

# Università degli Studi della Calabria

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE  
XX CICLO

*Settore disciplinare BIO-09*

*Il cuore ed il rene di "Protopterus dolloi" come modello  
del riarrangiamento strutturale e molecolare in risposta  
all'estivazione*

**COORDINATORE-TUTOR**

**Ch.mo Prof. Bruno TOTA**



**Dottoranda**

**Dott.ssa Daniela Amelio**



---

**Anno Accademico 2006/2007**

# Indice

<b>1) Sommario</b>	1
<b>2) Summary</b>	5
<b>3) Introduzione</b>	9
<b>3.1</b> Biologia dei pesci polmonati	10
<b>3.2</b> Estivazione	11
3.2.1 Generalità	11
3.2.2 Estivazione nei Dipnoi	12
3.2.3 Cambiamenti indotti dall'estivazione	13
<b>3.3</b> Aspetti anatomici del cuore di <i>Protopterus</i>	16
<b>3.4</b> Aspetti anatomici del rene di <i>Protopterus</i>	18
<b>3.5</b> L'ossido nitrico	21
3.5.1 Generalità	22
<b>3.6</b> Le Ossido Nitrico Sintasi (NOSs)	24
3.6.1 Struttura e funzione	24
3.6.2 Localizzazione delle isoforme della NOS	26
3.6.3 Il sistema NOS-NO nei pesci	31
<b>3.7</b> NO e regolazione della funzione cardiaca nei mammiferi	31
<b>3.8</b> NO e modulazione della performance cardiaca dei teleostei	32
<b>3.9</b> NO e regolazione dell'attività renale	33
<b>4) Materiali e metodi</b>	35
<b>4.1</b> Animali	36
<b>4.2</b> Analisi morfologiche	36
4.2.1 Istologia	37
<b>4.3</b> Istochimica (diaforasi su tessuto)	37

<b>4.4</b>	<b>Immunoistochimica</b>	<b>38</b>
<b>4.5</b>	<b>Analisi morfometriche</b>	<b>39</b>
<b>4.6</b>	<b>Osservazione ed elaborazione immagini</b>	<b>40</b>
<b>4.7</b>	<b>Analisi biochimiche</b>	<b>40</b>
4.7.1	Western Blotting	41
4.7.2	Analisi densitometrica	42
4.7.3	NADPH-diaforasi su omogenato	42
4.7.4	Analisi statistiche	43
<b>5)</b>	<b>Risultati.</b>	
<b>5.1</b>	<b>Analisi morfologica</b>	<b>45</b>
5.1.1	Istologia	45
5.1.2	Analisi morfometriche	46
5.1.3	Istochimica (diaforasi su tessuto)	48
5.1.4	Immunolocalizzazione delle NOSs	49
<b>5.2.</b>	<b>Analisi Biochimiche</b>	<b>53</b>
5.2.1	Western Blotting	53
5.2.2	NADPH diaforasi su omogenato	56
<b>6)</b>	<b>Discussione</b>	<b>58</b>
<b>7)</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>66</b>

## 1) SOMMARIO

L'estivazione è uno stato più o meno simile al torpore estivo, e rappresenta una strategia adattativa di sopravvivenza alla disidratazione durante la stagione tropicale secca.

Tale condizione è ben rappresentata dai pesci polmonati Africani (ordine Dipnoi; classe Osteitti; sottoclasse Sarcopterigi) (Fishman et al., 1986), conosciuti anche come animali a “respirazione doppia”. I pesci polmonati o “lungfishes” sono un gruppo di pesci arcaici dotati di veri polmoni che consentono di respirare aria e di sopravvivere per lunghi periodi di tempo al di fuori dell'acqua (Graham 1997). Attualmente i lungfishes comprendono quattro specie africane viventi cioè: *Protopterus annectens*, *Protopterus aethiopicus*, *Protopterus amphibious* e *Protopterus dolloi*, una specie australiana (*Neoceratodus forsteri*) ed una sud-americana (*Lepidosiren paradoxa*). Le specie appartenenti al genere *Protopterus*, a differenza delle altre, sono in grado di estivare per lunghi periodi al di fuori dell'acqua (Graham 1997; Greenwood 1986). In particolare *P. annectens* e *P. aethiopicus* tollerano lunghi periodi di siccità estivando in buche scavate nel fango (Smith 1935; Janssen e Cohen 1968), mentre *P. dolloi* estiva in superficie avvolto da un bozzolo di muco secco (Chew et al., 2004). L'estivazione, nel genere *Protopterus*, implica drastici cambiamenti metabolici e cardio-respiratori quali: il decremento del consumo di ossigeno, la completa dipendenza dalla respirazione aerea, la riduzione della frequenza cardiaca e l'abbassamento della pressione sanguigna (Fishman et al., 1986; De Laney et al., 1974). Anche se il bozzolo mucoso (cocoon) fornisce protezione contro l'evaporazione, durante l'estivazione, il disegno cardio-circolatorio va incontro a diversi cambiamenti. Ad esempio, le lamelle secondarie delle branchie collassano, ed i filamenti branchiali degli archi posteriori si fondono insieme (Sturla et al., 2002). Le branchie, sono quindi by-passate ed il flusso sanguigno è reindirizzato direttamente ai polmoni. In tal modo, da una circolazione semplice (caratteristica tipica dei pesci), si passa ad una circolazione simile a quella degli anfibi adulti (Johansen e Reite 1968). Contrariamente a quanto osservato negli anfibi, durante l'estivazione, in *P. dolloi*, l'ematocrito, la concentrazione plasmatica di  $\text{Na}^+$  e di  $\text{Cl}^-$  e

l'osmolalità restano invariati a causa dell'incremento della concentrazione di urea e dell'elevata permeabilità all'acqua ed agli ioni caratteristica della pelle della superficie ventrale del corpo (Wilkie et al., 2007). La costante perdita di piccole quantità d'acqua e la progressiva disidratazione per riduzione dell'approvvigionamento idrico sono controbilanciate dall'oliguria e dall'effetto protettivo del cocoon (Fishman et al., 1986).

Rimangono ancora incerti i meccanismi intrinseci attraverso i quali cellule, tessuti ed organi sono capaci di adattare le loro funzioni alle richieste indotte dall'estivazione. L'ossido nitrico (NO), messaggero cellulare universale generato dalla famiglia di isoforme delle ossido nitrico sintasi (NOSs), per la sua estrema versatilità ed i suoi effetti modulatori pleiotropici, rappresenta uno dei principali candidati implicati nell'adattamento funzionale a condizioni di stress ambientale dal livello cellulare a quello organismale. Per esempio, nei mammiferi, durante l'ibernazione, lo NO regola non solo il rimodellamento cardiovascolare (Milsom et al., 1999, Lyman 1989) ma anche i cambiamenti nell'emodinamica renale (Henning et al., 2002; Kudej e Vatner 2003). In relazione all'ampio spettro d'azione dello NO, tutte le NOSs [neuronale (nNOS), endoteliale (eNOS) ed inducibile (iNOS)] sono abbondantemente espresse e specificamente localizzate nei compartimenti subcellulari di diversi organi e tessuti inclusi il cuore ed il rene di vertebrati mammiferi (Moncada e Higgs 1993; Aokj et al., 1995) e non mammiferi (Fenoglio et al., 2004; Tota et al., 2005; Amelio et al., 2006). Al contrario dell'ibernazione, nulla è noto sul ruolo funzionale dello NO negli animali estivanti. Il presente lavoro ha quindi inteso approfondire tale aspetto, valutando nel cuore e nel rene di *P. dolloi* il rimodellamento morfo-funzionale associato all'estivazione. Lo studio si è avvalso di diversi approcci metodologici: analisi morfometriche (TEM), analisi biochimiche ed immunoistochimiche (NADPH diaforasi, Western Blotting, immunofluorescenza). In particolare, l'analisi morfometrica ha permesso di valutare il riarrangiamento cardiaco associato all'estivazione. Parallelamente, è stata studiata la localizzazione e l'espressione delle diverse

isoforme della NOS (eNOS, nNOS, iNOS) a livello renale e cardiaco, in condizioni acquatiche (definite fresh water: FW) e dopo 6 giorni (6GE) e 40 giorni (40GE) di estivazione in aria. I risultati documentano per la prima volta la presenza del sistema della NOS in un gruppo di pesci arcaici quali i Dipnoi.

I dati ottenuti mostrano che, nel cuore e nel rene, la eNOS rappresenta l'isoforma maggiormente espressa rispetto alle isoforme neuronale ed inducibile. A livello cardiaco, sia nei FW che negli estivanti, la eNOS si localizza sull'epicardio, sull'endotelio endocardico che riveste le trabecole ed in misura ridotta nei miocardiociti. Il Western Blotting ha rivelato che l'espressione della eNOS nel cuore aumenta dopo 6GE e ritorna a valori basali dopo il periodo lungo di estivazione (40GE). Nel rene dei FW l'enzima è presente sia nelle cellule dell'endotelio vascolare, che nei podociti del corpuscolo renale. Nelle cellule epiteliali tubulari l'enzima si localizza prevalentemente nel polo apicale. Con l'estivazione, l'aumento dell'espressione dell'enzima, rilevato mediante Western Blotting, avviene parallelamente all'incremento dell'attività totale della NOS, come dimostrato dalla diaforasi su omogenato. È interessante notare che, nei due organi, durante l'estivazione, l'espressione della eNOS e la sua localizzazione sono soggette ad una regolazione dipendente dal tempo e dallo spazio. Ciò supporta l'idea che, in *P.dolloi*, lo NO può modulare in maniera autocrino-paracrina il rimodellamento morfo-funzionale in risposta all'estivazione sia a breve che a lungo termine.

L'analisi morfometrica condotta sul cuore d'animali freshwater ed estivanti (6 mesi di estivazione), ha mostrato l'assenza di grosse modificazioni associate con l'estivazione. In particolare, negli estivanti i mitocondri diminuiscono in numero, ma aumentano la loro dimensione, parallelamente si osserva un incremento dell'area cellulare associato alla riduzione degli spazi interstiziali.

## **2) SUMMARY**

Aestivation is a status little more prominent than summer torpor, which represents an adaptation to survive dehydration during the dry tropical seasons. It is typically illustrated by African lungfishes (Order: Dipnoi; class Osteichthyes, sub-class Sarcopterygii) (Fishman et al., 1986) which are so named because they are “dual breathers”. Lungfish are archaic air-breathing fishes possessing true lungs which permit them to breathe air, thereby surviving out of water for an extended period (Graham 1997). They include four extant African species, i.e. *Protopterus annectens*, *Protopterus aethiopicus*, *Protopterus amphibious* and *Protopterus dolloi*, which, unlike their Australian (*Neoceratodus forsteri*) and South American (*Lepidosiren paradoxa*) counterparts, can aestivate for long time without water (Graham 1997; Greenwood, 1986). *P. aethiopicus* and *P. annectens* tolerate drought periods by aestivating in subterranean mud cocoons (Smith 1935; Janssen e Cohen 1968), while *P. dolloi* can withstand desiccation inside a layer of dried mucus in air (Chew et al., 2004 and references therein). In *Protopterus*, subterranean aestivation is characterized by cardio-respiratory and metabolic changes such as decreased oxygen consumption, complete reliance on air breathing, slowing of heart rate, drop in blood pressure, and oliguria (Fishman et al., 1986; De Laney et al., 1974). While the cocoon provides protection against evaporation, the circulatory design undergoes remarkable changes during aestivation. For instance, in aestivating lungfish the secondary lamellae of the gills, which are structurally restricted and play only a minor role in aquatic respiration (Perry et al., 2005; Burggreen e Johansen 1986), collapse and filaments of posterior gill arches fuse together (Sturla et al., 2002). Thus, gills are bypassed and the blood flow is redirected to the lungs, so that a single circulation (typical feature of piscine heart) switches to a circulation resembling that of the adult amphibian (Johansen e Reite 1968). While the aestivating lungfish is subjected to a progressive desiccation because of the lack in water supply and the constant loss of small quantities of water through the lungs, water loss is countered by the oliguria and the waterproofing effect of the cocoon (Fishman et al., 1986). The consequential accumulation of

metabolic wastes (Smith 1930; Janssen 1964) is minimized by a low level of metabolic acidosis and a reduction in ammonia production (Chew et al., 2003, 2004). Thus, during aestivation, the production of  $H^+$  in the kidney appears deeply diminished by oliguria and the concentrations of many plasma components including urea increase, thereby enhancing total plasma osmolarity (Fishman et al 1986).

To date, the intrinsic mechanisms by which cells, tissues and organs are able to adapt their function to the requirements induced by aestivation remain to be described. Nitric oxide (NO), a messenger generated by the nitric oxide synthase (NOS) isoform system, for its versatile and pleiotropic modulatory effects, is one of the potential candidates for orchestrating cell, tissue, molecular and organ functional adaptations to stressful environmental conditions. For example, during hibernation, NO regulates not only the dramatic cardiovascular readjustments, which include a drop in heart rate (Milsom et al., 1999) and blood pressure (Lyman 1989), but also the changes in renal hemodynamics and glomerulo-tubular function (i.e. reduction of glomerular filtration and renal plasma flow) (Henning et al., 2002; Kudej e Vatner 2003 and references therein). Interestingly, NO reversibly depresses mitochondrial respiration, decreases basal oxygen consumption and, as shown in the in vivo heart, it is able to shift myocardial substrate catabolism from the utilization of free fatty acids to lactate (Canty 2000). Consistent with such a large spectrum of actions, all NOS isoforms [NOS1 or neuronal NOS (nNOS), NOS3 or endothelial NOS (eNOS) and NOS2 or inducible NOS (iNOS)] are expressed and partitioned within specific sub-cellular compartments of different tissues and organs, including heart and kidney of mammalian (Moncada e Higgs 1993; Aoki et al., 1995) and non-mammalian (amphibians and teleosts) vertebrates (Fenoglio et al., 2004; Tota et al., 2005; Amelio et al., 2006).

Contrary to hibernation, nothing is known on the functional roles of NO in animals undergoing aestivation. To explore this question, using biochemical and immuno-histochemical (NADPH-

diaphorase, Western Blotting, and immunofluorescence) methods, we analysed expression, localization and activity of cardiac and renal NOS isoforms in *P. dolloi* under freshwater (FW) conditions or after 6 days (6DA) and 40 days (40DA) of experimentally induced surface aestivation. In addition, we performed morphometric analysis on ventricular sections to describe the morphological readjustment associated with aestivation.

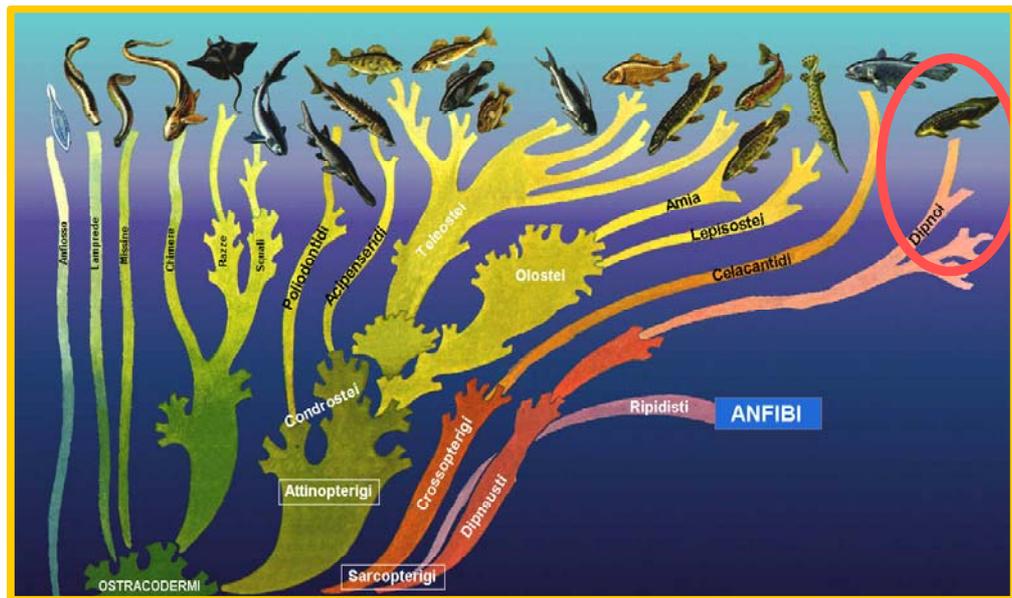
Our findings document for the first time, the presence of a NOS system in both heart and kidney of this archaic Dipnoan. Our results show that in both heart and kidney, endothelial NOS (eNOS) is the major isoform with respect to inducible and neuronal NOS (iNOS and nNOS, respectively). Cardiac eNOS locates in the epicardium, the trabecular endothelial endocardium, and to a lesser extent, in myocardiocytes of both FW and aestivating fish. Western Blotting analysis revealed that cardiac eNOS expression is enhanced in 6DA, but is reduced in 40DA fish. In the kidney, the enzyme is present in vascular endothelial cells and in podocytes of renal corpuscles of FW fish. In tubular epithelial cells it is restricted to the apical pole. With aestivation, both renal localization and expression of the enzyme increase. NADPH-diaphorase revealed that during aestivation also cardiac and renal NOS activities resulted increased. Interestingly, in the two organs during aestivation eNOS expression and localization undergo time and/or regional dependent regulation. This supports the idea that in *P. dolloi* NO may modulate in autocrine-paracrine fashion cardiac and renal morpho-functional readjustments during short- or medium-term responses to aestivation.

Analysis of the morphometric data, obtained from FW and six-month aestivating animals showed the absence of statistically significant differences in most of the parameters studied. During aestivation a decrease of the mitochondria number is associated with an increment of their size. In addition, aestivating animals showed a significant increase in mean cellular area, cytoplasmic compartment and sarcomer length, in parallel with a reduction of the interstitial spaces.

### **3) INTRODUZIONE**

### 3.1 Biologia dei pesci polmonati

I “lungfishes” o pesci polmonati (ordine Dipnoi; classe Osteitti; sottoclasse Sarcoperigi), rappresentano un gruppo di pesci arcaici comparsi circa 400 milioni di anni fa (Fishman et al., 1986). La loro caratteristica peculiare è quella di essere dotati di veri polmoni, che permettono di respirare aria e di sopravvivere per lunghi periodi di tempo al di fuori dell’acqua (Graham 1997). Essi attualmente sono rappresentati da sei specie viventi, quattro delle quali si trovano in Africa e comprendono: *Protopterus annectens*, *Protopterus aethiopicus*, *Protopterus amphibious* and *Protopterus dolloi*. Oltre alle specie africane, appartenenti al genere *Protopterus*, ricordiamo la specie australiana (*Neoceratodus forsteri*) e la sud-americana (*Lepidosiren paradoxa*). I pesci polmonati mancano di pinne dorsali, ma presentano pinne pettorali e pelviche di natura carnosa, non possiedono ossa mascellari poiché esse risultano fuse con la testa. Essi comprendono specie a respirazione aerea facoltativa o obbligatoria (Graham 1997). I lungfishes condividono con i teleostei acquatici diverse caratteristiche morfologiche funzionali quali: presenza delle branchie, mancanza di arti, produzione di urina diluita. Tuttavia l’arrangiamento scheletrico, il disegno cardio-circolatorio e soprattutto la presenza di veri polmoni li rendono filogeneticamente molto vicini ai vertebrati Tetrapodi (Figura 3.1). Zhu and Yu (2002), con la scoperta dell’esistenza di un fossile risalente a circa 400 milioni di anni fa avente caratteristiche comuni sia ai vertebrati tetrapodi che ai “lungfishes”, hanno fornito un supporto a tale ipotesi. Inoltre diversi studi sulla fisiologia dei “lungfishes” avvalorano l’ipotesi di una comune origine filogenetica (Brinkmann et al., 2004; Zardoya et al., 1998; Sanchez et al., 2001; Amin-Naves et al., 2004; Gilmour et al. 2007).



**Figura 3.1-** Dendrogramma mostrante la vicinanza filogenetica tra i Dipnoi ed i vertebrati tetrapodi

## 3.2 Estivazione

### 3.2.1 Generalità

L'**estivazione** è uno stato più o meno simile al torpore estivo e rappresenta una strategia adattativa di sopravvivenza alla disidratazione durante la stagione tropicale secca. L'estivazione è generalmente indotta da condizioni ambientali avverse, quali la carenza di cibo e/o la siccità (Abe 1995). I primi studi sull'estivazione risalgono ai lavori di Smith (1935). Generalmente l'estivazione è associata ad una riduzione degli scambi respiratori, della pressione sanguigna e del lavoro cardiaco (Glass et al., 1997). Durante l'estivazione, a differenza di quanto accade nell'ibernazione, la riduzione del metabolismo avviene in assenza di un decremento della temperatura (Glass, 2007).

L'estivazione è un fenomeno frequente anche fra anfibi e rettili, diversi studi, infatti, hanno dimostrato che, negli anfibi anuri estivanti, il consumo d'O<sub>2</sub> si riduce del 30% (McClanahan et al., 1983; Flanigan et al., 1991).

Una riduzione metabolica della stessa entità è stata registrata negli anfibi urodela (Etheridge, 1990). Nel 1981 Dejours ha stabilito che: “quanto più un animale dipende dalla respirazione polmonare, tanto più elevata sarà la sua pressione parziale di CO<sub>2</sub>”. Tale osservazione, rappresenta una tendenza comune a diverse specie. Infatti, ad esempio, in *Bufo marinus* la transizione dalla respirazione acquatica a quella polmonare comporta un significativo aumento della pressione parziale di CO<sub>2</sub> (Boutilier et al., 1979).

### 3.2.2 Estivazione nei Dipnoi

L'estivazione è una strategia adattativa usata anche dai pesci polmonati. In particolare le specie appartenenti al genere *Protopterus* sono in grado di estivare per lunghi periodi fuori dell'acqua (Graham 1997; Greenwood 1986). Di contro in *N. fortseri* la respirazione branchiale è la principale via per gli scambi gassosi, infatti, questo lungfish non va incontro ad estivazione ed in condizioni di normossia, riesce a non emergere dall'acqua per ore (Kind et al., 2002).

I Lepidosirenidi, che comprendono le quattro specie di *Protopterus*, possiedono tutti branchie ridotte, in associazione con un polmone ben sviluppato (Fishman et al., 1986). Durante la stagione secca, la mancanza d'acqua induce *P. aethiopicus* a secernere del muco che asciugandosi forma un bozzolo (cocoon) capace di minimizzare la disidratazione. Il tempo di sopravvivenza nel cocoon è sorprendente; Lomholt (1993) ha riportato, in *P. amphibious*, una capacità di sopravvivenza all'interno del cocoon di 7 anni.

Anche *P. annectens* tollera lunghi periodi di siccità, estivando in buche scavate nel fango e avvolto da un bozzolo (Smith 1935; Janssen e Cohen 1968). Invece, *P. dolloi*, è in grado di estivare in superficie, avvolto in uno strato di muco secco che lo protegge dalla disidratazione (Chew et al., 2004). In *P. dolloi* l'estivazione superficiale indotta in laboratorio si associa nei primi due giorni ad una transitoria iperattività, iperventilazione ed intensa secrezione mucosa. Dopo circa tre-sei giorni, fase che alcuni indicano come “terrestrializzazione”, nell'animale, si

registra un calo dell'attività fisica ed una secrezione latero-dorsale di muco. Infine, dopo 6 giorni, si raggiunge la completa inattività fisica associata alla refrattarietà agli stimoli di natura meccanica. In tale fase, il muco secreto forma un bozzolo che circonda completamente l'animale proteggendolo dalla disidratazione (Chew et al., 2004) (Figura 3.2).



**Figura 3.2-** Esemplici di *P.dolloi* in condizioni acquatiche o “freshwater” e durante l'estivazione superficiale indotta sperimentalmente

### 3.2.3 Cambiamenti indotti dall'estivazione

In generale, l'estivazione in *Protopterus* è caratterizzata da drastici cambiamenti metabolici e cardio-respiratori che comprendono: il calo del consumo di ossigeno, la completa dipendenza dalla respirazione aerea, la riduzione della frequenza cardiaca e l'abbassamento della pressione sanguigna (Fishman et al., 1986; De Laney et al., 1974). Durante il passaggio dalla condizione acquatica a quell'estivante sia il basso tasso metabolico che le ridotte funzioni escretorie permettono al lungfish estivante di sopravvivere per mesi senza assumere cibo o acqua (Fishman et al., 1986).

