

Università degli Studi della Calabria

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA ANIMALE

SCUOLA DI DOTTORATO "LIFE SCIENCES"

SSD: BIO/09

XXV CICLO

*Sistema NOS/NO e condizioni di stress:
meccanismi di adattamento cardiaco*

Dott.ssa Carla Capria

COORDINATORE

Prof.ssa
Maria Carmela Cerra

DOCENTE TUTOR

Dott.ssa
Sandra G. V. Imbrogno

IL DIRETTORE DELLA SCUOLA

Prof. Marcello Canonaco

Anno Accademico 2011/2012

INDICE

<u>SOMMARIO</u>	1
<u>SUMMARY</u>	6
<u>PREMESSA E SCOPO</u>	11
<u>INTRODUZIONE</u>	15
1. L'OSSIDO NITRICO	16
2. PRODUZIONE DI NO	17
2.1 Ossido Nitrico Sintasi (NOS)	17
2.2 Localizzazione delle NOS	19
2.3 I Nitriti come sorgente di NO	24
3. CHIMICA DELLO NO	25
4. NO E FUNZIONE CARDIACA	27
<u>PARTE 1. Temperatura e modulazione NO-dipendente della risposta di Frank-Starling nel teleosteo <i>Anguilla anguilla</i></u>	31
1. INTRODUZIONE	32
2. MATERIALI E METODI	35
2.1 Animali	35
2.2 Preparato di cuore isolato e perfuso	35
2.3 Protocolli sperimentali	38

2.4 Statistica	40
3. RISULTATI	41
3.1 Effetto delle variazioni termiche sulla risposta di Frank-Starling	41
3.2 Effetto delle variazioni termiche sulla modulazione NO-dipendente della risposta di Frank-Starling	43
3.3 Western Blotting	45
4. DISCUSSIONE	48
5. CONCLUSIONI	52

<u>PARTE 2.</u> Sistema NOS/NO e resistenza all'ipossia: il cuore di goldfish come modello sperimentale	53
1.INTRODUZIONE	54
2. MATERIALI E METODI	56
2.1 Animali	56
2.2 Esperimenti morfologici	56
2.3 Esperimenti fisiologici	58
3. RISULTATI	61
3.1 Risultati morfologici	61
3.2 Risultati fisiologici	66
4. DISCUSSIONE	73
5. CONCLUSIONI	80

<u>PARTE 3. NOS e stress iperglicemico: ruolo della BH4 sulla struttura e funzionalità dell'enzima</u>	81
1. INTRODUZIONE	82
2. MATERIALI E METODI	87
2.1 <i>Animali</i>	87
2.2 <i>Isolamento di cardiomiociti di ventricolo sinistro</i>	87
2.3 <i>Misurazione della produzione di superossido</i>	88
2.4 <i>Preparazione omogenati di tessuto ventricolare</i>	88
2.5 <i>Western Blotting</i>	89
2.6 <i>Valutazione della concentrazione di biopterine (BH₄, BH₂, B)</i>	89
2.7 <i>Valutazione dell'attività della GCH</i>	91
2.8 <i>Soluzioni standard</i>	92
2.9 <i>Analisi statistiche</i>	93
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	94
3.1 <i>Caratterizzazione del fenotipo dei topi mGCH-Tg</i>	94
3.2 <i>Valutazione della produzione di superossido</i>	96
3.3 <i>Induzione a breve termine del diabete di tipo 1</i>	102
3.4 <i>Monitoraggio variazioni di peso corporeo e livelli di glucosio</i>	102
3.5 <i>Effetti dell'induzione del diabete a breve termine sui livelli di BH₄ e sulla produzione di superossido</i>	103
3.6 <i>Induzione a lungo termine del diabete di tipo 1</i>	107
3.7 <i>Analisi delle variazioni di peso corporeo e glicemia</i>	107

CONCLUSIONI

110

BIBLIOGRAFIA

114

SOMMARIO

Questo lavoro di tesi di dottorato ha analizzato l'influenza di condizioni di stress, quali temperatura e disponibilità di ossigeno, sulla modulazione ossido nitrico sintasi (NOS)/ossido nitrico (NO)-dipendente della performance cardiaca dei teleostei (Parte 1 e 2). Nell'ultima parte del lavoro, realizzato presso il Dipartimento di Medicina Cardiovascolare dell'Università di Oxford, è stato valutato l'effetto dello stress iperglicemico sulla struttura e funzionalità dell'enzima NOS nei mammiferi (Parte 3).

Parte 1. Temperatura e modulazione NO-dipendente della risposta di Frank-Starling nel teleosteo *Anguilla anguilla*

La legge di Frank Starling è una proprietà fondamentale del miocardio dei vertebrati che permette al cuore di generare una risposta contrattile adeguata alle variazioni del precarico. È stato dimostrato che nel cuore di anguilla (*Anguilla anguilla*), l'Ossido nitrico (NO) esercita un effetto rilassante diretto sul miocardio, aumentando la sensibilità del cuore alla risposta di Frank-Starling. Utilizzando un preparato di cuore isolato e perfuso come modello sperimentale, il presente studio ha analizzato la relazione tra modulazione NO-dipendente della risposta di Frank-Starling e variazioni di temperatura. I risultati ottenuti hanno dimostrato che nei pesci acclimatati a varie temperature (animali primaverili perfusi a 20°C e animali invernali perfusi a 10°C) l'inibizione della Ossido Nitrico Sintasi (NOS), e quindi della produzione di NO, mediante trattamento con L-NIO ha ridotto la risposta di Starling, mentre in condizioni di shock termico (animali primaverili perfusi a 10 e 15°C e animali invernali perfusi a 15 e 20°C) il trattamento con L-NIO non ha esercitato alcun effetto. Le analisi di Western Blotting hanno evidenziato una riduzione dell'espressione di p-eNOS e p-Akt in campioni sottoposti a shock termico. Inoltre, in condizioni di acuti aumenti di temperatura, è stato osservato un incremento dell'espressione

proteica di Hsp90. Nel complesso, i risultati suggeriscono che la modulazione NOS/NO dipendente della risposta di Starling nel cuore dei pesci è sensibile allo stress termico.

Parte 2. Sistema NOS/NO e resistenza all'ipossia: il cuore di goldfish come modello sperimentale

Il goldfish (*Carassius auratus*) è un teleosteo noto per la sua capacità di tollerare prolungati e severi stati ipossici, ed è pertanto considerato un prezioso modello sperimentale per lo studio dei meccanismi che permettono la sopravvivenza ed il mantenimento della funzionalità cardiaca in condizioni in cui la disponibilità di O₂ rappresenta un fattore limitante. Il presente lavoro ha permesso la caratterizzazione morfo-funzionale del cuore di goldfish ed ha fornito le basi per l'analisi del ruolo dello NO sia come modulatore della performance cardiaca basale che come fattore coinvolto nei meccanismi di tolleranza a condizioni di ipossia. Oltre alle classiche 4 camere cardiache, ovvero seno venoso, atrio, ventricolo e bulbo arterioso, sono state identificate altre due strutture, corrispondenti alla regione atrio-ventricolare (AV) e al cono arterioso. L'atrio è molto ampio ed altamente trabecolato; il ventricolo appare costituito da una parte esterna di miocardio compatto, vascolarizzato da vasi coronarici, ed una interna di miocardio spugnoso; la parete bulbare è caratterizzata da un elevato rapporto elastina/collagene, che ne aumenta la *compliance*. Gli esperimenti di immunolocalizzazione hanno evidenziato la presenza dell'isoforma endoteliale attiva della NOS (p-eNOS) a livello dell'endotelio coronarico ed, in minor misura, nei miocardiociti e nell'endotelio vascolare. L'utilizzo di preparati di cuore isolato e perfuso, ha permesso la caratterizzazione funzionale del cuore di goldfish sia in condizioni basali che in risposta ad incrementi di precarico. I cuori sono risultati estremamente sensibili ad incrementi della pressione di riempimento,

raggiungendo il massimo valore di SV ($SV=1.08\pm 0.09$ mL/kg peso corporeo) a 0.4 kPa. In condizioni ipossiche, tale sensibilità è risultata ancora maggiore; i preparati hanno infatti raggiunto il massimo valore di SV ($SV=1.5\pm 0.2$ mL/kg peso corporeo) a valori di pressione di riempimento minori (0.25 kPa). Variazioni della pressione di postcarico ne hanno invece compromesso la funzionalità. Tali caratteristiche morfo-funzionali ci permettono di definire il comportamento del cuore di goldfish come pompa di volume. In condizioni basali, il trattamento con L-NMMA (inibitore della NOS) ha esercitato un effetto inotropo positivo sia in normossia che in ipossia, mentre il trattamento con nitrito ha indotto un effetto inotropo negativo in condizioni normossiche ed un effetto inotropo positivo in condizioni ipossiche. In risposta agli incrementi di precarico, il trattamento con L-NMMA ha significativamente ridotto la curva di Starling in normossia, mentre non ha esercitato alcun effetto in ipossia; al contrario, il nitrito non ha modificato la risposta di Starling in condizioni normossiche, mentre ha ridotto tale risposta in condizioni ipossiche, riportandola ai valori di controllo ottenuti in normossia. Questi risultati hanno evidenziato un ruolo del sistema NOS/NO nella modulazione della performance cardiaca sia basale che fisicamente stimolata, ed una sensibilità dei meccanismi di regolazione NOS/NO-dipendenti a variazioni della concentrazione di ossigeno.

Parte 3. NOS e stress iperglicemico: ruolo della BH_4 sulla struttura e funzionalità dell'enzima

La NOS, principale sorgente di NO in condizioni fisiologiche, è sintetizzata in forma monomerica, ma esplica le sue funzioni solo dopo formazione dell'omodimero attivo. Il corretto funzionamento della struttura dimerica richiede la presenza di una serie di cofattori, il più importante dei quali è la 5,6,7,8-tetraidrobiopterina (BH_4), responsabile della stabilizzazione del dimero. In assenza di tale cofattore infatti l'enzima produce anione

superossido e non NO. La BH₄ è sintetizzata *in vivo* attraverso un pathway il cui enzima limitante è la GTP Ciclo Idrolasi (GCH). Una riduzione della disponibilità di BH₄ è stata associata alla disfunzione vascolare correlata a varie patologie con implicazioni a livello cardiovascolare, tra cui il diabete. In questo contesto, utilizzando modelli di topi mGCH-Tg è stato analizzato il ruolo della BH₄ nel disaccoppiamento dell'enzima NOS associato a stress iperglicemico. La caratterizzazione del fenotipo di questo modello sperimentale ha evidenziato una over-espressione, miocardio specifica, dell'enzima GCH, ed un aumento delle concentrazioni di BH₄ e dei suoi prodotti ossidati in tessuto ventricolare di topi mGCH-Tg rispetto ai topi WT. Inoltre, la produzione di superossido è risultata significativamente ridotta rispetto ai topi di controllo, confermando l'ipotesi che la BH₄ riveste un ruolo fondamentale nella stabilizzazione della forma dimerica dell'enzima NOS. L'induzione del diabete di tipo 1 non ha modificato tali risultati. La concentrazione di BH₄ e dei suoi prodotti ossidati, così come la produzione di superossido, non sono risultate infatti modificate in condizioni di iperglicemia, supportando l'ipotesi che un aumento della disponibilità di BH₄ favorisce l'accoppiamento dell'enzima NOS anche in condizioni di stress iperglicemico. Nel complesso, i nostri dati suggeriscono un ruolo protettivo della BH₄ nei meccanismi di stress ossidativo associati alla condizione diabetica.

Nell'insieme, i dati ottenuti suggeriscono che nel cuore dei vertebrati il sistema NOS/NO rappresenta un punto nodale su cui convergono segnali attivati da condizioni di stress (ad esempio, variazioni di temperatura, stress ipossico ed iperglicemico), e da cui si dipartono cascate trasduzionali fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi cardiaca in tali condizioni.

SUMMARY

The present study analyzed the influence of stress conditions (i.e. thermal variations and oxygen availability) on the Nitric Oxide Synthase (NOS)/Nitric Oxide (NO)-dependent modulation of the teleost heart performance (Part 1 and 2). Moreover, in the last part of the work, carried out at the Cardiovascular Medicine Department, University of Oxford, a model of transgenic mouse was used to test the effects of hyperglycemic stress on the NOS enzyme structure and function (Part 3).

Part 1. Effects of temperature on the NO-dependent modulation of the Frank-Starling mechanism in the eel (*Anguilla Anguilla*) heart

The Frank-Starling Law is a fundamental property of the vertebrate myocardium which allows, when the end-diastolic volume increases, that the consequent stretch of the myocardial fibers generates a more forceful contraction. It has been shown that in the eel (*Anguilla anguilla*) heart, Nitric Oxide (NO) exerts a direct myocardial relaxant effect, increasing the sensitivity of the Frank-Starling response. With the use of isolated working heart preparations, this study investigated the relationship between NO modulation of Frank-Starling response and temperature challenges in the eel. The results showed that, while in long-term acclimated fish (spring animals perfused at 20 °C and winter animals perfused at 10 °C) the inhibition of NO production by L-N5 (1-iminoethyl)ornithine (L-NIO) significantly reduced the Frank-Starling response, under thermal shock conditions (spring animals perfused at 10 or 15 °C and winter animals perfused at 15 or 20 °C) L-NIO treatment resulted without effect. Western Blotting analysis revealed a decrease of pNOS and pAkt expression in samples subjected to thermal shock. Moreover, an increase in Hsp90 protein levels was observed under heat thermal stress.

Taken together, these data suggest that the NO synthase(NOS)/NO-dependent modulation of the Frank-Starling mechanism in fish is sensitive to thermal stress.

Part 2. NOS/NO system and hypoxic stress: the *Carassius auratus* heart as a case study

The teleost *Carassius auratus* (goldfish) has evolved to tolerate prolonged and severe hypoxic conditions, thus representing a well-suited model to study the mechanisms underlying survival and maintenance of cardiac function when O₂ availability becomes a limiting factor.

Using morphological and physiological approaches we provided, for the first time, a structural and functional characterization of *C. auratus* L. heart. Besides to the classical four chambers, i.e. *sinus venosus*, *atrium*, *ventricle*, *bulbus*, we described two distinct structures corresponding to the atrio-ventricular (AV) region and the *conus arteriosus*. The atrium is very large and highly trabeculated; the ventricle shows an outer *compacta*, vascularized by coronary vessels, and an inner *spongiosa*; the *bulbus* wall is characterized by a high elastin/collagen ratio, which makes it extremely compliant. Immunolocalization revealed a strong expression of activated “eNOS-like” isoforms both at coronary endothelium and, to a lesser extent, in the myocytes and the endocardial endothelium (EE). The structural design of the heart appears to comply with its mechanical function. Using an *in vitro* working heart preparation, cardiac performance was evaluated at different filling and afterload pressures. The hearts were very sensitive to filling pressure increases. Maximum Stroke volume (SV=1.08±0.09 mL/kg body mass) was obtained with an input pressure of 0.4 kPa. Under hypoxic conditions, the goldfish heart resulted more sensitive to preload increases, reaching the maximum SV (SV=1.5±0.2 mL/kg body weight) at an input pressure of 0.25 kPa.

The heart was not able to sustain afterload increases, values higher than 1.5 kPa impairing its performance. These morpho-functional features are consistent with a volume pump mechanical performance.

Under basal conditions, the treatment with the NOS inhibitor L-NMMA induced a significant positive inotropic effect in both normoxia and hypoxia, whereas the treatment with nitrate induced a negative inotropic effect under normoxic conditions and a positive inotropic effect under hypoxic conditions. The NOS inhibition with L-NMMA reduced the Frank-Starling response under normoxic conditions, while it didn't show any effect under hypoxic conditions; the goldfish heart response to preload was not modified by the treatment with nitrate under normoxic conditions, while a significant reduction of the Frank-Starling response was observed under hypoxic conditions. Taken together, these results highlight a role for the NOS/NO system in modulating both the basal and physically stimulated goldfish heart performance, and suggest the existence of oxygen availability-related differences in the NOS/NO dependent modulation of the *C. auratus* cardiac function.

Part 3. NOS and hyperglycemic stress: role of BH₄ on the enzyme function and structure

The NOS enzyme is the main source of NO under physiological conditions. It is synthesized as a monomer, but it is active only in the homodimeric form. The proper function of the dimer requires the presence of different cofactors, among which 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH₄) is the most important, being responsible for the stabilization of the dimer. In the absence of this molecule, the enzyme produces superoxide rather than NO. *In vivo*, BH₄ is mainly synthesized through a pathway involving GTP cyclo hydrolase (GCH) as the rate limiting enzyme. A decrease in BH₄ availability has been associated with endothelial dysfunction related to different diseases leading to cardiovascular complications, such as diabetes.

In this context, using mGCH-Tg mice, the role of BH₄ in the NOS enzyme uncoupling related to hyperglycemic stress has been analyzed. The phenotype characterization of the mGCH-Tg model showed a myocardial-specific GCH overexpression, and a related increase in BH₄, 7,8-dihydrobiopterin (BH₂) and biopterin (B) levels. This was associated with a decrease in superoxide production, measured in ventricular extracts of mGCH-Tg mice compared to the wild-type (WT) controls. This is consistent with a role of BH₄ in the stabilization of the NOS dimeric form. The induction of type 1 diabetes did not elicit any effect. In fact, BH₄, BH₂ and B concentrations, as well as superoxide production, were not modified by hyperglycemia, supporting the hypothesis that an increase in BH₄ levels promotes the NOS enzyme coupling under hyperglycemic stress conditions. These results suggest a protective role of BH₄ against the oxidative stress mechanisms related to the diabetic condition.

Taken together, our results suggest that, in both mammalian and non mammalian vertebrates, the NOS/NO system, acting at the cross-road of different stress signals (thermal variations, oxygen depletion and diabetic stress) plays a key role in the mechanisms of cardiac adaptation.

