dopo la somministrazione del peptide, mentre la durata dell'effetto inotropo positivo viene calcolata in più di 24 h. Tra tutti i peptidi con azione inotropica positiva l'urocortina possiede quindi l'effetto più prolungato⁵³.

Uno studio successivo⁵⁵ ha dimostrato che gli effetti vasoattivi mediati dall'urocortina non erano influenzati dal sistema nervoso autonomo. Infatti le variazioni di frequenza cardiaca, di gittata e di contrattilità osservate in pecore sane dopo infusione di urocortina risultavano sovrapponibili a quelle osservate in pecore sottoposte a blocco gangliare. Questi effetti sembrano mediati dal legame dell'urocortina all'isoforma beta del recettore CRH-R2, poiché il pretrattamento con un antagonista del CRH a dosi sufficientemente basse da ottenere un legame selettivo con il CRH-R2 β era in grado di abolire le risposte cardiovascolari all'urocortina nelle pecore⁵⁶. Tale riscontro è stato in seguito validato da due differenti studi, in cui è stato dimostrato che gli effetti di ipotensione e di incremento della contrattilità esercitati dall'urocortina nei topi *wild type* erano completamente assenti negli animali *knockout* per il CRH-R2^{47,57}.

Le citochine infiammatorie, come l'interleuchina-1 e il fattore di necrosi tumorale- α , così come l'incremento della sintesi di corticosteroidi indotto dallo stress, riducono l'espressione di CRH-R2³⁸, suggerendo che lo stress e l'infiammazione potrebbero antagonizzare gli effetti benefici sul cuore mediati dall'urocortina. È stato inoltre osservato che la stessa urocortina riduce l'espressione di CRH-R2 a livello cardiaco, favorendo lo sviluppo di tolleranza agli effetti di entrambi i peptidi endogeni ed esogeni. Questi studi, specialmente quelli suggestivi del fatto che lo stress possa sensibilizzare il cuore all'ischemia riducendo la funzione protettiva esercitata dall'urocortina endogena, rivestono pertanto un importante significato clinico e costituiscono uno spunto per la realizzazione di studi più ampi e approfonditi.

Tuttavia rimane incerto il significato in ambito fisiologico degli effetti osservati in seguito ad iniezione sistemica di urocortina esogena, dal momento che l'urocortina circolante è indosabile nel plasma umano⁵⁸, anche se sono stati rilevati valori attorno a 100 pg/ml nel plasma materno⁵⁹. Questa osservazione non per-

mette però di escludere che la produzione localizzata di urocortina a livello del cuore possa esercitare effetti autocrini e paracrini sulla funzione cardiaca simili a quelli prodotti dall'iniezione sistemica del peptide esogeno.

Un recente studio⁶⁰ ha anche dimostrato effetti emodinamici favorevoli dell'urocortina in un modello sperimentale di insufficienza cardiaca. Ripetuti boli intravenosi di urocortina in pecore con insufficienza cardiaca indotta dal pacing ventricolare ad elevata frequenza determinavano un aumento della gittata cardiaca con riduzione delle resistenze periferiche, della pressione arteriosa media e della pressione atriale sinistra. Ulteriori osservazioni hanno inoltre dimostrato che l'infusione di urocortina III in pecore con insufficienza cardiaca risultava associata ad una riduzione della concentrazione plasmatica di arginina-vasopressina, endotelina-1, epinefrina, renina e aldosterone, e ad incremento della diuresi, dell'escrezione renale di sodio e della clearance della creatinina⁶¹. Questi incoraggianti risultati mettono in evidenza la necessità di ulteriori ricerche sul possibile ruolo dell'urocortina nel trattamento dell'insufficienza cardiaca.