In particolare in *P. aethiopicus* l'estivazione è associata ad un aumento della  $p\text{CO}_2$  (De Laney et al., 1977), infatti, nell'animale FW è di circa 26 mmHg mentre nell'estivante sale a 45 mmHg. Ciò consegue alla ridotta funzionalità branchiale, sede preposta all'eliminazione della

CO<sub>2</sub>, che, durante l'estivazione, avviene principalmente attraverso i polmoni. La formazione completa del cocoon caratterizza il passaggio dalla respirazione bimodale (aerea ed acquatica) a quella polmonare. L'incremento della pressione parziale di CO<sub>2</sub> che si osserva durante l'estivazione, è associato solo a piccole riduzioni del pH (Andrade et al., 2004). Ciò concorda con il fatto che l'animale dipende dalla ventilazione polmonare sia durante la stagione attiva che durante l'estivazione. Con l'estivazione, l'escrezione dell'ammoniaca è notevolmente ridotta e, a causa della sua tossicità, la sua produzione deve essere ridotta, la percentuale in ogni caso presente deve essere convertita in composti meno tossici (Cooper and Plum, 1987; Ip et al., 2001b; Brusilow, 2002; Felipo and Butterworth, 2002; Rose, 2002; Chew et al., 2006). Infatti, i lungfishes nel passaggio dalla condizione acquatica a quella terrestre da ammoniotelici diventano ureotelici (Smith, 1935; Janssens and Cohen, 1966, 1968a,b; Mommsen and Walsh, 1989) grazie alla presenza, nel fegato, del ciclo funzionale ornitina-urea insieme all'enzima carbamoil fosfato sintetasi III (Chew et al., 2003a, 2004; Loong et al., 2005). Diversi studi sono stati focalizzati prevalentemente sul metabolismo dell'azoto e la sintesi dell'urea nei lungfishes estivanti (Chew et al., 2006). Apparentemente, infatti, sembrano esserci strette e intricate relazioni tra l'incremento della sintesi d'urea, la riduzione della produzione d'ammoniaca e l'induzione dell'estivazione (Ip et al., 2005 b,c,d).

Il "pattern" di estivazione in *P. aethiopicus* risulta diverso da quello osservato in *P. dolloi*. Infatti, in *P. dolloi* FW il consumo d'O<sub>2</sub> è paragonabile a quello di *P. aethiopicus* mantenuto nelle stesse condizioni (De Laney et al., 1974), ma durante i primi giorni di estivazione, indotta in laboratorio, in *P. dolloi* il tasso di consumo di O<sub>2</sub> tende ad aumentare (Perry et al., 2007), anche se non significativamente, piuttosto che diminuire come osservato nelle altre specie estivanti. In aggiunta, dopo la formazione del cocoon, anche la pCO<sub>2</sub> diminuisce da 18 a 14 mmHg. Alcuni autori, ritengono che, i primi giorni d'esposizione aerea non corrispondano ad

una vera estivazione e pertanto è stato coniato il termine “terrestrializzazione”. Solo dopo un periodo superiore ai 30 giorni comparirebbe la vera estivazione (Glass 2007).

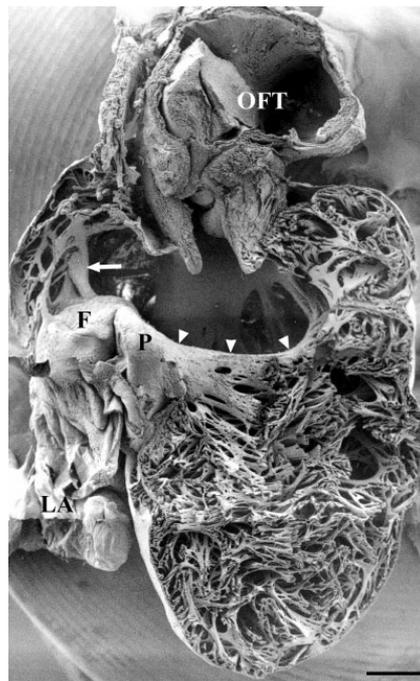
Al progredire dell'estivazione, in conseguenza del ridotto volume plasmatico associato alla disidratazione (De Laney et al., 1976) si osserva un graduale aumento di altri parametri fisiologici quali l'ematocrito, la capacità per l'ossigeno, il numero degli eritrociti e la concentrazione dell'emoglobina (Lenfant e Johansen 1968; Johansen et al., 1976). Al contrario di quanto osservato negli anfibi, in *P. dolloi* che è in grado di estivare in superficie, l'ematocrito, la concentrazione plasmatica di  $\text{Na}^+$  e di  $\text{Cl}^-$ , e l'osmolalità rimangono invariati a causa dell'incremento della concentrazione di urea e dell'elevata permeabilità all'acqua e agli ioni (Wilkie et al., 2007) della pelle che riveste la superficie ventrale dell'animale. La progressiva disidratazione a cui, è soggetto il lungfish durante l'estivazione, è controbilanciata dall'oliguria e dall'effetto protettivo del cocoon (Fishman et al., 1986). Il conseguente accumulo di scorie metaboliche (Smith 1930; Janssen 1964) è ridotto dal basso livello di acidosi metabolica e dal passaggio da una condizione ammoniotelica ad una urotelica (Chew et al., 2003, 2004) che comporta un incremento dell'osmolarità plasmatica totale (Fishman et al., 1986).

In *P. dolloi*, i maggiori cambiamenti strutturali associati all'estivazione sono a carico dei sistemi respiratorio e cardio-circolatorio. Infatti, nel lungfish estivante, si osserva il collasso delle lamelle secondarie delle branchie, che già risultano strutturalmente ridotte e giocano un ruolo minore durante la respirazione acquatica (Perry et al., 2005; Burggren e Johansen 1986). Inoltre, i filamenti branchiali degli archi posteriori si fondono insieme (Sturla et al., 2002), in tal modo le branchie sono bypassate e il flusso sanguigno è veicolato direttamente verso i polmoni. Ciò comporta il passaggio da una circolazione di tipo semplice (classica caratteristica del cuore dei pesci) ad una circolazione simile a quella che ritroviamo negli anfibi adulti (Figura 3.4) (Johansen e Reite 1968).

### 3.3 Aspetti anatomici del cuore di *Protopterus*

Come diretta conseguenza dell'adattamento alla respirazione aerea, il cuore dei pesci polmonati è altamente specializzato nel mantenere separati, attraverso le sue cavità, il sangue ossigenato da quello deossigenato (Figura 3.3). Il cuore, nel genere *Protopterus*, risulta infatti costituito da quattro camere disposte in serie: seno venoso, atrio, ventricolo e bulbo. Inoltre è presente una sola vena polmonare che convoglia il sangue ossigenato nella parte sinistra del seno venoso (Bugge 1961; Icardo et al., 2005). La fusione tra la vena polmonare, il seno venoso e la piega polmonare (una piega di natura cartilaginea estesa tra il cuscinetto atrio-ventricolare, la vena polmonare e la parete atriale) costituisce una separazione netta, a livello del seno venoso, in grado di dividere il flusso polmonare, da quello di ritorno dal circolo sistemico. In tal modo, si genera un segmento denominato "canale polmonare" (Icardo et al., 2005) che permette al sangue ossigenato di entrare direttamente nella parte sinistra dell'atrio. La porzione rimanente del seno venoso convoglia, invece, il sangue proveniente dal circolo sistemico nella parte destra dell'atrio. A livello atriale, è presente una parziale sepimentazione dovuta alla presenza di un setto muscolare disposto dorsalmente. In aggiunta, la connessione atrio-ventricolare è in parte ostruita da una massa di tessuto di cartilagine ialina chiamata "cuscinetto atrio-ventricolare" (Icardo et al., 2005). Il bulbo, si presenta allungato e ripiegato di circa 270° dalla porzione prossimale a quella distale. Esso è diviso internamente mediante una piega ventrolaterale con decorso a spirale (Burggren e Johansen, 1986; Graham, 1997). Il cuore dei pesci polmonati appare, dunque, altamente specializzato nella separazione tra il flusso sanguigno sistemico e quello polmonare. Gli studi condotti sul cuore di *P. dolloi* hanno mostrato che la morfologia cardiaca, coincide con quanto già descritto nel genere *Protopterus*. In particolare, il ventricolo di *P. dolloi* (Figura 3.3) presenta una forma sacculare, ed è ancorato mediante uno spesso tendine alla parete pericardica anteriore. Esso è separato da un setto verticale orientato dorso-

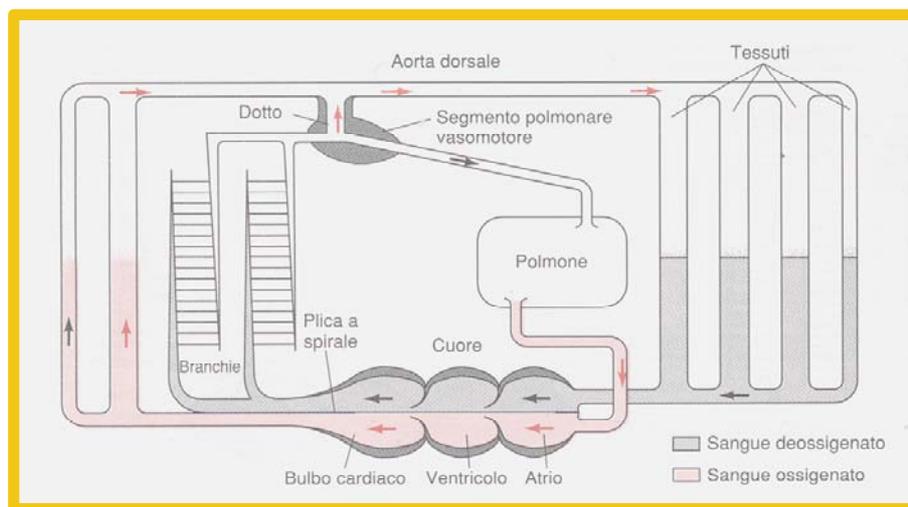
ventralmente che si estende dall'apice ventricolare verso l'alto. In accordo con quanto osservato nel genere *Protopterus*, la muscolatura ventricolare è interamente trabecolata. Di tipo trabecolare è anche il miocardio del setto e quello della parete libera ventricolare. La mancanza di tessuto compatto a livello del setto, rende quest' ultimo poco resistente. Le trabecole del setto sono in continuità con quelle della parete libera (Icardo et al., 2005).



**Figura 3.3-** Sezione frontale del cuore di *P. dolloi* al SEM. Il ventricolo è completamente trabecolato. Il cuscinetto atrioventricolare (P) poggia sul setto ventricolare. Il tratto di efflusso (OFT) si origina superiormente al setto. (da Icardo et al., 2005)

Il tratto d'efflusso comprende una porzione prossimale, denominata cono arterioso, che offre ancoraggio al bulbo, unica regione questa costituita da tessuto compatto molto vascolarizzato, presente anche in altri teleostei con miocardio di tipo trabecolare (Icardo et al., 2003). La porzione distale, invece, ricorda la struttura delle grosse arterie, essendo costituita prevalentemente da fibre elastiche e fibre collagene e può considerarsi "omologa" al bulbo arterioso dei teleostei (Icardo et al., 2003; Guerrero et al., 2004). Lo spazio subepicardico è separato dalle sottostanti trabecole mediante un sottilissimo strato di miocardio. Esso nella parte

che circonda il ventricolo è formato da tessuto connettivo liscio poco vascolarizzato e ricco di cellule simili ai fibroblasti (Icardo et al., 2005). Il tessuto subepicardico, che circonda la parte terminale del tratto d'efflusso, è ricco oltre che di vasi e fibroblasti anche di fibre nervose mieliniche e di gangli nervosi (Icardo et al., 2005).



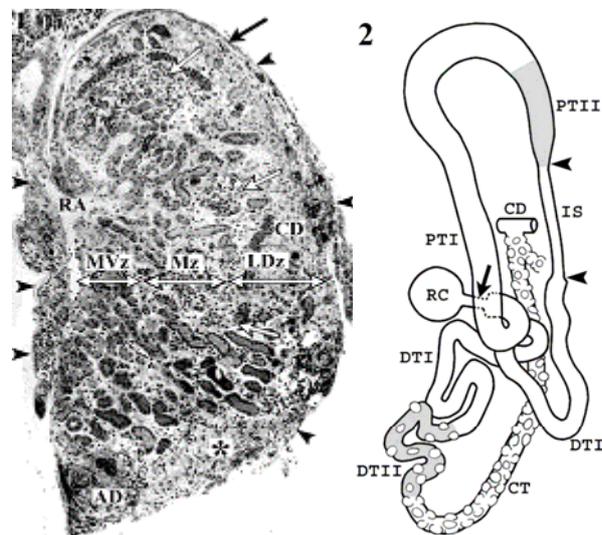
**Figura 3.4-** Rappresentazione schematica dell'apparato cardio-circolatorio nel Dipnoo *Protopterus dolloi*

### 3.4 Aspetti anatomici del rene di *Protopterus*

L'estivazione, come già accennato, è accompagnata da drastiche modificazioni funzionali che includono l'oliguria. Pertanto il rene di *Protopterus dolloi* deve essere strutturato in maniera tale da far fronte a questi drammatici e ciclici cambiamenti della sua funzionalità.

L'anatomia renale (Figura 3.5) di *P. dolloi* è stata abbondantemente studiata da Ojeda e collaboratori (Ojeda et al., 2006) mediante studi di microscopia ottica ed elettronica (scansione e trasmissione) che hanno permesso di dettagliare gli aspetti strutturali ed ultrastrutturali renali. In particolare, il rene di *P. dolloi*, è un organo pari localizzato ventralmente alla colonna vertebrale, adiacente alla cavità ventrale del corpo. In esso è possibile distinguere una regione latero-dorsale, rivestita da una capsula fibrosa, ed una medio-ventrale, dall'aspetto più

appiattito, contenente i corpuscoli renali ed i tubuli. Sotto la regione capsulare è presente un'abbondante quantità di tessuto emopoietico frammisto a cellule pigmentate (Ojeda et al., 2006). Il nefrone di *P. dolloi* risulta essere composto da un corpuscolo renale e da un tubulo renale. Quest'ultimo si distingue in cinque segmenti denominati: segmento prossimale, tubulo prossimale, segmento intermedio, tubulo distale e dotto collettore (Ojeda et al., 2006). Mentre il corpuscolo renale occupa la posizione centrale del rene, i tubuli contorti prossimali sono collocati prevalentemente nella regione dorso-laterale, al contrario dei tubuli distali che occupano la porzione medio-ventrale.



**Figura 3.5-** Sezione semifine renale (sinistra) e ricostruzione schematica del nefrone in *P.dolloi* (a sinistra). LDZ =regione latero-dorsale; Mz= regione centrale; MVz =regione medioventrale; Rc= corpuscolo renale; PT= tubulo prossimale diviso in due porzioni PT1 e PT2. IS=segmento intermedio compreso tra PT e DT. DTI e DTII corrispondono alle due suddivisioni del tubulo distale; CT= dotto collettore (da Ojeda et al., 2006)

I corpuscoli renali, si presentano aggregati in “cluster” formati da 4-5 unità. In *P. dolloi*, ogni “cluster” è irrorato da una singola arteriola afferente circondata dai periciti, cellule contrattili in grado di controllare il flusso ematico nei vasi renali (Sims 1986). Ogni “cluster” rappresenta dunque un'unità funzionale dotata di un meccanismo di regolazione emodinamico proprio, che può rappresentare un vantaggio funzionale in relazione ai cambiamenti ambientali. I capillari

glomerulari formano dei ciuffi costituiti da 3-4 vasi. I podociti, sono strettamente adesi al corpuscolo renale e presentano processi pedicellari fortemente interdigitati e comunicanti tra loro tramite gap-junction. Ciò consente di formare un sistema sincronizzato comunicante, in grado di rispondere prontamente ai cambiamenti ambientali, mediante modificazioni dell'arrangiamento spaziale dei podociti e della sintesi di vari componenti della membrana basale glomerulare (Ojeda et al., 2006). Quest'ultima, risulta essere formata da tre strati: una lamina subendoteliale, una lamina densa ed una lamina rara, ed ha uno spessore cinque volte maggiore di quello registrato in altre specie di teleostei marini (Hickman and Trump 1969; Zuasti et al., 1983).

Il segmento prossimale, consta prevalentemente di cellule cuboidali multiciliate. La funzione delle ciglia potrebbe essere quella di favorire l'avanzamento dell'urina verso il tubulo prossimale, riducendo così la pressione nello spazio urinario e favorendo la filtrazione glomerulare (Sawyer et al., 1982) che, altrimenti, sarebbe rallentata per via della bassa pressione arteriosa tipica di questi pesci (Sawyer, 1970). Il tubulo prossimale si distingue in due tratti, il primo dei quali contiene cellule dotate di orletto a spazzola, mentre il secondo tratto contiene sia cellule con orletto che cellule multiciliate. Il primo tratto del tubulo prossimale rappresenta il sito principale di riassorbimento del filtrato glomerulare (Ojeda et al., 2006). Il segmento intermedio, a causa dell'alta resistenza al flusso urinario legata al ridotto diametro del segmento distale e del dotto collettore, è costituito solo da cellule multiciliate coinvolte probabilmente nella propulsione dei fluidi.

I tubuli distali formano delle anse nella porzione ventro-mediale alcune delle quali in stretto contatto con le aree glomerulari. Anche nel tubulo distale si distinguono, un primo tratto (prossimale), costituito esclusivamente da cellule epiteliali colonnari, ed un secondo tratto (distale) contenente cellule epiteliali colonnari frammiste a cellule a fiasco (Ojeda et al., 2006). Le cellule colonnari sono dotate nella porzione apicale di microvilli irregolari corti e spessi e di

ciglia rare e corte. Il citoplasma apicale è ricco di numerose e piccole vescicole, mentre la porzione baso-laterale contiene numerosi mitocondri. Il tubulo collettore, consta di due tipi cellulari: le cellule principali e le cellule a fiasco. Le prime sono cellule prismatiche con una superficie apicale liscia e ciglia corte. Il loro citoplasma, nella porzione apicale, presenta un aspetto spugnoso a causa della presenza di numerose vescicole contenenti materiale flocculento. Le cellule a fiasco mostrano invece una caratteristica forma a pera con un polo basale dilatato (Ojeda et al., 2006).

### **3.5 L'Ossido Nitrico**

A causa dei suoi effetti modulatori e pleiotropici, ristretti dal punto di vista spazio-temporale, l'ossido nitrico (NO), messaggero gassoso universale generato dalla famiglia d'isoforme di ossido nitrico sintasi (NOSs), potrebbe rappresentare uno dei principali candidati nel dirigere gli adattamenti funzionali di cellule, tessuti ed organi dinanzi a stressanti condizioni ambientali. E' interessante notare che lo NO deprime in maniera reversibile la respirazione mitocondriale, riducendo il consumo basale d'ossigeno e, come mostrato nel cuore *in vivo*, inoltre è capace di deviare il catabolismo miocardico dall'utilizzo degli acidi grassi liberi al lattato (Canty 2000). Per esempio, durante l'ibernazione, stato per molti versi simile all'estivazione, lo NO è coinvolto non solo nella regolazione del drastico rimodellamento cardio-vascolare (riduzione della frequenza cardiaca e della pressione sanguigna, incremento della resistenza periferica, reindirizzamento del sangue verso cuore, cervello e polmoni) (Lyman 1989; Milsom et al., 1999; Bullard e Funkhouser 1962; Tempel et al., 1977), ma anche nei cambiamenti dell'emodinamica renale e della funzione tubulo-glomerulare. In particolare lo NO sarebbe coinvolto nella riduzione della filtrazione glomerulare e del flusso plasmatico renale (Henning et al., 2002; Kudey e Vatner 2003).

### 3.5.1 Generalità

Lo NO è un radicale libero gassoso costituito da atomi d'azoto e d'ossigeno. Esso, presenta elettroni spaiati, ed è pertanto altamente reattivo a livello tissutale provocando notevoli modificazioni dello stato chimico-fisico delle molecole con cui entra in contatto. Lo NO interagisce con la materia vivente, trasformandosi in composti più stabili che possono essere attivi a livello biologico.

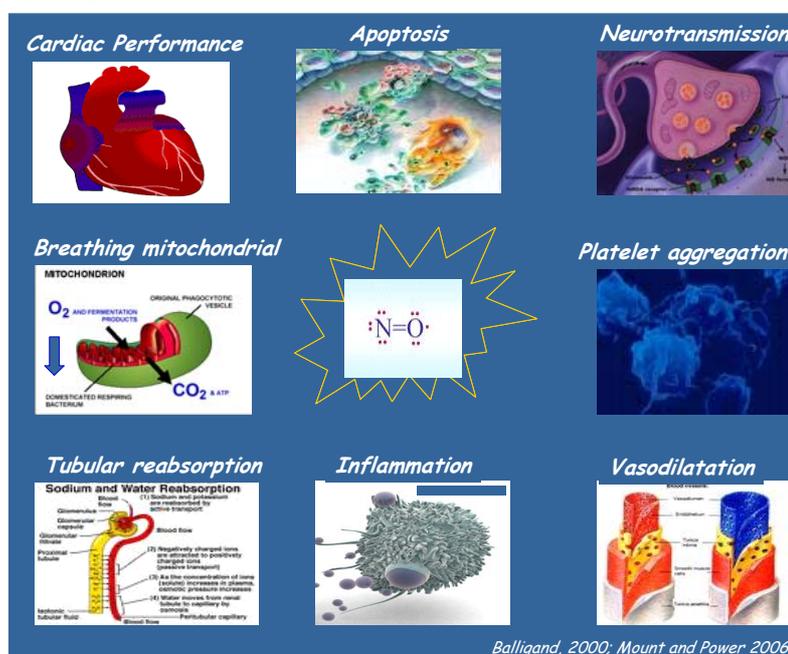
Lo NO è sintetizzato nei Vertebrati ed in altre forme di vita più semplici mediante l'ossidazione sequenziale della L-arginina (Griffith and Stuehr, 1995) catalizzata dalle Ossido Nitrico Sintasi (NOSs) (Figura 3.8). Il rilascio dello NO coinvolge diversi tipi cellulari, incluso le cellule dell'endotelio vascolare ed endocardico, i monociti/macrofagi ed i neuroni.

Lo NO è considerato un importante mediatore ed un potente agente citotossico, implicato nella regolazione di numerose funzioni fisiologiche (Figura 3.6), quali la neurotrasmissione a livello del sistema nervoso centrale e periferico, la difesa immunitaria ed il controllo vasale (Garthwaite, 1991; Snyder e Bredt, 1992; Gillespie et al., 1990; Rand, 1992; Nathan e Hibbs, 1991; Nussler e Billiar, 1993; Moncada et al., 1989; Furchgott, 1990; Ignarro, 1990; Vane et al., 1990; Luscher, 1991).

A livello dell'endotelio vascolare, lo NO può essere rilasciato sia in risposta a stimoli chimici che fisici e contribuisce al mantenimento di un tono vasodilatatorio, fondamentale nella regolazione del flusso e della pressione del sangue (Moncada et al., 1989; Furchgott, 1990; Ignarro, 1990; Vane et al., 1990; Luscher, 1991). Lo NO rilasciato a livello endoteliale e/o piastrinico esercita un effetto anti-aggregante, inibente l'adesione dei leucociti e la proliferazione delle cellule muscolari lisce (Moncada e Higgs, 1993).