PREMESSA E SCOPO

La funzione cardiaca è modulata da meccanismi intrinseci (legge di Frank-Starling, relazione forza frequenza, *shear stress* ecc...) ed estrinseci (umorali e nervosi). Nei mammiferi, in entrambi i meccanismi è coinvolto l'ossido nitrico (NO), sintetizzato da diverse isoforme della Ossido Nitrico Sintasi (nNOS, iNOS, eNOS) e rilasciato dalle cellule dell'endotelio endocardico (EE), dai miociti, dai vasi coronarici e dai neuroni miocardici. È ben noto il ruolo che lo NO svolge nel regolare diversi aspetti della fisiologia cardiaca, con particolare riferimento alla trasduzione di molti segnali, sia chimici che fisici. Gli effetti dello NO sulla *performance* cardiaca includono variazioni delle proprietà diastoliche (*Smith et al., 1991*), modulazione della risposta di Frank-Starling (*Prendergast et al., 1997*), della regolazione forza-frequenza (*Kaye et al., 1996*), della risposta colinergica (*Balligand, 2000*) e β -adrenergica (*Hare et al., 1995*) ed effetti inotropi (*Mery et al., 1994*).

Negli ultimi anni una vasta letteratura ha evidenziato il ruolo del sistema NOS/NO nella modulazione della *performance* cardiaca dei vertebrati non mammiferi. In particolare, nei pesci teleostei le conoscenze riguardo il controllo della *performance* cardiaca sono state significativamente ampliate da studi effettuati nell'ultima decade (*Imbrogno et al., 2001, 2003, 2004, 2006, 2010; Garofalo et al., 2009*). Questi lavori sono stati condotti su preparati di cuore isolato e perfuso che, lavorando in condizioni fisiologiche (in termini di pressione di precarico e postcarico), permettono l'analisi della *performance* cardiaca escludendo le influenze neuro-umorali. Molti di questi studi sono stati focalizzati sul ruolo del sistema NOS/NO, non solo come modulatore autocrino/paracrino della *performance* cardiaca basale, ma anche come fattore capace di realizzare una fine modulazione della risposta cardiaca a variazioni della pressione di precarico ed a numerosi agenti cardioattivi, quali ad esempio neurotrasmettitori, ormoni, autacoidi, ecc. Inoltre, grazie alle note capacità di fronteggiare variazioni delle condizioni ambientali, quali ad esempio cambiamenti di salinità, temperature estreme,

variazioni della disponibilità di ossigeno ecc., il cuore dei teleostei è considerato un utile modello sperimentale per lo studio dei meccanismi che convertono i segnali ambientali in risposte fisiologiche (Randall, 1982; McKenzie et al., 2004; Pedersen et al., 2010; Klaiman et al., 2011). In questo contesto, un esempio è fornito dall'anguilla d'acqua dolce (*Anguilla anguilla*) che durante il ciclo vitale, caratterizzato da lunghissime migrazioni (Tesch, 2003), fronteggia considerevoli escursioni termiche, e dal goldfish (*C. auratus*), teleosteo capace di tollerare prolungati e severi stati ipossici (Pedersen et al., 2010).

Tuttavia, ad oggi non sono disponibili informazioni riguardo le eventuali influenze di condizioni di stress sulla modulazione NOS/NO-dipendente della funzionalità cardiaca dei teleostei. Pertanto, utilizzando come modello sperimentale il cuore dei teleostei *A. anguilla* e *C. auratus*, è stato valutato l'effetto di variazioni termiche ed ipossia, sulla modulazione NOS/NO dipendente della performance cardiaca dei pesci.

L'ultima parte del lavoro, svolta presso il Dipartimento di Medicina Cardiovascolare dell'Università di Oxford, è stata finalizzata allo studio della struttura dell'enzima NOS, ed all'analisi del ruolo della BH₄ nel disaccoppiamento dell'enzima associato a stress iperglicemico. La 5,6,7,8-tetraidrobiopterina (BH₄) costituisce un cofattore fondamentale per il corretto funzionamento dell'enzima, ed una riduzione della disponibilità di tale molecola è stata associata allo sviluppo di disfunzione vascolare in una serie di patologie correlate ad alterazione della funzionalità cardiaca, ad esempio il diabete. Allo scopo di studiare il ruolo della BH₄ nella stabilizzazione della forma dimerica dell'enzima NOS a livello cardiaco, lo studio è stato condotto su topi transgenici, che presentavano una over-espressione miocardio-specifica dell'enzima limitante la sintesi di BH₄ (GTP Ciclo Idrolasi; GCH), cui è stato indotto diabete di tipo 1.

Nell'insieme, le indagini condotte si sono avvalse di un approccio metodologico multiplo che ha permesso di descrivere il sistema NOS/NO cardiaco a livello morfologico (identificazione e localizzazione dell'enzima NOS), biochimico (quantificazione dell'attivazione della eNOS e delle proteine Akt e Hsp90 e valutazione del ruolo della BH₄ nella stabilizzazione della forma dimerica della NOS), e funzionale (valutazione dell'effetto diretto di fattori di stress sulla performance cardiaca).

INTRODUZIONE

1. L'OSSIDO NITRICO

L'ossido nitrico (NO) è una molecola gassosa, biatomica, di natura radicalica, considerata per molti anni quale comune inquinante ambientale, ed al giorno d'oggi totalmente riconsiderata ed annoverata tra le più importanti molecole di segnalazione intracellulare. La scoperta che le azioni biologiche del fattore di rilascio endotelio-derivato (EDRF) (Furchgott e Zawadzki, 1980) sono dovute al rilascio endogeno di NO (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987; Khan e Furchgott, 1987) rivelò l'esistenza di un pathway biochimico ubiquitario per la produzione dello NO (Moncada et al., 1989). All'inizio degli anni 90 venne riconosciuto il valore biologico della NO e nel 1992 la rivista Science (vol. 258, pag. 1862) dichiarò lo NO molecola dell'anno. L'importanza dello NO è stata confermata nel 1998, quando il premio Nobel per la medicina venne assegnato a R. Furchgott, L. Ignarro e F. Murad per le ricerche che dimostrarono come lo NO sia un mediatore biologico prodotto per via enzimatica da vari tipi cellulari e coinvolto in numerosi processi fisiologici.

Lo NO viene sintetizzato *in vivo*, e possiede un'emivita di pochi secondi. Tuttavia, essendo una molecola solubile sia in soluzione acquosa che in mezzi lipidici, è capace di diffondere attraverso le membrane plasmatiche e nel citoplasma ed è coinvolta nella regolazione di numerose funzioni fisiologiche tra cui la neurotrasmissione, la difesa immunitaria ed il controllo vasale (Moncada et al., 1989; Vanhoutte, 1989; Furchgott, 1990; Ignarro, 1990; Vane et al., 1990; Gillespie et al., 1990; Luscher, 1991; Garthwaite, 1991; Nathan e Hibbs, 1991; Snyder e Brecht, 1992; Rand, 1992; Nussler e Billiar, 1993).

In termini generali, lo NO sintetizzato dai neuroni del sistema nervoso centrale è un importante neuromediatore per molte funzioni fisiologiche, inclusi il processo mnemonico, la coordinazione tra l'attività neuronale ed il flusso sanguigno, e la modulazione del dolore

(*Garthwaite, 1991; Snyder e Brecht, 1992*). La produzione di NO nelle cellule dell'endotelio vascolare mantiene un tono vasodilatatorio essenziale per la regolazione del flusso e della pressione del sangue (*Moncada et al., 1989; Vanhoutte, 1989; Furchgott, 1990; Ignarro, 1990; Vane et al., 1990; Luscher, 1991*). Lo NO prodotto dall'endotelio e/o dalle piastrine inibisce l'aggregazione e l'adesione piastrinica, inibisce l'adesione dei leucociti e modula la proliferazione delle cellule muscolari lisce (*Moncada e Higgs, 1993*). Inoltre, lo NO è generato in grandi quantità nella risposta immunitaria cellulo-mediata (*Nathan e Hibbs, 1991; Nussler e Billiar, 1993*).

2. PRODUZIONE DI NO

2.1 Ossido Nitrico Sintasi (NOS)

La fonte primaria di NO è la NO Sintasi (NOS), di cui sono state identificate tre isoforme, prodotte da geni differenti, con differente localizzazione, regolazione, proprietà catalitiche e sensibilità agli inibitori, e prendono il nome dal tessuto in cui furono per la prima volta isolate. Il prodotto del primo gene (*Nos1*), purificato per la prima volta da tessuto neuronale, viene indicato con il nome di NOS neuronale (nNOS) (*Brecht e Snyder, 1990*), mentre il prodotto del secondo gene (*Nos2*), purificato per la prima volta da una linea cellulare di macrofagi immuno-attivati, prese il nome di NOS inducibile (iNOS) (*Stuehr et al., 1991, Xie et al., 1992*). Il prodotto del gene *Nos3*, infine, venne originariamente purificato da cellule dell'endotelio vasale, da cui il nome di NOS endoteliale (eNOS) (*Pollock et al., 1991*). Ognuno di questi geni risulta localizzato su un diverso cromosoma (*Nathan e Xie, 1994*). E' importante considerare che i nomi delle tre isoforme non riflettono la loro effettiva distribuzione all'interno dell'organismo.

Le isoforme neuronale ed endoteliale della NOS sono costitutivamente espresse a livello cellulare, e la loro attività è strettamente dipendente dalla Calmodulina, cui l'enzima si lega in seguito all'aumento delle concentrazioni di Calcio intracellulare e dalla fosforilazione di specifiche porzioni della proteina enzimatica (Bredt et al., 1992; Corson et al., 1996; Fleming et al., 1998).

L'attivazione della iNOS viene invece stimolata dal rilascio di citochine pro-infiammatorie durante il processo di immuno-attivazione, e porta alla produzione di NO indipendentemente dalle concentrazioni di Calcio intracellulare (Nathan et al., 1994; Michel et al., 1997).

Tutte e tre le isoforme di NOS catalizzano la produzione di ossido nitrico attraverso una reazione che prevede la conversione della L-arginina (Palmer et al., 1988) e dei co-substrati Ossigeno (O_2) e NADPH (Nicotinamide adenina di-nucleotide fosfato) ad L-Citrullina ed NO. Il corretto funzionamento dell'enzima richiede la presenza di vari cofattori e gruppi prostetici, quali: BH_4 ((6R)-5,6,7,8-tetraidrobiopterina) (Cosentino et al., 1999), FAD (flavin adenin dinucleotide), FMN (flavin mononucleotide), calmodulina, e gruppo eme; questi ultimi due strettamente legati all'enzima nello stato attivo (Stuehr et al., 1999) (Fig. 1).

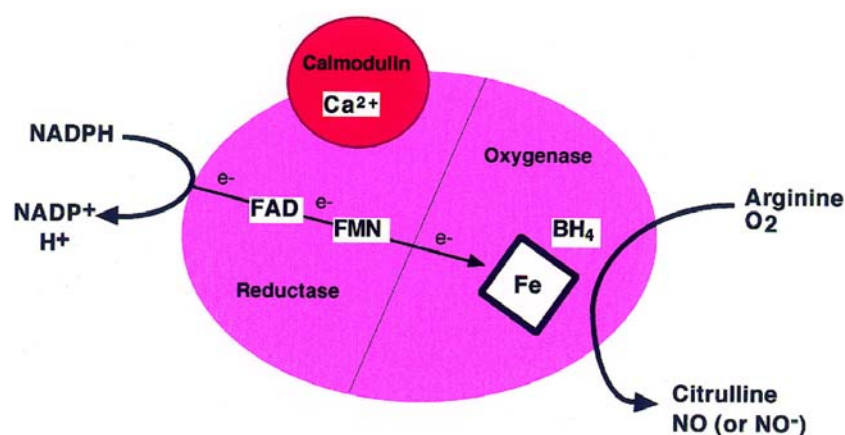


Fig.1. Reazione di sintesi dello NO catalizzata dall'enzima NOS

La trascrizione del gene che codifica per la NOS da luogo a forme enzimatiche monomeriche che, in presenza di L-arginina e BH₄ formano il dimero funzionale. Le tre isoforme della NOS catalizzano la stessa sequenza di reazioni e sembrano avere lo stesso meccanismo catalitico. Le NOSs ossidano la L-arg prima a N-idrossi-L-arginina, ed in seguito ad NO e citrullina. Entrambi i passaggi di questa sequenza sono NADPH- ed O₂-dipendenti (Marletta, 1988; Knowles e Moncada, 1994; Stuehr, 1997). Gli elettroni donati dal NADPH al dominio reduttasico sono trasferiti attraverso i gruppi flavinici (FAD e FMN) al domino ossigenasico dove interagiscono con il ferro emico e la BH₄ a livello del sito attivo per catalizzare la reazione dell'ossigeno con la L-arg. Nelle isoforme endoteliale e neuronale il legame con la CaM è necessario per garantire il flusso elettronico dai gruppi prostetici flavinici al gruppo eme. La BH₄ contiene un atomo di zinco coordinato con due cisteine in ciascun monomero (ZnS₄) 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 al., 1995; Tzeng et al., 1995). In assenza del substrato L-arginina o della BH₄, l'enzima è funzionante ma viene definito "uncoupled", ovvero disaccoppiato. In questa forma l'elettrone non è in grado di passare dal dominio reduttasico della prima subunità a quello ossidasico della seconda subunità enzimatica, inibendo pertanto la reazione di sintesi dello NO e favorendo invece la produzione di anione superossido (O²⁻) (Xia e Zweier, 1997).

2.2 Localizzazione delle NOS

Le sequenze aminoacidiche della nNOS e della iNOS sono prive di elementi che permettono l'associazione dell'enzima a livello della membrana plasmatica e, infatti, queste isoforme sono state rilevate principalmente nella porzione solubile di omogenati di tessuti e di cellule (Stuehr e Griffith, 1992; Forstermann et al., 1993; Nathan e Xie, 1994; Sessa, 1994). Al contrario, la

eNOS si trova prevalentemente associata alle membrane delle cellule endoteliali (*Pollock et al., 1991*).

nNOS. Identificata e purificata per la prima volta nel tessuto neuronale di ratto e di suino, la nNOS presenta un peso molecolare compreso fra 150 e 160 kDa (*Bredt e Snyder, 1990; Mayer et al., 1990; Schmidt et al., 1991*). Evidenze di immunistochemicali hanno dimostrato che la nNOS è espressa anche nelle terminazioni periferiche nitrergiche (*Hassal 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*), nelle cellule dell'epitelio polmonare, incluse le cellule dell'epitelio polmonare dell'uomo (*Asano et al., 1994*), uterino e gastrico (*Schmidt et al., 1991*), nelle cellule delle isole pancreatiche ed in quelle della macula densa renale (*Schmidt et al., 1992*) e nel muscolo scheletrico umano, di ratto e del porcellino d'india (*Kobzik et al., 1994; Nakane et al., 1993*). In molti neuroni, la nNOS sembra essere co-localizzata con neurotrasmettitori (o con enzimi che sintetizzano neurotrasmettitori) (*Sheng et al., 1993; Dun et al., 1993; Dun et al., 1994; Schwarz et al., 1995*).

Studi condotti nei mammiferi hanno dimostrato la presenza della nNOS a livello cardiaco, indicando lo NO quale importante messaggero neuronale in quest'organo. Questa isoforma è espressa nelle fibre pre- e post-gangliari innervanti i nodi seno-atriale ed atrio-ventricolare, nelle cellule neuronali subepicardiche e nei neuroni cardiaci intrinseci (*Klimachewski et al., 1992; Schwarz et al., 1995*). In particolare, sono risultati positivi i terminali nervosi colinergici, quelli NANC, e i terminali nervosi ortosimpatici (a livello dei quali è stato postulato un ruolo della nNOS nel rilascio e nel recupero delle catecolamine) (*Schwarz et al., 1995*). Studi più recenti hanno fornito evidenze per 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 ha funzione d'interazione con proteine di membrana contenenti domini PDZ presenti in cellule tra cui quelle dei neuroni, del muscolo scheletrico e dell'endotelio (*Brenman e Bredt, 1997*). Le interazioni che si possono instaurare attraverso questo dominio della nNOS comprendono: l'associazione con la proteina postsinaptica PSD-95 di molti neuroni che permette l'abbinamento funzionale con i recettori per il glutammato NMDA e con i canali VOCCs per il calcio (*Christopherson et al., 1999*) ed il legame con la sintrofina del muscolo scheletrico (*Brenman et al., 1995, 1996*) che in caso di un elevato lavoro muscolare permette una vasodilatazione da NO ed il conseguente aumento del flusso sanguigno (*Thomas e Victor, 1998*).

iNOS. La iNOS presenta un peso molecolare di 125-135 kDa e, come la nNOS, è un enzima prevalentemente solubile (*Hevel et al., 1991; Stuehr et al., 1991*). Nei mammiferi, dove è stata caratterizzata per la prima volta (*Xie et al., 1992; Lyons et al., 1992*), la iNOS è espressa nei fagociti, in particolare nei macrofagi, probabilmente in risposta a citochine pro-infiammatorie e/o prodotti batterici come il lipopolissaccaride (LPS). Lo NO derivato dai macrofagi è la componente più importante dell'azione citostatica e citotossica di queste cellule e prende parte nella risposta immunitaria alle cellule tumorali ed ai parassiti intracellulari inclusi i virus (*Nathan e Xie, 1994*). Numerosi studi hanno dimostrato un incremento dell'attività della iNOS in diversi componenti cellulari (endotelio endocardico, macrofagi, endotelio e muscolo liscio vasale) in seguito ad esposizione ad endotossine batteriche, con conseguente sovrapproduzione di NO (*Balligand et al., 2000*). Negli ultimi anni è stata inoltre dimostrata una espressione costitutiva della iNOS in miocardiociti di ratti neonati ed adulti, prevalentemente associata a mitocondri e fibre contrattili (*Buchawalow et al., 2001*). L'attività della iNOS aumenta dopo esposizione a citochine e prodotti microbici e, una volta indotta, può perdurare fino a 5 giorni (*Nathan e Xie, 1994*); ciò la distingue dalle altre due isoforme che

sono attivate nel giro di pochi secondi da aumenti transitori di Ca^{2+} , ed altrettanto rapidamente riportano la loro attività ai livelli basali. Nel caso della iNOS, l'aumento di produzione di NO (di maggiore entità rispetto a quello indotto dall'attività delle altre due isoforme) dipende essenzialmente dalla sintesi di nuove unità enzimatiche (*Papapetropoulos et al., 1999; Balligand, 2000*).