Cardioprotezione nel danno da ischemia/riperfusion

Molte evidenze suggeriscono che l'urocortina possa esercitare un ruolo protettivo sui miociti cardiaci nei confronti del danno da ipossia/riossigenazione e/o da ischemia/riperfusion (Figura 4). L'esposizione di miociti cardiaci ad una simulazione di ischemia/riperfusion *in vitro* porta infatti ad un'aumentata produzione di mRNA dell'urocortina, così come al rilascio del peptide maturo dai siti di deposito intracellulari⁶². Il meccanismo con cui l'ischemia/riperfusion conduce alla trascrizione *de novo* del gene dell'urocortina è stato identificato solo parzialmente. È stato dimostrato, infatti, che l'ischemia/riperfusion è in grado di aumentare la trascrizione del gene dell'urocortina, attraverso i promotori C/EBP β e δ ¹⁶. Rimangono invece ancora oscuri i meccanismi che conducono all'incremento della formazione di urocortina a partire dal peptide precursore.

Alcuni studi hanno dimostrato l'esistenza di effetti cardioprotettivi esercitati dall'urocortina su colture di miociti esposte ad ischemia subletale *in vitro*⁶². Questi effetti protettivi venivano inibiti da antagonisti del recettore per CRH aggiunti a colture di miociti esposti a ipossia/riossigenazione, con un significativo, anche se lieve, incremento della morte cellulare. Inoltre, l'aggiunta di urocortina esogena (10^{-10} M) a miociti *in vitro*, non solo prima dell'ipossia e durante la riossigenazione, ma anche solo durante la fase di riossigenazione riduceva sia la necrosi postischemica che l'apoptosi. In modo analogo l'infusione di urocortina (10^{-8} M) determinava una riduzione della zona infartuale nel cuore di ratto sia *ex vivo* sia *in vivo*, anche quando veniva somministrata solo dopo la riperfusion^{63,64}. È stato inoltre evidenziato che l'urocortina protegge il cuore isolato di ratto contro il danno da ischemia/riperfusion senza modificare significativamente la contrattilità basale miocardica⁶⁵.

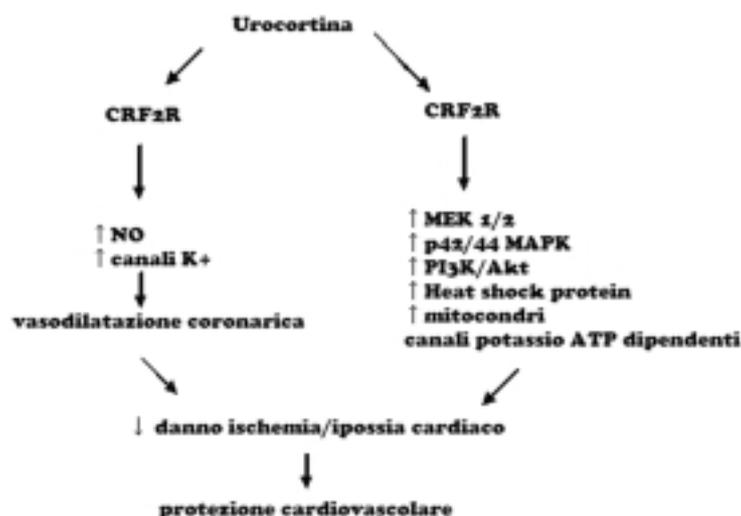


Figura 4. Meccanismi di protezione del danno da ischemia/riperfusioni mediati dall'urocortina.

Di conseguenza, a differenza dei farmaci con azione cardioprotettiva utilizzati nella pratica clinica, come ad esempio i betabloccanti e i calcioantagonisti, l'urocortina esercita un effetto cardioprotettivo indipendentemente dalla riduzione del consumo di ossigeno conseguente ad un effetto inotropo negativo. In considerazione degli effetti emodinamici che l'urocortina esercita quando somministrata per via sistemica in animali coscienti, l'utilizzo di preparati di cuore isolato di ratto esposti a ischemia da assenza di flusso ha permesso di eliminare le alterazioni secondarie della frequenza cardiaca, la vasodilatazione periferica e coronarica ed altre influenze ormonali. Inoltre il cuore isolato non è sottoposto ad input provenienti dal sistema nervoso centrale, che potrebbero essere potenzialmente causati dall'urocortina. In questo modello l'infusione di urocortina durante la fase aerobica si è dimostrata in grado di prevenire l'aumento della pressione ventricolare diastolica durante ischemia e di migliorare il recupero funzionale durante la riperfusioni. Sia la pressione telediastolica sia la pressione telesistolica ventricolare sinistra al termine della fase di riperfusioni risultavano normalizzate quando il trattamento con l'urocortina veniva ripetuto durante la fase postischemica. I parametri emodinamici risultavano inoltre significativamente migliorati anche quando la somministrazione di urocortina avveniva solo durante la riperfusioni. Dal momento che il progressivo declino della compliance diastolica durante l'ischemia risulta associato ad un incremento di calcio libero intracellulare⁶⁶ si può ipotizzare che gli effetti cardioprotettivi dell'urocortina siano associati alla capacità del peptide di mantenere l'omeostasi del calcio durante l'ischemia/riperfusioni, anche se sono necessari ulteriori studi per confermare questa teoria. L'aumento dei livelli di calcio intracellulare durante l'ischemia sembra dipendere dalla mancanza dell'energia necessaria per pompare il calcio libero fuori dalla cellula o all'interno del reticolo sarcoplasmatico. È stato