Lo NO sintetizzato nei neuroni del sistema nervoso centrale, agisce come neuromediatore per molte funzioni fisiologiche, coordinando l'attività neuronale, il flusso sanguigno e la modulazione del dolore (Garthwaite, 1991; Snyder e Bredt, 1992). Nel sistema nervoso

periferico, lo NO è rilasciato da una larga gamma di reti neuronali che mediano alcune forme di vasodilatazioni neurogeniche e regolano funzioni gastrointestinali, respiratorie e genitourinarie (Gillespie et al., 1990; Rand, 1992). Queste azioni sono mediate dall'attivazione della guanilato ciclasi solubile (GCs) e dal conseguente aumento della concentrazione del guanosin-monofosfato ciclico (cGMP) (Murad et al., 1990; Ignarro, 1991). Inoltre, lo NO è generato in grandi quantità nella risposta immunitaria cellulo-mediata (Nathan e Hibbs, 1991; Nussler e Billiar, 1993). La presenza dello NO è stata riscontrata nei macrofagi attivati (Hibbs et al., 1988; Stuehr et al., 1989) dove contribuisce ad aumentare la citotossicità contro cellule tumorali, batteri, virus ed altri microrganismi aggressori, inibendo gli enzimi della catena respiratoria e la sintesi del DNA nelle cellule bersaglio (Hibbs et al., 1990; Nguyen et al., 1992). L'interazione dello NO con la citocromo-c ossidasi è importante nella modulazione della respirazione cellulare, tale interazione, infatti, è in competizione con l'O<sub>2</sub> ed induce una inibizione dell'attività enzimatica (Brown e Cooper, 1994). Lo NO gioca pertanto un ruolo importante nella risposta immunitaria ed è implicato nella patogenesi di condizioni come lo shock settico e le infiammazioni.

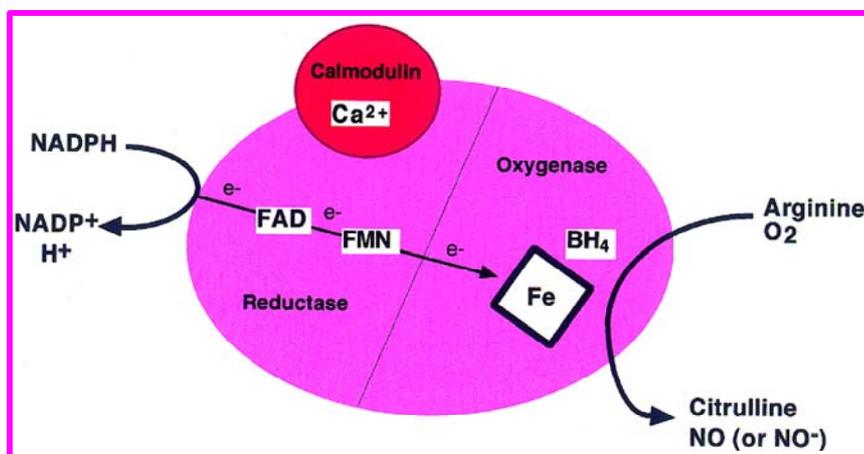


**Figura 3.6-** Coinvolgimento dello NO nella regolazione di diverse funzioni fisiologiche

## 3.6 Le Ossido Nitrico Sintasi (NOSs)

### 3.6.1 Struttura e funzione

Le NOSs catalizzano l'ossidazione della L-arginina ad NO e L-citrullina (Figura 3.7)(Stuher, 1997; Marletta, 1988; Knowles e Moncada, 1994). Tali enzimi sono dimerici nella loro forma attiva, se s'ignora l'interazione con la calmodulina (CaM), necessaria per l'attivazione enzimatica e che rende il complesso tetramerico (due monomeri della NOS associati con due CaMs) (Alderton et al., 2001).



**Figura 3.7-** Reazione e co-fattori della NOS (Alderton et al., 2001)

Sono state identificate tre isoforme della NOS, prodotte da geni diversi, con differente localizzazione, regolazione, proprietà catalitiche e sensibilità agli inibitori. L'elevata omologia di sequenza fra le isoforme umane (51-57%) lascia supporre l'esistenza di un comune gene ancestrale (Alderton et al., 2001). Le tre principali isoforme sono (Figura 8):

- ❖ NOS neuronale (nNOS o NOS-1), predominante nel tessuto neuronale dal quale venne isolata per la prima volta (Bredt e Snyder, 1990);
- ❖ NOS inducibile (iNOS o NOS-2), associata ai macrofagi ma presente anche in un vasto range di cellule e tessuti (Xie et al., 1992);

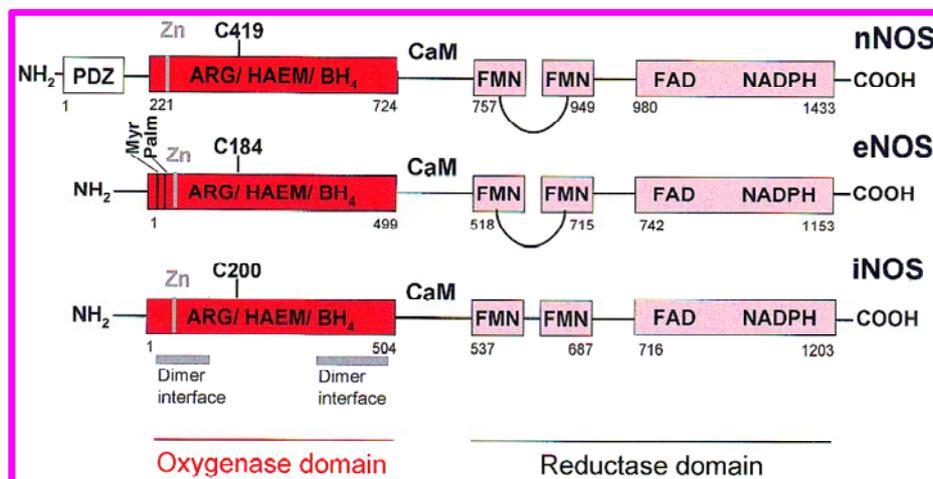
- ❖ NOS endoteliale (eNOS o NOS-3), isoforma isolata per la prima volta nella cellule dell'endotelio vascolare (Pollock et al., 1991).

La distinzione delle isoforme, in passato, è stata legata alla loro espressione costitutiva (eNOS ed nNOS) o inducibile (iNOS), ed alla loro dipendenza (eNOS ed nNOS) o indipendenza (iNOS) dalla concentrazione intracellulare del calcio.

Le NOSs mostrano una struttura con un doppio dominio (Figura 3.8). Il dominio ossigenasico N-terminale, contiene i siti di legame per tetraidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), eme e L-arginina, ed è legato attraverso un sito di riconoscimento per la CaM ad un dominio reduttasico C-terminale contenente i siti di legame per FAD, FMN e NADPH (McMillan e Masters, 1995; Richards e Marletta, 1994; Ghosh e Stuehr, 1995). La sequenza amminoacidica della nNOS risulta più lunga (200 amino acidi in più amino-terminali) rispetto alle altre isoforme (Moncada e Higgs, 1995). Tale frammento aggiunto, contiene un dominio PDZ coinvolto nella localizzazione subcellulare della proteina (Brenman et al., 1995); per la stessa funzione la eNOS presenta, sempre in posizione N-terminale, i siti di miristilazione e di palmitoilazione (Busconi et Michel, 1993; Garcia-Cardena et al., 1996). Inoltre, l'attività enzimatica della nNOS e della eNOS dipende dal legame Ca<sup>2+</sup>-dipendente della CaM con la sequenza di legame per la CaM presente sull'enzima. Pertanto minime variazioni locali nella concentrazione del Ca<sup>2+</sup> regolano finemente la loro attività (Moncada e Higgs, 1993; Nathan et Xie, 1994). Al contrario, la iNOS lega la CaM indipendentemente dalla concentrazione di Ca<sup>2+</sup> e la sua attività aumenta dopo l'esposizione a citochine e prodotti microbici (Moncada e Higgs, 1993; Nathan e Xie, 1994).

Le isoforme della NOS ossidano la L-arginina nell'intermedio stabile N-idrossi-L-arginina, ed in seguito questo intermedio in NO e citrullina. I passaggi di questa sequenza di reazioni sono NADPH- ed O<sub>2</sub>-dipendenti (Stuehr, 1997; Marletta, 1998; Knowles et Moncada, 1994). Gli elettroni donati dallo NADPH al dominio reduttasico sono trasferiti, attraverso i gruppi flavinici (FAD e FMN), al dominio ossigenasico dove interagiscono con il ferro emico e la BH<sub>4</sub>, a livello

del sito attivo per catalizzare la reazione dell'ossigeno con la L-arginina (Figura 3.8). Il legame con la CaM è necessario per garantire il flusso elettronico dai gruppi prostetici flavinici al gruppo eme. La  $BH_4$  è un centro contenente zinco coordinato con due cisteine in ciascun monomero ( $ZnS_4$ ) ed è necessaria in tutte e tre le isoforme per stabilizzarne la conformazione omodimerica (l'associazione coinvolge una larga porzione all'interfaccia dei domini ossigenasici) (Cho et al., 1995; Klatt et al., 1995; Tzeng et al., 1995).



**Figura 3.8-** Struttura delle tre isoforme della NOS umana. Sono evidenziati i domini ossigenasico e reductasico, i siti di legame per i cofattori, i siti di miristilazione (Myr) palmitoilazione (Palm) nella e-NOS, il dominio PDZ nella n-NOS e le cisteine leganti lo zinco (Alderton et al., 2001).

### 3.6.2 Localizzazione delle isoforme della NOS

Le sequenze aminoacidiche della nNOS e della iNOS non permettono a tali isoforme di localizzarsi sulla membrana plasmatica e pertanto queste due isoforme sono state rinvenute solo nella porzione solubile degli omogenati di cellule e tessuti (Forstermann et al., 1998; Nathan et Xie, 1994; Sessa, 1994; Griffith e Stuehr, 1992; Pollock et al., 1995). L'isoforma endoteliale invece è prevalentemente associata al plasmalemma delle cellule endoteliali (Pollock et al., 1991). **nNOS:** (peso molecolare compreso tra 150 e 160 kDA) è stata per la prima volta rinvenuta nel tessuto nervoso di ratto e di suino (Bredt e Snyder, 1990; Mayer et al, 1990;

Schmidt et al.,1991). Studi più approfonditi hanno evidenziato mediante tecniche immunoistochimiche l'espressione di tale isoforma anche nelle terminazioni periferiche nitrergiche (Hassall et al 1992; Saffrey et al., 1992; Sheng et al., 1992), nei gangli del simpatico e nelle ghiandole surrenali (Dun et al., 1993; Sheng et al., 1992), in alcune aree della corda spinale (Dun et al., 1992), dell'utero e dello stomaco (Schmidt et al.,1991), nell'epitelio polmonare umano (Asano et al., 1994), nelle cellule delle isole pancreatiche, in quelle della macula densa renale e nel muscolo scheletrico umano, di ratto e del porcellino d'india (Kobzik et al., 1994; Nakane et al., 1993).

Studi condotti nei mammiferi, hanno dimostrato la presenza della nNOS anche a livello cardiaco, implicando così un ipotetico ruolo di messaggero neuronale per lo NO in quest'organo. Tale isoforma è espressa nelle fibre pre- e post-gangliari che innervano il nodo seno-atriale ed atrio-ventricolare, nelle cellule neuronali subepicardiche e nei neuroni cardiaci intrinseci (Schwartz et al., 1995). In particolare, la nNOS si localizza sia nelle terminazioni colinergiche, che nei terminali nervosi ortosimpatici (a livello dei quali è stato postulato un ruolo della nNOS nel rilascio e nel recupero delle catecolamine) (Schwartz et al., 1995). Altri studi hanno evidenziato una localizzazione della nNOS anche a livello del reticolo sarcoplasmatico dei cardiomiociti (Xu et al. 1999).

Il dominio PDZ nella regione N-terminale della nNOS consente l'interazione con proteine di membrana contenenti domini PDZ presenti in cellule quali quelle neuronali, del muscolo scheletrico e dell'endotelio (Brenman e Bredt, 1997).

**iNOS:** (peso molecolare di 125-135 kDa) (Hevel et al., 1991; Stuehr et al., 1989). Nei mammiferi, è espressa nei fagociti, in particolare dai macrofagi, in risposta a citochine pro-infiammatorie e/o prodotti batterici come il lipopolissacaride (LPS). Lo NO rilasciato dai macrofagi è implicato nell'azione citostatica e citotossica di queste cellule nella risposta immunitaria alle cellule tumorali ed ai parassiti intracellulari (Nathan et Xie, 1994).

Numerosi studi hanno dimostrato che l'esposizione ad endotossine batteriche può indurre un incremento dell'attività della iNOS in diversi costituenti cellulari del tessuto cardiaco inclusi i miociti cardiaci, l'endotelio endocardico, i macrofagi, l'endotelio ed il muscolo liscio vascolare (Balligand et al., 2000). E' stata inoltre evidenziata l'espressione costitutiva della iNOS nei miocardiociti di ratto, dove essa risulta associata con la frazione mitocondriale e fibrillare cellulare (Buchwalow et al., 2001).

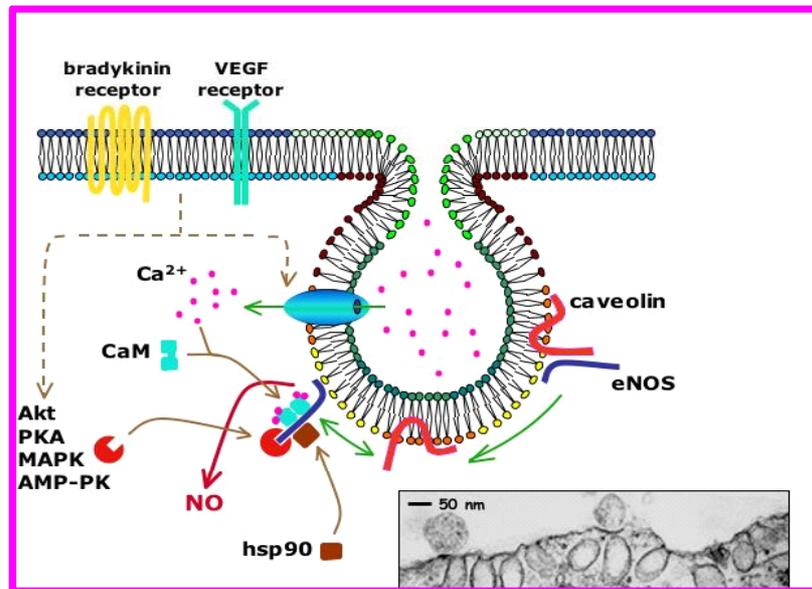
**eNOS:** (peso molecolare di 135 kDa) (Pollock et al., 1991), è stata per la prima volta identificata in cellule endoteliali aortiche bovine (Lamas et al., 1992; Nishida et al., 1992), dove per più del 90% si trova in forma particolata (Forstermann et al., 1991). Solo successivamente tale isoforma è stata localizzata in altri tipi cellulari, quali ad esempio: piastrine, neutrofilii, cellule epiteliali, cardiomiociti, cellule muscolari lisce (Tracey et al., 1994; Balligand et al., 1995; Forstermann et al., 1998), nonché nell'endotelio vasale di numerosi tessuti (Vanhoutte 1989; Pollock et al., 1993). A livello cardiaco, la eNOS si localizza prevalentemente nell'endotelio endocardio, nei vasi coronarici, nei miocardiociti e nel miocardio specifico (Schulz et al., 1991; Smith et al., 1991; Han et al., 1994, 1995, 1996; Seki et al., 1996; Gauthier et al., 1991).

La eNOS contiene un dominio trans-membrana non idrofobico e l'associazione con la membrana cellulare è mediata principalmente attraverso l'acilazione dell'enzima (Sase et al., 1997). A livello subcellulare, tale isoforma si localizza nelle caveole (Figura 3.9) della membrana plasmatica (Feron et al., 1996; Shaul et al., 1996). Le caveole sono invaginazioni della membrana plasmatica, caratterizzate dalla presenza di una proteina trans-membranaria denominata caveolina (Parton, 1996), hanno una caratteristica composizione lipidica, essendo ricche di colesterolo e glicosfingolipidi e prive di fosfolipidi (Parton, 1996; Couet et al., 1997). Strutture caveolari sono presenti nella membrana plasmatica delle cellule endoteliali, dei cardiomiociti e di altri tipi cellulari (Michel e Feron, 1997). Esse possono servire come siti per

il sequestro di molecole segnale quali recettori, proteine G, proteine chinasi ed ovviamente la eNOS (Couet et al., 1997).

La eNOS rappresenta l'unica isoforma doppiamente acilata dagli acidi grassi insaturi miristico e palmitico. La miristoilazione avviene sul residuo di glicina amino-terminale attraverso una specifica sequenza-consenso assente nelle altre due isoforme. La palmitoilazione (che non è stata mai riferita per le altre isoforme) avviene sui due residui di cisteina vicini alla regione amino-terminale ed ha la funzione di stabilizzare l'associazione della eNOS con la membrana. La miristoilazione, che è richiesta per l'associazione della eNOS alla membrana delle cellule endoteliali, è essenzialmente irreversibile; al contrario la palmitoilazione è reversibile: antagonisti come la bradichinina promuovono il turnover della palmitoilazione (Wedegaertner et al., 1995).

Come già accennato, la eNOS nelle caveole (Figura 3.9) è legata principalmente alle caveoline, tale legame ne inibisce l'attività (Feron et al., 1996; Garcia-Cardena et al., 1996; Ju et al., 1997). L'effetto inibitorio è eliminato dall'interazione con la CaM, infatti, l'incremento del  $Ca^{2+}$  intracellulare attiva la CaM ed il complesso  $Ca^{2+}/CaM$  favorisce il distacco della eNOS dalla caveolina; quando i livelli del  $Ca^{2+}$  ritornano a valori basali avviene la dissociazione del complesso  $Ca^{2+}-CaM-eNOS$  e l'enzima si inattiva ristabilendo il suo legame con la caveolina (Michel et al., 1997). Questo meccanismo di regolazione (Figura 3.9) può essere modificato dall'interazione con l'heat shock protein 90 (Hsp90) la quale, interagendo con la eNOS, ne facilita il distacco dalla caveolina (Gratton et al., 2000). Altri meccanismi, in aggiunta alle interazioni già menzionate, possono intervenire nella regolazione della eNOS, come ad esempio la fosforilazione operata della proteina chinasi Akt che attiva l'enzima fosforilandolo nella serina 1177 (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999).



**Figura 3.9-** Regolazione della eNOS nella caveole (Bredt, 2003)

**Isoforma mitocondriale.** Alcuni studi immunostochimici fanno supporre l'esistenza di una NOS all'interno dei mitocondri (mtNOS) (Kobzik et al., 1995; Bates et al., 1995; Bates et al., 1996). Ciò concorda con la già nota capacità dello NO di modulare il consumo d'ossigeno e la produzione di ATP attraverso l'inibizione competitiva della citocromo c ossidasi (Brown e Cooper, 1994). Inizialmente si riteneva che tale isoforma coincidesse con quell'endoteliale (Kanai et al., 2001). In seguito, studi più approfonditi su mitocondri isolati da fegato di ratto e particelle sub-mitocondriali (Ghafourifar et Richter, 1997) ed enzimi della NOS purificate (Tatoyan e Giulivi, 1998; Giulivi et al., 1998; Giulivi, 1998) hanno avvalorato l'ipotesi della esistenza di una isoforma mitocondriale della NOS. Tuttavia, non era chiaro se si trattasse realmente di una nuova isoforma o di un prodotto derivante da modificazioni post-trascrizionali del trascritto primario (splicing alternativi) soprattutto a carico della nNOS (Huang et al, 1993; Ogura et al., 1993; Silvagno et al., 1996; Brenman et al., 1997; Eliasson et al., 1997). Diversi studi, infatti, hanno rilevato il 100% di omologia di sequenza a livello della struttura primaria tra i frammenti e la nNOS costitutiva di ratto (Giulivi, 2003). Una stretta analogia funzionale tra

mtNOS e nNOS è stata anche suggerita da studi eseguiti su mitocondri cardiaci di ratto wild type e knockout per la nNOS, ma non per eNOS o iNOS. L'evidenza di tale analogia è la mancata produzione di NO nei mitocondri provenienti dai ratti knockout per la nNOS (Kanai et al., 2001).

### **3.6.3 Il sistema NOS-NO nei pesci**

Alcuni studi condotti nei bassi vertebrati, inclusi i pesci, hanno evidenziato che molti tessuti sono in grado di generare NO (Cox et al., 1996; Grabowsky et al., 1996; Laing et al., 1996; Neumann et al., 1995; Schoor e Ploomb, 1994; Wang et al., 1995; Barroso et al., 2000; Shin et al., 2000). In particolare in *Carassius auratus* (Laing et al., 1996) è stato parzialmente sequenziato un cDNA per la iNOS. La presenza della iNOS è stata dimostrata anche in *Oncorhynchus mykiss* (Barroso et al., 2000; Grabowsky et al., 1996) ed in *Brachydanio rerio* (Shin et al., 2000) dove anche la nNOS risulta espressa. Recentemente le isoforme inducibile ed endoteliale della NOS sono state individuate nel cuore di due specie Antartiche (*Trematomus bernacchii* e *Chionodraco hamatus*) sia in condizioni basali che dopo trattamento con il Lipopolisaccaride batterico LPS (Amelio et al., 2006).

### **3.7 NO e regolazione della funzione cardiaca nei mammiferi**

Lo NO, nei mammiferi, è coinvolto nella regolazione della performance cardiaca intervenendo sia nei meccanismi intrinseci che in quelli estrinseci. Infatti, lo NO regola la funzione cardiaca in risposta a numerosi segnali fisici e chimici che includono cambiamenti delle proprietà diastoliche (Smith et al., 1991), modulazione della relazione forza-frequenza (Kaye et al., 1996), della risposta di Frank-Starling (Prendergast et al., 1997), della risposta  $\beta$ -adrenergica (Hare et al., 1995) e colinergica (Balligand, 2000) ed effetti inotropi (Mèry et al., 1994).

Nella regolazione dell'attività cardiaca, oltre ai meccanismi "classici", intervengono anche meccanismi d'autoregolazione mediati da sostanze che agiscono localmente con modalità autocrino-paracrina e che includono: i peptidi natriuretici (Reinecke et al., 1987), lo NO (Smith et al., 1991), le prostaglandine e l'endotelina, (Mebazaa et al., 1993). Tali molecole sono rilasciate dall'endotelio vascolare ed endocardico ed influenzano l'attività dei miocardiociti adiacenti. In aggiunta, lo NO può essere rilasciato dagli stessi miocardiociti suggerendo l'esistenza di un controllo autocrino parallelo della funzione cardiaca (Balligand, 2000).

### **3.8 NO e modulazione della performance cardiaca dei teleostei**

La regolazione della funzione cardiaca nei pesci è legata alle proprietà meccaniche intrinseche del muscolo cardiaco che, in risposta al grado di riempimento del ventricolo, regolano automaticamente la gittata sistolica (Farrell e Jones, 1992). In aggiunta, anche i meccanismi di controllo umorale, mediati dall'endotelio endocardio, ricoprono un ruolo importante nella regolazione della performance cardiaca. La tipica mioarchitettura trabecolata del cuore permette di aumentare il rapporto fra la superficie cavitaria, e quindi del rivestimento endocardio che la ricopre, ed il volume ventricolare (Tota et al., 1983). Un simile arrangiamento morfologico, a differenza del miocardio compatto dei mammiferi, permette alle cellule endoteliali che sono strettamente in contatto con i miocardiociti, di rivestire un ruolo fondamentale nel controllo paracrino dell'attività cardiaca (Tota et al., 1991; Tota e Gattuso, 1996; Imbrogno et al., 2001,2003).

L'influenza dello NO sulla performance cardiaca è stata studiata prevalentemente nei mammiferi dove gli effetti NO-mediati sembrano essere variabili e contraddittori (Shah e MacCarthy, 2000). Anche i risultati ottenuti nei pesci mostrano aspetti contrastanti, dipendenti dai diversi modelli sperimentali e quindi da differenze specie-specifiche. Gli studi che negano l'esistenza di un pathway enzimatico dello NO nel sistema cardio-circolatorio dei teleostei

(Olson e Villa, 1991), sono associati a quelli che dimostrano, nella trota, un effetto vasodilatatorio NO dipendente (McGeer e Eddy, 1996).

Il primo studio che ha accertato una modulazione della performance cardiaca dipendente da rilascio di NO riguarda il cuore del teleosteo *Anguilla anguilla* (Imbrogno et al., 2001). Lo NO endogeno esercita un effetto inotropo negativo cGMP-dipendente, che richiede l'integrità funzionale dell'EE (Imbrogno et al., 2003). Risultati analoghi sono stati ottenuti in *Salmo salar* (Gattuso et al., 2002). Il coinvolgimento dello NO nella regolazione della performance cardiaca è stato indagato anche nel cuore del nototeniideo antartico privo di Hb, *C. hamatus*. La somministrazione di donatori, sia esogeni che endogeni di NO, provoca in questo un effetto inotropo positivo (Pellegrino et al., 2003, 2004).