Lo NO prodotto dalla iNOS agisce (anche attraverso la formazione di perossinitriti) come un potente agente citotossico fornendo un utile meccanismo di difesa contro i microrganismi invasori (*Cunha, 1992; Murray e Nathan, 1999; Shiloh et al., 1999; Nathan e Shiloh, 2000*)

eNOS. Identificata per la prima volta nelle cellule endoteliali aortiche bovine (*Lamas et al., 1992; Nishida et al., 1992*), diversamente dalle altre due isoforme la eNOS si trova per più del 90% in forma particolata (*Forstermann et al., 1991*). L'enzima solubilizzato presenta una massa di 135 kDa (*Pollock et al., 1991*). In seguito, questa isoforma è stata localizzata in numerosi altri tipi cellulari, quali ad esempio piastrine, neutrofili, alcuni tipi di cellule epiteliali, cardiomiociti, cellule muscolari lisce (*Tracey et al., 1994; Balligand et al., 1995; Forstermann et al., 1998*), nonché nell'endotelio di vene, arterie e capillari di numerosi tessuti di varie specie, incluso l'uomo (*Pollock et al., 1993*). La localizzazione cardiaca della eNOS riguarda l'endotelio endocardico, la vascolatura coronarica, i miociti cardiaci ed i tessuti di conduzione specializzati, come quelli dei nodi seno-atriale ed atrio-ventricolare (*Gauthier et al., 1991; Schulz et al., 1991; Smith et al., 1991; Han et al., 1994, 1995, 1996; Seki et al., 1996*).

L'associazione della eNOS con la frazione particolata subcellulare fu notata già con i primi tentativi di isolare l'enzima che dimostrarono la necessità di utilizzare detergenti per solubilizzarlo (*Pollock et al., 1991*). La eNOS contiene un dominio trans-membrana non idrofobico, e l'associazione con la membrana cellulare è mediata dall'acilazione dell'enzima

(Sase et al., 1997). Questa isoforma della NOS è localizzata nelle caveole (Feron et al., 1996; Shaul et al., 1996), piccole invaginazioni della membrana plasmatica caratterizzate dalla presenza della proteina trans-membranaria caveolina (Anderson, 1993; Parton, 1996). Le caveole hanno una caratteristica composizione lipidica, ricca di colesterolo e glicosfingolipidi e priva di fosfolipidi (Anderson, 1993; Parton, 1996; Couet et al., 1997). Le caveole, osservate nella membrana plasmatica sia di cellule endoteliali che di cardiomiociti (Michel e Feron, 1997), fungono da siti per il sequestro di molecole segnale che, oltre alla eNOS, includono recettori, proteine G, proteine chinasi, ecc (Couet et al., 1997). E' stato dimostrato che in seguito a stimolazione due recettori accoppiati a proteine G, il recettore muscarinico M₂ ed il recettore B₂ per la bradichinina, si localizzano nelle caveole (Feron et al., 1996; de Weerd et al., 1997). Questi due recettori promuovono le prime cascate di segnale per la produzione di NO in molti tipi cellulari incluse le cellule endoteliali ed i miociti. La presenza all'interno delle caveole di questi recettori facilita l'attivazione della eNOS attraverso la formazione di domini caveolari nei quali le molecole segnale si trovano nelle vicinanze dell'enzima. L'interazione della eNOS con la caveolina all'interno delle caveole ne inibisce l'attività (Feron et al., 1996; Garcia-Cardena et al., 1996; Ju et al., 1997). Tale inibizione è eliminata dall'interazione con la CaM: in presenza di aumentate concentrazioni di Ca²⁺ intracellulare, la CaM attivata dal calcio compete con la caveolina; il complesso Ca²⁺/CaM favorisce il distacco della eNOS dalla caveolina e quindi la sua attivazione; quando i livelli di Ca²⁺ ritornano a valori basali, avviene la dissociazione del complesso Ca²⁺-CaM-eNOS e l'enzima si inattiva ristabilendo il suo legame con la caveolina (Michel et al., 1997). Modificazioni di questo meccanismo di regolazione avvengono grazie all'interazione della eNOS con la Heat shock protein 90 (Hsp90), la quale facilita il distacco dell'enzima dalla caveolina (Gratton et al., 2000). Altri meccanismi, come ad esempio la

fosforilazione operata dalla proteina chinasi Akt (su Ser 1177), che attiva l'enzima, possono intervenire nella regolazione della eNOS (*Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999*).

2.3 I Nitriti come sorgente di NO

Nonostante la NOS sia ampiamente considerata quale sorgente primaria di NO nei sistemi biologici, diversi studi hanno documentato l'esistenza di un pathway di produzione dello NO NOS-indipendente. Nel 1994 Benjamin e collaboratori riportarono una conversione del nitrito ad Ossido Nitrico in condizioni di forte acidità (pH3), tipiche del lume dello stomaco, e nel 1995 è stato dimostrato che nei tessuti biologici, in condizioni di acidosi intracellulare, come quella che si presenta dopo l'insorgere di uno stato ischemico (*Zweier et al 1995*), il nitrito è in grado di fungere da sorgente di NO. In questi casi la produzione di NO risulta ulteriormente incrementata dalla presenza di stati metabolici riducenti (*Zweier et al 1999*). Questo processo di produzione dello NO è un fenomeno generalizzato, che può verificarsi in tutti i tessuti biologici. La produzione di NO NOS-indipendente svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi di molte malattie. Infatti, in condizioni patologiche in cui acidosi e stati ipossici sono particolarmente frequenti, questo pathway diventa la maggiore sorgente di NO, e la quantità di NO prodotto arriva ad essere di gran lunga superiore a quella normalmente prodotta dalla NOS negli stessi tessuti (*Zweier et al 1999*).

3. CHIMICA DELLO NO

Lo NO è un radicale libero gassoso composto da atomi di azoto ed ossigeno. I radicali liberi hanno gli elettroni del livello energetico più esterno spaiati e quindi tendono a reagire nei tessuti biologici provocando cambiamenti dello stato chimico-fisico delle molecole con cui vengono a contatto. Lo NO può interagire in diversi modi con la materia vivente, trasformandosi in composti più stabili che possono essere attivi a livello biologico.

Interazioni con O₂. Lo NO può interagire con O₂ formando NO₂ sotto forma di gas o nitrito (NO₂⁻) in soluzione acquosa (Nisticò et al., 1996). Lo NO₂⁻ è uno dei prodotti che si formano normalmente in natura come conseguenza della produzione di NO e della sua successiva interazione con l'O₂; la sua misurazione è un utile indice della produzione di NO (Nisticò et al., 1996).

Interazioni con anione superossido (O₂⁻). Lo NO è in grado di reagire con l'anione superossido (O₂⁻), un altro radicale libero presente nei liquidi biologici o nelle cellule, trasformandosi in perossinitrito (-OONO) e quindi in nitrato (NO₃⁻) (Nisticò et al., 1996). La formazione di -OONO è di estrema importanza nell'induzione di danno e morte cellulare.

Interazioni con ozono (O₃). Lo NO può interagire con l'O₃ formando NO₂ attivato, che è possibile misurare mediante tecniche di chemiluminescenza spesso utilizzate per determinare le concentrazioni di NO (Nisticò et al., 1996).

Interazioni con ossiemoglobina ed altre emoproteine. In presenza di ossiemoglobina (Hb₃+O₂) lo NO interagisce con essa formando metaemoglobina e nitrato (NO₃⁻). Tale reazione, reversibile, rappresenta il prototipo di una serie di reazioni dello NO con le emoproteine nelle quali il ferro (Fe²⁺) è complessato con la protoporfirina. Lo NO, interagendo con il ferro

dell'eme, produce un nitrosil-eme che può essere misurato spettrofotometricamente (*Nisticò et al., 1996*). Tale interazione avviene tipicamente con i due enzimi che sono i target intracellulari di elezione dello NO: la guanilato ciclastasi solubile (GCs) e la citocromo c ossidasi (*Ignarro, 1990*). L'interazione dello NO con il ferro eme contenuto nella GCs, produce una modificazione conformazionale dell'enzima che, nella forma nitrosilata, è attivo ed induce aumento della concentrazione intracellulare di GMP ciclico (3'5'-cGMP). La formazione di questo secondo messaggero avvia una cascata di eventi che giustifica l'ampio spettro di effetti dello NO a livello cellulare (*Balligand, 2000; Shah e MacCarthy, 2000*). L'interazione dello NO con la citocromo c ossidasi è importante nella modulazione della respirazione cellulare; lo NO compete infatti con l'O₂ per il sito di legame all'enzima, ed induce una inibizione dell'attività enzimatica (*Brown e Cooper, 1994*).

Interazioni con composti solforati. Una reazione che, oltre ad essere ricorrente in natura, potrebbe essere di rilievo nell'azione biologica dello NO, è rappresentata dalla nitrosilazione di alcuni composti solforati e formazione di nitrosotioili. Per esempio, la cisteina può interagire con lo NO formando S-nitroso-cisteina, importante attivatore della guanilato ciclastasi, tanto che è stato recentemente ipotizzato che l'EDRF possa essere S-nitroso-cisteina anziché NO (*Nisticò et al., 1996*).

Interazioni con amine. Un'altra reazione di importanza biologica è la nitrosilazione delle amine. Le nitrosamine, rilasciate dai macrofagi dopo stimolazione con linfocine od endotossine, esercitano un'azione tossica nei confronti dei batteri contribuendo all'attività di difesa operata dai macrofagi nei confronti degli agenti infettivi (*Nisticò et al., 1996*).

4. NO E FUNZIONE CARDIACA

La performance cardiaca è modulata da meccanismi intrinseci (legge di Starling, relazione forza-frequenza, *shear stress*, ecc.) ed estrinseci (umorali e nervosi). Oltre ai meccanismi "classici" di modulazione della performance cardiaca negli ultimi anni si sono accumulate evidenze su meccanismi di regolazione mediati da sostanze che sono prodotte ed agiscono localmente con modalità autocrino-paracrina quali ad esempio i peptidi natriuretici (*Reinecke et al., 1987*), le prostaglandine, l'endotelina, (*Mebazaa et al., 1993*) e lo NO (*Smith et al., 1991*). Tali sostanze sono prodotte dalle cellule endoteliali sia vascolari che endocardiche ed agiscono sugli adiacenti miocardiociti. In particolare, lo NO può essere prodotto anche dagli stessi miocardiociti, suggerendo l'esistenza di un controllo autocrino parallelo della funzione cardiaca (*Balligand, 2000*). E' oggi ben noto che lo NO regola la funzione cardiaca in risposta a numerosi segnali sia fisici che chimici inducendo effetti 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 β -adrenergica (*Hare et al., 1995*) e colinergica (*Balligand, 2000*) e dell'inotropismo (*Mèry et al., 1994*) (**Fig. 2**).

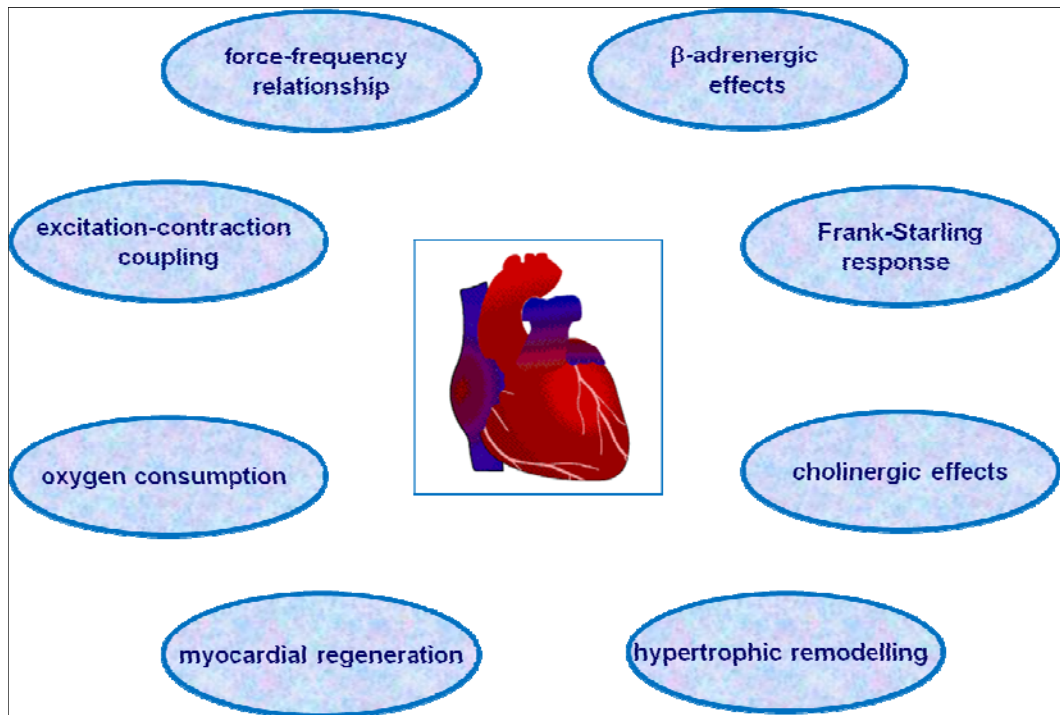


Fig.2. Effetti cardiaci dello NO

Gli effetti cardiaci dello NO sono distinti fra quelli subordinati al cGMP, la cui formazione avviene in seguito all'attivazione della GCs, e quelli indipendenti dal cGMP (**Fig. 3**). Questa classificazione non esclude azioni concomitanti dello NO attraverso entrambi i meccanismi, i cui effetti dipendono da parametri quali la quantità di NO prodotto, la provenienza intra- o extra-cellulare, la compartimentalizzazione intracellulare e le condizioni redox locali, tutte variabili che possono influenzare la reattività dello NO con specifici target intracellulari (Balligand,1997).

Effetti cGMP-dipendenti

Lo NO interagendo con la GCs forma un complesso nitrosil-eme-enzima che provoca nell'enzima un cambiamento conformazionale ed il conseguente aumento della concentrazione intra-cellulare del cGMP (Ignarro, 1990), il quale può esercitare diversi effetti. Da un lato, attraverso interazioni allosteriche, esso è in grado di stimolare od inibire specifiche

isoforme di fosfodiesterasi (PDE). Le PDE idrolizzano il cAMP, e la loro inibizione ha importanti implicazioni nel controllo dell'inotropismo indotto dalla stimolazione adrenergica. D'altro canto, il cGMP attiva la proteina chinasi G (PKG), fondamentale nel controllo dell'omeostasi del calcio nei miocardiociti. La PKG è infatti in grado di esercitare diversi effetti che includono l'inibizione della corrente del Ca^{2+} dei canali VOC stimolata dalla PKA (Mery *et al.*, 1991; Wahler e Dollinger, 1995).

Effetti cGMP-indipendenti

Oltre agli effetti mediati dal cGMP, esistono altre modalità d'azione dello NO e dei suoi derivati [perossinitriti(ONOO-)]. Lo NO può infatti interagire direttamente con la citocromo c ossidasi a livello dello stesso sito di legame per l' O_2 , inibendo l'attività enzimatica e quindi la respirazione mitocondriale (Shen *et al.*, 1994; Oddis *et al.*, 1995). L'ossidazione da parte dello NO o dei perossinitriti dei residui tiolici di alcune proteine regolatrici, può influenzare la contrazione cardiaca a più livelli. Sono stati infatti osservati effetti cardio-soppressivi da inibizione della creatina chinasi (CK) (Arstall *et al.*, 1998), riduzione della corrente del Ca^{2+} attraverso i canali VOC ed effetti stimolanti mediati dall'attivazione dei recettori dei canali di rilascio del Ca^{2+} (RyR) (Xu *et al.*, 1999).

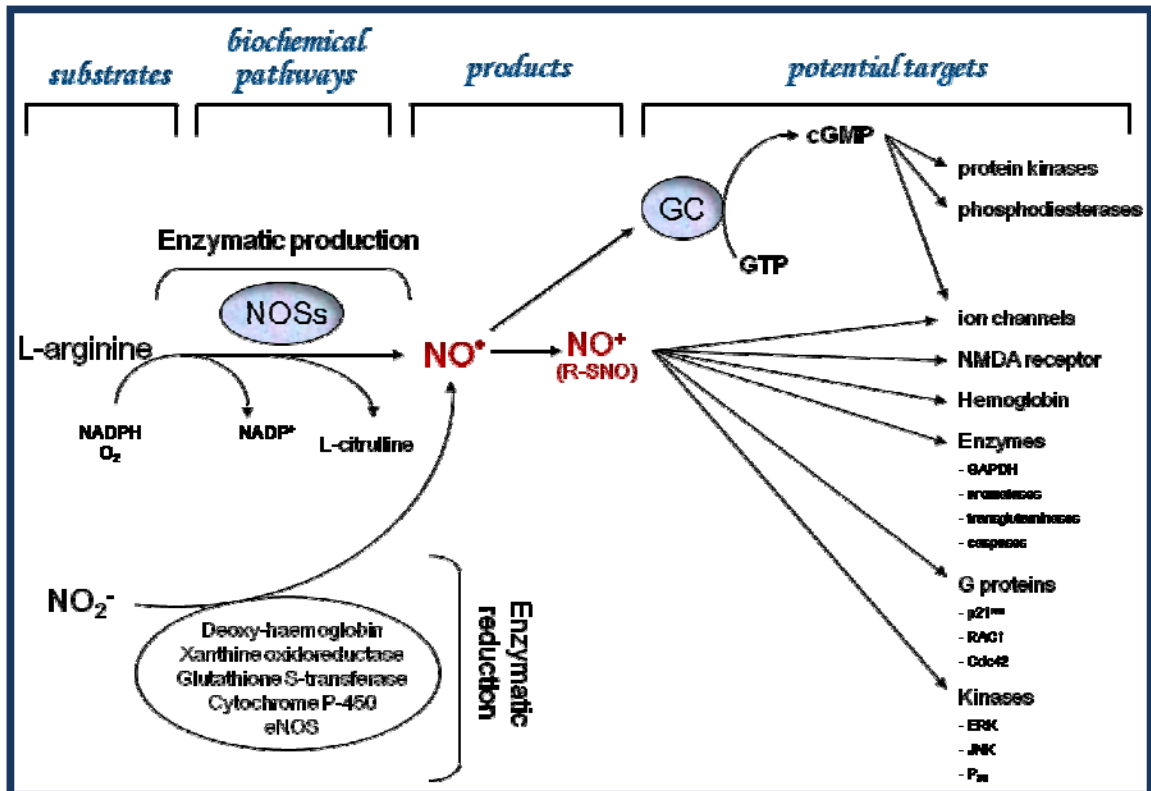


Fig.3. Schema riassuntivo dei meccanismi di sintesi e dei target dello NO

PARTE 1

***Temperatura e modulazione NO-dipendente della risposta di
Frank-Starling nel teleosteo Anguilla anguilla***

1. INTRODUZIONE

Una delle caratteristiche che contraddistingue i teleostei è la straordinaria variabilità morfo-funzionale cardiaca che si manifesta nell'adattamento evolutivo a mutevoli condizioni ambientali e fattori biologici, come carenza di cibo, maturazione sessuale e attività fisica (Gamperl e Farrell, 2004). In particolare, i pesci possiedono una sorprendente capacità di adattamento cardiaco a variazioni stagionali di temperatura (Hazel e Posser, 1974; Cossins e Bowler, 1987) e, alla pari di altri ectotermi, sono capaci di fronteggiare l'effetto di tali variazioni su processi fisici e reazioni enzimatiche mediante meccanismi di acclimatazione (Driedzic e Gesser, 1994; Gamperl e Farrell, 2004). Questo richiede una grande plasticità fisiologica, ottenuta attraverso l'espressione, temperatura-dipendente, di differenti isoforme di una stessa proteina, o di proteine relativamente insensibili ai cambiamenti termici (Driedzic e Gesser, 1994; Johnson e Bennett, 1995; Wakeling et al., 2000; Johnston e Temple, 2002; Rosenthal e Bezanilla, 2002; Vornanen et al., 2002a; Watabe, 2002).