dimostrato a questo proposito che l'urocortina migliora radicalmente le riserve miocardiche di ATP e creatinfosfato quando somministrata prima dell'ischemia, mentre non era in grado di prevenire la riduzione dei fosfati intracellulari ad alta energia quando somministrata solo durante la fase di riperfusioni. La ricostituzione del contenuto di ATP e creatinfosfato durante la riperfusioni indicava tuttavia che nei cuori trattati con urocortina le vie cellulari di produzione energetica erano ancora integre⁵¹⁻⁵³.

Accanto a questi benefici metabolici ed emodinamici, le proprietà cardioprotettive dell'urocortina furono confermate dalla sua capacità di ridurre il rilascio postischemico della creatinfosfochinasi, e dalla scoperta che la sua somministrazione in cuori di ratto sano precedentemente all'insulto ischemico era correlata a riduzione delle dimensioni dell'area infartuata⁶³. L'effetto cardioprotettivo dell'urocortina si manifestava anche attraverso una riduzione dell'apoptosi miocardica. L'apoptosi, identificata mediante metodo TUNEL e colorazione specifica per la caspasi-3 clivata, risultava ridotta sia a livello delle cellule endoteliali sia dei miocardiociti nei cuori perfusi con urocortina durante la fase aerobica che precedeva l'insorgenza dell'insulto ischemico. Una seconda infusione di urocortina durante la riperfusioni diminuiva l'intensità dell'apoptosi, mentre la somministrazione di urocortina solo durante la fase di riperfusioni risultava associata ad un minore effetto antiapoptotico. Queste scoperte furono confermate dalla valutazione dei livelli di attività di caspasi-3 in estratti tissutali.

In studi preliminari è stato dimostrato che l'urocortina III ha effetti cardioprotettivi grossolanamente equivalenti a quelli dell'urocortina nei confronti del danno da ischemia/riperfusioni, mentre l'urocortina II risulta meno efficace⁶⁷.

Come precedentemente ricordato, l'urocortina biologicamente attiva viene rilasciata da miociti isolati

esposti ad ischemia e conferisce al mezzo di coltura proprietà cardioprotettive, che sono annullate dagli antagonisti del recettore per CRH⁵⁸. Nell'uomo forme controllate di danno da ischemia/riperfusionne avvengono generalmente nel cuore durante le procedure di rivascolarizzazione. Questo è il caso delle procedure di angioplastica coronarica, durante il gonfiaggio/degonfiaggio del pallone a livello di una lesione aterosclerotica, e negli interventi di bypass aortocoronarico, durante i quali l'arresto cardioplegico e la successiva riperfusionne espongono inevitabilmente il cuore ad un insulto iatrogeno da ischemia/riperfusionne.

Questo background di evidenze sperimentali ha suggerito dunque di valutare i cambiamenti nell'espressione dell'urocortina durante la cardioplegia, così come il potenziale coinvolgimento dell'urocortina endogena come meccanismo di salvataggio contro la morte cellulare per apoptosi post-cardioplegica nei pazienti sottoposti ad interventi di cardiocirurgia.

A questo proposito i risultati di uno studio recentemente pubblicato⁶⁸ mostrano che l'arresto cardioplegico e la successiva riperfusionne inducivano apoptosi dei miocardiociti prevalentemente attraverso il danno mitocondriale e un parallelo incremento dell'espressione di urocortina limitato ai miociti non apoptotici. Questa osservazione potrebbe pertanto suggerire un ruolo cardioprotettivo dell'urocortina endogena nell'uomo.