### **3.9 NO e regolazione dell'attività renale**

Lo NO gioca un ruolo importante in vari processi fisiologici nel rene. Diversi esperimenti hanno dimostrato che gli effetti natriuretici e diuretici mediati dallo NO possono essere legati al decremento del riassorbimento di NaCl e di acqua dal nefrone. Diversi studi, hanno accertato il coinvolgimento dello NO nel modulare il trasporto nei diversi segmenti tubulari. Gli effetti NO-mediati a livello del tubulo prossimale sono controversi. Infatti sono stati riferiti effetti sia stimolatori (Wang et al., 2000), che inibitori del riassorbimento di fluidi e di ioni carbonato, ma solo effetti inibitori (Roczniack et Burns 1996) dello NO sui trasportatori  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e sull'attività della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP asica (Guzman et al., 1995; Linas e Repin 1999). Gli effetti dello NO sul tratto ascendente dell'ansa di Henle sono più omogenei di quelli registrati a livello del tubulo prossimale. A tale livello lo NO riduce nettamente l'assorbimento di ioni  $\text{Cl}^-$  e bicarbonato (Ortiz et al., 2001), in aggiunta svolge un effetto inibitorio diretto sul cotrasporto di  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}_2$  e sugli scambiatori  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Garvin e Hong 1999), mentre stimola i canali del potassio localizzati apicalmente in tale tratto (Lu et al., 1998). Nel dotto collettore lo NO

inibisce il riassorbimento di  $\text{Na}^+$  e la permeabilità osmotica all'acqua mediata dalla vasopressina (Garcia et al., 1997; Stoos et al., 1995). Un effetto inibitorio NO-mediato sull' $\text{H}^+$ ATPasi è stato inoltre riportato per le cellule interposte nel dotto collettore. Lo NO gioca un ruolo fondamentale nel controllo dell'emodinamica renale, nelle risposte a feedback tubulo-glomerulari, nella natriuresi, nel rilascio di neurotrasmettitori simpatici e di renina nel trasporto tubulare d'acqua e soluti (Kone 2004). A livello renale le isoforme della NOS sono distribuite e regolate in maniera differenziale. Studi d'immunocitochimica hanno rivelato che, nel rene, tutte le tre isoforme della NOS sono espresse (Kone 2004). In particolare la eNOS si localizza a livello delle cellule dell'endotelio vascolare, mentre la nNOS è prevalentemente associata alle cellule epiteliali della macula densa, alle cellule principali del dotto collettore ed alle terminazioni nervose sensoriali della pelvi renale (Terada et al., 1992; Bachmann et al., 1995; Wang et al., 1998; Liu et al., 1996). La iNOS è fortemente espressa dopo il trattamento con endotossine o altri stimoli infiammatori a livello dell'epitelio tubulare, incluso il tubulo prossimale, il tratto ascendente dell'ansa di Henle ed il tubulo contorto distale (Morrissey et al., 1994).

## **4) MATERIALI E METODI**

## 4.1 Animali

Per la realizzazione del presente lavoro sperimentale sono stati utilizzati esemplari di *Protopterus dolloi* provenienti dall’Africa centrale ed importati da un allevamento locale di Singapore. Gli animali sono stati forniti dal Prof. Yuen Kwong Ip dell’Università di Singapore, con il quale il gruppo di ricerca del laboratorio di Fisiologia d’Organo collabora da diversi anni. In particolare, sono stati sacrificati 27 esemplari adulti di *P. dolloi* con un peso corporeo compreso tra circa 100-150 gr. Inizialmente gli animali sono stati divisi in tre gruppi: uno di controllo o freshwater (FW n=9), costituito da animali mantenuti in acquari di plastica riempiti d’acqua (pH =7.0, T=25°C) priva di cloro, cambiata quotidianamente e contenente 2.3 mmol l<sup>-1</sup> Na<sup>+</sup>, 0.54 mmol l<sup>-1</sup> K<sup>+</sup>, 0.95 mmol l<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup>, 0.08 mmol l<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, 3.4 mmol l<sup>-1</sup> Cl<sup>-</sup> and 0.6 mmol l<sup>-1</sup> M HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Gli altri due gruppi sono stati esposti all’aria, rispettivamente per un breve [6 giorni=6GE, n=9) e per un lungo (40 giorni=40GE, n=9) periodo di tempo, per indurli ad estivare. Tale stato, indotto in laboratorio, è facilmente riconoscibile in *P. dolloi*, in quanto caratterizzato da inattività fisica e refrattarietà dinanzi ad ogni stimolo tattile, oltre che dalla secrezione, intorno al corpo dell’animale, di un rivestimento mucoso contenente acqua e sali, che lo protegge dalla disidratazione. Gli esemplari di *P. dolloi* in condizioni acquatiche o “freshwater” sono stati anestetizzati in 0,1% trichine-methane-sulfonate (Sigma UK) e poi despinalizzati, mentre gli esemplari estivanti sono stati sacrificati direttamente mediante despinalizzazione. I campioni di cuore e rene sono stati immediatamente prelevati ed in seguito processati secondo i seguenti protocolli.

## 4.2 Analisi Morfologiche

Subito dopo il sacrificio, i cuori ed i reni isolati da 9 esemplari di *P. dolloi* (n=3: FW; n=3: 6GE; n=3: 40GE) sono stati lavati con soluzione isoosmotica di Ringer (NaCl 3,366 gr/l, NaHCO<sub>3</sub>

2,016 gr/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,313 gr/l,  $\text{CaCl}_2$  0,177 gr/l,  $\text{MgSO}_4$  0,096 gr/l, Glucosio 0,558gr/l, HEPES 1,906 gr/l). I cuori sono stati quindi bloccati in diastole mediante perfusione con ringer iperosmotico contenente un eccesso di KCl (0,3 gr/l).

#### **4.2.1 Istologia**

Al fine di valutare gli aspetti strutturali di cuore e rene di *P. dolloi*, i campioni sono stati fissati in M.A.W (metanolo, acetone, acqua nel rapporto 2:2:1), disidratati in etanolo a gradazione crescente, inclusi in paraplast (Sherwood, St. Louis, USA) ed infine tagliati allo spessore di 8  $\mu\text{m}$  mediante microtomo rotativo (CUT 4055, MICROTEC). Le sezioni ottenute sono state raccolte su vetrini Superfrost PLUS (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) ed infine colorate seguendo il seguente protocollo:

##### ***Colorazione Istologica EMATOSSILINA-EOSINA***

Le sezioni istologiche sono state sparaffinate in due passaggi da 10 minuti in xilolo e reidratate in una scala di alcool a gradazione decrescente. In seguito sono state colorate per 45 minuti con ematossilina (Emallume di Mayer MERK) e lavate per 1 ora sotto l'acqua corrente. Successivamente sono state controcolorate con eosina 1% (Eosin Y Carlo Erba) per 10 minuti, lavate in  $\text{H}_2\text{O}$  distillata, disidratate in alcool a gradazione crescente, diafanizzate in xilolo. Infine i vetrini sono stati montati con EUKITT (O.Kindler Gmb&Co).

#### **4.3 Istochimica (diaforasi su tessuto)**

Tre cuori di *P. dolloi* (1 per ciascuna condizione) sono stati utilizzati per valutare l'attività totale della NOS mediante la tecnica della NADPH diaforasi su tessuto. I campioni sono stati fissati in paraformaldeide al 4% in Buffer Fosfato (PB) per 4 ore alla temperatura di 4°C, in seguito lavati in PBS, inclusi in OCT (Optimal Cutting Temperature compound, IMEB INC) e

immediatamente congelati in azoto liquido. Successivamente sono stati conservati a -80 °C fino al momento del taglio. Le criosezioni (7µm), ottenute con l'ausilio del criostato (MICROM HM 505 E) alla temperatura di -25°C, sono state raccolte su vetrini dotati di carica elettrostatica (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) e lasciate ad asciugare a temperatura ambiente per 10 minuti; in seguito sono state lavate in PBS (Phosphate Buffer Saline pH 7,2 ) ed incubate per 1 ora al buio a 37°C con un mezzo d'incubazione composto da: 0.1M Tris-HCl, 0.1% TRITON X-100, 0,00049 gr NBT, 0,0065 gr Na azide, 0,00083 gr NADPH. L'incubazione è stata bloccata mediante 2 lavaggi in Tris-HCl 0,1 M. Quindi le sezioni sono state disidratate in alcool a gradazione crescente e diafanizzate in xilolo. Infine i vetrini sono stati montati con EUKITT (O.Kindler GmbH & Co). Il controllo negativo è stato ottenuto su sezioni parallele incubate omettendo lo NADPH dal mezzo di incubazione.

## 4.4 Immunoistochimica

### *eNOS*

Per lo studio sul “pattern” di distribuzione della eNOS, sezioni dello spessore di 8µm, ottenute dai cuori e reni fissati in M.A.W. ed inclusi in paraffina, sono state sparaffinate e reidratate in una scala di alcool a gradazione decrescente. In seguito sono state lavate in TBS (pH 7,6) ed i siti aspecifici sono stati bloccati incubando i vetrini per 1 ora con BSA (Albumin Serum Bovin SIGMA) all'1,5% in PBS. Le sezioni sono state lavate velocemente in TBS ed incubate overnight a 4°C con anticorpo policlonale anti e-NOS (diluito 1:100) sviluppato nel coniglio ed in grado di riconoscere l'estremità carbossi-terminale (a.a. 1185-1205) della eNOS di origine bovina (SIGMA, Saint Louis, Missouri). L'incubazione è stata bloccata mediante lavaggio in TBS (3 passaggi da 10 minuti), il sito di legame è stato identificato incubando le sezioni per 1 h a T ambiente con IgG anti-rabbit coniugate alla fluoresceina isotiocianato FITC (SIGMA, Saint

Louis, Missouri) diluite 1:100. Al fine di contrastare i nuclei, le sezioni sono state controcolorate per 5 minuti con ioduro di propidio diluito 1:100 in PBS.

### ***iNOS, nNOS***

Per l'immunolocalizzazione della iNOS e della nNOS, i cuori ed i reni di 9 esemplari di *P. dolloi* (n=3: FW; n=3: 6GE; n=3: 40GE), sono stati lavati in Ringer ed inclusi in crioprotettivo OCT (Optimal Cutting Temperature compound, IMEB INC), fissati in N<sub>2</sub> liquido e conservati a -80°C fino al momento dell'uso. Le criosezioni (7 µm), ottenute mediante taglio al criostato, sono state post-fissate in acetone per 10 minuti e congelate a -20°C. In seguito sono state asciugate a temperatura ambiente, lavate in TBS ed incubate overnight a 4 °C con un anticorpo monoclonale di mouse coniugato FITC diretto contro la iNOS (BD Transduction Laboratories; 1:100), o con anticorpo policlonale anti nNOS sviluppato nel coniglio e diretto contro la porzione carbossi-terminale della nNOS (a.a.1095-1289) (BD Transduction Laboratories; 1:100). La nNOS è stata rilevata mediante incubazione per 1 ora a temperatura ambiente, con IgG anti-rabbit coniugate FITC (SIGMA, Saint Louis, Missouri) diluite 1:100. I vetrini sono stati montati con montante acquoso (Vectashield, Vector Laboratories).

## **4.5 Analisi morfometriche**

Al fine di valutare le eventuali variazioni morfologiche indotte da un lungo periodo (6 mesi) di estivazione superficiale, 3 cuori di *Protopterus dolloi* in condizioni acquatiche (FW) e 3 cuori appartenenti ad esemplari estivanti (6 mesi) sono stati isolati e bloccati in diastole come descritto precedentemente. I cuori sono stati fissati in gluteraldeide al 3% in PBS (Phosphate Buffer Saline pH:7,6) e processati in accordo con i protocolli convenzionali per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM). Dopo la fissazione, essi sono stati tagliati in frammenti di

circa 1mm<sup>3</sup>, disidratati in acetone a gradazione crescente, in ossido di propilene ed infine inclusi in Araldite (Fluka, Chemie GmbH, Buchs, Switzerland). Le sezioni ultrasottili sono state tagliate con un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT), colorate con acetato d'uranile ed osservate con il microscopio Zeiss ME 10C. Le immagini delle sezioni sono state digitalizzate con scanner Umax Ilc (UMAX Systems GmbH, Willich, Germany). Le valutazioni morfometriche sono state ottenute su 256 valori di grigio impiegando il software NIH Image 1,61 per Macintosh previa calibratura del software.

Ciascun parametro morfometrico è stato misurato usando 12 immagini per ciascun animale in entrambe le condizioni (FW ed estivanti a 6 mesi). La misura dell'area dei miocardiociti e dei mitocondri è stata ottenuta selezionando la stessa, mediante "lazo tool".

#### **4.6 Osservazione ed elaborazione immagini**

Le sezioni istologiche, sia quelle colorate con ematossilina-eosina che quelle processate con la NADPH diaforasi, sono state osservate al microscopio (in campo chiaro) ZEISS AXIOSCOPE, la digitalizzazione delle immagini è stata ottenuta con l'utilizzo di una fotocamera digitale (OLYMPUS-ZC 200). L'osservazione e l'acquisizione delle immagini delle sezioni incubate con anticorpi fluorescenti sono state realizzate mediante microscopio laser confocale (TCS-SP2, Leica). In presenza di una debole fluorescenza, l'osservazione delle sezioni è stata realizzata mediante microscopio a fluorescenza (ZEISS AXIOSCOPE) e l'acquisizione delle immagini effettuata tramite fotocamera digitale (OLYMPUS-ZC 200).

#### **4.7 Analisi Biochimiche**

Sia per la NADPH-diaforasi su omogenato che per il Western Blotting sono stati utilizzati cuori (ventricoli) e reni di *P. dolloi* (n=3 FW; n=3 6GE; n=3 40GE). Subito dopo il prelievo, i

campioni sono stati congelati in azoto liquido e conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; al momento dell'utilizzo sono stati scongelati, pesati, tagliati in piccoli frammenti ed immersi nel buffer di lisi [Tris-HCl (30 mM; pH 7,4), EGTA (15  $\mu\text{M}$ ), EDTA (10  $\mu\text{M}$ ), dithiothreitol (5  $\mu\text{M}$ ), pepstatin-A (0.01  $\mu\text{M}$ ), PMSF (1  $\mu\text{M}$ ), Leupeptin-A (0.02  $\mu\text{M}$ ), benzamidine (0.1  $\mu\text{M}$ ) and BH4 (0.1  $\mu\text{M}$ )] nel rapporto peso/volume 1:2. I campioni, quindi, sono stati omogenati con Ultra Turrax a 22000 rpm (3 passaggi x 10 secondi) ed infine ultra-centrifugati a 27000 rpm per 60 minuti a  $4^{\circ}\text{C}$ . Il sovrinatante è stato raccolto ed utilizzato sia per la NADPH diaforasi su omogenato che per il Western Blotting. La concentrazione proteica è stata calcolata mediante il metodo di Bradford usando come standard l'albumina.

#### **4.7.1 Western Blotting**

Per il Western Blotting, il sovrinatante, contenente 100  $\mu\text{g}$  di proteine, è stato bollito per 5 minuti in buffer di Lämmli (Fluka). Le proteine sono state caricate e separate, mediante elettroforesi su gel al 6% di poliacrilammide, utilizzando Bio-Rad Mini Protean-II a 110V per 1 ora. In seguito, le proteine sono state trasferite su membrana di polivinildenfluoruro (PVDF) (Hybond-P, Amersham) usando un mini trans-blot (Bio-Rad) per 2 ore a 60V. I siti aspecifici, sulla membrana, sono stati bloccati mediante TBS-T contenente il 5% di latte in polvere. In seguito la membrana è stata incubata overnight a  $4^{\circ}\text{C}$  con i seguenti anticorpi policlonali di rabbit anti-eNOS (SIGMA St Louis) o anti-nNOS (BD Transduction LAB), o con anticorpo monoclonale di mouse anti-iNOS (BD Transduction LAB), diluiti 1:1000 in TBST contenente il 5% di latte in polvere. Quindi la membrana è stata lavata in TBS-T ed incubata con anticorpo secondario (anti-rabbit o anti-mouse) coniugato alla perossidasi di rafano diluito 1:5000 in TBST contenente 5% di latte in polvere. La rilevazione delle bande è stata ottenuta mediante il

kit chemiluminescente ECL PLUS (Amersham) in grado di impressionare la pellicola X ray Hyperfilm ECL (Amersham) sovrapposta sulla membrana.

#### **4.7.2 Analisi densitometrica**

La pellicola dell'immunoblot è stata digitalizzata con scanner Umax Ilc (UMAX Systems GmbH, Willich, Germany) e la lettura densitometrica delle bande è stata effettuata usando NIH Image 1,6 per computer Macintosh in base a 256 valori di grigio (0=bianco; 256= nero). La quantificazione delle bande è stata realizzata misurando (5 misure per ciascuna banda) la densità ottica media di un'area rettangolare dopo aver sottratto il background.

#### **4.7.3 NADPH-diaforasi su omogenato**

Per la diaforasi su omogenato 20  $\mu$ l di sovranatante, derivante da reni e cuori nelle tre condizioni sperimentali, sono stati incubati per 15 min a 37°C con 80  $\mu$ l di paraformaldeide al 4% e con 1 ml di mezzo d'incubazione contenente: Tris-HCl (50mM) buffer pH 7.5, 0.1% Triton X-100, EDTA (5mM), NBT (0.5mM), and  $\beta$ -NADPH (0.5mM). Il prodotto della reazione è stato determinato spettrofotometricamente a 585 nm. I campioni di controllo sono stati ottenuti con lo stesso protocollo omettendo il  $\beta$ -NADPH. La lettura spettrofotometrica degli omogenati è stata realizzata leggendo ciascun campione per due volte. Dai valori medi d'assorbanza di ogni campione sono state sottratte le misure di assorbanza dei controlli negativi corrispondenti. I dati sono stati espressi come unità d'assorbanza e normalizzati per il contenuto proteico d'ogni campione.

#### **4.7.4 Analisi statistiche**

I risultati delle misure d'assorbanza e dei valori di grigio ottenuti mediante analisi densitometriche sono stati espressi come valore medio  $\pm$ SEM delle determinazioni effettuate su ciascun campione. Per testare le differenze tra i gruppi è stato utilizzato il test t-Student. Le differenze significative sono state stabilite per valori di  $p < 0.01^*$  e di  $p < 0.001^{**}$ .

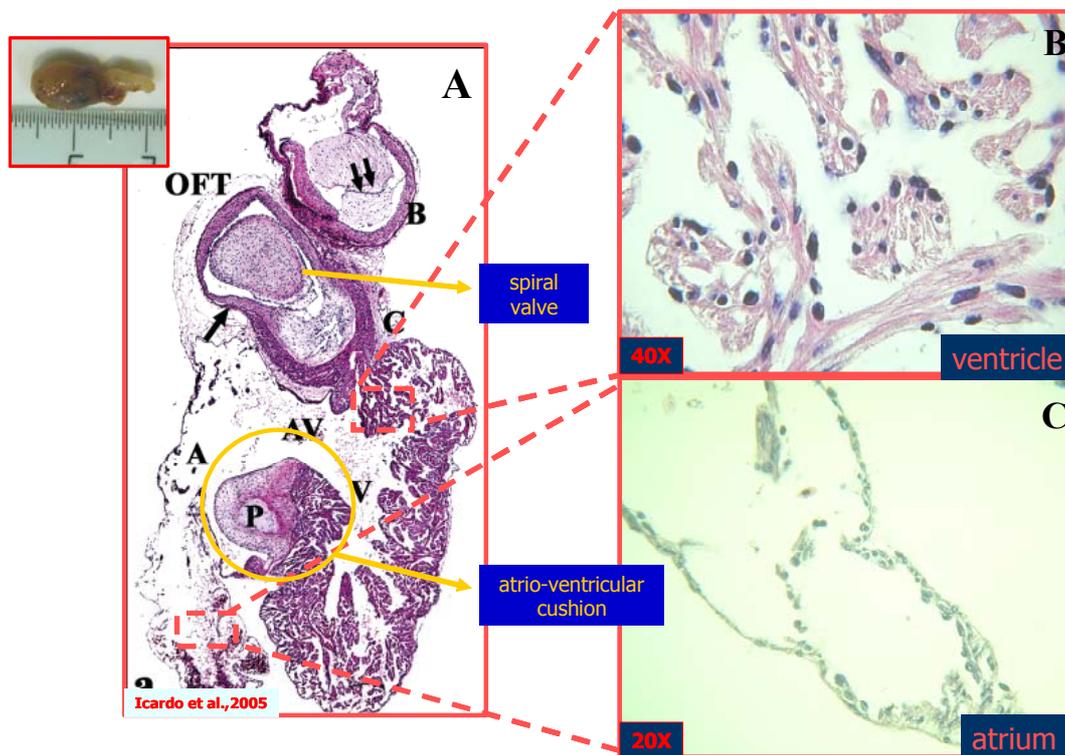
## 5) RISULTATI

## 5.1 Analisi morfologiche

### 5.1.1 Istologia

#### *Cuore*

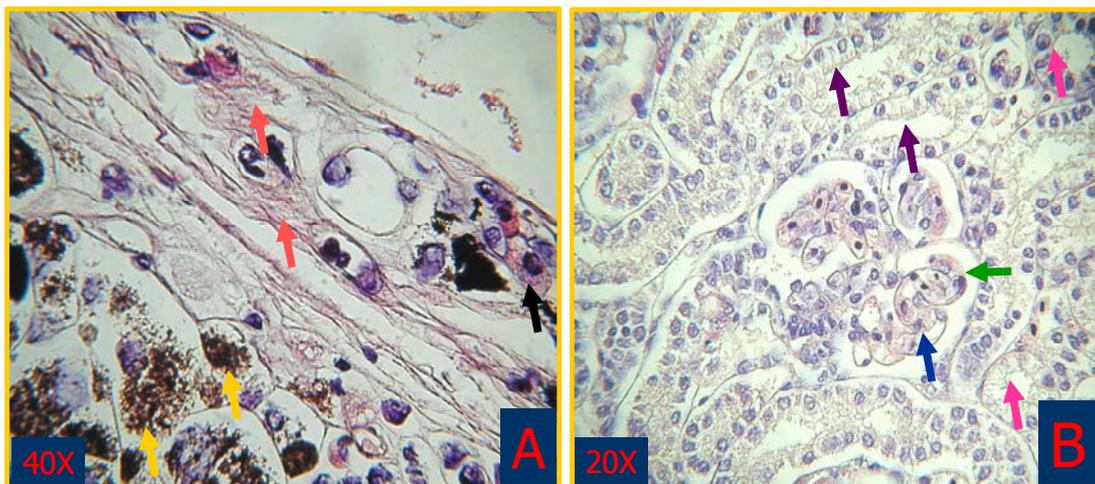
L'esame istologico del cuore di *P. dolloi*, condotto su sezioni colorate con Ematossilina-Eosina, ha permesso di rilevare la presenza di una mioarchitettura completamente avascolare e trabecolata sia a livello atriale che ventricolare (Figura 5.1) Le trabecole appaiono rivestite da un sottile strato di endotelio endocardio. Inoltre, in accordo con quanto descritto da Icardo e collaboratori, è stata evidenziata una plica spirale che decorre nel bulbo contribuendo alla parziale separazione del sangue venoso da quello arterioso ed un cuscinetto di natura cartilaginea in corrispondenza della connessione atrio-ventricolare (Icardo et al., 2005).



**Figura 5.1-** Sezioni istologiche del cuore di *Protopterus dolloi* colorate con ematossilina-eosina. Notare la mioarchitettura completamente trabecolata.