Accanto alle graduali e prevedibili variazioni termiche stagionali, molte specie di pesci vanno incontro a variazioni termiche acute, dovute per esempio alla discesa in acque più profonde o all'escursione termica che si verifica tra il giorno e la notte, responsabili di rapide variazioni della temperatura corporea, con effetti immediati sulla funzione cardiaca (Klaiman et al., 2011). Per esempio, nella trota (*Oncorhynchus mykiss*), il controllo della frequenza cardiaca (HR) dipende principalmente dal tono inibitorio colinergico, a basse temperature, e dal tono eccitatorio adrenergico, a temperature più alte (Wood et al., 1979).

Nonostante molti aspetti della funzionalità cardiaca dei pesci siano stati studiati in relazione all'acclimatazione, e molti cambiamenti morfo-funzionali siano stati riportati in funzione dei cambiamenti termici (Gamperl e Farrell, 2004), i meccanismi specifici responsabili delle

risposte cellulari e molecolari del cuore di pesce allo stress termico non sono stati ancora del tutto chiariti.

L'anguilla d'acqua dolce (*A. anguilla*) rappresenta un ottimo modello sperimentale per lo studio delle influenze delle oscillazioni termiche sulla funzione cardiaca. Infatti, il complesso ciclo vitale dell'anguilla è caratterizzato da lunghissime migrazioni (circa 5000-6000 km) dalle coste dell'Europa alle zone di riproduzione nel Mar dei Sargassi (*Van Ginneken et al., 2005*), durante le quali l'animale sperimenta considerevoli escursioni termiche (*Tesch, 2003*). E' pertanto verosimile ipotizzare che i meccanismi di adattamento cardiaco alle variazioni termiche giochino un ruolo fondamentale per la sopravvivenza di questo animale.

Un meccanismo cruciale per la modulazione della performance meccanica del cuore dei pesci è la risposta di Frank-Starling, meccanismo che permette al miocardio di rispondere ad incrementi della pressione di riempimento con contrazioni più vigorose, che determinano aumenti del volume sistolico (Stroke Volume, SV) e, quindi, della gittata cardiaca (Cardiac Output, CO). La notevole sensibilità del cuore di pesce agli incrementi di precarico è stata attribuita ad una elevata estensibilità del miocardio, associata alla capacità di mantenere gli aumenti di sensibilità dei mio-filamenti al calcio in un ampio range di lunghezze del sarcomero (*Di Maio e Block 2008; Shiels et al., 2006*).

Il nostro gruppo di lavoro ha precedentemente dimostrato che, nell'anguilla, il sistema NOS/NO svolge un ruolo cardio-modulatorio fondamentale, facilitando il rilassamento miocardico, la distensibilità diastolica ventricolare e, di conseguenza, la risposta di Frank-Starling (*Garofalo et al., 2009*). In questo contesto, scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare i meccanismi di adattamento del cuore di anguilla a variazioni di temperatura con particolare riferimento al ruolo del sistema NOS/NO. In particolare, mediante l'utilizzo di

preparati di cuore isolato e perfuso, in cui la pressione di riempimento e la frequenza cardiaca possono essere finemente controllati, sono stati valutati gli effetti delle variazioni di temperatura sulla modulazione NOS/NO dipendente della risposta di Frank-Starling. A tale scopo la risposta di Frank-Starling è stata analizzata a differenti temperature, sia in assenza che in presenza dell'inibitore della NOS L-N5(1-iminoethyl)ornithine (L-NIO). Sono stati inoltre valutati i livelli proteici dell'enzima eNOS e della proteina partner Akt (proteina chinasi principale responsabile della fosforilazione della eNOS) (Dimmler et al., 1999) e della proteina Hsp-90 (importante intermediario tra fattori di stress e risposte cellulari adattative). I risultati ottenuti indicano che, mentre nei pesci acclimatati l'inibizione della NOS induce una significativa riduzione della risposta di Frank-Starling, confermando precedenti evidenze sperimentali (Garolafo et al., 2009; Imbrogno et al., 2011), in condizioni di variazioni termiche acute, il pre-trattamento con L-NIO non induce alcun effetto. Tali evidenze fisiologiche sono supportate da una significativa riduzione dell'espressione delle proteine p-eNOS e p-Akt e da un incremento di espressione dell'Hsp-90, in condizioni di shock termico. Nell'insieme questi risultati evidenziano la sensibilità del sistema NOS/NO ad acute variazioni di temperatura.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Animali

Per la realizzazione del presente lavoro sono stati utilizzati esemplari di anguilla europea d'acqua dolce (*A. anguilla*), con un peso di 76.5 ± 1.8 g (media \pm SEM, N = 75). I pesci sono stati forniti da un vivaio locale, in cui sono stati tenuti per almeno 1-2 mesi. Gli esperimenti sono stati effettuati in primavera ed in inverno. Gli animali invernali e primaverili sono stati mantenuti alla stessa temperatura del vivaio (ovvero 10°C per gli animali invernali e 20° per gli animali primaverili), per almeno 15-20 giorni prima degli esperimenti. Entrambi i gruppi di animali sono stati utilizzati per effettuare esperimenti alla temperatura di 10, 15 e 20°C. Gli animali sono stati anestetizzati con MS-222 (tricaine methane sulfonate, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Gli esperimenti sono stati organizzati in maniera da ridurre al minimo lo stress ed il numero di animali utilizzati.

2.2 Preparato di cuore isolato e perfuso

Dissezione ed isolamento del cuore

Gli animali sono stati anestetizzati e, dopo despinalizzazione, aperti ventralmente lungo la linea longitudinale mediana, dietro le pinne pettorali. Sono stati eliminati la muscolatura ventrale, il pericardio ed i legamenti che lo uniscono al cuore. Sono stati quindi effettuati due tagli, il primo in corrispondenza dell'aorta, ad una distanza di circa 2-3 mm dalla sua origine dal bulbo, ed il secondo a livello del seno venoso. Il cuore così espantato è stato posto in una capsula Petri, riempita di soluzione fisiologica (Ringer), e dotata di due cannule temporaneamente fissate sul fondo della capsula, per permettere l'incannulazione dell'aorta

(cannula di output) e del seno venoso (cannula di input). Al termine della procedura di isolamento, che richiedeva circa 15 min, il cuore è stato collegato all'apparato di perfusione (Imbrogno et al., 2001).

Apparato di perfusione

In figura 1 (**Fig. 1**) è schematizzato l'apparato di perfusione del cuore di anguilla. Il sistema è costituito da una pompa peristaltica, una camera di perfusione e due serbatoi, uno di ingresso ed uno di uscita. Il ringer è contenuto in un serbatoio esterno dal quale viene prelevato mediante ausilio di una pompa peristaltica, ed attraverso il serbatoio di ingresso raggiunge la cannula inserita nel seno venoso. Il perfusato, pompato dal cuore, si raccoglie nel serbatoio d'uscita.

La camera di perfusione è costituita da un contenitore in plexiglas di sezione rettangolare, che presenta tre vie di comunicazione con l'esterno: una via di ingresso collegata alla cannula inserita nel seno venoso, una via di uscita collegata alla cannula inserita nel bulbo, ed una terza via che permette di misurare la pressione interna della camera.

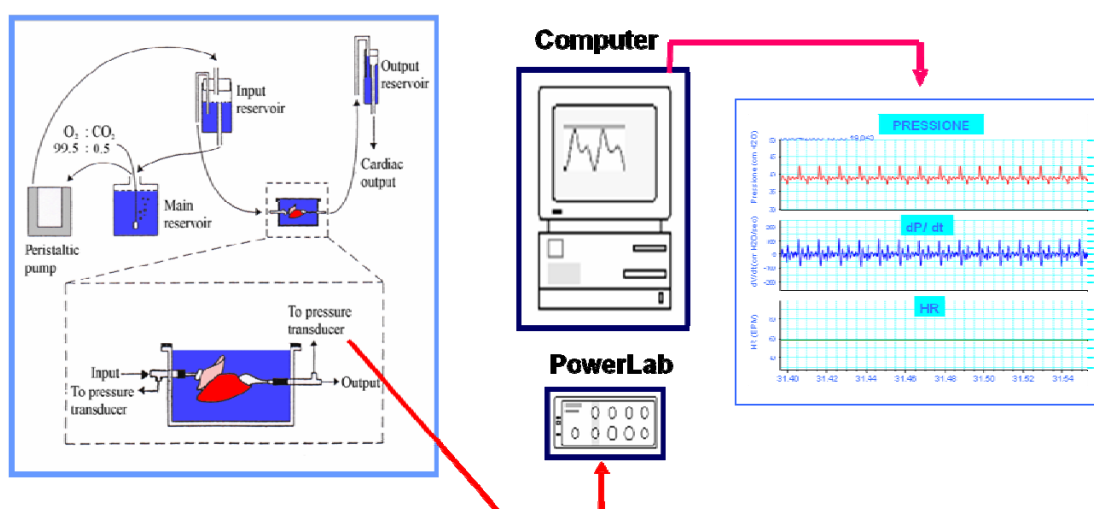


Fig.1. Schema dell'apparato di perfusione del cuore di teleosteo (Imbrogno et al., 2001).

I parametri emodinamici sono stati calcolati attraverso un trasduttore di pressione di tipo MP-20D (Micron Instruments, Simi Valley, CA, USA), connesso ad un sistema di acquisizione dati PowerLab, ed analizzati mediante un software Chart (ADInstruments, Basile, Italy) (**Fig. 1**). La frequenza cardiaca (HR) è stata calcolata dalle curve di pressione. La gittata cardiaca (Cardiac Output: CO) è stata determinata mediante misurazione del volume di perfusato raccolto in un minuto nel serbatoio di uscita; i valori sono stati corretti tenendo conto della densità del ringer, ed espressi come misure di volume (mL/min/kg di peso corporeo). Il volume sistolico (SV, CO/HR) è stato usato come misura della performance ventricolare.

Per escludere eventuali effetti di variazioni di frequenza nell'analisi delle curve di Starling, i preparati sono stati elettricamente stimolati. A tale scopo sono stati utilizzati due elettrodi, posti vicino al cuore, e connessi ad uno stimolatore elettrico LE 12006. La frequenza è stata mantenuta al valore fisiologico di circa 50 battiti al minuto (*Imbrogno et al., 2001, 2010*).

Composizione della soluzione fisiologica (Ringer)

NaCl:	6.68 g/L
KCl:	0.15 g/L
KH ₂ PO ₄ :	0.05 g/L
MgSO ₄ :	0.35 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	0.05 g/L
Na ₂ HPO ₄ :	0.227 g/L
Glucosio:	1 g/L
CaCl ₂ :	0.14 g/L

Il Ringer è stato gassificato con una miscela costituita da O₂ e CO₂ al 99.5 : 0.5% (Davie et al., 1992); il pH è stato stabilizzato ad un valore compreso tra 7.7 e 7.9 mediante aggiunta di NaHCO₃ (circa 1g/L).

2.3 Protocolli sperimentali

Condizioni basali

La perfusione è stata avviata, in condizioni basali, per un periodo di circa 15-20 minuti, necessari per permettere la stabilizzazione della performance cardiaca. In tutti gli esperimenti le condizioni basali di perfusione erano: post-carico diastolico pari a 3 kPa, precarico tale da indurre una gittata cardiaca di 10-12 ml/min/kg di peso corporeo. Questi valori rientrano nel range fisiologico (Imbrogno et al., 2001, 2006). Tutti i parametri, ovvero frequenza cardiaca, pressione di entrata, gittata cardiaca e volume sistolico, sono stati misurati contemporaneamente durante gli esperimenti.

Risposta di Frank-Starling

Per valutare la risposta del cuore agli incrementi di preload, dopo aver settato la temperatura specifica e stabilizzato il cuore alle condizioni basali di perfusione, la pressione di riempimento è stata gradualmente aumentata (di 0.1kPa per ogni incremento), fino al massimo CO (ottenuto ad un valore di pressione di ingresso pari a circa 0.6kPa). Ulteriori incrementi di preload compromettono significativamente la funzionalità cardiaca, riducendo il CO (Cerra et al., 2004). La pressione di riempimento è stata quindi riportata al valore basale, ed è stata generata una seconda curva. In un secondo set di esperimenti, la seconda curva di Starling è stata generata in presenza dell'inibitore della NOS, L-NIO. I parametri cardiaci sono stati

valutati dopo 5-7 minuti da ogni incremento di pressione di input effettuato. La pressione di output è stata mantenuta al valore costante di 3 kPa. Il fattore tempo è stato escluso da precedenti studi (*Imbrogno et al., 2001, 2003*).

Western Blotting ed analisi densitometrica

Al fine di analizzare l'influenza delle variazioni termiche sull'espressione di eNOS, Akt ed Hsp-90, sono stati collezionati preparati di cuore di anguilla in 4 differenti condizioni: 1) animali primaverili, perfusione a 20°C; 2) animali invernali, perfusione a 10°C; 3) animali primaverili, perfusione a 10°C; 4) animali invernali, perfusione a 20°C. Alla fine di ogni esperimento i campioni di ventricolo (n=3 per ogni condizione) sono stati immediatamente immersi in azoto liquido e conservati a -80°C. Come precedentemente descritto da Amelio e collaboratori (*Amelio et al., 2006*), i tessuti sono stati immersi in buffer Tris-HCl (30mM; pH 7,4) ghiacciato, contenente EGTA (15 µM), EDTA (10 µM), dithiothreitol (5 µM), pepstatin-A (0.01 µM), PMSF (1 µM), leupeptin-A (0.02 µM), benzamidine (0.1 µM) e BH₄ (0.1 µM). I ventricoli sono stati successivamente omogenati utilizzando un Ultra Turrax a 22,000 rpm (3×10 s), e centrifugati a 105,000 g, per 60 min a 4 °C. Una quantità di sovrantante contenente 100 µg di proteina è stata scaldata per 5 minuti in sample buffer Laemmli (Fluka), le proteine sono state separate tramite SDS-PAGE utilizzando un gel 8% in cameretta Bio-Rad Mini Protean-III e poi trasferite su membrana PVDF (polyvinylidene difluoride membrane) (Hybond-P, Amersham) grazie all'ausilio di un mini trans-blot (Bio-Rad). I siti ancora liberi presenti sulla membrana sono stati bloccati con un buffer TBS-T contenente il 5% di latte in polvere. I blot sono stati successivamente incubati, per tutta la notte a 4°C, con anticorpi "rabbit" diretti contro eNOS (Sigma), β-actina, pAkt 172 (Ser 473) ed Akt (Santa Cruz Biotechnology), a con anticorpi "goat" diretti contro la forma fosforilata dell'enzima, p-eNOs (Ser 1177) e Hsp-90 (Santa Cruz) (*Amelio et al., 2006, 2008; Di Felice et al., 2007; Garofalo et al., 2009, 2012; Angelone et al., 2010*), tutti

diluiti 1:500 in buffer TBS-T contenente il 5% di albumina di siero bovino (BSA). Gli anticorpi secondari legati alla perossidasi (anti rabbit o anti-goat) sono stati diluiti 1:5000 in una soluzione di TBS-T contenente il 5% di latte in polvere senza grassi. L'immunorilevazione è stata eseguita utilizzando un kit di chemiluminescenza avanzata (ECL PLUS, Amersham), e l'autoradiografia è stata ottenuta tramite esposizione a pellicola per raggi X (Hyperfilm ECL, Amersham). Gli immunoblot sono stati digitalizzati utilizzando per l'analisi densitometrica delle bande il programma WCIF Image J, il quale si basa su 256 tonalità di grigi (0=bianco, 256=nero).

La quantificazione dei blots è stata ottenuta misurando (5 volte per ogni banda) la densità ottica di un'area quadrata della banda presa in considerazione. I dati sono espressi come media \pm SEM. La normalizzazione è stata effettuata sottraendo il valore di background da ogni misurazione.

2.4 Statistica

I risultati ottenuti dagli esperimenti fisiologici sono stati espressi come media \pm SEM delle variazioni percentuali ottenute dai singoli esperimenti. Il confronto tra le curve di Frank-Starling è stato effettuato utilizzando l'analisi ANOVA a due vie (two-way ANOVA); la significatività è stata determinata utilizzando il test di Duncan (* $p < 0.05$).