Gli effetti cardioprotettivi dell'urocortina sono mediati da diversi meccanismi molecolari, alcuni dei quali non sono ancora conosciuti. Ad esempio, l'urocortina fosforila e attiva la via del *p42/p44 mitogen activated protein kinase*, e gli agenti bloccanti l'attivazione di questa via di traduzione del segnale, bloccano anche il suo effetto protettivo⁶³. L'urocortina è in grado, inoltre, di attivare la via del fosfatidil-inositolo 3 chinasi/proteinchinasi B (PKB), nota per proteggere alcuni tipi cellulari dall'apoptosi⁶⁹. Inoltre, l'espressione di hsp 90 cardioprotettiva è incrementata significativamente dall'urocortina⁷⁰. Nel tentativo di identificare altre vie di cardioprotezione urocortina-mediate, è stata recentemente utilizzata la tecnologia del *microarray* genico su miociti trattati con urocortina. Il grosso quantitativo di dati emersi attraverso l'utilizzo di questa metodica richiederà del tempo per una completa analisi.

Comunque, l'urocortina si è mostrata in grado di aumentare l'espressione del gene codificante per le proteine canale K_{ATP} nei miociti (confermato dalla reazione a catena della polimerasi e Northern Blot)⁷¹ e agenti come la tolbutamide, che bloccano l'apertura dei canali, inibiscono anche la protezione mediata dall'urocortina. È stato inoltre dimostrato che l'urocortina riduce l'espressione cardiaca della fosfolipasi A2 calcio-indipendente, un enzima la cui attività è aumentata dall'ischemia/riperfusionne e i cui metaboliti sono altamente tossici per i miociti cardiaci⁷².

Osservazioni più recenti hanno inoltre evidenziato un incremento specifico dell'isoenzima epsilon della proteinchinasi C (PKC ϵ) all'interno dei miociti trattati

con urocortina. Questo isoenzima si è dimostrato in grado di esercitare un effetto cardioprotettivo, contrariamente all'isoenzima δ , che è dotato di un'attività cardiotossica, ma i cui livelli non subivano variazioni dopo infusione di urocortina⁷³. Evidenze sperimentali hanno inoltre mostrato che le molecole la cui espressione genica è influenzata dall'urocortina (ad esempio, il canale K_{ATP} , la fosfolipasi A2 e la PKC ϵ) sono localizzate prevalentemente a livello dei mitocondri. Questo riscontro ha portato a concludere che l'effetto cardioprotettivo dell'urocortina risulta mediato almeno in parte da una riduzione del danno mitocondriale⁷³.

L'urocortina e l'ipertrofia cardiaca

Contrariamente alla maggior parte degli effetti cardiovascolari dell'urocortina, che potrebbero risultare potenzialmente benefici nella pratica clinica, è stato descritto un effetto favorente l'ipertrofia miocardica mediato dall'urocortina in colture di miociti di ratto neonato e adulto⁷⁴. Inoltre è stato osservato un incremento dell'espressione di urocortina in cuori ipertrofici di ratti ipertesi, rispetto ad un gruppo controllo⁷⁵. L'ipertrofia cardiaca, che si instaura come adattamento ad un sovraccarico di volume o di pressione, è associata ad aumentato consumo miocardico di ossigeno, creando uno stato ischemico latente, e può risultare in una progressiva degenerazione connettivale del cuore, con conseguente peggioramento della sua performance.

Sono dunque necessari ulteriori studi per verificare se l'urocortina sia implicata nel determinare ipertrofia miocardica o se l'incremento della sua espressione sia solo un effetto secondario al sovraccarico e all'ischemia.

L'urocortina e la funzione renale

Alcuni studi eseguiti su ratto indicano che l'urocortina determina una marcata dilatazione delle arterie renali e l'entità di tale dilatazione è identica nei maschi e nelle femmine. Il rilasciamento può essere mediato dai recettori del fattore di rilascio della corticotropina (CRF) localizzati a livello delle arterie renali. È stato inoltre osservato che il rilasciamento è mediato, almeno in parte, dall'attivazione di canali del potassio calcio-dipendenti. Il meccanismo con il quale l'attivazione di recettori CRF possa determinare l'apertura di tali canali non è noto, ma pare essere diverso per i maschi e le femmine^{77,78}.