## Rene

Il rene di *P. dolloi* è un organo pari, che, a livello macroscopico, appare come un nastro disposto ventralmente alla colonna vertebrale. In esso si distinguono una regione dorso-laterale rivestita da una capsula fibrosa contenente cellule pigmentate e tessuto emopoietico (Figura 5.2 A), ed una regione medio-ventrale contenente il corpuscolo ed i tubuli renali (Figura 5.2 B). I vasi glomerulari sono riuniti in “cluster”, ciascuno dei quali contiene 4-5 vasi (Figura 5.2 B) strettamente adesi a cellule podocitiche. I tubuli prossimali sono disposti dorsalmente rispetto al corpuscolo renale, mentre quelli distali si localizzano ventralmente. I tubuli prossimali sono rivestiti da un epitelio cubico dotato di un orletto a spazzola, a differenza dei tubuli distali che sono rivestiti da un epitelio colonnare ciliato (Figura 5.2 B).

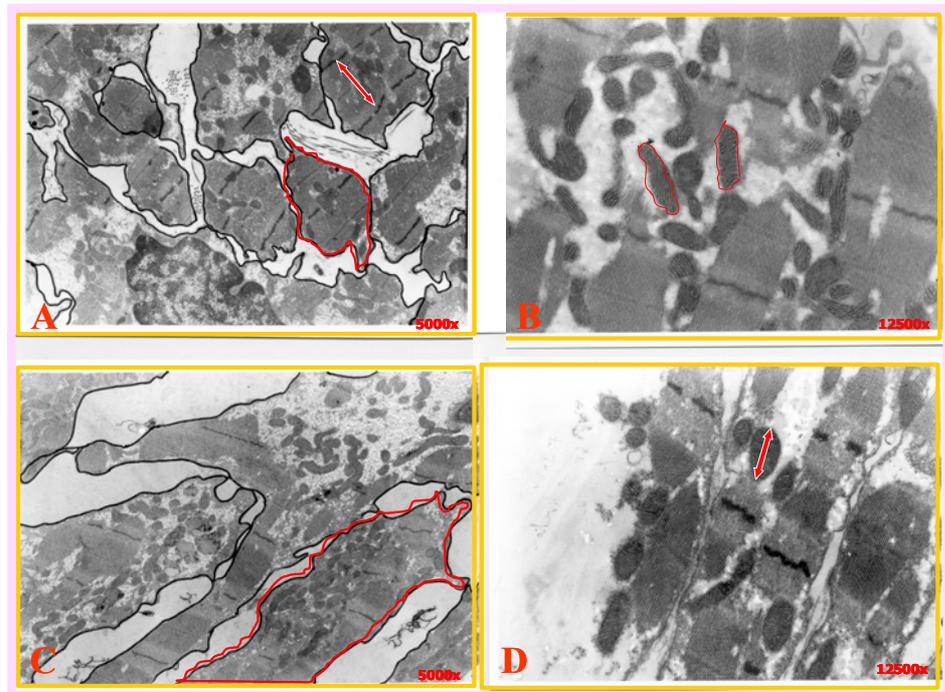


**Figura 5.2-** Sezioni istologiche del rene di *Protopterus dolloi* colorate con ematossilina-eosina. In A) è mostrata la regione dorso-laterale ed in B) la regione medio-ventrale. Freccie rosse=capsula fibrosa; freccie gialle=cellule pigmentate; freccie blu = vasi glomerulari; freccie viola=tubulo distale; freccie rosa =tubulo prossimale; freccie verdi=podociti; freccia nera=tessuto emopoietico

### 5.1.2 Analisi morfometriche

La valutazione del riarrangiamento cardiaco, conseguente all'estivazione, è stata realizzata mediante analisi morfometriche, su sezioni ultrasottili, di diversi parametri quali: numero e area dei mitocondri, area cellulare, spazi interstiziali ect. (Figura 5.3). Il confronto tra i risultati

ottenuti su esemplari freshwater ed estivanti (6 mesi) ha mostrato l'assenza di differenze statisticamente significative in alcuni dei parametri analizzati (Tabella 1). Tuttavia, nel cuore estivante, è stato evidenziato un incremento significativo della dimensione dei mitocondri (valutata sia come area media che come asse maggiore), sebbene sia evidente un decremento significativo del loro numero. In aggiunta, i miocardiociti degli animali estivanti hanno mostrato un significativo aumento dell'area cellulare media, del compartimento citoplasmatico (indicato come incremento del rapporto citoplasma/area cellulare) e della lunghezza del sarcomero, in parallelo con un decremento degli spazi interstiziali. I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella 1.



**Figura 5.3** Sezioni ultrasottili del ventricolo di *Protopterus dolloi* in condizioni acquatiche (A, B) e dopo 6 mesi di estivazione (C,D). Alcuni dei parametri morfometrici misurati sono indicati in rosso

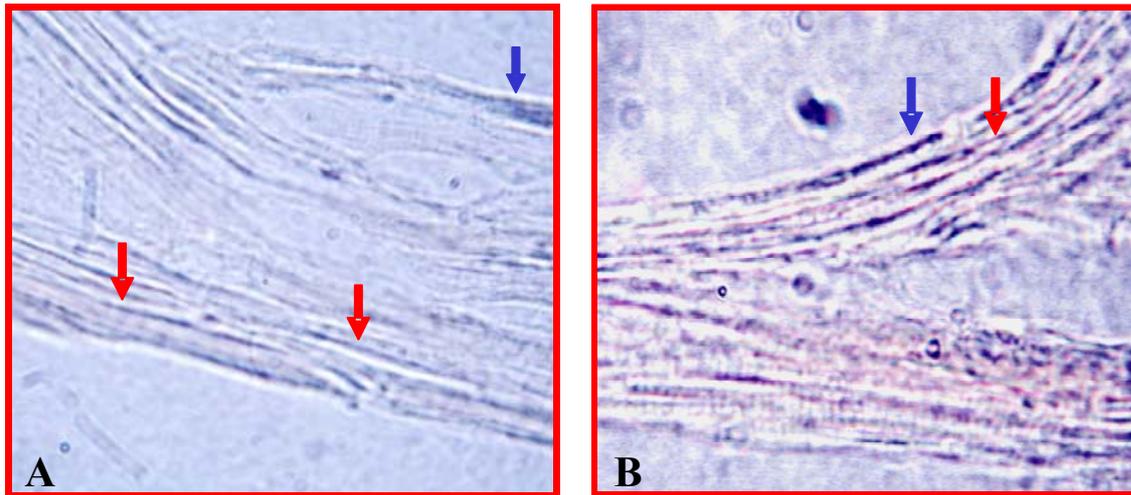
<b>morphometric analysis</b>	<b>control</b>	<b>aestivating</b>	<b>Δ%</b>
<b>mitochondria</b>			
mitochondria number (mean)	49,88 ± 10,64	20,87 ± 2,56*	-58,16
mean mitochondrial area (nm <sup>2</sup> )	118057,53 ± 593143,2	284145 ± 465773,83***	140,68
max mitochondrial axis length (nm)	344,37 ± 52,18	619,73 ± 87,16***	79,96
mitochondrial number/image surface ratio (mean)	4,78E-06 ± 1,92E-06	5,62E-07 ± 6,6E-08	-88,26
mitochondrial area/image surface ratio (mean)	0,23 ± 0,079	0,087 ± 0,012	-61,50
<b>cell</b>			
cellular area/image surface (% mean)	71,47 ± 2,89	79,72 ± 2,61	11,53
mean cellular area/image surface (μm <sup>2</sup> )	120,30 ± 4,36	147,34 ± 6,27**	22,48
mean cell area (μm <sup>2</sup> )	48,36 ± 5,93	35,70 ± 4,70	34,09
mean cytoplasm area (μm <sup>2</sup> )	1,70 ± 0,06	2,34 ± 0,01*	109,92
mean cytoplasm area/cell area	16,53 ± 2,24	22,16 ± 3,21*	56,55
sarcomer length (μm)	3,67 ± 0,98	7,70 ± 2,25***	37,33
interstitial area (μm <sup>2</sup> )	0,22 ± 0,01	0,34 ± 0,03	-26,17
***p<0.0005; **p<0.005; *p<0.05			

**Tabella 1-** Parametri morfometrici ottenuti dai ventricoli di *Protopterus dolloi* in condizioni freshwater e dopo sei mesi di estivazione. I valori sono la media ± S.E.M. di 12 determinazioni. La significatività statistica è stata calcolata mediante test t-Student (\*\*\*p<0.0005; \*\*p<0.005; \*p<0.05)

### 5.1.3 Istochimica (diaforasi su tessuto)

L'utilizzo della NADPH-diaforasi su tessuto ha consentito di eseguire un primo screening morfologico dell'attività e quindi della presenza della NOS nel ventricolo, sia in condizioni acquatiche che dopo l'estivazione (Figura 5.4).

I risultati ottenuti hanno mostrato la presenza dell'attività diaforasica, evidenziata dal precipitato di blu di formazano, sia a livello dei miocardiociti che dell'endotelio endocardico. L'estivazione è associata ad un incremento dell'intensità del segnale e quindi dell'attività totale della NOS. La specificità della marcatura è stata confermata dalla mancanza di segnale su sezioni parallele di controllo, incubate in assenza del β-NADPH (dato non mostrato).



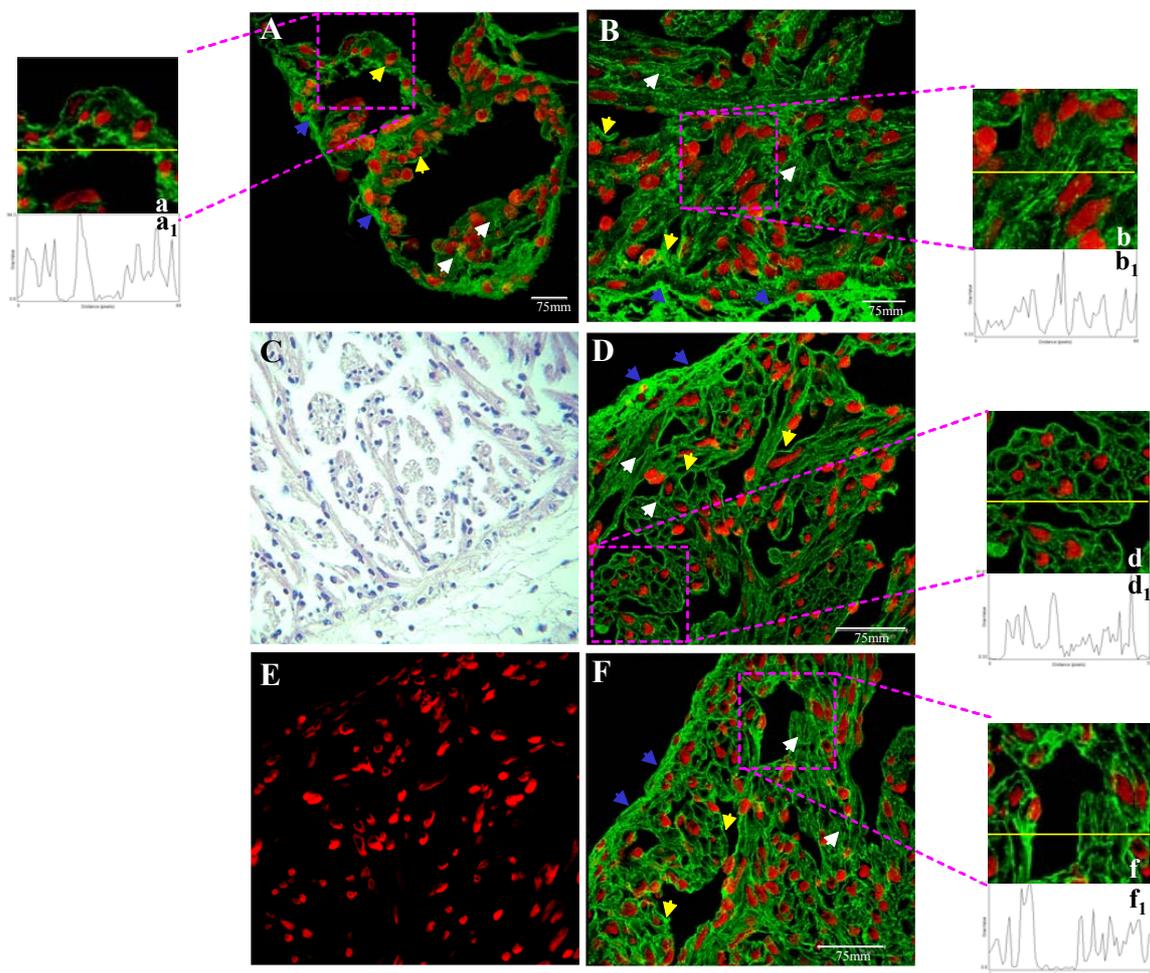
**Figura 5.4-** NADPH diaforasi su sezioni di ventricolo di *P. dolloi* in condizioni acquatiche (A) e dopo 40 giorni di estivazione (B). Freccce rosse= miocardiociti; Freccce blu= endotelio endocardico

### 5.1.4 Immunolocalizzazione delle NOSs

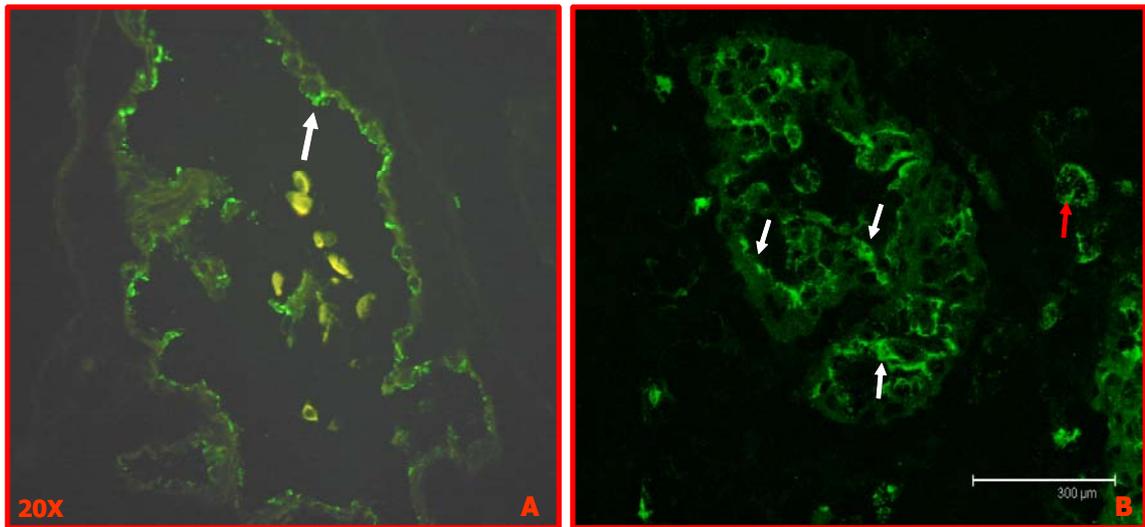
#### *Cuore*

In Figura 5.6 sono mostrate le immagini, ottenute al microscopio confocale, di sezioni del cuore di *P. dolloi* incubate con anticorpo policlonale anti-eNOS. In particolare è riportata la localizzazione atriale (A) e ventricolare (B) dell'enzima negli esemplari freshwater. E' evidente che la NOS endoteliale si localizza sia a livello delle trabecole atriali che di quelle ventricolari. L'enzima, nello specifico, è presente a livello dell'endotelio endocardico (EE) che riveste le trabecole del miocardio spugnoso e, in misura minore, nei miocardiociti (Figura 5.6 A, B). Sia nei miocardiociti che nell'EE, la fluorescenza è associata prevalentemente con la membrana plasmatica, mentre risulta meno espressa nel citoplasma. La specificità del legame è stata confermata dall'assenza del segnale in sezioni parallele di controllo, trattate omettendo l'anticorpo primario (Figura 5.6 E). Lo stesso pattern di distribuzione della NOS endoteliale, è stato riconosciuto nell'atrio e nel ventricolo di *P. dolloi* dopo 6 giorni (6GE) e dopo 40 giorni (40GE) d'estivazione superficiale (Figura 5.6 D, F rispettivamente). Inoltre, sia negli esemplari

freshwater che in quelli estivanti è stata evidenziata un'intensa marcatura a livello della regione epicardica. A differenza di quanto osservato impiegando l'anticorpo diretto contro la NOS endoteliale, l'incubazione con anticorpo anti-eNOS, ha evidenziato solo una debole marcatura in corrispondenza dell'endotelio endocardico atriale e in prossimità di strutture, che appaiono simili a terminazioni nervose (Figura 5.7 A, B). Al contrario, l'incubazione delle sezioni cardiache con anticorpo anti-iNOS non ha permesso di rilevare alcun tipo di marcatura (dato non mostrato).



**Figura 5.6** -Immunolocalizzazione della eNOS su sezioni di atrio (A) e ventricolo (B) di *P. dolloi* (FW). Non ci sono differenze nel pattern di distribuzione dopo 6 giorni (D) e 40 giorni (F) d'estivazione. Controllo negativo (E). I nuclei, in rosso, sono controcolorati con ioduro di propidio. Sezione di ventricolo colorata con Ematossilina-eosina (C). Ingrandimenti digitali dell'atrio (a) e del ventricolo (b, d, f). I pannelli a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>, d<sub>1</sub> and f<sub>1</sub> mostrano il "plot profile" (in 256 valori di grigio) ottenuto al livello della linea gialla del corrispondente riquadro mediante il programma WCIF Image J per Windows. I valori più elevati indicano zone d'intensa marcatura endoteliale. Freccia gialla: EE; Freccie bianche: miocardiociti; Freccie blu: epicardio



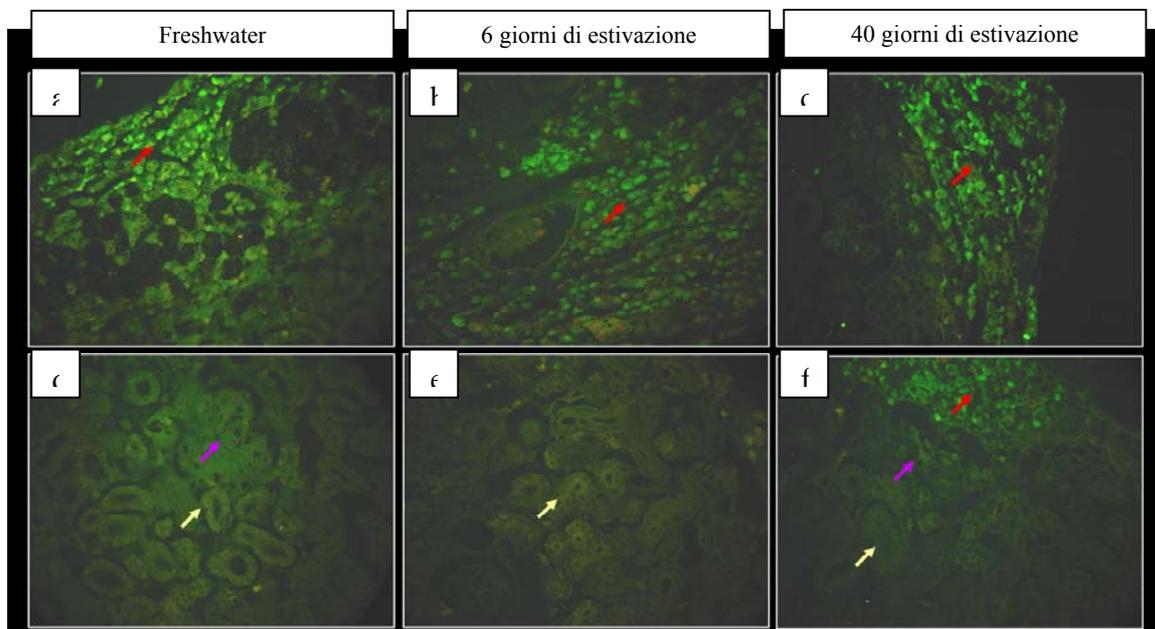
**Figura 5.7** -Immunolocalizzazione della nNOS su sezioni atriali di *Protopterus dolloi* (FW), che mostrano il segnale confinato nell'endotelio endocardio EE (freccie bianche) e sulle terminazioni nervose (freccie rosse) (A, B).

### ***Rene***

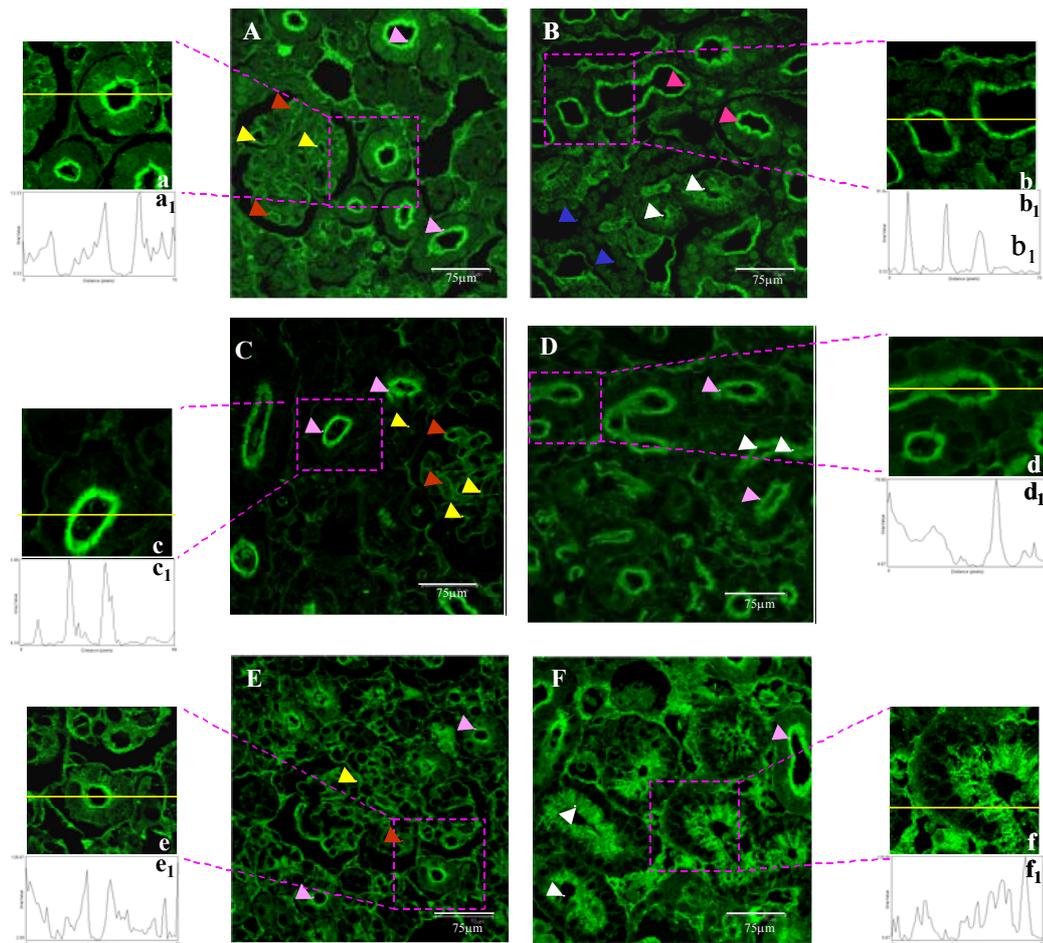
L'incubazione delle sezioni istologiche di rene di *P. dolloi* con anticorpo anti-eNOS ha permesso di evidenziare la presenza di un intenso segnale sia a livello glomerulare che tubulare (Figura 5.8 A, B). In particolare, nel rene degli esemplari freshwater, la NOS endoteliale si ritrova prevalentemente espressa a livello delle cellule endoteliali vascolari e in misura più ridotta a livello dei podociti che rivestono i vasi glomerulari (Figura 5.8 A). Nella porzione tubulare, il segnale rimane confinato nelle cellule epiteliali dei tubuli prossimali in prossimità dell'orletto a spazzola del polo apicale (Figura 5.8 A, B). Il segnale, a livello tubulare, è molto più intenso di quello riscontrato a livello dei vasi glomerulari (Figura 5.8 A, B). In prossimità del dotto collettore, invece l'enzima non risulta espresso (Figura 5.8 A). Un pattern di distribuzione del segnale molto simile è stato riscontrato negli esemplari estivanti di *P. dolloi*. Tuttavia, dopo 6 giorni d'estivazione superficiale, si osserva una piccola riduzione dell'espressione glomerulare della eNOS ed un incremento del segnale a livello dei podociti rispetto agli esemplari freshwater (Figura 5.8 C, D). A livello tubulare, sia durante il breve che

il lungo periodo d'estivazione, un'intensa fluorescenza rimane confinata a livello del tubulo contorto prossimale (Figura 5.8 C, D, E). Nei tubuli distali, sia in condizioni acquatiche che dopo il breve periodo di estivazione (6GE) la localizzazione della eNOS è prevalente nel citoplasma apicale submembranario dell'epitelio colonnare tubulare (Figura 5.8B). Dopo 40 giorni di estivazione il segnale diviene particolarmente evidente nel compartimento cellulare sopranucleare (Figura 5.8 F).