I risultati delle misure di assorbanza dei valori di grigio ottenuti dall'analisi densitometrica sono stati espressi come media \pm SEM delle determinazioni di ogni campione. Il test ANOVA ad una via seguito dal confronto multiplo di Bonferroni ha permesso di determinare la significatività delle differenze ottenute dai valori medi (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3. RISULTATI

3.1 Effetto delle variazioni termiche sulla risposta di Frank-Starling

La prima parte del lavoro ha riguardato la valutazione delle influenze di variazioni acute di temperatura sulla risposta del cuore di anguilla ad incrementi di preload. A tale scopo abbiamo utilizzato cuori non trattati di animali invernali e primaverili per generare doppie curve di Starling, in presenza ed in assenza di shock termico. Quando esposti ad incrementi di preload (da 0.2 a 0.6 kPa), i cuori di entrambi i gruppi di animali sono risultati particolarmente sensibili alla pressione di riempimento, mostrando una analoga risposta di Frank-Starling (**Fig. 2**). I massimi valori di SV [0.46 ± 0.03 , 0.50 ± 0.05 , 0.67 ± 0.01 mLkg⁻¹ di peso corporeo (animali primaverili perfusi alla temperatura di 10, 15 e 20 °C, rispettivamente), e 0.59 ± 0.05 , 0.52 ± 0.05 , 0.52 ± 0.01 mLkg⁻¹ di peso corporeo (animali invernali perfusi a 10, 15, and 20°C, rispettivamente)] sono stati ottenuti ad una pressione di input di 0.6kPa. I valori basali sono riportati in Tabella 1.

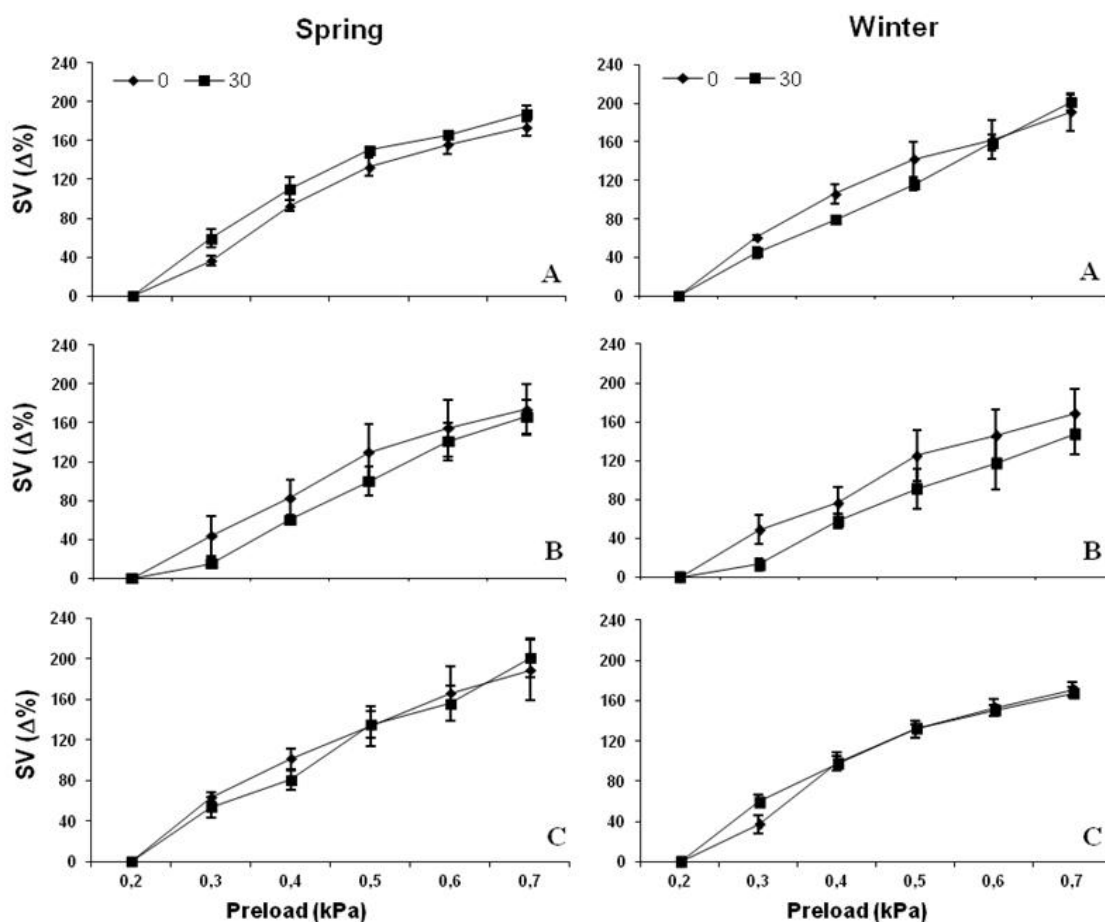


Fig. 2. Sinistra: effetti dell'aumento di precarico sullo SV alla temperatura sperimentale di 10 °C (A), 15 °C (B), e 20 °C (C) negli animali primaverili (temperatura di acclimatazione 20 °C). Destra: effetti dell'aumento di precarico sullo SV alla temperatura sperimentale di 10 °C (D), 15 °C (E) e 20 °C (F) negli animali invernali (temperatura di acclimatazione 10 °C). Le variazioni percentuali sono state valutate come $media \pm SEM$ ($n=4-5$ per tutte le condizioni sperimentali). Le due curve rappresentano il controllo basale a 0 minuti e a 30 minuti.

	[A]	[B]	[C]	[D]	[E]	[F]
Stroke volume $mLkg^{-1}$	0.21 ± 0.004	0.22 ± 0.005	0.23 ± 0.006	0.21 ± 0.006	0.23 ± 0.003	0.24 ± 0.004

Tab.1. Valori basali di SV di cuori di animali primaverili perfusi alla temperatura di 10 (A), 15 (B) e 20 °C (C) e di animali invernali perfusi alla temperatura di 10 (D), 15 (E) e 20 °C (F).

3.2 Effetto delle variazioni termiche sulla modulazione NO-dipendente della risposta di Frank-Starling

Recenti evidenze sperimentali hanno evidenziato il ruolo dello NO nella modulazione della risposta del cuore di anguilla agli incrementi di precarico. Infatti, il trattamento con l'inibitore della NOS, L-NIO, induce una significativa riduzione della risposta di Frank-Starling (*Imbrogno et al., 2001; Garofalo et al., 2009*). Allo scopo di valutare l'influenza della temperatura sulla modulazione nitrgica della risposta di Frank-Starling, animali primaverili (temperatura di acclimatazione: 20°C) ed animali invernali (temperatura di acclimatazione: 10°C) sono stati utilizzati per eseguire esperimenti a 10, 15 e 20°C.

Negli animali primaverili (temperatura di acclimatazione: 20°C), il pretrattamento con L-NIO ha significativamente ridotto la risposta di Starling quando l'esperimento era effettuato alla stessa temperatura di acclimatazione (**Fig. 3C**). Al contrario, il trattamento con L-NIO non ha indotto alcun effetto quando la temperatura di perfusione era fissata a 10 o 15°C (**Fig. 3A-B**). Questo suggerisce che nel cuore di anguilla la modulazione NO-dipendente della risposta di Starling è abolita da acute variazioni di temperatura. I risultati ottenuti con gli animali invernali (temperatura di acclimatazione: 10°C) hanno mostrato che, quando l'esperimento era effettuato alla stessa temperatura di acclimatazione, il trattamento con L-NIO induceva una significativa riduzione della risposta di Starling (**Fig. 3D**), con un trend simile a quello osservato quando la risposta di Starling era analizzata alla temperatura sperimentale di 20°C utilizzando animali primaverili (**Fig. 3C**). Al contrario, quando l'esperimento era effettuato a 15 o 20°C (**Fig. 3E-F**), il trattamento con L-NIO non ha mostrato alcun effetto, confermando che nell'anguilla variazioni acute di temperatura aboliscono la modulazione NO-dipendente della risposta di Frank-Starling. I valori basali di SV sono riportati in Tabella 2.

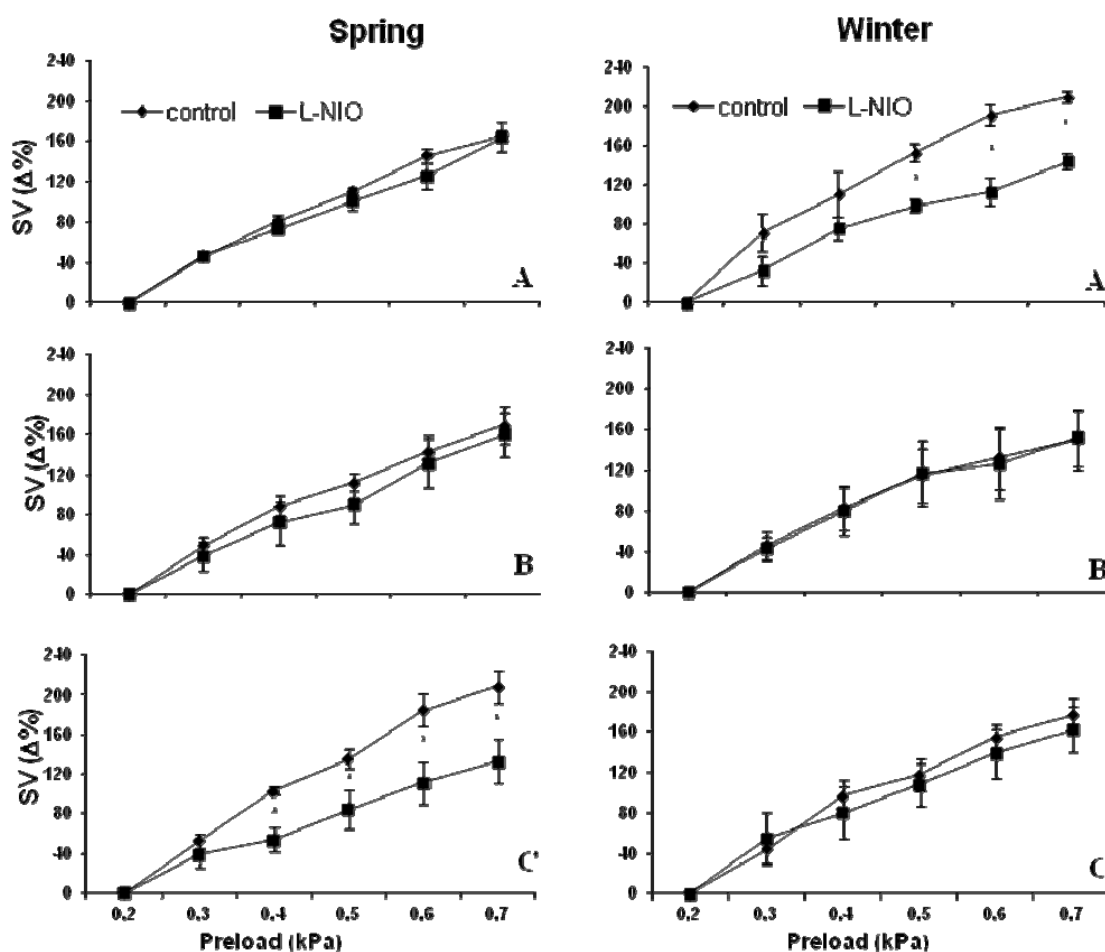


Fig. 3. Effetti dell'aumento di precarico sullo SV alle temperature sperimentali di 10 °C (A), 15 °C (B) e 20 °C (C) negli animali primaverili (temperatura di acclimatazione 20 °C) e negli animali invernali (D,E,F) (temperatura di acclimatazione 10 °C), prima e dopo trattamento con L-NIO ($10^{-5}M$). Le variazioni percentuali sono state valutate come $media \pm SEM$ ($n=4-5$ per tutte le condizioni sperimentali). Le differenze statistiche fra i gruppi sono state calcolate utilizzando l'analisi ANOVA a due vie; * $p<0.05$.

	[A]	[B]	[C]	[D]	[E]	[F]
Stroke volume $mLkg^{-1}$	0.21 ± 0.006	0.2 ± 0.002	0.21 ± 0.006	0.24 ± 0.008	0.25 ± 0.01	0.21 ± 0.02

Tab.2. Valori basali di SV di cuori di animali primaverili perfusi alla temperatura di 10 (A), 15 (B) e 20 °C (C) e di animali invernali perfusi alla temperatura di 10 (D), 15 (E) e 20°C (F) prima del trattamento con L-NIO.

3.3 Western Blotting

Le analisi di Western Blotting hanno evidenziato la presenza di bande immunoreattive corrispondenti ai pesi molecolari di eNOS (135 kDa), peNOS (140 kDa) (**Fig. 4**), Akt (60 kDa), pAkt (60 kDa) (**Fig. 5**), e Hsp90 (90kDa) (**Fig. 6**). Al fine di valutare l'attività enzimatica, l'espressione proteica di p-eNOS e di pAkt è stata normalizzata su Western Blotting effettuati sugli stessi estratti incubati con anticorpi per le forme non fosforilate delle due proteine, ovvero eNOS e Akt (**Fig. 4-5**). Il pattern di espressione di tutte le proteine prese in esame non ha mostrato alcuna differenza tra i preparati di cuore di animali primaverili acclimatati a 20°C e quelli di animali invernali acclimatati a 10°C, per cui si è deciso di utilizzare come controllo cuori di animali primaverili perfusi a 20°C.

I risultati ottenuti mostrano una significativa riduzione dell'espressione della p-eNOS in entrambe le condizioni di shock termico [animali invernali; perfusione a 20°C (L2), ed animali primaverili; perfusione a 10°C (L3)], rispetto agli animali di controllo [animali primaverili; perfusione a 20°C (L1)], mentre non sono state osservate differenze significative tra i cuori di animali primaverili perfusi a 10°C e di animali invernali perfusi a 20°C (**Fig. 4**).

L'analisi dell'espressione proteica del rapporto pAkt/Akt ha rivelato un trend analogo a quello del rapporto p-eNOS/eNOS. Nessuna significativa differenza è stata infatti osservata tra i campioni di animali invernali perfusi a 20°C (L2) ed animali primaverili perfusi a 10°C (L3), mentre si evince una significativa riduzione dei livelli proteici di pAkt in entrambe queste condizioni rispetto al controllo (**Fig. 5**).

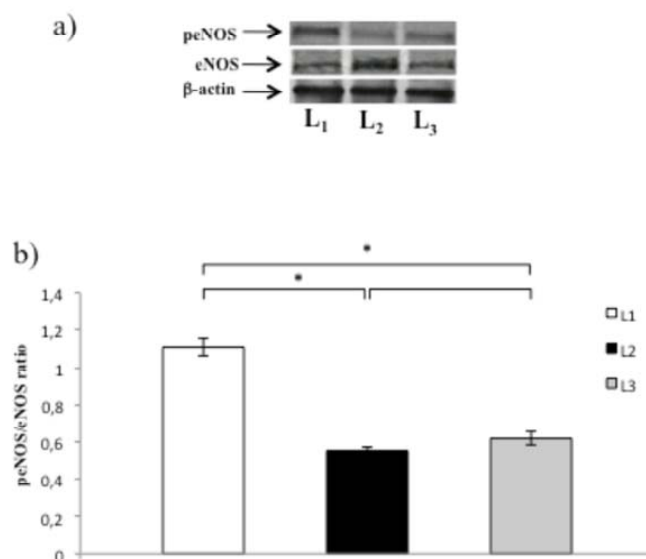


Fig. 4. (a) Western blotting di p-eNOS e eNOS in omogenati di cuore di animali primaverili perfusi a 20 °C (L1), animali invernali perfusi a 20°C (L2) ed animali primaverili perfusi a 10 °C (L3). Come controllo proteico è stata utilizzata la β -actina. La quantificazione densitometrica degli immunoblots (b) è espressa come rapporto p-eNOS/eNOS. Le variazioni sono state valutate come media \pm SEM di 5 esperimenti per ogni gruppo. La significatività è stata assegnata con il test ANOVA ad una via; *= p<0.05.

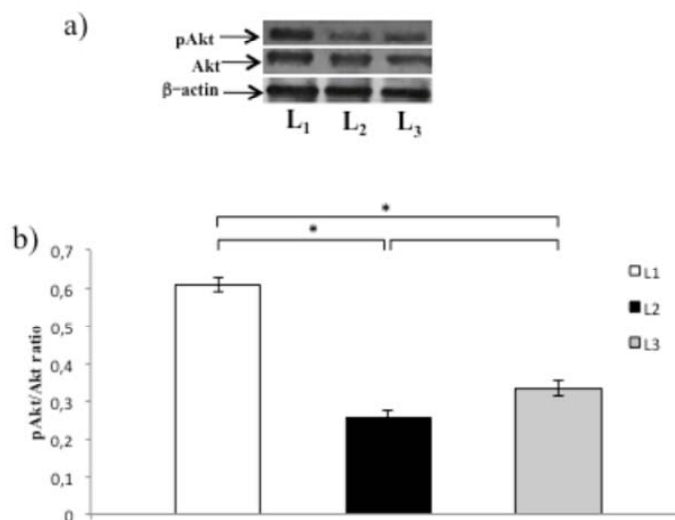


Fig. 5. (a) Western blotting di p-Akt e Akt in omogenati di cuore di animali primaverili perfusi a 20 °C (L1), animali invernali perfusi a 20°C (L2) ed animali primaverili perfusi a 10 °C (L3). Come controllo proteico è stata utilizzata la β -actina. La quantificazione densitometrica degli immunoblots (b) è espressa come rapporto p-Akt/Akt. Le variazioni sono state valutate come media \pm SEM di 5 esperimenti per ogni gruppo. La significatività è stata assegnata con il test ANOVA ad una via; *= p<0.05.

L'espressione di Hsp-90, proteina sensibile alle elevate temperature, è risultata significativamente aumentata in campioni di animali invernali perfusi a 20°C (L2) rispetto agli animali di controllo (L1), mentre nessuna differenza è stata osservata tra il controllo ed i campioni di animali primaverili perfusi a 10°C. Inoltre, questi ultimi hanno mostrato un significativa riduzione dell'intensità della banda corrispondente a Hsp-90 rispetto ai campioni di animali invernali perfusi a 20°C (shock termico positivo) (**Fig. 6**).