Conclusioni e prospettive future

I dati sperimentali qui riportati, particolarmente quelli focalizzati sulla cardioprotezione, potrebbero avere importanti implicazioni cliniche. Visto che l'urocortina è un peptide cardiaco endogeno che viene over-espresso e rilasciato dalle cellule cardiache dopo ischemia e che determina cardioprotezione endogena contro l'insulto da ischemia/riperfusionne, alcune strategie che mirano a incrementare i livelli basali dell'urocortina possono contribuire a migliorare la tolleranza cardiaca all'ischemia nei pazienti con patologia coronarica cronica.

L'aumento dei livelli endogeni dell'urocortina conseguente all'insulto ischemico subletale⁷⁶ potrebbe anche suggerire che l'incremento dei livelli di urocortina abbia un ruolo nell'effetto di preconditionamento, anche se nessuno studio è stato realizzato per testare questa ipotesi. Inoltre, dal momento che l'urocortina esogena riduce le dimensioni dell'infarto e promuove il recupero emodinamico e bioenergetico, anche quando somministrata solo durante la riperfusione, la somministrazione di questo peptide può essere clinicamente utile in aggiunta al trattamento di pazienti con infarto miocardico, in particolare con disfunzione ventricolare.

Inoltre, le evidenze circa l'effetto protettivo dell'urocortina endogena nei confronti dell'apoptosi indotta da arresto cardioplegico potrebbero suggerire che la somministrazione di urocortina esogena a breve termine prima e dopo l'arresto cardioplegico, e/o il suo utilizzo come componente della soluzione cardioplegica, sia in grado di esercitare effetti protettivi su cuori umani esposti ad inevitabile insulto da ischemia/riperfusione associato alla chirurgia cardiaca. Nonostante questi dati incoraggianti sono comunque necessari ulteriori studi che possano chiarire il ruolo dell'urocortina nel cuore ipertrofico e i dati relativi agli effetti sulla pressione arteriosa.

Riassunto

Le urocortine, insieme all'ormone di rilascio corticotropo (CRH) hanno una storia evolutiva molto lunga. Nel sistema nervoso il CRH in gran parte media effetti ansiogeni associati alla risposta allo stress, mentre le urocortine sono correlate con il comportamento adattativo e di imitazione.

Le urocortine in particolare sono presenti anche a livello cardiaco, dove si legano al recettore CRH-R2. L'espressione dell'urocortina cardiaca endogena è stimolata dal danno da ischemia/riperfusione *in vitro*, e l'aggiunta di urocortine esogene riduce la morte cellulare determinata dall'ischemia/riperfusione. Nei cuori isolati perfusi l'urocortina stimola la contrattilità e previene la riduzione dei fosfati ad alta energia che segue l'ischemia/riperfusione. Dal punto di vista emodinamico l'urocortina è associata ad un effetto di vasodilatazione a livello periferico e coronarico, oltre che ad un incremento della contrattilità cardiaca. Esistono dati suggestivi di effetti emodinamici favorevoli dell'urocortina in un modello sperimentale di insufficienza cardiaca, mentre nell'uomo vi sono evidenze che suggeriscono un meccanismo endogeno di cardioprotezione mediato dall'urocortina contro l'insulto iatrogeno da ischemia/riperfusione associato alla cardiocirurgia. Questi studi sperimentali suggeriscono la possibilità di una più profonda valutazione sull'uso clinico delle urocortine nello scompenso cardiaco e nel danno iatrogeno da ischemia/riperfusione.

Parole chiave: Danno da ischemia/riperfusione; Insufficienza cardiaca; Urocortina.

Bibliografia

1. Lovejoy DA, Balment RJ. Evolution and physiology of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 1999; 115: 1-22.

2. Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 1981; 213: 1394-7.
3. Habib KE, Gold PW, Chrousos GP. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001; 30: 695-728.
4. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 2002; 53: 865-71.
5. Fisher LA. Central actions of corticotropin-releasing factor on autonomic nervous activity and cardiovascular functioning. *Ciba Found Symp* 1993; 172: 243-53.
6. Muglia LJ, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Majzoub JA. Expression of the mouse corticotropin-releasing hormone gene in vivo and targeted inactivation in embryonic stem cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 2066-72.
7. Stephanou A, Jessop DS, Knight RA, Lightman SL. Corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *Brain Behav Immun* 1990; 4: 67-73.
8. Bamberger CM, Bamberger AM. The peripheral CRH/urocortin system. *Ann NY Acad Sci* 2000; 917: 290-6.
9. Bamberger CM, Wald M, Bamberger AM, Ergun S, Beil FU, Schulte HM. Human lymphocytes produce urocortin, but not corticotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 708-11.
10. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 1995; 378: 287-92.
11. Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, et al. Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology* 1996; 137: 2167-70.
12. Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, et al. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 2843-8.
13. Lewis K, Li C, Perrin MH, et al. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7570-5.
14. Shibahara S, Morimoto Y, Furutani Y, et al. Isolation and sequence analysis of the human corticotropin-releasing factor precursor gene. *EMBO J* 1983; 2: 775-9.
15. Park JH, Lee YJ, Na SY, Kim KL. Genomic organization and tissue-specific expression of rat urocortin. *Neurosci Lett* 2000; 292: 45-8.
16. Brar BK, Stephanou A, Okosi A, et al. CRH-like peptides protect cardiac myocytes from lethal ischaemic injury. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 158: 55-63.
17. Chen A, Vaughan J, Vale WW. Glucocorticoids regulate the expression of the mouse urocortin II gene: a putative connection between the corticotropin-releasing factor receptor pathways. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 1622-39.
18. Miranda A, Koerber SC, Gulyas J et al. Conformationally restricted competitive antagonists of human/rat corticotropin-releasing factor. *J Med Chem* 1994; 37: 1450-9.
19. Gulyas J, Rivier C, Perrin M, et al. Potent, structurally constrained agonists and competitive antagonists of corticotropin-releasing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 10575-9.
20. Perone MJ, Ahmed I, Linton EA, Castro MG. Pro-corticotropin releasing hormone is endoproteolytically processed by the prohormone convertase PC2 but not by PC1 within stably transfected CHO-K1 cells. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 497S.
21. Brar B, Sanderson T, Wang N, Lowry PJ. Post-translational processing of human pro-corticotropin-releasing factor in transfected mouse neuroblastoma and Chinese hamster ovary cell lines. *J Endocrinol* 1997; 154: 431-40.