I risultati ottenuti, impiegando l'anticorpo anti-iNOS, hanno permesso di evidenziare solo una debole marcatura in prossimità della capsula fibrosa esterna del rene (Figura 5.9 A, B, C). Nessun segnale, invece, appare nel compartimento tubulo-glomerulare della regione ventromediale (Figura 5.9 D, E, F). Tale pattern di distribuzione non cambia nelle tre condizioni sperimentali. Infine, sia nei FW che negli estivanti, l'impiego dell'anticorpo anti-nNOS non ha permesso di rilevare tale isoforma enzimatica nel rene di *P. dolloi*.



**Figura 5.9**-Immunolocalizzazione della iNOS su sezioni di rene di *Protopterus dolloi*. Un lieve segnale è presente solo a livello della capsula fibrosa a,b,c, (freccie rosse), ma è assente a livello tubulare (freccie bianche) e glomerulare (freccie rosa) d,e,f,



**Figura 5.8** – Immagini al confocale dell’immunolocalizzazione della eNOS su sezioni di rene di *Protopterus dolloi* FW (A, B) dopo 6GE (C, D) e 40GE (E, F). E’ visibile il decremento della fluorescenza dopo 6 giorni a livello glomerulare (C), mentre rimane invariato il pattern di espressione nei tubuli prossimali (C, D). In F è mostrata la localizzazione a livello del citoplasma apicale delle cellule colonnari epiteliali dopo 40 GE. Ingrandimento digitale della eNOS a livello tubulare nei FW (a,b) e nei campioni estivanti (c-f). I pannelli a<sub>1</sub>,b<sub>1</sub>,c<sub>1</sub>,d<sub>1</sub>,e<sub>1</sub>,f<sub>1</sub> mostrano i “plot profiles” (in 256 valori di grigio) ottenuti a livello della linea gialla del riquadro corrispondente usando il programma WCIF Image J per Windows. Freccie gialle: endotelio vascolare; freccie rosse: podociti; freccie bianche: tubulo distale; freccie rosa: tubulo prossimale; freccie blu: dotto collettore.

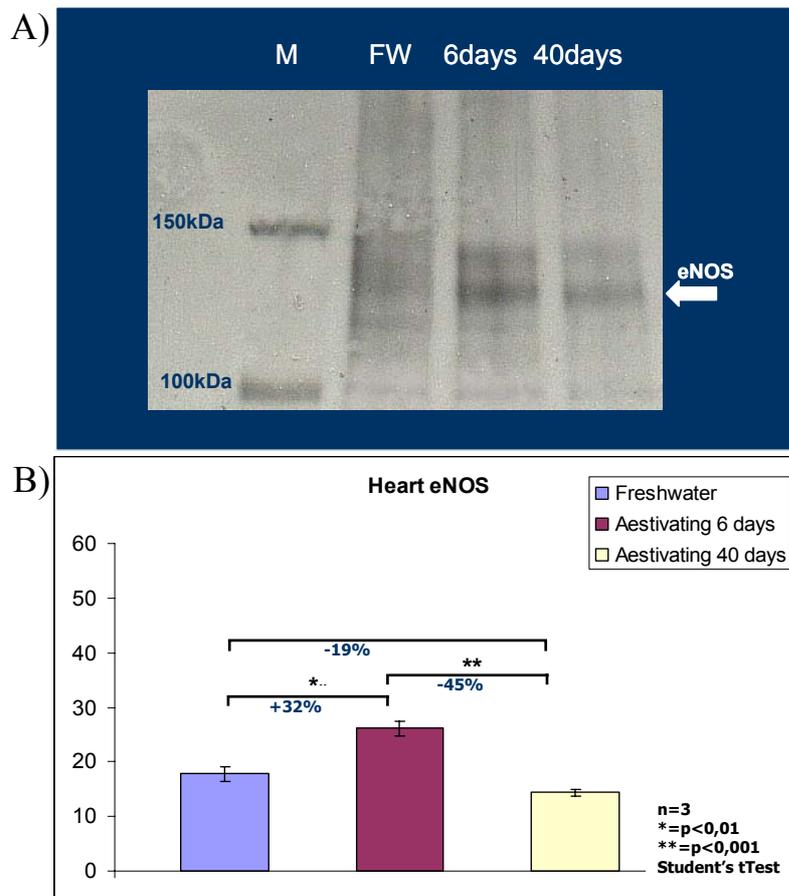
## 5.2 Analisi Biochimiche

### 5.2.1 Western Blotting

#### *Cuore*

Il Western blotting, condotto con gli stessi anticorpi utilizzati per gli studi d’immunolocalizzazione, ha confermato la presenza della eNOS, sia nel cuore che nel rene di

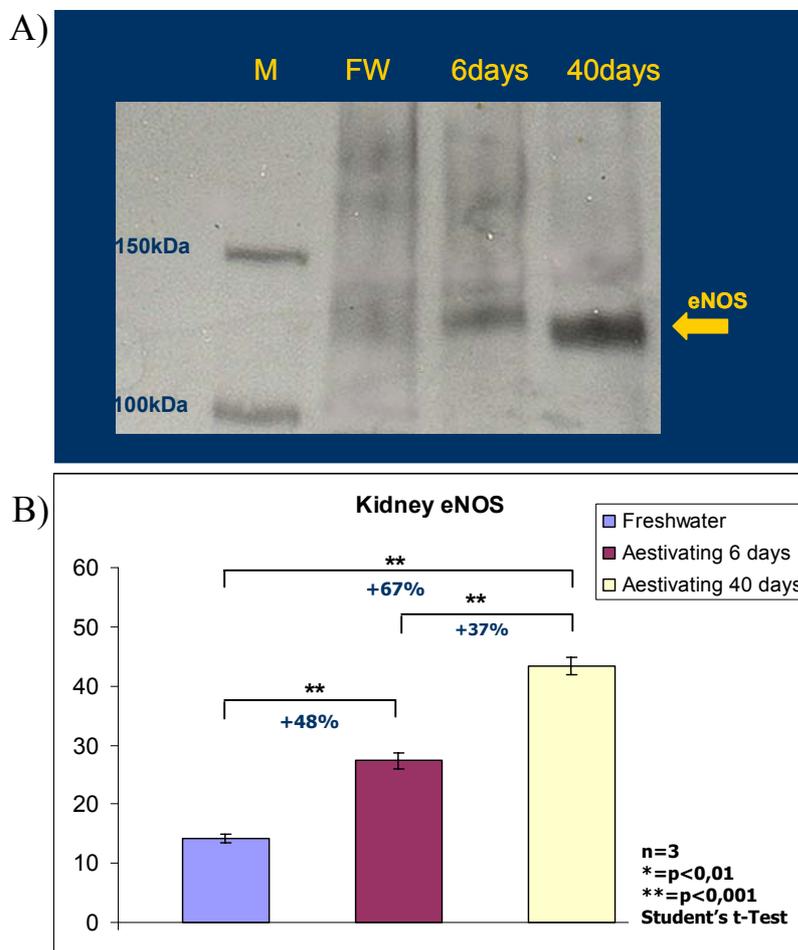
*P. dolloi*. In particolare, è stata identificata una banda del peso molecolare di circa 130 kDa corrispondente al peso molecolare della eNOS (Figura 5.9 A). L'analisi densitometrica dei blots (Figura 5.9 B) ha rivelato un incremento del 31,8% ( $p<0,01$ ) dell'espressione della eNOS dopo 6 giorni di estivazione. Questo valore diminuisce significativamente del 45% ( $p<0,001$ ) dopo 40 giorni di estivazione. Il confronto fra i FW e i 40GE mostra un decremento non significativo (19%;  $p>0,01$ ) (Figura 5.9 B).



**Figura 5.9** – Immunoblot della eNOS negli estratti cardiaci di *Protopterus dolloi* (FW, 6DA, 40 DA) (A). In B è mostrata l'analisi densitometrica dei “blots”. I dati sono la media  $\pm$ SEM di 5 determinazioni per ogni animale ( $n=3$ ). Le differenze statistiche sono valutate mediante test t-Student \*= $p<0,01$ ; \*\*= $p<0,001$

## Rene

Negli estratti renali la eNOS è espressa sia in condizione FW che dopo 6 e 40 giorni di estivazione (Figura 5.10 A). L'analisi densitometrica ha rilevato un significativo incremento della eNOS sia dopo 6 giorni (48%,  $p<0.001$ ) che dopo 40 giorni (67%,  $p<0.001$ ) di estivazione rispetto agli esemplari freshwater (Figura 5.10 B). Anche dal confronto fra estivazione a breve (6GE) ed a lungo termine emerge un significativo aumento dell'espressione della eNOS (37%,  $p<0.001$ ).

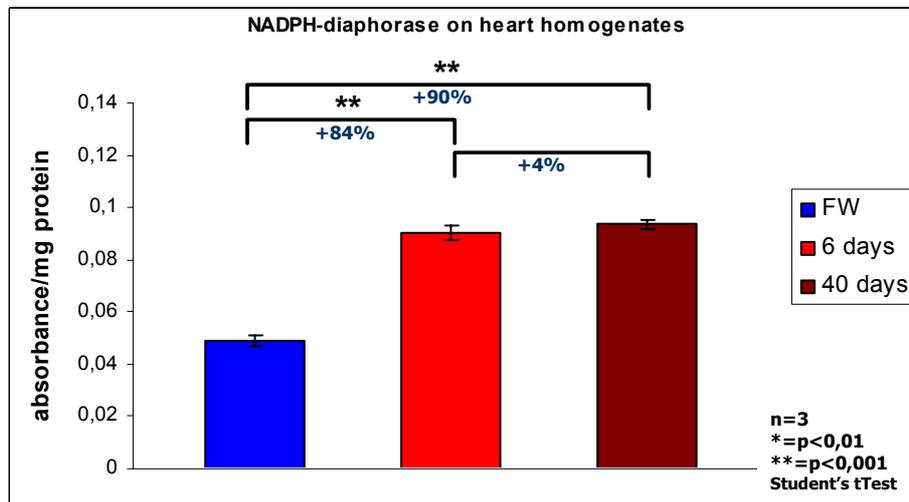


**Figura 5.10** – Immunoblot della eNOS negli estratti renali di *Protopterus dolloi* (FW, 6DA, 40 DA) (A). In B è mostrata l'analisi densitometrica dei “blots”. I dati sono la media  $\pm$ SEM di 5 determinazioni per ogni animale (n=3). Le differenze statistiche sono valutate mediante test t-Student t \*= $p<0.01$ ; \*\*= $p<0.001$

## 5.2.2 NADPH-diaforasi su omogenato

### Cuore

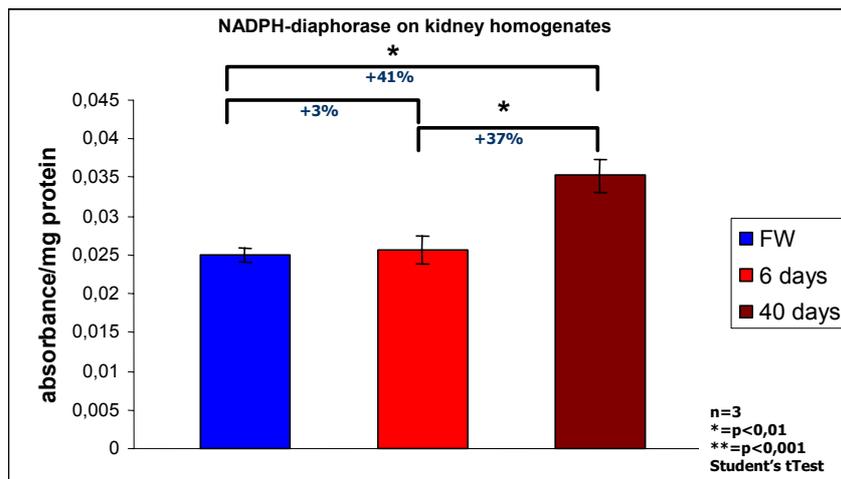
L'applicazione di una variante del protocollo della NADPH-diaforasi sugli estratti ventricolari e renali di *P. dolloi* fornisce una valutazione quantitativa dell'attività totale della NOS. Rispetto alle condizioni freshwater, nel ventricolo (Figura 5.11) i risultati hanno mostrato un significativo incremento dell'attività totale della NOS dopo 6 giorni (+83,9%,  $p<0.001$ ) e dopo 40 giorni di estivazione (+90,7%  $p<0.001$ ). Non sono state riscontrate, invece, differenze significative tra gli esemplari estivanti a 6 giorni e a 40 giorni (+3,7%  $p=0.36$ ).



**Figura 5.11**— Quantificazione spettrofotometrica dell'NADPH-diaforasi su cuore di *Protopterus dolloi* (FW e dopo 6 e 40 giorni di estivazione). I dati sono espressi come media  $\pm$ SEM di 3 determinazioni per ciascun animale (n=3). Le differenze statistiche sono valutate mediante test t-Student (\* =  $p<0.01$ , \*\* =  $p<0.001$ )

## Rene

Al contrario, nel rene (Figura 5.12), è stato osservato un piccolo ma non significativo aumento nell'attività della NOS dopo 6 giorni di estivazione rispetto alla condizione FW (+3.1%,  $p=0.71$ ). Tale incremento diviene tuttavia significativo dopo 40 giorni di estivazione (+41,3%,  $p<0.01$ ) e tra i due gruppi di lungfish estivanti (+37%,  $p<0.01$ ).



**Figura 5.12** – Quantificazione spettrofotometrica dell’NADPH-diaforasi su rene di *Protopterus dolloi* (FW e dopo 6 e 40 giorni di estivazione). I dati sono espressi come media  $\pm$ SEM di 3 determinazioni per ciascun animale ( $n=3$ ). Le differenze statistiche sono valutate mediante test t-Student (\*=  $p<0.01$ , \*\*= $p<0.001$ )

## **6) DISCUSSIONE**

Nel corso dell'evoluzione i "lungfishes" hanno giocato un ruolo cruciale nella transizione dalla vita acquatica a quella terrestre rappresentando, probabilmente, i primi veri vertebrati terrestri (Graham, 1997). I risultati da noi ottenuti, sul cuore e sul rene di *Protopterus dolloi*, documentano per la prima volta, in questi pesci ancestrali, la presenza del sistema NOS-NO e della sua flessibilità in rapporto a importanti stimoli adattativi. Ciò ha un grande interesse evolutivo in quanto documenta e rafforza le remote origini dello NO nei vertebrati. I dati ottenuti rappresentano un prezioso punto di partenza per poter stabilire la relazione causa-effetto fra il pattern di distribuzione della eNOS nel cuore e nel rene di *P. dolloi*, e la resistenza che tale specie mostra nell'affrontare i diversi stress di natura chimico-fisica associati all'estivazione (perdita di H<sub>2</sub>O, calore, fluttuazioni della pressione parziale di ossigeno).

### *Cuore*

Nel cuore la localizzazione della eNOS risulta essere prevalentemente confinata nelle cellule endoteliali, nei miocardiociti e nel pericardio viscerale (epicardio) sia dell'atrio che del ventricolo. Tale modello di distribuzione corrisponde a quello riscontrato nel cuore di varie specie di teleostei con caratteristiche filogenetiche, ecofisiologiche e morfo-funzionali diverse (Tota et al., 2005; Amelio et al., 2006), suggerendo la natura conservativa del sistema NOS-NO. Sia nei cardiomiociti che nelle EE, la eNOS appare associata alla membrana plasmatica. Ciò è in accordo con quanto documentato nei mammiferi, nei quali l'enzima co-localizza nelle caveole dei miocardiociti con l'isoforma specifica muscolare delle proteine caveolari (caveolina-3) (Feron et al., 1996; Cohen et al., 2004). La caveolina-3 agisce come trasduttore di segnale, accoppiando i diversi stimoli extracellulari che convergono nella regolazione dell'attività della miocardica eNOS (Uematsu et al., 1995; North et al., 1996; Bredt 2003; Massion e Balligand 2003). Rispetto al miocardio compatto degli omeotermi, la maggiore estensione dell'EE, caratteristica del ventricolo trabecolato dei pesci, suggerisce che la ricca

produzione di NO di derivazione EE possa svolgere un ruolo importante nella regolazione intracavitaria della performance cardiaca (Tota et al., 2005, Fenoglio et al., 2004, Imbrogno et al., 2001). In *P. dolloi* lo NO che diffonde dall'ampia superficie di EE può svolgere un ruolo di protezione paracrina del miocardio, il quale durante l'estivazione, risulta esposto ad ampie fluttuazioni di pO<sub>2</sub>, protoni ed osmoliti. Questa condizione, ricorda la protezione a lungo termine esercitata dallo NO sul miocardio ibernante, la quale permette l'adattamento metabolico al ridotto flusso ematico e alla ridotta disponibilità di ossigeno (Canty 2000; Heusch 1998). Inoltre, nei numerosi spazi lacunari del miocardio trabecolare, il flusso turbolento del sangue e la ridotta frequenza cardiaca rappresentano un potente stimolo pro-trombotico. E' noto che lo NO inibisce l'aggregazione piastrinica e l'adesione delle piastrine all'EE (Radomski e Moncada 1993 ). Pertanto, il rilascio di NO a livello dell'EE potrebbe contribuire all'omeostasi anti-trombotica.

La eNOS è espressa abbondantemente anche a livello del pericardio viscerale (epicardio) che circonda sia l'atrio che il ventricolo di *P. dolloi*. Nei mammiferi, l'epicardio produce e rilascia nel fluido pericardico un gran numero di sostanze cardio-attive (endotelina-1, prostaglandine, peptidi natriuretici atriali, fattori di crescita) che influenzano sia la permeabilità che la produzione del fluido a livello pericardico, così come anche la risposta immune e infiammatoria (Mebazaa et al., 1998). Tale funzione può essere estesa anche al pericardio dei pesci (ad es. vedi peptide natriuretico atriale in *Trematomus bernacchii* e in *Chionodraco hamatus*) (Cerra et al., 1997). Il tessuto subepicardico di *T. bernacchii*, per esempio, presenta alcuni tratti morfologici peculiari dei siti specializzati nella risposta immune, infatti, l'organizzazione tessutale ricorda quella dei centri germinativi presenti nei vertebrati superiori (Icardo et al., 1999). In *P. dolloi*, l'espressione epicardica della eNOS può contribuire sia al mantenimento di un'adeguata composizione del fluido interstiziale cardiaco durante lo stress idrico, che alle proprietà immuni di questo mesotelio. Infatti, è noto che nei primi 30 giorni di estivazione in

*Protopterus* si ha incremento dello stress e della risposta infiammatoria, come evidenziato dall'aumento transitorio dei neutrofili circolanti (Fishman et al., 1986; De Laney et al., 1976).

Le variazioni nell'espressione della eNOS, rilevate mediante Western Blotting, evidenziano un incremento dell'enzima dopo 6 giorni di estivazione. Dopo un più lungo periodo di estivazione (40GE), l'espressione della eNOS torna a livelli paragonabili a quelli riscontrati in condizioni FW. Al momento, le ragioni di queste variazioni sono poco chiare, ma si può ipotizzare che i cambiamenti nell'espressione della eNOS cardiaca possano agire distintamente come un meccanismo di regolazione neuro-endocrina, coordinando i cambiamenti nell'estivazione a breve termine contro quella a medio-lungo termine.

### *Rene*

Recentemente Ojeda e collaboratori hanno descritto, in una prospettiva funzionale, i tratti morfologici del rene di *P. dolloi* in condizioni acquatiche (Ojeda et al., 2006). Da quanto riportato, la struttura renale appare complessa. I nefroni sono composti da corpuscoli renali, raggruppati in unità funzionali ed irrorati da una singola arteriola circondata da periciti. Il tubulo renale è composto da cinque segmenti distinti: segmento prossimale, tubulo prossimale, segmento intermedio, tubulo distale e tubulo collettore. Quest'ultimo è separato dal corpuscolo renale e non partecipa ai processi controcorrente (Ojeda et al., 2006).

Le analisi mediante Western Blotting degli omogenati di rene di *P. dolloi* hanno rivelato che la eNOS è espressa sia nei FW che negli estivanti. Tale espressione, quantificata attraverso analisi densitometrica dei blots, aumenta nei pesci in estivazione sia nel breve che nel lungo periodo. Dopo 40 giorni di estivazione superficiale, l'incremento dell'espressione della eNOS è associato all'aumento dell'attività totale dell'enzima, come rilevato dalla NADPH-diaforasi su omogenato. Poiché sia il Western Blotting che l'NADPH-diaforasi sono stati effettuati su omogenati di rene intero, rimane difficile stabilire la specifica struttura renale in cui avvengono

i cambiamenti relativi all'espressione e all'attività totale della NOS. Tuttavia, l'impiego dell'immunolocalizzazione ha consentito di ottenere una mappatura regionale-specifica dell'isoforma endoteliale. I nostri studi indicano, infatti, che la eNOS è l'isoforma prevalentemente espressa nel rene, infatti, per la iNOS è stata riscontrata solo una debole positività mentre la nNOS risulta non espressa.