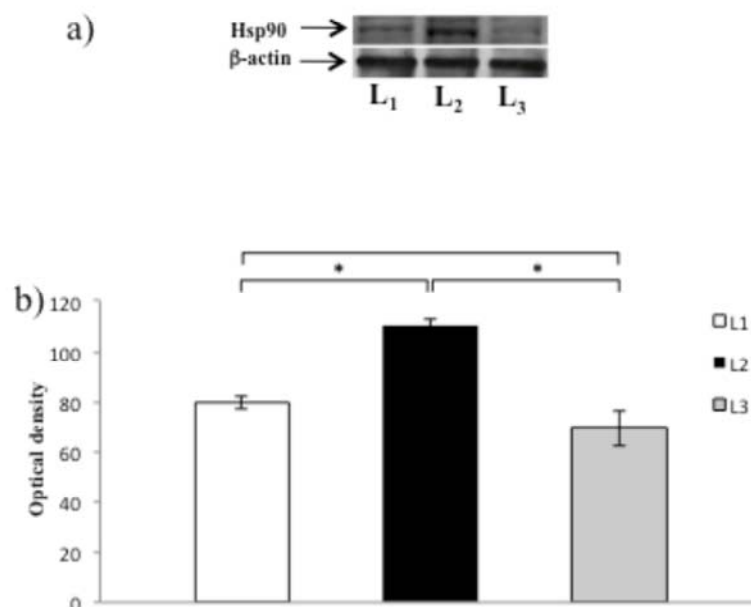


Fig. 6. (a) Western blotting di Hsp90 in omogenati di cuore di animali primaverili perfusi a 20 °C (L1); animali invernali perfusi a 20°C (L2) ed animali primaverili perfusi a 10 °C (L3). Come controllo proteico è stata utilizzata la β -actina. La quantificazione densitometrica degli immunoblots è indicata in figura b. Le variazioni sono state valutate come media \pm SEM di 5 esperimenti per ogni gruppo. La significatività è stata assegnata con il test ANOVA ad una via; *= $p < 0.05$.

4. DISCUSSIONE

Il presente lavoro di tesi ha evidenziato, per la prima volta in letteratura, la sensibilità termica della modulazione nitrgica del meccanismo di Frank-Starling nel cuore del teleosteo *A. anguilla*.

Nei pesci, la relazione tra temperatura e risposta di Frank-Starling non è stata finora analizzata. Tuttavia, è risaputo che nei pesci che sperimentano continue escursioni termiche (ad esempio, per cacciare o per sfuggire ai predatori), l'abilità del muscolo cardiaco di mantenere la corretta funzionalità durante acute variazioni di temperatura è essenziale per la sopravvivenza (trota: *Matthews e Berg, 1997; Reid et al., 1997*; salmone: *Brett, 1971*; blue marlin: *Block et al., 1992*; tonno: *Block et al., 1997*). In vari teleostei, inclusi la trota (*Oncorhynchus mykiss*) e la carpa (*Cyprinus carpio*), variazioni acute di temperatura influenzano la contrattilità e la frequenza cardiaca, quest'ultima inversamente correlata alla forza isometrica prodotta (*Shiels et al., 2002*). Questa relazione, definita "staircase effect" o "relazione forza-frequenza" (*Bowditch, 1871*), limitando l'aumento di output cardiaco mediante aumento della frequenza spiega perché, a differenza dei mammiferi, nei pesci i cambiamenti di CO siano dovuti principalmente a cambiamenti dello SV piuttosto che della frequenza (*Farrell e Jones, 1992; Tota e Gattuso, 1996; Olson, 1998*). Il preparato di cuore elettricamente stimolato utilizzato per il presente studio, lavorando a frequenza costante, esclude le eventuali influenze della temperatura sulla frequenza cardiaca, permettendo l'analisi degli effetti diretti della temperatura sull'aumento di SV indotto da incrementi di preload.

Utilizzando lo stesso preparato, il gruppo di ricerca di Fisiologia d'Organo dell'Unical, ha dimostrato il ruolo dello NO nel modulare la sensibilità del cuore di anguilla agli incrementi della pressione di riempimento (*Imbrogno et al., 2001; Garofalo et al., 2009*); ciò avviene

attraverso attivazione pAkt-dipendente della eNOS, con conseguente aumento della produzione di NO che, a sua volta, modula il recupero di calcio dal reticolo sarcoplasmatico (Garofalo et al., 2009). Questa modulazione NO-dipendente del meccanismo di Starling è stata confermata dal presente studio, attraverso gli esperimenti condotti alla stessa temperatura di acclimatazione (20°C per gli animali primaverili e 10°C per gli animali invernali). Il mantenimento della modulazione nitrgica della risposta di Frank-Starling durante il processo di acclimatazione fisiologica a differenti temperature enfatizza il ruolo chiave dello NO nel permettere una adeguata funzionalità cardiaca. Tuttavia, i nostri risultati mostrano che, nel cuore di anguilla, la modulazione nitrgica della risposta di Frank-Starling è abolita in condizioni di shock termico. Questo è evidenziato dalla riduzione della risposta di Starling osservata in condizioni di shock termico e confermata dal trattamento con l'inibitore della NOS (L-NIO), che è risultato incapace di esercitare i suoi effetti quando la perfusione era condotta a temperature diverse (sia maggiori che minori) da quella di acclimatazione.

Il mantenimento di una appropriata funzionalità cardiaca richiede profonde modificazioni compensatorie in termini di massa cardiaca, metabolismo energetico e controllo umorale della contrattilità cardiaca (Keen et al., 1993; Keen et al., 1994; Driedzic et al., 1996; Aho e Vornanen, 1999; Vornanen et al., 2002b). Questo rimodellamento cardiaco richiede cambiamenti quantitativi e qualitativi a carico di migliaia di molecole che costituiscono il fenotipo cardiaco (per l'anguilla vedi Cerra et al., 2004). Ad esempio, nei pesci d'acqua dolce, l'acclimatazione al freddo modifica la conduttanza dei canali per il potassio (K^+), e riduce la durata del potenziale d'azione (Galli et al., 2009; Haverinen e Vornanen, 2009). Inoltre, nella trota *Oncorhynchus mykiss*, l'acclimatazione al freddo aumenta l'attività dei recettori per la rianodina durante la contrazione isometrica cardiaca (Aho e Vornanen, 1999; Keen et al., 1994; Shiels e Farrell, 1997) e l'attività delle pompe SERCA (Aho e Vornanen, 1998). I risultati ottenuti

nel presente lavoro permettono di includere il sistema NOS/NO nel *network* di segnali temperatura-dipendenti fondamentali per permettere il mantenimento dell'omeostasi cardiaca a temperature fisiologiche. Tale ipotesi è supportata dall'analisi dei livelli proteici dell'enzima eNOS, che evidenzia una riduzione della forma attivata dell'enzima in omogenati di cuori esposti ad acute variazioni di temperatura rispetto ai controlli (cioè cuori che lavorano alla stessa temperatura di acclimatazione). La perdita di attività enzimatica della eNOS in condizioni di shock termico, risulta associata ad una riduzione dell'espressione della p-Akt. E' noto che la serina-treonina kinesi Akt è in grado di fosforilare la eNOS sia *in vivo* che *in vitro* (Dimmeler et al., 1999), determinando un significativo incremento dell'attività enzimatica (McCabe et al., 2000). E' stato precedentemente riportato che, nel cuore di anguilla, la modulazione NO-dipendente della risposta di Frank-Starling coinvolge una fosforilazione della eNOS mediata dal pathway PI3K-Akt, come dimostrato dalla significativa riduzione della risposta di Frank-Starling dopo pre-trattamento con Wortmannina, inibitore della PI3K (Garofalo et al., 2009). Inoltre è stato dimostrato, in varie linee cellulari, murine ed umane, che lo stato di fosforilazione p-Ser473-PKB/Akt è strettamente dipendente dalla temperatura (Oehler-Jänne et al., 2008). La riduzione dei livelli proteici della forma fosforilata dell'Akt da noi osservata suggerisce che, nel cuore di anguilla, il meccanismo di attivazione della Akt è temperatura-dipendente. Questo, associato alla parallela riduzione della espressione della peNOS, suggerisce che, nel cuore di anguilla, lo shock termico impedisce l'attivazione della eNOS da parte della Akt, con conseguente riduzione della produzione di NO.

La sensibilità del cuore di anguilla a variazioni di temperatura è stata ulteriormente confermata dall'analisi dei livelli proteici di Hsp-90, che sono risultati aumentati in condizioni di shock termico "positivo", ovvero in cuori perfusi a temperature più alte rispetto a quella di acclimatazione (animali invernali; perfusione a 20°C). Le *Heat Shock Proteins* (Hsps)

costituiscono una famiglia di proteine responsive a condizioni di stress, universalmente prodotte da tutti gli organismi viventi in risposta a variazioni ambientali quali, ad esempio, aumenti della temperatura (*Lindquist e Craig, 1988; Lee et al., 1991*), condizioni di stress ossidativo (*Liao et al., 1994*), ed ischemia miocardica (*Benjamin e Williams, 1994*). In particolare Hsp-90, uno dei membri della famiglia delle Hsps, funge da fattore di protezione in condizioni di stress, agendo ad esempio sui meccanismi di aggregazione aspecifica e sulla denaturazione proteica (*Arad et al., 2010*). Queste funzioni fanno dell'Hsp-90 un fondamentale intermediario tra i fattori di stress e le risposte di adattamento cellulare, come nel caso delle variazioni ambientali e delle conseguenti risposte adattative. In risposta ad incrementi termici, le cellule di tutti gli organismi viventi rispondono, infatti, con una rapida trascrizione dei geni che codificano per le proteine della famiglia delle Hsps (*Locke e Noble, 1995*), indicando che lo stress causato da innalzamenti termici comporta l'immediata trascrizione dello mRNA di Hsp-90 al fine di proteggere le cellule. L'aumento della produzione di Hsp-90 nel cuore di anguilla in risposta ad innalzamento termico rafforza, anche nel cuore dei pesci, il ruolo protettivo di questa proteina nel preservare l'integrità morfo-funzionale miocardica in condizioni di stress termico.

5. CONCLUSIONI

In conclusione, il presente studio suggerisce che l'abolizione della modulazione NO-dipendente della risposta di Frank-Starling in condizioni di stress termico avviene attraverso la modulazione di proteine kinasi, designando la kinasi Akt come elemento termosensibile nella cascata che porta alla produzione di NO. Tuttavia, bisogna tenere in considerazione la possibilità che la temperatura eserciti anche un effetto diretto sulla struttura e sulla funzionalità delle isoforme enzimatiche della NOS. Infatti, l'enzima NOS è una ossido-reduttasi omodimerica contenente un gruppo eme porfirinico, il cui corretto funzionamento necessita di cofattori quali FAD, FMN e BH₄ (Knowles e Moncada, 1994; Stuehr et al., 2001; Moens e Kass, 2006). La forma dimerica si costituisce quando il dominio ossidasico di una delle due subunità lega il dominio reduttasico dell'altra, grazie all'intervento di una catena regolatoria peraltro responsabile del legame della calmodulina all'enzima. E' stato ampiamente dimostrato che solo la forma dimerica della NOS è enzimaticamente attiva e che varie condizioni di stress, che includono stress ipossico, ossidativo e rapide variazioni di temperatura, possono alterarne la stabilità (Tóth et al., 1998; Delgado-Esteban et al., 2002). Ulteriori studi sono attualmente in corso al fine di valutare in che misura questi meccanismi possano essere implicati nella sensibilità termica del sistema NOS/NO nel cuore di pesci.

PARTE 2

***Sistema NOS/NO e resistenza all'ipossia: il cuore di goldfish
come modello sperimentale***

1. INTRODUZIONE

Il cuore dei pesci è caratterizzato da una grande flessibilità morfo-funzionale in relazione a variazioni eco-fisiologiche ed evolutive. Questa caratteristica, esemplificata dalla relazione tra la mio-architettura della pompa ventricolare e la sua performance meccanica, è oggetto di grande interesse nello studio della morfo-dinamica cardiaca comparata (*Tota e Gattuso 1996; Cerra et al., 2004*). Numerosi studi hanno descritto l'organizzazione strutturale della camera cardiaca dei pesci anche in termini di performance cardiaca (*Santer, 1985; Satchell, 1991; Farrell e Jones, 1992; Burggren et al., 1997*). Sulla base della forma esterna, tre categorie di ventricolo sono state descritte per il cuore dei pesci: i) a sacco, arrotondato e dotato di un apice spuntato; ii) tubulare, a sezione cilindrica; iii) piramidale, a base triangolare (*Santer et al., 1983; Santer 1995*). Inoltre, l'arrangiamento della struttura miocardica permette di distinguere i ventricoli in ventricoli di "tipo 1", i quali mostrano una struttura completamente trabecolata e quindi totalmente avascolare, di "tipo 2", che presentano uno strato esterno compatto (*compacta*) e vascolarizzato, ed uno strato interno spugnoso (*spongiosa*), di "tipo 3", in cui si osserva la presenza di vasi sanguigni sia nello strato compatto che nello strato spugnoso, e di "tipo 4", a cui appartengono ventricoli prevalentemente formati da strato compatto e vascolarizzato (*Tota et al., 1983; Tota 1989; Farrell e Jones 1992*).

I pesci del genere *Carassius* rappresentano forme evolute di teleostei, ampiamente utilizzati come modello sperimentale per studi di evoluzione molecolare e genomica comparata (*Luo et al., 2006*), biologia cellulare (*Lee et al., 1997*), immunologia (*Hanington et al., 2006*) e neurobiologia (*Huesa et al., 2005; Preuss et al., 2006*). Sia il goldfish (*C. auratus*) che la carpa (*Crucian carp*) sono in grado di tollerare prolungati e severi stati ipossici, e di rimanere attivi anche quando le pozze d'acqua in cui vivono sono congelate (*Bickler e Buck 2007*). Ovviamente, questo richiede che l'apparato molecolare che sostiene la contrattilità miocardica

preservi la sua funzione. Anche molti rettili, ad esempio la tartaruga, manifestano una sorprendente abilità nel fronteggiare condizioni di acidosi conseguenti a stati anossici e/o ipossici. Nonostante la risposta finale sia analoga, le varie specie di pesci utilizzano differenti strategie per fronteggiare gli stati di acidosi. Per esempio il goldfish e la carpa sono in grado di prevenire l'acidosi lattica conseguente a stati anossici e/o ipossici convertendo il lattato ad etanolo e CO₂, entrambi eliminati attraverso le branchie (Bickler e Buck 2007). In questo contesto, il teleosteo *C. auratus* è stato finora considerato un prezioso modello sperimentale per lo studio dei meccanismi che permettono la sopravvivenza ed il mantenimento della funzionalità cardiaca in condizioni in cui la disponibilità di O₂ rappresenta un fattore limitante (Pedersen et al., 2010).

Nonostante i numerosi studi riguardanti la fisiologia ed il comportamento del goldfish e la sua notevole tolleranza all'anossia, i tratti basali morfologici e funzionali del suo cuore, così come i meccanismi di modulazione della performance cardiaca non sono ancora stati analizzati. Recenti studi hanno suggerito un coinvolgimento dello NO e dei nitriti nei meccanismi di adattamento del cuore a condizioni di ipossia (Pedersen et al., 2010; Hansen e Jensen, 2010), sebbene i meccanismi specifici non siano stati ancora chiariti. Pertanto, scopo di questo lavoro è stato quello di fornire una caratterizzazione morfo-funzionale del cuore di goldfish e di analizzare il ruolo del sistema NOS/NO nella modulazione della funzione cardiaca sia in condizioni di normossia che di ipossia.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Animali

Esemplari di *C. auratus* (n=40; peso 63.8 ± 19.8 g, media \pm SD), forniti da un allevamento ittico (COF SAS, Bologna, Italia), sono stati stabulati a temperatura ambiente (18-20°C) per 7-10 giorni, ed anestetizzati prima dell'inizio degli esperimenti con una dose di MS222 (tricaine methane sulfonate, Sigma-Aldrich Chemical Co., UK). Gli esperimenti sono stati organizzati in modo da ridurre al minimo lo stress ed il numero di animali utilizzati.

2.2 Esperimenti morfologici

I cuori, rimossi dalla cavità pericardica e lavati in PBS (phosphate-buffer saline) a pH 7.6, sono stati bloccati in diastole utilizzando un eccesso di KCl (0.5 g/L) e processati in accordo con le seguenti procedure.

Microscopia elettronica a scansione (SEM)

3 cuori, dissezionati longitudinalmente sotto uno stereo microscopio per esporre le valvole del cono, sono stati fissati per 3 h in PBS addizionato al 3% di glutaraldeide. Sono stati successivamente deidratati mediante passaggi consecutivi in concentrazioni crescenti di acetone, asciugati mediante "Critical Point Drying" e metallizzati mediante "Gold-Sputter-Coating". Le osservazioni e le acquisizioni delle immagini sono state effettuate utilizzando un microscopio a scansione Philips SEM 501.

Microscopia ottica

I cuori di 4 campioni sono stati fissati in MAW (metanolo-acetone-acqua, 2:2:1), deidratati mediante passaggi consecutivi in concentrazioni crescenti di etanolo, chiarificati in xilolo ed infine inclusi in paraffina (Sherwood, St. Louis, MO, USA), e sezionati a 8µm. Le sezioni sono state posizionate su vetrini Superfrost Plus (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germania). Alcune sezioni sono state colorate con ematossilina ed eosina per una valutazione generale della struttura tissutale, con Tricromica di Gomori per visualizzare il tessuto connettivo, con orceina per la rilevazione dell'elastina e con Sirius Red per evidenziare le fibre collagene. Inoltre, tre cuori sono stati fissati in PBS al 3% di glutaraldeide per 3 h, post-fissati in tetraossido di osmio allo 1%, deidratati in concentrazioni crescenti di acetone ed ossido di propilene, ed inclusi in Araldite (Fluka). Sono state tagliate, mediante microtomo Leica ultracut UCT sezioni semifini (1 µm), successivamente colorate con 1% di blu di toluidina, ed osservate al fotomicroscopio Zeiss III.