22. Hillhouse EW, Randeve H, Ladds G, Grammatopoulos D. Corticotropin-releasing hormone receptors. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 428-32.
23. Coste SC, Quintos RF, Stenzel-Poore MP. Corticotropin-releasing hormone-related peptides and receptors: emergent regulators of cardiovascular adaptations to stress. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 176-82.
24. Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8967-71.
25. Perrin MH, Donaldson CJ, Chen R, Lewis KA, Vale WW. Cloning and functional expression of a rat brain corticotropin releasing factor (CRF) receptor. *Endocrinology* 1993; 133: 3058-61.
26. Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, et al. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 836-40.
27. Liaw CW, Lovenberg TW, Barry G, et al. Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 1996; 137: 72-7.
28. Vamvakopoulos NC, Sioutopoulou TO. Human corticotropin-releasing hormone receptor gene (CRHR) is located on the long arm of chromosome 17 (17q12-qter). *Chromosome Res* 1994; 2: 471-3.
29. Meyer AH, Ullmer, C, Schmuck K, et al. Localization of the human CRF2 receptor to 7p21-p15 by radiation hybrid mapping and FISH analysis. *Genomics* 1999; 40: 189-90.
30. Xiong Y, Xie LY, Abou-Samra AB. Signaling properties of mouse and human corticotropin-releasing factor (CRF) receptors: decreased coupling efficiency of human type II CRF receptor. *Endocrinology* 1995; 136: 1828-34.
31. Dautzenberg FM, Kilpatrick GJ, Wille S, Hauger RL. The ligand-selective domains of corticotropin-releasing factor type 1 and type 2 receptor reside in different extracellular domains: generation of chimeric receptors with a novel ligand-selective profile. *J Neurochem* 1999; 73: 821-9.
32. Assil IQ, Abou-Samra AB. N-glycosylation of CRF receptor type 1 is important for its ligand-specific interaction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 281: E1015-21.
33. Perrin MH, Vale WW. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann NY Acad Sci* 1999; 885: 312-28.
34. Dautzenberg FM, Kilpatrick GJ, Hauger RL, Moreau J. Molecular biology of the CRH receptors - in the mood. *Peptides* 2001; 22: 753-60.
35. Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol* 2000; 428: 191-212.
36. Reul JM, Holsboer F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 23-33.
37. Baie TL, Giordano FJ, Vale WW. A new role for corticotropin-releasing factor receptor-2: suppression of vascularization. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13: 68-71.
38. Coste SC, Heldwein KA, Stevens SL, Tobar-Dupres E, Stenzel-Poore MP. IL-1 α and TNF α down-regulate CRH receptor-2 mRNA expression in the mouse heart. *Endocrinology* 2001; 142: 3537-45.
39. Nazarloo HP, Nishiyama, M, Tanaka Y, Asaba K, Hashimoto K. Down-regulation of corticotropin-releasing hormone receptor type 2 β mRNA expression in the rat cardiovascular system following food deprivation. *Regul Pept* 2002; 105: 121-9.
40. Makino S, Asaba K, Takao T, Hashimoto K. Type 2 corticotropin-releasing hormone receptor mRNA expression in the heart in hypertensive rats. *Life Sci* 1998; 62: 515-23.
41. Vetter DE, Li C, Zhao L, et al. Urocortin-deficient mice show hearing impairment and increased anxiety-like behavior. *Nat Genet* 2002; 31: 363-9.
42. Wang X, Su H, Copenhagen L, et al. Urocortin-deficient mice display normal stress-induced anxiety behavior and autonomic control but an impaired acoustic startle response. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6605-10.
43. Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale PE, Sawchenko PE. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol* 1999; 415: 285-312.
44. Coste SC, Murray SE, Stenzel-Poore MP. Animal models of CRH excess and CRH receptor deficiency display altered adaptations to stress. *Peptides* 2001; 22: 733-41.
45. Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, et al. Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet* 1998; 19: 162-6.
46. Bradbury MJ, McBurnie MI, Denton DA, Lee KF, Vale WW. Modulation of urocortin-induced hypophagia and weight loss by corticotropin-releasing factor receptor 1 deficiency in mice. *Endocrinology* 2000; 141: 2715-24.
47. Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, et al. Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet* 2000; 24: 403-9.
48. Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, et al. Deletion of CRHR2 reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet* 2000; 24: 415-9.
49. Bale TL, Giordano FJ, Hockey RP, et al. Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7734-9.
50. Lenz HJ, Fisher LA, Vale WW, Brown MR. Corticotropin-releasing factor, sauvagine, and urotensin I: effects on blood flow. *Am J Physiol* 1985; 249: R85-R90.
51. Parkes DG, Weisinger RS, May CN. Cardiovascular actions of CRH and urocortin: an update. *Peptides* 2001; 22: 821-7.
52. Terui K, Higashiyama A, Horiba N, Furukawa KI, Motomura S, Suda TI. Coronary vasodilation and positive inotropism by urocortin in the isolated rat heart. *J Endocrinol* 2001; 169: 177-83.
53. Parkes DG, Vaughan J, Rivier J, Vale W, May CN. Cardiac inotropic actions of urocortin in conscious sheep. *Am J Physiol* 1997; 272: H2115-22.
54. Ikeda K, Tojo K, Sato S, et al. Urocortin, a newly identified corticotropin-releasing factor-related mammalian peptide, stimulates atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide secretions from neonatal rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250: 298-304.
55. Parkes D, May C. Cardiac and vascular actions of urocortin. In: Share L, ed. *Hormones and the heart in health and disease*. Totowa, NJ: Humana Press, 1999: 39-52.
56. Fisher L, Rivier C, Rivier J, Brown M. Differential antagonist activity of alpha-helical corticotropin-releasing factor 9-41 in three bioassay systems. *Endocrinology* 1991; 129: 1312-6.
57. Bale TL, Contarino A, Smith GW, et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 2000; 24: 410-4.
58. Glynn BP, Wolton A, Rodriguez-Linares B, Phaneuf S, Linton EA. Urocortin in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 533-9.
59. Florio P, Cobellis L, Woodman J, Severi FM, Linton EA, Petraglia FJ. Levels of maternal plasma corticotropin-releasing factor and urocortin during labor. *J Soc Gynecol Invest* 2002; 9: 233-7.