L'analisi del pattern di distribuzione della eNOS, ha mostrato che sia l'espressione che la distribuzione dell'enzima variano con l'estivazione. Negli esemplari FW, la eNOS localizza nell'endotelio vascolare dei vasi glomerulari e nei podociti, così come nelle cellule tubulari epiteliali sia dei tubuli prossimali che di quelli distali. Durante il breve periodo di estivazione, l'espressione della eNOS a livello glomerulare risulta debolmente ridotta, mentre rimane invariata nelle cellule dell'epitelio tubulare. Tale andamento osservato in *P. dolloi*, ricorda le modificazioni dell'espressione della eNOS glomerulare che avvengono nello scoiattolo durante l'ibernazione (Sandovici et al., 2004). In tal caso, la ridotta espressione della eNOS, associata con un decremento sia dei livelli di mRNA che dell'attività dell'enzima, ha suggerito il coinvolgimento del sistema eNOS-NO nel preparare il rene ad una attività renale ridotta e ad una riduzione del tasso di filtrazione glomerulare (Zatzman e South 1972; Sandovici et al., 2004). È noto, infatti, che lo NO derivato dall'endotelio vasale modula il tasso di filtrazione glomerulare, vasodilatando le arteriole preglomerulari (Deng e Baylis 1993) ed inibendo la contrazione delle cellule mesangiali (Raji e Shultz 1993). Quindi è probabile che durante l'estivazione, in *P. dolloi* la riduzione nella produzione di NO eNOS-dipendente, possa ridurre sia la pressione che la superficie di filtrazione glomerulare diminuendo così il tasso di filtrazione glomerulare. Contrariamente al modello glomerulare, l'estivazione comporta un incremento dell'espressione della eNOS a livello dei podociti. Di recente è stato osservato che in *P. dolloi* in condizione FW, i podociti che si trovano sulla superficie esterna della membrana basale glomerulare (GBM), possiedono caratteristiche esclusive, essendo ricchi di complessi

giunzionali localizzati tra i processi pedicellari (Ojeda et al., 2006). In tal modo essi possono partecipare attivamente e rapidamente all'adattamento della risposta glomerulare ai cambiamenti ambientali, ad esempio modificando l'arrangiamento spaziale dei processi pedicellari e la sintesi dei componenti della GBM (Ojeda et al., 2006). Come in tutte le specie con un basso tasso di filtrazione glomerulare, la membrana basale di *P. dolloi* è estremamente spessa (da due a cinque volte maggiore rispetto a quella di alcuni teleostei acquatici e marini) (Ojeda et al., 2006). Alcuni peptidi ormonali sono considerati di grande importanza nel compensare l'ostacolo di una barriera fisica così spessa (Ojeda et al., 2006). In particolare, è stato dimostrato che l'arginina vasotocina (AVT) regola il tasso di filtrazione glomerulare (GFR), agendo, nei lungfish, come un ormone diuretico e natriuretico (Sawyer et al., 1982). In assenza dell'ansa di Henle, l'effetto renale dell'arginina vasotocina AVT nei lungfish, dipende dalla variazione della performance del corpuscolo renale e quindi dal tasso di filtrazione glomerulare (Balment et al., 2006). È interessante notare che la risposta idro-osmotica dell'AVT è sotto un controllo nitregico negativo. Infatti, come dimostrato nella vescica urinaria della rana, lo NO prodotto localmente inibisce l'incremento AVT-dipendente della permeabilità osmotica all'acqua (Fock et al., 2004). Stabilire se l'incremento dell'espressione della eNOS, osservato nel rene estivante, contribuisce all'azione inibitoria dell'AVT attraverso un incremento dello NO prodotto localmente, potrebbe aiutare a chiarire i meccanismi coinvolti nell'inizio e/o nel mantenimento dell'oliguria durante l'estivazione. Nel tubulo prossimale di *P. dolloi* FW, la eNOS localizza prevalentemente sul polo luminale delle cellule epiteliali. Tale localizzazione permane sia nel breve (6 giorni) che nel medio-lungo (40 giorni) periodo di estivazione. Dal momento che la membrana apicale delle cellule epiteliali del tubulo prossimale nei pesci contiene una grande varietà di trasportatori coinvolti negli scambi transepiteliali (Perry e Fryer 1997), si potrebbe supporre che lo NO prodotto dalla eNOS esplichi un ruolo importante nel regolare il riassorbimento prossimale di  $\text{Na}^+$  ed acqua. Da studi effettuati sui

mammiferi sono emersi dati contraddittori sul ruolo dello NO nel riassorbimento tubulare. Studi in vivo, infatti, hanno dimostrato che lo NO inibisce il riassorbimento di  $\text{Na}^+$  dal tubulo prossimale, aumentando così il flusso tubulare e l'escrezione dell'urina. Al contrario, studi di microperfusione e microiniezione hanno evidenziato un ruolo stimolatorio dello NO basale sul riassorbimento di  $\text{Na}^+$ . I dati contraddittori sul ruolo dello NO nel riassorbimento tubulare, suggeriscono che l'effetto finale NO-mediato dipende dalla sua disponibilità e quindi dalla quantità di eNOS espressa, dalla sua attività e/o dall'efficienza dei meccanismi di disattivazione dello NO (Liang e Knox 2000). Sebbene al momento non si conosca il ruolo dello NO nella regolazione del sistema di trasporto transepiteliale a livello del tubulo prossimale di *P. dolloi*, i risultati da noi ottenuti, supportano l'idea di una stimolazione NO-mediata del riassorbimento tubulare in questi pesci. Contrariamente a quanto osservato nel tubulo prossimale, nelle cellule colonnari epiteliali del tubulo distale, dopo un lungo periodo di estivazione, l'espressione della eNOS si espande dalla porzione apicale al compartimento soprannucleare. Dati di letteratura mostrano che nelle cellule epiteliali del dotto collettore, in assenza di flusso luminale, la eNOS è prevalentemente diffusa nel citoplasma. Tuttavia, in presenza di flusso luminale, l'enzima trasloca a livello della membrana apicale (Ortiz et al., 2003). Ciò avviene in associazione con un'aumentata produzione di NO, conseguenza della fosforilazione e dell'attivazione della eNOS dipendente dal complesso HSP90-PI3k/Akt (Ortiz et al., 2003; Cai et al., 2000). Coerentemente con questa compartimentalizzazione della eNOS nell'epitelio dei tubuli distali, la maggiore localizzazione citoplasmatica osservata nei pesci a 40GE e l'esclusiva espressione dell'enzima a livello della membrana apicale, sia nei FW che in quelli a 6GE, suggeriscono il coinvolgimento del sistema eNOS-NO nella riduzione del flusso. Complessivamente, i nostri risultati suggeriscono che a livello dei tubuli la eNOS mostra una sensibilità regionale specifica all'estivazione. A livello dell'epitelio prossimale, un sistema nitregico localizzato stabilmente può operare nel mantenere un tasso basale di riassorbimento tubulare indipendente dalle

condizioni ambientali. Al contrario, una traslocazione citosolica della eNOS associata all'estivazione, attraverso il coinvolgimento di target intracellulari spazialmente compartimentalizzati, può contribuire alla risposta adattativa cellulare NO-dipendente e permettere la riduzione della funzione renale nel tubulo distale. Di recente in *P. dolloi*, a livello del compartimento sopranucleare delle cellule epiteliali dei tubuli distali, è stata dimostrata la presenza di un esteso compartimento mitocondriale, che può rappresentare un target per l'azione dello NO (Ojeda et al., 2006). E' noto, infatti, che lo NO riduce la funzione mitocondriale controllando l'attività della ciclossigenasi (Quintero et al., 2006). Tuttavia, al momento, rimane da indagare in *P. dolloi* la possibilità di un controllo mitocondriale NO-dipendente durante l'estivazione. Se così fosse, un tale meccanismo, potrebbe contribuire a deprimere l'attività delle cellule epiteliali distali, determinando, indirettamente, la riduzione della filtrazione glomerulare responsabile dell'oliguria/anuria nei pesci estivanti (Sawyer et al., 1982). In alternativa e/o in aggiunta, ciò potrebbe rappresentare una strategia di "standby" in grado di favorire la completa e immediata ripresa della funzione renale alla fine del periodo di estivazione superficiale.

## **7) BIBLIOGRAFIA**

**Abe A.S., 1995.** Estivation in South American amphibians and reptiles. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**: 1241–1247.

**Alderton W.K., C.E. Cooper & R. G. Knowles. 2001.** Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition *Biochem. J.* **357** : 593–615.

**Amelio D., Garofalo F., Pellegrino D., Giordano F., Tota B., Cerra M.C. (2006).** Cardiac expression and distribution of nitric oxide synthases in the ventricle of the cold-adapted Antarctic teleosts, the hemoglobinless *Chionodraco hamatus* and the red-blooded *Trematomus bernacchii*, *Nitric Oxide* **15**:190-198.

**Amin-Naves AJ., Giusti H., Glass M.L. (2004).** Effects of acute temperature changes on aerial and aquatic gas exchange, pulmonary ventilation and blood gas status in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. *Comp. Biochem. Physiol.* **138**: 133–139.

**Andrade D.V., Simone P.B., Toledo L.F., Abe A.S. (2004)** Seasonal changes in blood oxygen transport and acid–base status in the tegu lizard, *Tupinambis merianae*. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **140**: 197–208.

**Aoki E., Takeuchi I.K., Shoji R. (1995).** Nitric oxide: an attractive signalling molecule, *Acta Histochem Cytochem* **28**: 97-106.

**Asano K., Chee C.B., Gaston B., Lilly C.M., Gerard C., Drazen J.M., Stamler J.S. (1994).** Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **91(21)**:10089-93.

**Bachmann S., Bosse H.M., Mundel P, (1995).** Topography of nitric oxide synthesis by localising constitutive NO synthases in mammalian kidney. *Am J Physiol* **268**: 885-898

**Balligand J.L. (2000).** Regulation of cardiac function by nitric oxide. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. **143**: 206-234 (Ed. B. Mayer), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

**Balligand J.L., Kobzik L., Han X., Kaye D.M., Belhassen L., O'Hara DS, Kelly RA, Smith TW, Michel T. (1995).** Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* **270**: 14582-14586.

**Balment R.J., Lu W., Weybourne E., Warne J.M. (2006).** Arginine vasotocin a key hormone in fish physiology and behaviour: A review with insights from mammalian models, *Gen Comp Endocrinol* **147**: 9-16.

**Barroso, J. B., Carreras A., Esterban F. J., Peinado M. A., Martínez- Lara E., Valderrama R., Jimènez A., Rodrigo J., Lupianez J. A. (2000).** Molecular and kinetic characterization and cell type location of inducible nitric oxide synthase in fish. *Am. J. Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* **279**: R650-R656.

**Bates T.E., Loesch A., Burnstock G., Clark J.B. (1995).** Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun.* **213(3)**:896-900.

**Bates T.E., Loesch A., Burnstock G., Clark J.B. (1996).** Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation? *Biochem Biophys Res Commun.* **218(1)**:40-4.

**Boutillier R.G., Randall D.J., Shelton G., Toews D.P. (1979).** Acid–base relationships in the blood of the toad, *Bufo marinus*. III. The effects of burrowing. *J. Exp. Biol.* **83**, 357–365.

**Bredt D.S. (2003).** Nitric oxide signaling specificity—the heart of the problem, *J Cell Sci* **116**: 9–15.

**Bredt, D.S., Snyder, S. H. (1990).** Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 682 -685.

**Brenman J.E., Chao D.S., Xia H., Aldape K., Bredt D.S. (1995).** Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **82**:743 -752.

**Brenman J.E., Bredt D.S. (1997).** Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**: 374 -378.

**Brenman J.E., Xia H., Chao D.S., Black S.M., Bredt, D.S. (1997).** Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev. Neurosci.* **19**: 224–231.

**Brinkmann B.H., Denk A., Zitzler J., Joss J.J, Meyer A. (2004).** Complete mitochondrial genome sequences of the South american and the Australian lungfish: testing of the phylogenetic performance of mitochondrial data sets for phylogenetic problems in tetrapod relationships *J Mol Evol* 834-48.

**Brown G.C., Cooper C.E. (1994).** Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* **356**: 295-298.

**Brusilow, S.W., (2002).** Reviews in molecular medicine—hyperammonemic encephalopathy. *Medicine* **81**: 240–249.

**Buchawalow I.B., Schulze W., Karczewski P., Kostic M.M., Wallukat G., Morwinski R., Krause E.G., Müller J., Paul M., Slezak J., Luft F.C., Haller H. (2001).** Inducible nitric oxide synthase in the myocard. *Mol. and Cell. Biochem.* **217**: 73- 82.

**Bugge B.J. (1961)** The heart of the African lungfish, *Protopterus*. *Vidensk Meddr Dansk Natuhr Foren* **123**:193–210.

**Bullard R.W., Funkhouser G.E. (1962).**Estimated regional blood flow by rubidium 86 distribution during arousal from hibernation, *Am. J. Physiol* **203**: 266–270.

**Burggrenn W.W., Johansen K. (1986).** Circulation and respiration in lungfishes (Dipnoi), in: W. E. Bemis, W. W. Burggren & N. E. Kemp (Ed.), *The Biology and Evolution of Lungfishes*, Alan Liss: New York. (Supplement J Morphol) 217-236.

**Busconi L., Michel T. (1993).** Endothelial nitric oxide synthase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J. Biol. Chem.* **268**: 8410 -8413

**Cai Z., Xin J., Pollock D.M., Pollock J.S. (2000).** Shear stress-mediated NO production in inner medullary collecting duct cells, *Am J Physiol Renal Physiol* **279**: 270-4

**Canty J.M. Jr (2000).** Nitric oxide and short-term hibernation: friend or foe? *Circ Res* **87**:85-7

**Cerra M.C., Canonaco M., Acierno R., Tota B. (1997).** Different binding activity of A- and B-type natriuretic hormones in the heart of two Antarctic teleosts, the red blooded *Trematomus bernacchii* and the haemoglobinless *Chionodraco hamatus*. *Comp Biochem Physiol* **118**: 993-999.

**Chew S.F., Chan N.K.Y., Loong A.M., Hiong K.C., Tam W.L., Ip Y.K. (2004).** Nitrogen metabolism in the African lungfish (*Protopterus dolloi*) aestivating in a mucus cocoon on land, *J Exp Biol* **207**: 777-786.

**Chew S.F., Ong T.F., Ho, L., Tam, W.L., Loong, A.M., Hiong, K.C., Wong, W.P., Ip, Y.K. (2003a).** Urea synthesis in the African lungfish *Protopterus dolloi*: hepatic carbamoyl phosphate synthetase III and glutamine synthetase are up regulated by 6 days of aerial exposure. *J. Exp. Biol.* **206**: 3615–3624.

**Chew S.F., Wilson J.M., Ip Y.K., Randall D.J. (2006).** Nitrogenous excretion and defense against ammonia toxicity. In: Val, A., Almedia-Val, V., Randall, D.J. (Eds.), *The Physiology of Tropical Fishes. Fish Physiology*, Academic Press, London **21**:. 307–395.

**Cho H.J., Martin E., Xie Q.W., Sassa S, Nathan C. (1995).** Inducible nitric oxide synthase: identification of amino acid residues essential for dimerization and binding of tetrahydrobiopterin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 11514-11518.

**Cohen A.W., Hnasko R., Schubert W., Lisanti M.P. (2004).** Role of caveolae and caveolins in health and disease, *Physiol Rev* **84**: 1341-1379.

**Cooper, J.L., Plum, F., (1987).** Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev.* **67**: 440–519.

**Couet J., Li S., Okamoto T., Ikezu T., Lisanti M.P. (1997).** Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J Biol Chem.* **272(10)**: 6525-33

**Cox R.L., Stegeman J.J. (1996).** Characterization of nitric oxide synthase (NOS) in fish liver: enzyme activity and immunoblot analysis. In: *The biology of nitric oxide*, editori: Moncada S, Stamler J, Gross S, Higgs EA. London: Portland, p.47.

**Dejours, P., 1981.** Principles of Comparative Respiratory Physiology, 2nd ed. Elsevier/North Holland Publishing Company

**DeLaney R.G., Lahiri S., Fishman A.P. (1974).** Aestivation of the African lungfish *Protopterus aethiopicus*: cardiovascular and pulmonary function, *J Exp Biol* **61**: 11-128.

**DeLaney R.G., Shub C., Fishman A.P. (1976)** Hematologic observations on the aquatic and aestivating African lungfish *Protopterus aethiopicus*, *Copeia* **4**: 423-434.

**Delaney, R.G., Fishman, A.P., 1977.** Analysis of lung ventilation in the aestivating lungfish *Protopterus aethiopicus*. *Am. J. Physiol.* **233**: R181–R187.

**Deng A., Baylis C. (1993).** Locally produced EDRF controls preglomerular resistance and ultrafiltration coefficient, *Am J Physiol* **264**: 212–215.

**Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher, A.M. (1999).** Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt- dependent phosphorylation. *Nature* **399**: 601 -605.

**Dun N.J., Dun S.L., Forstermann U., Tseng L.F. (1992).** Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. *Neurosci Lett.* **147(2)**:217-20.

**Dun N.J., Dun S.L., Wu S.Y., Forstermann U. (1993).** Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat superior cervical ganglia and adrenal glands. *Neurosci Lett.* **158(1)**:51-4.

**Eliasson M.J., Blackshaw S., Schell M.J., Snyder S.H. (1997).** Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**: 3396–3401.

**Etheridge, K. (1990).** The energetics of aestivating sirenid salamanders (*Siren lacertia* and *Pseudobranchius striatus*). *Herpetology* **46**: 407–414.

**Farrel A.P., D.R. Jones. (1992).** The heart. In “ Fish Physiology” ( W. S. Hoar, D. J. Randall and A. P. Farrel eds.). Academic Press, San Diego. **XIIA**: 1-88.

**FelipoV., Butterworth R.F. (2002).** Neurobiology of ammonia. *Prog. Neurobiol.* **67**, 259–279.

**Fenoglio FC., Visai L., Addario C., Gerzeli G., Milanesi G., Vaccarone R, Barni S., (2004).** Expression of natriuretic peptides, nitric oxide synthase, and guanylate cyclase activity in frog mesonephros during the annual cycle, *Gen Comp Endocrinol* **137**:166-176.

**Feron O., Belhassen L., Kobzik L., Smith T.W., Kelly R.A., Michel T.,(1996).** Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells, *J. Biol. Chem.* **271**: 22810–22814.

**Fishman A.P., Pack A.I., Delaney R.G., Galante R.J. (1986).** Aestivation in *Protopterus* *J Morphol* **1** 237-248.

**Flanigan J.E., Withers P.C., Guppy M., (1991).** In vitro metabolic depression of tissues from the aestivating frog *Neobatrachus pelobatooides*. *J. Exp. Biol.* **161**: 273–283.

**Fock E.M., Lavrova E.A., Bachtееva V.T., Chernigovskaya E.V., Parnova R.G. (2004).** Nitric oxide inhibits arginine-vasotocin-induced increase of water osmotic permeability in frog urinary bladder *Pflugers Arch* **448**:197-203.

**Förstermann U., Boissel J.P., Kleinert H. (1998).** Expressional control of the ‘constitutive’ isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* **12**: 773-790.

**Förstermann U., Pollock J., Schmidt H.H.H.W., Heller M., Murad F. (1991).** Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 1788-1792.

**Fulton D., Gratton J.P., McCabe T.J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T.F., Papapetropoulos A., Sessa W.C. (1999).** Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**: 597 -601.

**Furchgott RF. (1990).** The 1989 Ulf von Euler lecture. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand.* **139**(2):257-70.

**Garcia N.H., Stoos B.A., Carretero O.A. (1996).** Mechanism of the nitric oxide induced blockade of collecting duct water permeability. *Hypertension* **27**: 679- 683

**Garcia-Cardena G., Oh P., Liu J., Schnitzer J.E., Sessa, W.C. (1996b).** Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6448 -6453.

**Garthwaite J. (1991).** Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurochem Sci* **14**: 60-67.

**Garvin JL, Hong N.J. (1999).** Nitric oxide inhibits sodium/ hydrogen exchange activity in the thick ascending limb. *Am J Physiol* **277**:377-382

**Gattuso A., Mazza R., Imbrogno S., Sverdrup A., Tota B., Nylund A., (2002).** Cardiac performance in *Salmo salar* with Infectious Salmon Anemia (ISA): putative role of nitric oxide. *Dis. Aquat. Org.* **52**: 11-20.

**Gauthier L., Dziak R., Kramer D.J., Leishman D., Song X., Ho J., Radovic M., Bentley D., Yankulov K. (2002).** *Genetics.* **162**(3):1117-29

**Ghafourifar P., Richter C. (1997).** Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* **418**(3):291-6.

**Ghosh D.K., Stuehr D.J. (1995).** Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction. *Biochemistry* **34**: 801–807.

**Gillespie, JS, Liu X and Martin W. (1990).** The neurotransmitter of the non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves to smooth muscle of the genital system. In Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System (ed. S. Moncada and E. A. Higgs) 147-164. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam

**Gilmour K.M., Euverman R.M., Esbaugh A.J., Kenney L., Chew S.F., Ip Y.K, Perry S.F., (2007)** Mechanisms of acid–base regulation in the African lungfish *Protopterus annectens*. J. Exp. Biol. **210**:1944–1959.

**Giulivi C. (1998).** Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. Biochemic. J. **332**: 673-679

**Giulivi C. (2003).** Characterization and function of mitochondrial nitric oxide synthase. Free Radical Biology & Medicine Vol. **34**, No. **4**, pp. 397-408.

**Giulivi C., Poderoso J.J., Boveris A. (1998).** Production of nitric oxide by mitochondria. J. Biol. Chem. **273**: 11038- 11043.

**Glass M.L. (2007).** Commentary on “The enigma of aestivation in the African lungfish *Protopterus dolloi*” by Perry et al. Respiratory Physiology & Neurobiology

**Glass M.L., Fernandes M.S, Soncini R., Glass H., Wasser J., (1997).** Effects of dry season dormancy on oxygen uptake, heart rate, and blood pressures in the toad *Bufo paracnemis*. J. Exp. Zool. **279**: 330–336.

**Grabowsky P.S., Laing K.J., McGuigan F.E., Hardie L.J., Ralston S.H., Secombes C.J. (1996).** Detection of mRNA for a nitric oxide in macrophages and gill of rainbow trout challenged with an attenuated bacterial pathogen. In: The biology of nitric oxide, editori: Moncada S, Stamler J, Gross S, Higgs EA. London: Portland, p.48.

**Graham J.B., (1997).** Air-Breathing Fishes: Evolution, Diversity and Adaptation. Accademic Press, S. Diego,.

**Gratton J. P., Fontana J., O'Connor D.S., Garcia-Cardena G., McCabe T.J., Sessa W.C. (2000).** Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1, J. Biol. Chem. **275**: 22268 -22272.

**Greenwood, (1986).** The natural history of African lungfishes. The Biology and Evolution of Lungfishes, in: W. E. Bemis, W. W. Burggren & N. E. Kemp (Ed.), Alan Liss: NewYork. (Supplement J Morphol) 163-198.

**Griffith O.W., Stuehr D.J. (1992).** Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. Annu Rev Physiol. **57**:707-36

**Griffith W. and Stuehr DJ. (1995).** Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. Annu Rev Physiol **57**:707-36.

**Guerrero A., Icardo J.M., Duran A.C., Gallego A., Domezain A., Colvee E., Sans-Coma V (2004).** Differentiation of cardiac outflow tract components in alevins of the sturgeon *Acipenser naccarii* (Osteichthyes, Acipenseriformes). Implications for heart evolution. *J Morphol* **260**:172–183.

**Guzman N.J., Fang M.Z. Tang S.S. (1995).** Autocrine inhibition of Na/K –ATP ase by nitric oxide in mouse proximal tubule epithelial cells **95**: 2083-2088

**Han X., Kobzik L., Balligand J.L., Kelly R.A., Smith T.W. (1996).** Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. *Circ Res.* **78**: 998-1008.

**Han X., Shimoni Y., Giles W.R. (1994).** An obligatory role of nitric oxide in autonomic control of mammalian heart rate. *J Physiol.* **476**: 309-314.

**Han X., Shimoni Y., Giles W.R. (1995).** A cellular mechanism for nitric oxide-mediated cholinergic control of mammalian heart rate. *J Gen Physiol.* **106**: 45-65

**Hare J.M., Loh E., Creager M.A., Colucci W.S. (1995).** Nitric oxide inhibits the contractile response to  $\beta$ -adrenergic stimulation in humans with left ventricular dysfunction. *Circulation* **92**:2198-2203.

**Hassal C.J.S., Saffrey M.J., Belai A., Hoyle C. H.V., Moules E.W., Moss J., Schmidt H.H.H.W., Murad F., Förstermann U., Burnstock G. (1992).** Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH-diapohrase activity in a subpopulation of intrinsic neurones of the guinea pig heart. *Neurosci Lett* **143**: 65-68.

**Henning R.H., Deelman L.E., Hut R.A., van der Zee E.A, Buikema H., Nelemans S.A, Lip H., de Zeeuw D., Daan S., Epema A.H (2002).**Normalization of aortic function during arousal episodes in the hibernating ground squirrel, *Life Sci* **70**: 2071–2083.

**Heusch G., (1998).** Hibernating myocardium, *Physiol Rev* **78**: 1055-1085.

**Hevel J.M., White K.A., Marletta M.A. (1991).** Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J. Biol. Chem.* **266**: 22789-22791

**Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. (1988).** Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* **157(1)**:87-94

**Hibbs JB Jr., Taintor R R, Vavrin Z, Cranger DL, Drapier JC, Amber IJ and Lancaster JR Jr. (1990).** Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: a molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. In *Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System.* (ed. S. Moncada and EA Higgs) 189-223, Elsevier, Amsterdam.

**Hickman C.P., Trump B.F. (1969).** The kidney. In: Hoar WS, Randall DJ, editors. *Fish physiology*, vol. 1. New York: Academic Press. 91–239.

**Huang P. L., Dawson T. M., Brecht D. S., Snyder S. H., Fishman M. C. (1993).** Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell (Cambridge, Mass.)* **75**: 1273–1286.

**Icardo J.M., Brunelli E., Perrotta I., Colvee E., Wong W. P., Ip Y.K., (2005).** Ventricle and Outflow Tract of the African Lungfish *Protopterus dolloi* *Journal of Morphology* **265**, 43–51.

**Icardo J.M., Colvee E., Cerra M.C., Tota B., (1999).** Bulbus arteriosus of the Antarctic teleosts the red-blooded *Trematomus Bernacchii*, *Anat Rec* **256** 116-126.

**Icardo JM, Schib JL, Ojeda JL, Duran AC, Guerrero A, Colvee E, Amelio D, Sans-Coma V. (2003)** The conus valves of the adult gilthead seabream (*Sparus auratus*). *J Anat* **202**:537–550.