Immunofluorescenza

Per l'immunolocalizzazione della eNOS fosforilata (Ser 1177) le sezioni di cuore, ottenute come precedentemente descritto, sono state sparaffinate, reidratate, lavate in TBS ed incubate per 1h con BSA 1.5% in TBS. Sono state successivamente incubate per tutta la notte a 4°C con anticorpo policlonale anti p-eNOS sviluppato in "goat" (Ser 1177) (Santa Cruz Biotechnology) diluito 1:100. Per la rilevazione del segnale, dopo lavaggio in TBS (3x10 min) i vetrini sono stati incubati con anticorpo secondario IgG anti-goat coniugato con FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluito 1:100. I vetrini sono poi stati montati con mezzo di montaggio (Vectashield, Vector Laboratories) ed osservati al microscopio (Leica DMI 4000B). I controlli negativi sono

stati ottenuti su sezioni analoghe non incubate con anticorpo primario. I nuclei sono stati contro-colorati incubando le sezioni con Hoechst (Sigma, USA, 1:1000) per 5 minuti.

2.3 Esperimenti fisiologici

Preparati di cuore isolato e perfuso

I cuori sono stati incannulati, trasferiti in una camera di perfusione riempita con soluzione Ringer e connessi ad un apparato di perfusione analogo a quello descritto nella prima parte del presente lavoro di tesi. Tutti gli esperimenti sono stati condotti a temperatura ambiente (18-20°C). I parametri emodinamici sono stati misurati mediante un trasduttore di pressione MP-20D (Micron Instruments, Simi Valley, CA, USA) connesso ad un sistema di acquisizione dati PowerLab, ed analizzati mediante software Chart (ADInstruments, Basile, Italia). La frequenza cardiaca (Heart Rate: HR) è stata calcolata dalle curve di pressione. La gittata cardiaca (Cardiac Output: CO) è stata determinata mediante misurazione del volume di perfusato raccolto in un minuto nel serbatoio di uscita; i valori sono stati poi corretti tenendo conto della densità del ringer, ed espressi come misure di volume (mL/min/kg di peso corporeo). Il volume sistolico (SV, CO/HR) è stato usato come misura della performance ventricolare.

Composizione della soluzione fisiologica (Ringer)

NaCl: 124.9 g/L

KCl: 2.49 g/L

NaH₂PO₄: 1 g/L

MgSO₄: 0.94 g/L

Glucosio: 5 g/L

CaCl₂: 1.2 g/L

NaHCO₃: 15 g/L

Il Ringer normossico è stato gassificato con una miscela costituita da O₂ e CO₂ al 99.5 : 0.5% (Davie et al., 1992). Il ringer ipossico è stato invece gasificato con una miscela costituita da 10% O₂; 0.5% CO₂; 89.5% N₂ (Hansen e Jensen, 2010). Il pH è stato settato ad un valore compreso tra 7.7 e 7.9.

Condizioni basali

La perfusione è stata avviata, in condizioni basali, per un periodo di circa 15-20 minuti, necessari per permettere la stabilizzazione del preparato. Tutti i parametri cardiaci, ovvero frequenza cardiaca, pressione di entrata, gittata cardiaca e volume sistolico, sono stati misurati contemporaneamente durante gli esperimenti. I cuori che non si sono stabilizzati entro 20 minuti sono stati scartati.

Trattamento farmacologico

Dopo 15-20 minuti di perfusione in condizioni basali, necessari per la stabilizzazione, i cuori sono stati perfusi con ringer medicato: L-NMMA o Nitrito di Sodio. Su ogni cuore è stata testata una sola concentrazione della sostanza utilizzata.

Esperimenti di Time-course

Per valutare la resistenza del preparato ed al fine di rilevare l'instaurarsi dello stato ipodinamico, le variabili di performance cardiaca sono state valutate ogni 10 minuti durante la perfusione in condizioni basali. La durata di ogni esperimento è stata di circa 160 minuti. Gli esperimenti sono stati effettuati in condizioni normossiche ed in condizioni ipossiche.

Risposta di Frank-Starling

Per valutare la risposta del cuore agli incrementi di preload, dopo un periodo di stabilizzazione di circa 15-20 minuti, partendo dalle condizioni basali, la pressione di riempimento è stata gradualmente aumentata (di 0.5 cmH₂O per ogni incremento), fino a che non sono stati osservati ulteriori incrementi di CO. La pressione di output è stata mantenuta stabile a 1.5kPa. La risposta di Starling è stata valutata sia in assenza di stimolazione chimica, che in presenza di L-NMMA e nitrito di sodio. I parametri cardiaci sono stati valutati dopo 5 minuti da ogni incremento di pressione di input effettuato.

3. RISULTATI

3.1 Risultati morfologici

Come mostrato in figura 1 (**Fig.1**) il cuore di *C. auratus* appare costituito dalle classiche 4 camere: seno venoso, atrio, ventricolo e bulbo arterioso. È inoltre evidente una regione Atrio-Ventricolare (AV) di natura muscolare vascolarizzata, che sostiene le valvole del cono arterioso.

Seno venoso ed atrio

Il seno venoso, che spinge il sangue all'interno della cavità atriale, è composto prevalentemente da tessuto connettivo (**Fig. 2A**). In prossimità della regione seno-atriale sono evidenti anelli di tessuto simili ad agglomerati di cellule gangliari (**Fig. 2A**). La camera atriale risulta piuttosto ampia, di misura comparabile a quella del ventricolo (**Fig. 2A-B**); infatti la percentuale del rapporto tra atrio e massa ventricolare è del 27.6%, e tra atrio e massa corporea è di 0.021%. L'atrio mostra la presenza di una complessa rete di sottili trabecole, che lo dividono in lacune progressivamente più piccole procedendo dalla regione luminale verso quella epicardica (**Fig. 1B**). Il miocardio è circondato da uno strato sub-epicardico di fibre di collagene, evidenti anche attorno alle trabecole a livello sub-endocardico (**Fig. 2B**).

La regione atrio-ventricolare (AV) fornisce sostegno alla valvola AV, e consiste in un anello di miocardio compatto vascolarizzato (**Fig. 2C**). Questo risulta circondato da tessuto connettivo formato da fibre collagene che delimitano la regione AV (**Fig. 2D-E**). Le valvole AV sono formate da due lembi, che originano dall'anello muscolare AV. I lembi contengono numerose cellule, densamente raggruppate al centro, e concentrazioni variabili di collagene (**Fig. 2D**) ed elastina (**Fig. 2E**), particolarmente abbondanti a livello della spessa *fibrosa* atriale (**Fig. 2D-E**).

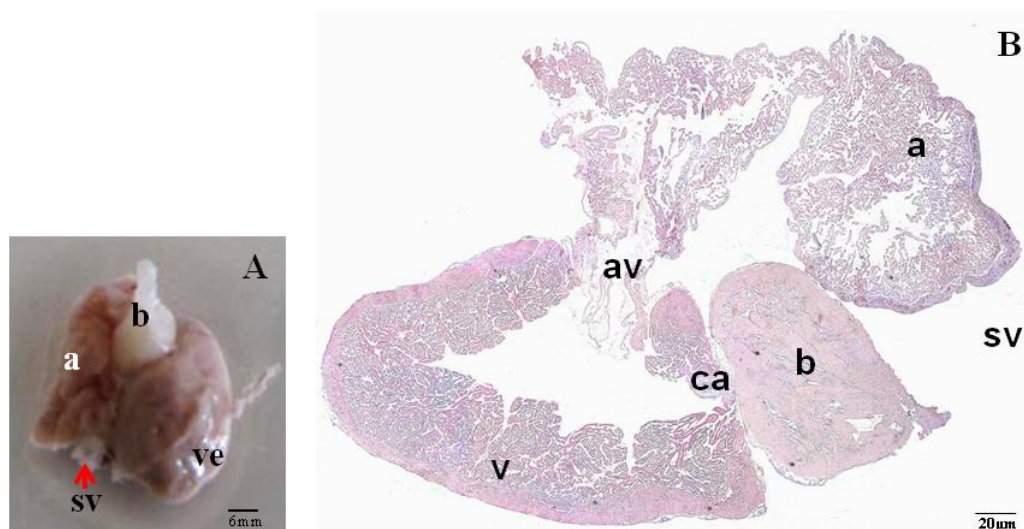


Fig. 1. (A) Sezione del cuore di *C. auratus* fissato in MAW (porzione dorso-laterale destra). (B) sezione sagittale del cuore colorata con ematossilina-eosina: v=ventricolo; a=atrio; b=bulbo; le frecce rosse indicano il seno venoso (SV); av=regione atrio-ventricolare; ca=cono arterioso.

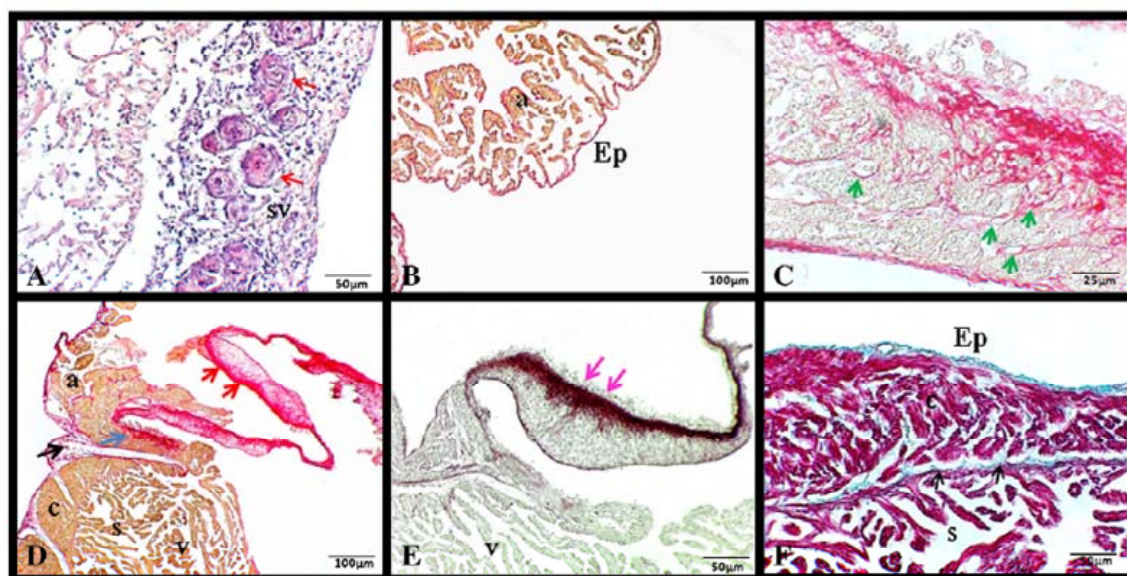


Fig. 2. (A) Parete del seno venoso (sv) contenente anelli di tessuto nervoso (frecce rosse) corrispondenti alla regione pacemaker. (B) Sezione sagittale dell'atrio destro colorata con Sirius red. Sezione longitudinale della regione atrio-ventricolare colorata con Sirius red (C,D) e orceina (E). In C sono evidenziati vasi sanguigni (frecce verdi) presenti nel tessuto miocardico che sostiene la valvola atrio-ventricolare. D mostra l'anello di tessuto connettivo (frecce nere) che circonda il tessuto muscolare vascolarizzato (frecce blu); notare la spessa fibrosa delle valvole atrio-ventricolari, ricca in collagene (D; frecce rosse) ed elastina (E; frecce rosa). (F) Sezione sagittale del ventricolo colorata con soluzione Tricromica di Gomori; è evidente il confine (frecce nere) fra strato compatto (c) e spugnoso (s). Ep=epicardio; a=atrio; v=ventricolo; c= compatta; s= spugnosa.

Ventricolo

Il ventricolo del cuore di goldfish presenta una struttura a forma di sacco (**Fig. 1A**), e risulta costituito da una parte compatta (*compacta*) esterna e da uno strato interno di natura spugnosa (*spongiosa*) (**Fig. 2F, 3A-E**). Lo strato compatto è formato da un fascio di muscoli orientati in varie direzioni, irrorato da vasi coronarici (**Fig. 2F, 3D, 3E**), e risulta più spesso in corrispondenza della base del ventricolo e più sottile procedendo verso l'apice (**Fig. 1B, 3B**). Al contrario, lo strato spugnoso non è vascolarizzato e contiene numerose trabecole, che dividono il lume ventricolare in piccole lacune, con spazi inter-trabecolari progressivamente più piccoli procedendo dal lume verso la regione epicardica (**Fig. 1B, 3B**). Le trabecole sono ricoperte da un sottile strato di cellule endoteliali e sono connesse da "ponti endocardici" (**Fig. 3F**).

Cono arterioso

Un segmento anatomico, corrispondente al cono arterioso, è interposto tra il ventricolo ed il bulbo, fornendo sostegno al complesso valvolare (**Fig. 4A, B, C**). Il cono arterioso appare come un cerchio di miocardio compatto vascolarizzato localizzato alla base del ventricolo (**Fig. 4C**), ricco di elastina e fibre collagene. Il collagene ed il tessuto connettivo lasso separano il cono arterioso rispettivamente dal miocardio ventricolare e dal bulbo (**Fig. 4A, B, C**). Il complesso valvolare consiste di due valvole (sinistra e destra), ognuna formata da due componenti: il lembo valvolare e la sua struttura di supporto, il seno (**Fig. 3C; 4A, B, C**). Ogni lembo presenta un robusto corpo prossimale, ancorato al cono, ed una regione distale orientata verso il bulbo (**Fig. 4A, B**). Sul versante ventricolare, i lembi presentano una spessa *fibrosa*, ricca sia di elastina (**Fig. 4A**) che di collagene (**Fig. 4B, C**). Anche la parete del seno è ricca in elastina (**Fig. 4A**) e collagene (**Fig. 4B, C**), e risulta più spessa verso il bulbo. Icardo e collaboratori (2005)

hanno evidenziato in vari teleostei che il seno rappresenta il legame anatomico fra tre differenti strutture: ventricolo, cono arterioso e bulbo. Il suo strato esterno è infatti connesso al cono (nella porzione prossimale), al tessuto subepicardico lasso (nella porzione mediale) e alla superficie interna del bulbo (nella porzione distale) (**Fig. 4A, B, C**).

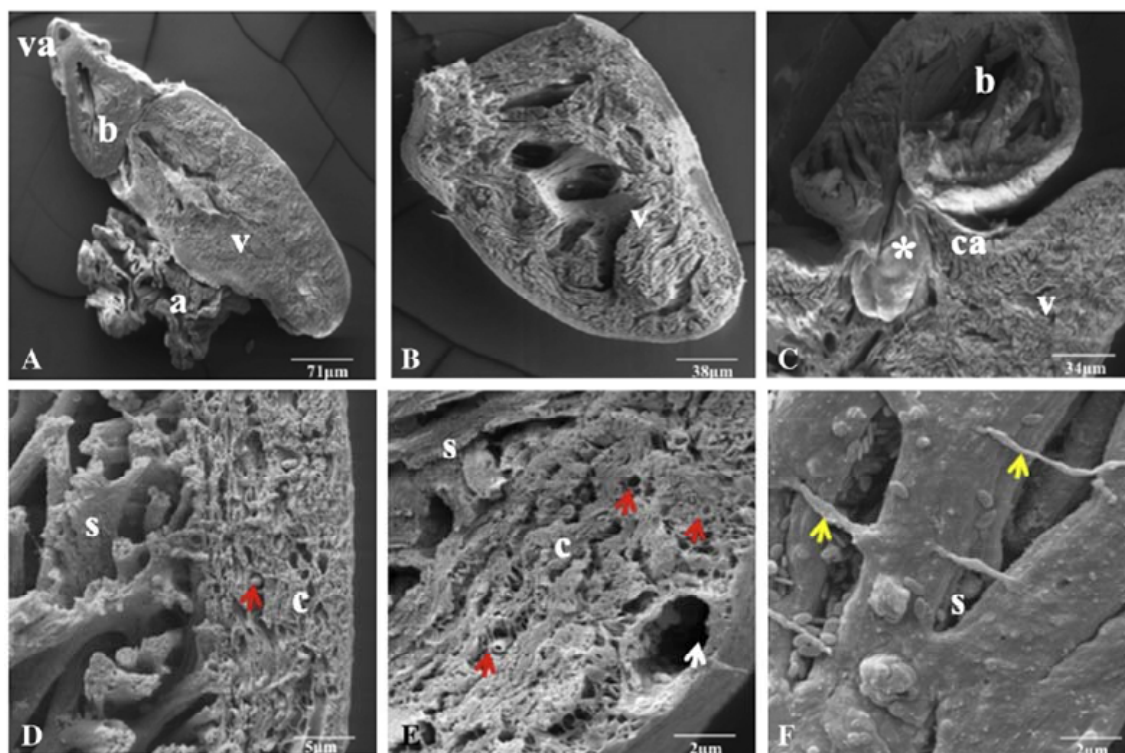


Fig. 3. Immagini di microscopia elettronica a scansione (SEM) del cuore di *C. auratus* (A,B,C). Le figure D, E e F mostrano in dettaglio lo strato compatto (c) e spugnoso (s). In C sono evidenziati il cono arterioso (ca) e le sue valvole (*). I vasi del compatto (freccie rosse) e subepicardici (freccie bianche) sono evidenziati nelle figure D e E. I ponti endocardici (freccie gialle) sono evidenziati in F. va=aorta ventrale; b=bulbo; a=atrio; v=ventricolo; c=compacta; s=spongiosa; ca=cono arterioso; *=valvole conali.