60. Rademaker MT, Charles CJ, Espiner EA, et al. Beneficial hemodynamic, endocrine, and renal effects of urocortin in experimental heart failure: comparison with normal sheep. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 1495-505.
61. Rademaker MT, Cameron VA, Charles CJ, Richards AM. Urocortin 3: haemodynamic, hormonal, and renal effects in experimental heart failure. *Eur Heart J* 2006; 27: 2088-98.
62. Brar BK, Stephanou A, Okosi A, et al. CRH-like peptides protect cardiac myocytes from lethal ischaemic injury. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 158: 55-63.
63. Brar BK, Jonassen AK, Stephanou A, et al. Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 8508-14.
64. Schulman D, Latchman DS, Yelion DM. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H1481-H1488.
65. Scarabelli T, Pasini E, Stephanou A, et al. Urocortin promotes hemodynamic and bioenergetic recovery and improves cell survival in the isolated rat heart exposed to ischemia/reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 155-61.
66. Nayler WG, Panagiotopoulos S, Elz JS, Sturrock W. Fundamental mechanisms of action of calcium antagonists in myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 1987; 59: 75B-83B.
67. Chanalaris A, Lawrence KM, Stephanou A, et al. Protective effects of the urocortin homologues stresscopin (SCP) and stresscopin-related peptide (SRP) against hypoxia/reoxygenation injury in rat neonatal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 1295-305.
68. Scarabelli TM, Pasini E, Ferrari G, et al. Warm blood cardioplegic arrest induces mitochondrial-mediated cardiomyocyte apoptosis associated with increased urocortin expression in viable cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 128: 364-71.
69. Brar BK, Stephanou A, Knight R, Latchman DS. Activation of protein kinase B/Akt by urocortin is essential for its ability to protect cardiac cells against hypoxia/reoxygenation-induced cell death. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 483-92.
70. Brar BK, Railson J, Stephanou A, Knight RA, Latchman DS. Urocortin increases the expression of heat shock protein 90 in rat cardiac myocytes in a MEK1/2-dependent manner. *J Endocrinol* 2002; 172: 283-93.
71. Lawrence KM, Chanalaris A, Scarabelli T, et al. K(ATP) channel gene expression is induced by urocortin and mediates its cardioprotective effect. *Circulation* 2002; 106: 1556-62.
72. Lawrence KM, Scarabelli TM, Turtle L, et al. Urocortin protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion injury by attenuating calcium-insensitive phospholipase A2 gene expression. *FASEB J* 2003; 17: 2313-5.
73. Lawrence KM, Kabir AM, Bellahcene M, et al. Cardioprotection mediated by urocortin is dependent on PKC ϵ activation. *FASEB J* 2005; 19: 831-3.
74. Railson JE, Liao Z, Brar BK, et al. Cardiotrophin-1 and urocortin cause protection by the same pathway and hypertrophy via distinct pathways in cardiac myocytes. *Cytokine* 2002; 17: 243-53.
75. Nishikimi T, Miyata A, Horio T, et al. Urocortin, a member of the corticotropin-releasing factor family, in normal and diseased heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H3031-H3039.
76. Okosi A, Brar BK, Chan M, et al. Expression and protective effects of urocortin in cardiac myocytes. *Neuropeptides* 1998; 32: 167-71.
77. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, et al. Expression of urocortin III/stresscopin in human heart and kidney. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 89: 1897-903.
78. Sanz E, Monge L, Fernandez N, Climent B, Dieguez G, Garcia-Villalon AL. Mechanisms of relaxation by urocortin in renal arteries from male and female rat. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1003-7.