**Ignarro L.J. (1990).** Nitric oxide: a novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* **16**: 477-483.

**Ignarro L.J. (1991).** Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol.* **41(4)**:485-90.

**Imbrogno S., Cerra M.C., Tota B. (2003).** Angiotensin II-induced inotropism requires an endocardial endothelium-nitric oxide mechanism in the in-vitro heart of *Anguilla anguilla*, *J Exp Biol* **206**: 2675-2684.

**Imbrogno S., De Iuri, L., Mazza R., Tota B. (2001).** Nitric oxide modulates cardiac performance in the heart of *Anguilla anguilla*. *J. Exp. Biol.* **204**: 1719-1727

**Ip Y.K., Chew S.F., Randall D.J. (2001b).** Ammonia toxicity, tolerance, and excretion. In: Wright, P.A., Anderson, P.M. (Eds.), *Nitrogen Excretion. Fish Physiology*, Academic Press, San Diego, **20**:109–148.

**Ip Y.K., Peh B.K., Tam W.L., Lee S.L.M., Chew S.F. (2005c).** Changes in salinity and ionic compositions act as environmental signals to induce a reduction in ammonia production in the African lungfish *Protopterus dolloi*. *J. Exp. Zool.* **303**: 456–463.

**Ip Y.K., Peh B.K., Tam W.L., Wong W.P., Chew S.F. (2005b).** Effects of intraperitoneal injection with NH<sub>4</sub>Cl, urea or NH<sub>4</sub>Cl + urea on nitrogen excretion and metabolism in the African lungfish *Protopterus dolloi*. *J. Exp. Zool.* **303**: 272–282.

**Ip Y.K., Yeo P.J., Loong A.M., Hiong K.C., Wong W.P., Chew S.F. (2005d).** The interplay of increased urea synthesis and reduced ammonia production in the African lungfish *Protopterus aethiopicus* during 46 days of aestivation in a mucus cocoon on land. *J. Exp. Zool.* **303**: 1054–1065.

**Janssens P.A., (1964).** The metabolism of aestivating African lungfish. *Comp Biochem Physiol* **11**:105-117.

**Janssens P.A., Cohen P.P. (1966).** Ornithine–urea cycle enzymes in the African lungfish *Protopterus aethiopicus*. *Science* **152**:358–359.

**Janssens P.A., Cohen P.P. (1968a).** Biosynthesis of urea in the estivating African lungfish and in *Xenopus laevis* under conditions of water shortage. *Comp. Biochem. Physiol.* **24**: 887–898.

**Janssens P.A., Cohen P.P. (1968b).** Nitrogen metabolism in the African lungfish. *Comp. Biochem. Physiol.* **24**: 879–886.

**Johansen J K., Reite O.B., (1968).** Influence of acetylcholine and biogenic amines on branchial, pulmonary and systemic vascular resistance in the African lungfish, *Protopterus aethiopicus*. *Acta Physiol Scand.* **74**: 465-471.

**Johansen K., Lykkeboe G., Weber R.E., Maloiy G.M., (1976).** Respiratory properties of blood in awake and estivating lungfish, *Protopterus amphibius*. *Respir Physiol* **27**: 335-4

**Ju H., Zou R., Venema V. J., Venema R. C. (1997).** Direct interaction of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J. Biol. Chem.* **272**: 18522 -18525.

**Kanai A. J., Pearce L.L., Clements P. R., Birder L.A., VanBibber M.M., Choi S. Y., de Groat, W. C., Peterson J. (2001).** Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14126-14231.

**Kaye D.M., Wiviott S.D., Balligand J.L., Simmons W.W., Smith T.W., Kelly R.A. (1996).** Frequency-dependent activation of a constitutive nitric oxide synthase and regulation of contractile function in adult rat ventricular myocytes. *Circ. Res.* **78**: 217- 224.

**Kind P.K., Grigg G.C., Booth D.T., (2002).** Physiological responses to prolonged aquatic hypoxia in the Queensland lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **132**: 179–190.

**Klatt P., Schmidt K., Lehner D., Glatter O., Bachinger H.P., Mayer B. (1995).** Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO J.* **14(15)**:3687-95.

**Knowles R.G., Moncada S. (1994).** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* **298** : 249-58.

**Kobzik L., Reid M.B., Bredt D.S., Stamler J.S. (1994).** Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* **372**:546 -548.

**Kobzik L., Stringer B., Balligand J.L., Reid M.B., Stamler J.S. (1995).** Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Commun.* **211(2)**:375-81

**Kone B.C. (2004).** Nitric Oxide Synthesis in the Kidney: Isoforms, Biosynthesis, and Functions in Health **24**:299-315

**Kudej R.K., Vatner S.F., (2003).** Nitric oxide-dependent vasodilation maintains blood flow in true hibernating myocardium, *J Mol Cell Cardiol* **35**:931–935.

**Laing K.J., Grabowski P.S., Belosevic M., Secombes C.J. (1996).** A partial sequence for nitric oxide synthase from a goldfish (*Carassius auratus*) macrophage cell line. *Immunol Cell Biol.* **74(4):**374-9

**Lamas S., Marsden P.A., Li K.G., Tempst P., Michel T. (1992).** Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* **89:** 6348-6352.

**Lenfant C., Johansen K. (1968).** Respiration in the African Lungfish *Protopterus Aethiopicus*: Respiratory Properties of Blood and Normal Patterns of Breathing and Gas Exchange, *J Exp Biol* **49:** 437-452.

**Liang M., Knox G.F. (2000).** Production and functional roles of nitric oxide in the proximal tubule *Am J Physiol* **278:** 1117-1124.

**Linas S.L., Repine J.E., (1999).** Endothelial cells regulate proximal tubule epithelial cell sodium transport. *Kidney Int* **55:** 1251-1258

**Liu L., Liu G.L., Barajas L. (1996).** Distribution of nitric oxide synthase-containing ganglionic neuronal somata and postganglionic fibers in rat kidney. *J.Comp. Neurol.* **369:** 16-30

**Lomholt J.P. (1993).** Breathing in the aestivating African lungfish, *Protopterus amphibius*. *Adv. Fish Res.* **1:** 17-34.

**Loong A.M., Hiong K.C., Lee S.M.L., Wong W.P., Chew S.F., Ip Y.K. (2005).** Ornithine-urea cycle and urea synthesis in African lungfishes, *Protopterus aethiopicus* and *Protopterus annectens*, exposed to terrestrial conditions for 6 days. *J. Exp. Zool.* **303:** 354-365.

**Lu M., Wang X., Wang W., (1998).** Nitric oxide increases the activity of the apical 70 pS K<sup>+</sup> channel TAL of rat kidney. *Am J Physiol* **274:** 946-950

**Luscher TF. (1991).** Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. *Eur Heart J.* **Suppl E:**2-11

**Lyman C.P. (1989).** Circulation in mammalian hibernation, in: P. Dow, W.F. Hamilton (Ed), *Handbook of Physiology*, Washington, DC, 1967-1989.

**Marletta MA. (1998).** Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol.* **1(5):**249-57

**Massion P.B., Balligand J.L. (2003).** Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol* **546:** 63-75.

**Mayer B., John M., Böhme E. (1990).** Purification of a calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum: cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.* **277:**

**McGeer J.C., Eddy F.B. (1996).** Effects of sodium nitropusside on blood circulation and acid-base and ionic balance in rainbow trout: indications for nitric oxide induced vasodilatation. *Can. J. Zool.* **74**: 1211- 1219.

**McClanahan ML., Ruibal R., Shoemaker V.H., (1983).** The rate of cocoon formation and its physiological correlates in a ceratophryd frog. *Physiol. Zool.* **56**: 430-435.

**McMillan K., Masters, B.S. (1995).** Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415. *Biochemistry* **34**: 3686-3693.

**Mebazaa A., Mayoux E., Maeda K. (1993).** Paracrine effects of endocardial endothelial cells on myocyte contraction mediated via endothelin. *Am J. Physiol.* **268**: H250-H259.

**Mebazaa A., Wetzel R.C., Dodd-o J.M., Redmond E.M., Shah A.M., Maeda K, Maistre G., Lakatta E.G., Robotham J.L.,(1998).** Potential paracrine role of the pericardium in the regulation of cardiac function. *Cardiovasc Res* **40**: 332-342.

**Mery P., Riou B., Chemla D., Lecarpentier Y. (1994).** Cardiotoxicity of colchicine in the rat. *Intensive Care Med.* **20(2)**:119-23

**Michel T., Feron O. (1997).** Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J. Clin. Invest.* **100**: 2146-2152.

**Milsom W.K., Zimmer M.B., Harris M.B., (1999).** Regulation of cardiac rhythm in hibernating mammals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **124**:383-91.

**Mommsen T.P., Walsh P.J. (1989).** Evolution of urea synthesis in vertebrates: the piscine connection. *Science* **243**: 72-75.

**Moncada S., Higgs A. (1993).** The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* **329**: 2002-2012.

**Moncada S., Higgs E.A. (1995).** Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* **9(13)**:1319-30

**Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E.A. (1989).** Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* **38**: 1709-1715.

**Morrissey J.J., Mc Craken R., Kaneto H., et al., (1994).** Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney Int* **45**: 998-1005

**Murad F, Ishii K, Forstermann U, Gorsky L, Kerwin JF Jr, Pollock J, Heller M. (1990).** EDRF is an intracellular second messenger and autacoid to regulate cyclic GMP synthesis in many cells. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res.* **24**:441-8.

**Nakane M., Schmidt H.H.H.W., Pollock J., Förstermann U., Murad F. (1993).** Cloned human brain, nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS. Lett.* **316**: 175-180, 1993.

**Nathan C., Xie Q.W. (1994).** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* **269**: 13725-13728.

**Nathan CF, Hibbs JB Jr. (1991).** Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol.* **3(1)**:65-70.

**Neumann N.F., Fagan D., Belosevic M. (1995).** Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Dev Comp Immunol.* **19(6)**:473-82

**Nguyen T, Brunson DC, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS and Tannenbaum SR. 1992.** DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**:3024-3030.

**Nishida K., Harrison D.G., Navas J.P., Fisher A.A., Dockery S.P., Uematsu M., Nerem R.M., Alexander R.W., Murphy T.J. (1992).** Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* **90(5)**:2092-6.

**North A.J., Lau K.S., Brannon T.S., Wu L.C., Wells L.B., German Z., Shaul P.W., (1996).** Oxygen upregulates nitric oxide synthase gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelial cells, *Am J Physiol* **270**: 643–649.

**Nussler AK, Billiar TR. (1993).** Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol.* **54(2)**:171-8.

**Ogura T., Yokoyama T., Fujisawa H., Kurashima Y., Esumi H. (1993).** Structural diversity of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 1014–1022

**Ojeda J.L., Icardo J.M., Wong W.P., Ip Y.K. (2006).** Microanatomy and ultrastructure of the kidney of the African lungfish *Protopterus dolloi*, *Anat Rec* **288**: 609-25.

**Olson, K.R., Villa J. (1991).** Evidende aganist nonprostanoid endothelium-derived relaxing factor(s) in trout vessels. *Am. J. Physiol.* **260**: R925-R933.

**Ortiz P.A., Garvin J.L. (2002).** Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *Am J Physiol* **282**: 777-784

**Ortiz P.A., Hong N.J., Garvin J.L. (2001).** NO decreases thick ascending limb chloride absorption by reducing Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>2</sup> cotransporter activity **281**: 819-825

**Ortiz P.A., Hong N.J., Wang D., Garvin J.L. (2003).** Gene transfer of eNOS to the thick Aascending limb of eNOS-KO mice restores the effects of L-Arginine on NaCl absorption. *Hypertension* **42**: 674–679.

**Parton R.G. (1996).** Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol.* **8(4)**:542-8.

**Pellegrino D., Acierno R., Tota B. (2003).** Control of cardiovascular function in the icefish *Chionodraco hamatus* involvement of serotonin and nitric oxide. *Comp. Biochem. and Physiol. Part A* **134**: 471-480.

**Pellegrino D., Palmerini C.A., Tota B. (2004).** No hemoglobin but NO: The icefish (*Chionodraco hamatus*) heart as a paradigm. *J. Exp. Biol.* **207 (22)**:3855-3864.

**Perry S.F., Euverman R., Wang T., Loong A.M., Chew S.F., Ip Y.K., Gilmour K.M. (2007).** Control of breathing in African lungfish (*Protopterus dolloi*): A comparison of aquatic and cocooned (terrestrialized) animals. *Respiratory Physiology & Neurobiology*

**Perry S.F., Fryer J.N. (1997).** Proton pumps in the fish gill and kidney. *Fish Physiology and Biochemistry* **17**: 363-369.

**Perry S.F., Gilmour K.M., Swenson E.R., Vulesevic B., Chew S.F., Ip. Y.K., (2005).** An investigation of the role of carbonic anhydrase in aquatic and aerial gas transfer in the African lungfish *Protopterus dolloi*. *J Exp Biol* **208**:3805–3815.

**Pollock J.S., Forstermann U., Mitchell J.A., Warner T.A., Schmidt H.H.H.W., Nakane M. Murad F. (1991).** Purification and characterization of particulate endothelium-derivate relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:10480-10484.

**Pollock J.S., Forstermann U., Tracey W.R., Nakane M., (1995).** Nitric oxide synthase isozymes antibodies, *Histochemistry* **27**: 738–744.

**Pollock J.S., Nakane M., Buttery L.D., Martinez A., Springall D., Polak J.M., Forstermann U., Murad F. (1993).** Characterization and localization of endothelial nitric oxide synthase using specific monoclonal antibodies. *Am J Physiol.* **265(5 Pt 1)**:C1379-87

**Prendergast B.D., Sagach V.F., Shah A.M. (1997).** Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart. *Circulation* **96**: 1320-1329

**Quintero QM., Colombo S.L., Godfrey A., Moncada S., (2006).** Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **103**:5379-5384

**Radomski M.W., Moncada S., (1993).** Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost* **70**: 36-41.

**Raji L., Shultz P.J., (1993).** Endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide: effects on and production by mesangial cells and the glomerulus. *J Am Soc Nephrol* **3**:1435-1441.

**Rand M.J., (1992).** Nitrergic trasmission: nitric oxide as mediator of non-adrenergic, non-colinergic neuro-effector trasmission. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **19**:132-143.

**Reinecke M., Betzler D., Forssmann W.G. (1987).** Immunocytochemistry of cardiac polypeptide hormones (cardiodilatin/atrial natriuretic polypeptide) in brain and hearts of *Myxine glutinosa* (Cyclostomata). *Histochemistry.* **86(3)**: 233-9.

**Richards M.K., Marletta M.A. (1994).** Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system. *Biochemistry*. **33(49)**:14723-32

**Roczniak A., Burns K.D. (1996)** Nitric oxide stimulates guanylate cyclase and regulates sodium transport in rabbit proximal tubule **270**: 106-115

**Rose C. (2002).** Increased extracellular brain glutamate in acute liver failure: decreased uptake or increased release? *Metab. Brain. Dis.* **17**: 251–261.

**Saffrey M.J., Hassall C.J., Hoyle C.H., Belai A., Moss J., Schmidt H.H., Forstermann U., Murad F., Burnstock G. (1992).** Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase in cultured myenteric neurones. *Neuroreport*. **3(4)**:333-6.

**Sanchez A.P., Hoffman A., Rantin F.T., Glass M.L. (2001).** The relationship between pH of the cerebro-spinal fluid and pulmonary ventilation of the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. *J. Exp. Zool.* **290**: 421–425.

**Sandovici M., Henning R.H., Hut R.A., Strijkstra A.M., Epema A.H., Van Goor H., Deelman L.E. (2004).** Differential regulation of glomerular and interstitial endothelial nitric oxide synthase expression in the kidney of hibernating ground squirrel. *Nitric Oxide* **11**: 194-200.

**Sase K., Michel T. (1997).** Expression and regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Trends in Cardiovascular Medicine*, **7**: 25-34

**Sawyer W.H., Uchiyama M., Pang P.K.T. (1982).** Control of renal functions in lungfishes. *Fed Proc* **41**:2361–2364.

**Sawyer WH. (1970).** Vasopressor, diuretic, and natriuretic responses by lungfish to arginine vasotocin. *Am J Physiol* **218**:1789–1794.

**Schmidt H.H.W, Gagne G.D., Nakane M., Pollock J.S., Miller M.F., Murad F. (1992).** Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem.* **40**: 1439-1456

**Schmidt H.H.W., Pollock J.S., Nakane M., Gorsky L.D., Forstermann U., Murad F. (1991).** Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88(2)**: 365-9.

**Schoor W.P., Plumb M. (1994).** Induction of NOS in channel catfish *Ictalurus punctatus* by *Edwardsiella ictaluri*. *Dis Aquat Org.* **19**: 153-155.

**Schulz R., Smith, J. A., Lewis M.J., Moncada S. (1991).** Nitric oxide synthase in cultured endocardial cells of the pig. *Br J. Pharmacol* **105**: 575-580.

**Schwarz P., Diem R., Dun N.J., Forstermann U. (1995).** Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heart sympathetic nerves. *Circ Res.* **77**: 841-848.

**Seki T., Hagiwara H., Naruse K., Kadowaki M., Kashiwagi M., Demura H., Hirose S., Naruse M. (1996).** In situ identification of messenger RNA of endothelial type nitric oxide synthase in rat cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **218**: 601-605.

**Sessa W.C., Harrison J.K., Barber C.M, Zeng D., Durieux M.E., D' Angelo D.D., Lynch K.R., Peach M.J. (1992).** Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **267**: 15274-15276.

**Shah A.M., MacCarthy P.A. (2000).** Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacology & Therapeutics* **86**: 49-86.

**Shaul P.W., Smart E.J., Robinson L.J., German Z., Yuhanna I.S., Ying Y., Anderson R.G. Michel T. (1996).** Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.* **271**: 6518 -6522.

**Sheng H., Hughes M.L., Murad F., Briggs C.A. (1992).** Evidence that nitric oxide mediates the cyclic GMP response to synaptic activity in the rat superior cervical ganglion. *Brain Res.* **597(2)**:343-5.

**Shin D.H., Lim H.S., Cho S.K., Lee H.Y., Lee H.W., Lee K.H., Chung Y.H., Cho S.S., Cha C.I., Hwang D.H. (2000).** Immunocytochemical localization of neuronal and inducible nitric oxide synthase in the retina of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Neuroscience Letters* **292**: 220-222

**Silvagno F., Xia H., Brecht D.S. (1996).** Neuronal nitric oxide synthase-mu, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **271**:11204 -11208.

**Sims D.E. (1986).** The pericyte: a review. *Tissue Cell* **18**:153-174

**Smith H.W., (1935).** The metabolism of the lungfish II. General considerations of the fasting metabolism inactive fish. *J Cell Comp Physiol* **6**:43-67.

**Smith J.A., Shah A.M., Lewis M.J. (1991).** Factors released from endothelium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. *J. Physiol.(Lond)* **439**: 1-14

**Smith, H.W. (1930).** Metabolism of lungfish, *Protopterus aethiopicus*. *J Biol Chem* **88**: 97-130.

**Snyder S.H., Brecht D.S. (1992).** Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* **266(5)**:68-71.

**Stoos B.A., Garcia N.H., Garvin J.L. (1995).** Nitric oxide inhibits sodium reabsorption in the isolated perfused cortical collecting duct. *J Am Soc Nephrol* **6**: 89-94

**Stuehr D.J. (1997).** Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **37**:339-59.

**Stuehr D.J., Kwon N.S., Gross S.S., Thiel B.A., Levi R., Nathan C.F. (1989).** Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol: requirement for inducible and constitutive components. *Biochem Biophys Res Commun.* **161(2)**:420-6.

**Sturla M., Prato P., Grattarola C., Masini M.A, Uva B.M. (2002).** Effects of induced aestivation in *Protopterus annectens*: A histomorphological study, *J Exp Zool* **292**: 26-31.

**Tatoyan A., Giulivi C. (1998).** Purification and characterization of a nitric oxide synthase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **273**: 11044-11048.

**Tempel G.E, Musacchia X.J., Jones S.B. (1977).** Mechanisms responsible for decreased glomerular filtration in hibernation and hypothermia, *J Appl Physiol* **42**: 420–425.

**Terada Y., Tomita K., Nonoguchi H., et al., (1992).** Polymerase chain reaction localization of constitutive nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase messenger RNAs in microdissected rat nephron segments *J.Clin Invest* **90**: 659-666

**Tota B., A. Gattuso. (1996).** Heart ventricle pump in teleost and elasmobranchs: A morphodynamic approach. *J. Exp. Zool* **275**: 162-171.

**Tota B., Acierno R., Agnisola C. (1991).** Mechanical performance of the isolated and perfused heart of the haemoglobinless Antarctic icefish *Chionodraco hamatus* (Lönnerberg): effects of loading conditions and temperature. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. [Biol.]* **332**: 191-198.

**Tota B., Amelio D., Pellegrino D., Ip Y.K., Cerra M.C. (2005).** NO modulation of myocardial performance in fish hearts, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **142**:164-177.

**Tota B., Cimini V., Salvatore G., Zummo G. (1983).** Comparative study of the arterial and lacunary systems of the ventricular myocardium of elasmobranch and teleost fishes. *Amer. J. Anat.* **167**: 15-32.

**Tracey W.R., Xue C., Klinghofer V., Barlow J., Pollock J.S., Forstermann U., Johns R.A. (1994).** Immunochemical detection of inducible NO synthase in human lung. *Am J Physiol.* **266(6)**:L722-7.

**Tzeng E., Billiar T.R., Robbins P.D., Loftus M., Stuehr D.J. (1995).** Expression of human inducible nitric oxide synthase in a tetrahydrobiopterin (H4B)-deficient cell line: H4B promotes assembly of enzyme subunits into an active dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 11771-11775.

**Uematsu M, Ohara Y., Navas J.P., Nishida K., Murphy T.J, Alexander R.W., Nerem R.M., Harrison D.G. (1995).** Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress, *Am J Physiol* **269**: 1371–1378.

**Vane J.R., Anggard E.E., Botting R.M. (1990).** Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* **323(1)**:27-36.

**Vanhoutte P.M. (1989).** Endothelium and control of vascular function: State of the art lecture. *Hypertension* **13**: 658-667;

**Wang R., Neumann N.F., Shen Q., and Belosevic M. (1995).** Establishment and characterization of a macrophage cell line from the goldfish. *Fish Shellfish Immunol.* **5**: 329-346

**Wang T., Inglis F.M., Kalb R.G. (2000).** Defective fluid and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorption in proximale tubule of neuronal nitric oxide synthase knockout mice *Am J Physiol* **279**: 518-524

**Wang X., Lu G.L., Gao Y., et al., (1998).** Neuronal nitric oxide synthase is expressed in principal cell of collecting duct. *Am J Physiol* **275**: 395-399

**Wedegaertner P.B., Wilson P.T., Bourne H.R. (1995).** Lipid modifications of trimeric G proteins. *J Biol Chem.***270**(2):503-6

**Wilkie M.P., Morgan T.P., Galvez F., Smith R.W, Kajimura M., Ip Y.K., Wood C.M. (2007).** The African lungfish (*Protopterus dolloi*): ionoregulation and osmoregulation in a fish out of water. *Physiol Biochem Zool* **80**: 99-112.

**Xie, Q.W., Cho H.J., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Troso T., Nathan C. (1992).** Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**: 225-228.

**Xu K.Y., Huso D.L., Dawson T.M.,. Bredt D.S, Becker L.C. (1999).** Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Medical Sciences* **96**: 657-662.

**Zardoya Z.R., Cao Y., Hasegawa M., Meyer A. (1998).** Searching for the closest living relative(s) of tetrapods through evolutionary analyses of mitochondrial and nuclear data *Mol Biol Evol.* **15**(5):506-17

**Zatzman M.L, South F.E. (1972).** Renal function of the awake and hibernating marmot *Marmota Xaviventris*, *Am J Physiol* **222**: 1035–1039.

**Zhu Z.M., Yu X. (2002).** A primitive fish close to the common ancestor of tetrapods and lungfish. *Nature* **418**: 767–770

**Zuasti Z.A., Agulleiro B., Hernandez Z. (1983).** Ultrastructure of the kidney of the marine teleost *Sparus auratus*: the renal corpuscle and the tubular nephron. *Cell Tissue Res* **228**:99–106.