Bulbo arterioso

La parete del bulbo arterioso è organizzata in strati: endocardio, creste endocardiche, strato intermedio, sub-epicardio ed epicardio. Le creste colonnari (**Fig. 1B, 3A-C, 4D-E**), che occupano quasi tutta l'area luminale, sono coperte da cellule endocardiche ed appaiono più spesse alla

base del bulbo, assottigliandosi procedendo verso l'aorta ventrale (**Fig. 1B, 4E**). Lo strato intermedio è costituito da cellule muscolari lisce, intercalate in tessuto connettivo ricco di elastina (**Fig. 4E**) e povero in collagene (**Fig. 4D**). Al contrario, lo strato sub-epicardico appare ricco di fibre collagene e vasi sanguigni (**Fig. 4D**). Il bulbo è in continuità con l'aorta ventrale, che presenta una spessa parete elastica (**Fig. 4F**), contenente fibre collagene prevalentemente nello strato sub-epicardico e nello strato esterno della tunica media (**Fig. 4G**). Sull'avventizia dell'aorta ventrale è presente un vaso sanguigno distinto, appartenente al sistema arterioso ipobranchiale e circondato da tessuto connettivo lasso (**Fig. 4F-G**).

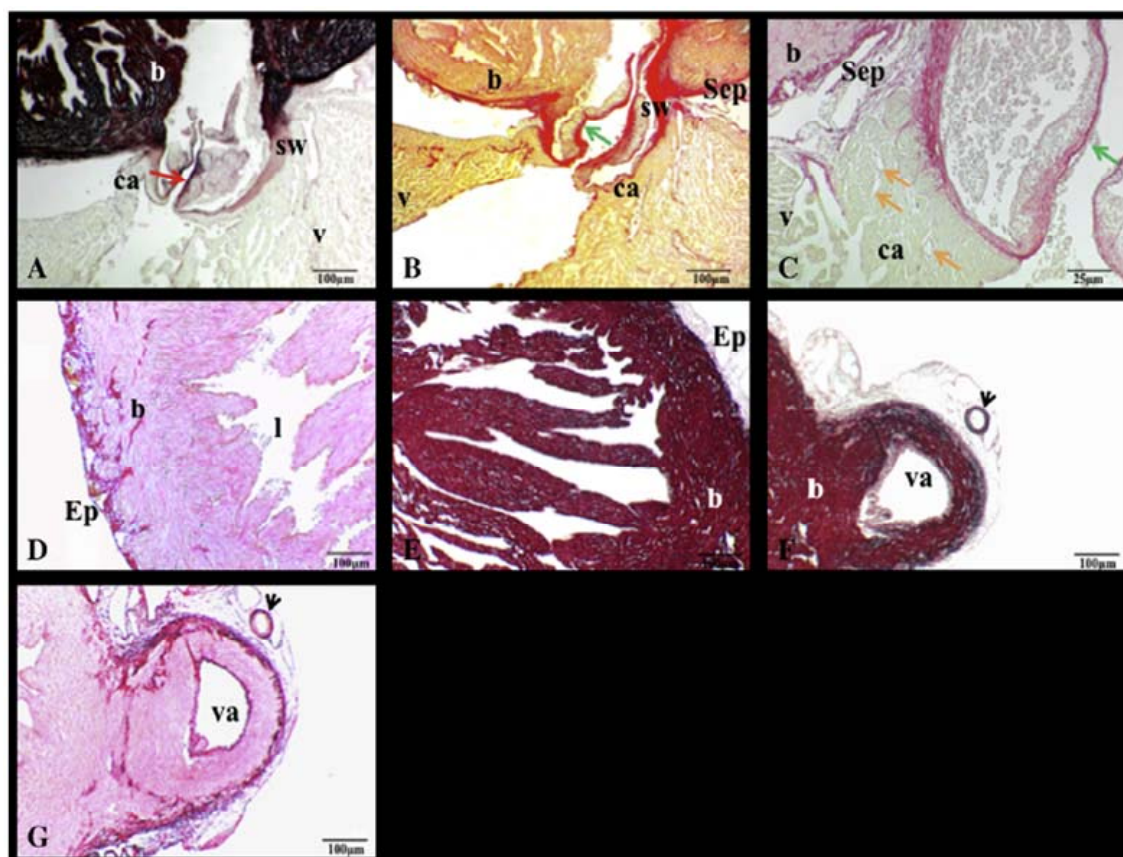


Fig. 4. Cono arterioso colorato con Orceina (A) e Sirius red (B). E' evidente la spessa fibrosa, presente sul versante ventricolare dei lembi valvolari, ricca in elastina (freccie rosse) e collagene (freccie verdi). (C) Visione dettagliata del cono arterioso: da notare i vasi sanguigni (freccie arancio) presenti nel miocardio compatto. Colorazioni con Sirius red (D,G) e Orceina (E,F) di sezioni longitudinali del bulbo. Nelle figure F e G è evidente un taglio trasversale dell'aorta ventrale e dell'arteria ipobranchiale (freccie nere). Ca=cono arterioso; sw=parete del seno; b=bulbo; v=ventricolo; va= aorta ventrale; ep=epicardio; sep=sub epicardio; l=lume.

3.2 Risultati fisiologici

Parametri basali

La prima parte del lavoro è stata finalizzata alla definizione dei parametri di performance cardiaca basale. A tal proposito la performance cardiaca è stata studiata a differenti valori di pressione di ingresso e pressione di uscita. Sulla base dei risultati ottenuti, i valori basali sono stati settati ad una pressione di output di 1.5kPa e ad una pressione di input tale da indurre un CO di 10-12 mL/min/kg di peso corporeo. I parametri emodinamici basali del preparato di cuore isolato e perfuso di *C. auratus* in condizioni normossiche sono riportati in tabella 1.

Heart rate beats min ⁻¹	Filling pressure kPa	Output pressure kPa	Cardiac output mlmin ⁻¹ kg ⁻¹	Stroke volume mlkg ⁻¹	Power output mWg ⁻¹
56.21 ± 3.24	0.11 ± 0.03	1.51 ± 0.05	11.85 ± 0.31	0.2 ± 0.02	0.36 ± 0.01

Tab.1. Parametri emodinamici basali del cuore di *C. auratus*

Esperimenti di time course

Gli esperimenti di time-course hanno evidenziato che, in condizioni di normossia, il preparato di cuore di goldfish è stabile per circa 2h, periodo dopo il quale si osserva l'instaurarsi di uno stato ipodinamico, caratterizzato da riduzione dello SV. In ipossia, i preparati sono risultati più stabili nel tempo, mostrando addirittura una tendenza all'aumento dello SV nel tempo (**Fig. 5**).

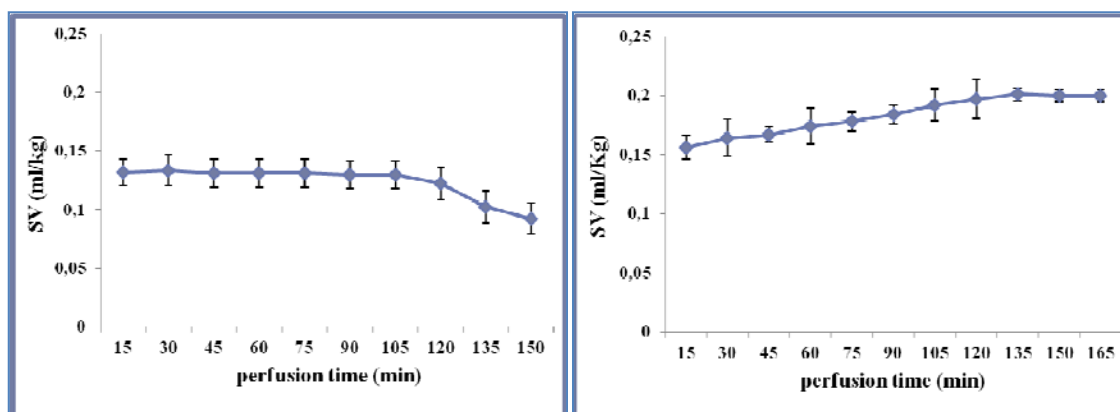


Fig.5. Time course dello SV di preparati di cuore di *C. auratus* perfuso in condizioni di normossia (sinistra) ed ipossia (destra).

Risposta di Frank-Starling

La risposta di Frank-Starling costituisce un meccanismo fondamentale per la modulazione della performance cardiaca del cuore dei pesci, permettendo al miocardio di rispondere ad incrementi della pressione di riempimento con contrazioni più vigorose, che determinano aumenti dello SV e, di conseguenza, del CO (Shiels *et al.*, 2008).

Il cuore di goldfish ha mostrato una tipica risposta di Frank-Starling quando perfuso in condizioni normossiche. Infatti, graduali incrementi della pressione di riempimento (da 0.05 a 0.4kPa) hanno indotto corrispondenti incrementi di SV. Il massimo valore di $SV=1.08 \pm 0.09$ mL/min/kg di peso corporeo è stato ottenuto ad un valore di pressione di input di 0.4kPa (Fig. 6).

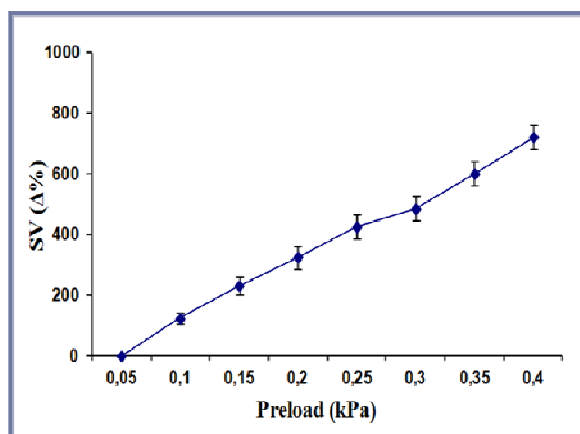


Fig.6. Risposta del cuore di *C. auratus* ad incrementi di preload in condizioni di normossia.

In condizioni ipossiche, il massimo valore di SV ($SV=1.5\pm 0.2$ mL/kg peso corporeo) è stato ottenuto a valori pressori più bassi (0.25kPa), evidenziando una maggiore sensibilità del cuore di goldfish ad incrementi di preload in tali condizioni (**Fig. 7**). Ulteriori incrementi della pressione di riempimento hanno determinato una rapida riduzione dello SV.

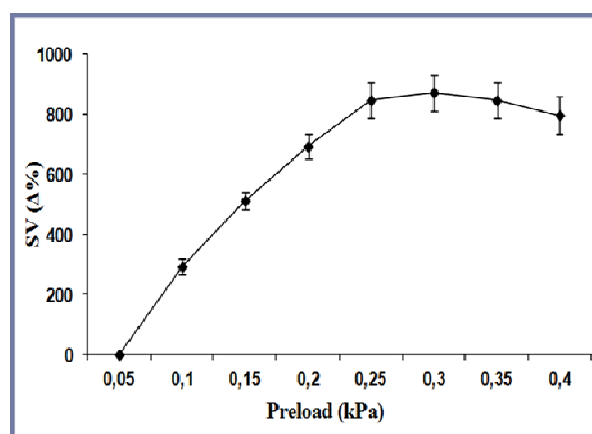


Fig.7. Risposta del cuore di *C. auratus* ad incrementi di preload in condizioni di ipossia

Localizzazione della p-eNOS

Utilizzando un anticorpo policlonale, specifico per l'isoforma enzimatica fosforilata sulla Ser-1177, abbiamo valutato la presenza della forma fosforilata dell'enzima eNOS. La p-eNOS è localizzata nel miocardio atriale (dati non mostrati) e ventricolare, prevalentemente a livello dell'endotelio vascolare ed, in minor misura, nell'endotelio endocardico (EE) (**Fig. 8A-B**). La specificità del segnale è stata confermata utilizzando sezioni cardiache non incubate con l'anticorpo primario come controlli negativi (**Fig. 8C**).

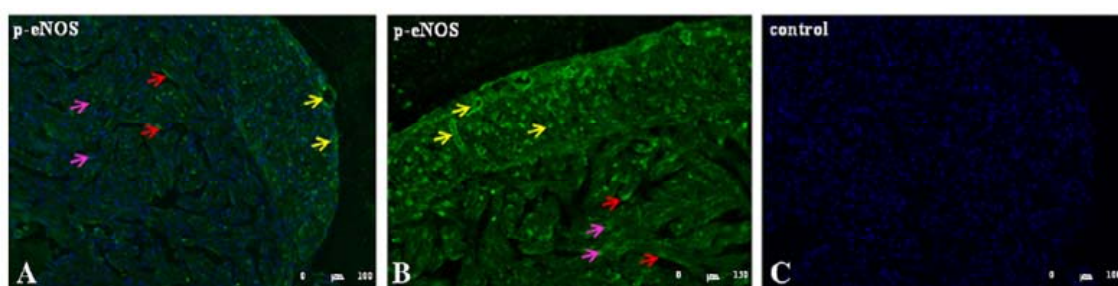


Fig. 5. Immunolocalizzazione di p-eNOS nel ventricolo di *C. auratus* (A,B). Il segnale è molto forte a livello dell'endotelio vascolare (frecche gialle), mentre è debole nella regione dell'endotelio endocardico (frecche rosse) e nei miocardiociti (frecche rosa). In C è mostrato il controllo negativo. In A e C i nuclei sono stati colorati con Hoechst.

Effetto di L-NMMA e Nitrito sulla performance cardiaca basale

Dopo aver confermato la presenza e la funzionalità della e-NOS nel cuore di goldfish, abbiamo valutato il coinvolgimento di tale enzima nella regolazione della performance cardiaca. A tal proposito, la perfusione è stata condotta in condizioni normossiche ed ipossiche e la performance del cuore è stata valutata in presenza di L-NMMA, inibitore della eNOS (**Fig. 9**). I risultati ottenuti mostrano un significativo incremento della performance cardiaca sia in condizioni di normossia che in condizioni di ipossia, suggerendo il coinvolgimento di un rilascio basale di NO nella regolazione della funzione contrattile.

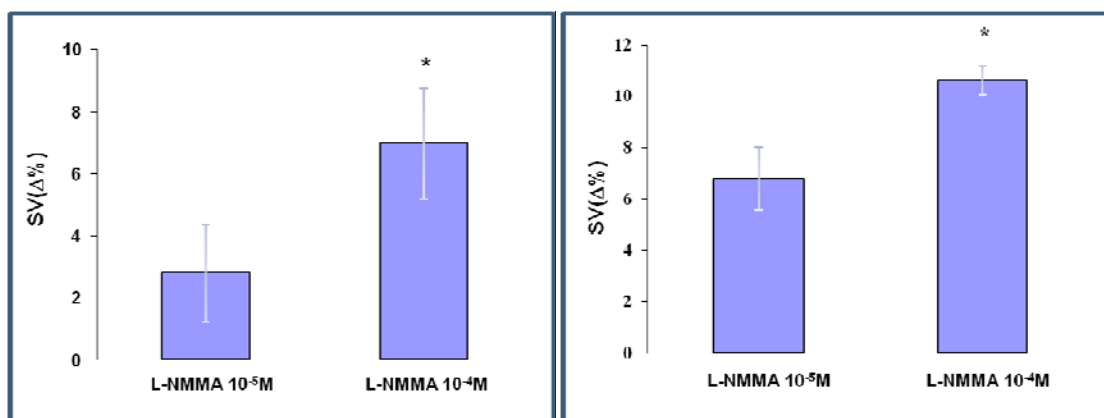


Fig.9. Effetti del trattamento con L-NMMA ($10^{-5}M$ e $10^{-4}M$) su cuori perfusi in condizioni basali in normossia (sinistra) ed ipossia (destra).

In letteratura è riportato che, in condizioni di pH acido o di riduzione della concentrazione di ossigeno la riduzione dei nitriti diventa la sorgente primaria di NO (Zweier *et al* 1999). Al fine di valutare il ruolo dei nitriti sulla performance basale del cuore di goldfish, la perfusione è stata condotta, in normossia ed in ipossia, in presenza di nitrito di sodio. In condizioni normossiche è stata osservata una significativa riduzione dei valori di SV, mentre in condizioni ipossiche il trattamento ha indotto un significativo effetto inotropo positivo (**Fig. 10**).

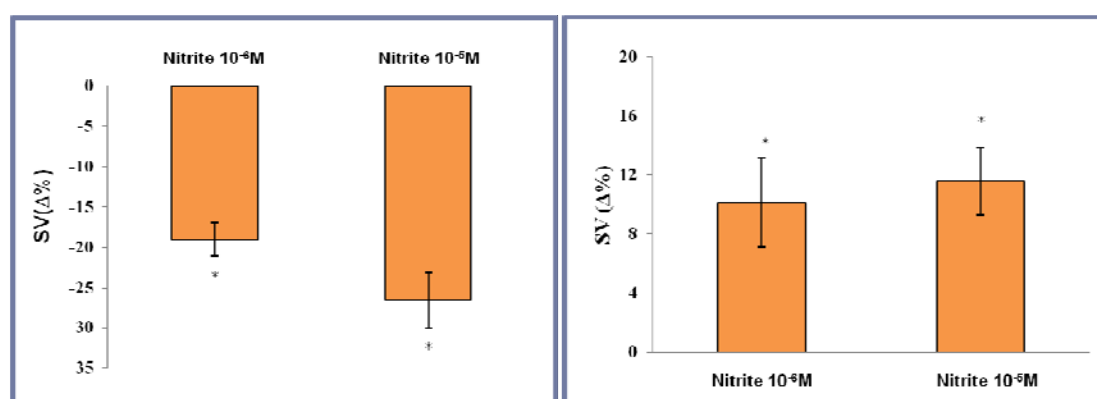


Fig.10. Effetti del trattamento con nitrito di sodio ($10^{-6}M$ e $10^{-5}M$) su preparati cardiaci perfusi in condizioni basali in normossia (sinistra) ed ipossia (destra).

Effetto di L-NMMA e Nitriti sulla risposta di Frank-Starling

Recenti studi hanno dimostrato che nei teleostei lo NO è un importante modulatore del meccanismo di Frank-Starling (Imbrogno et al., 2001; Garofalo et al., 2009). Allo scopo di valutare l'esistenza di una modulazione nitrergica della risposta eterometrica in *C. auratus*, preparati di cuore isolato e perfuso sono stati sottoposti, in condizioni normossiche ed ipossiche, a graduali incrementi di precarico, e la risposta di Starling è stata valutata in presenza di L-NMMA e nitrito.

Il trattamento con L-NMMA ha indotto, in condizioni normossiche, una significativa riduzione della risposta di Starling (**Fig. 11A**), mentre non ha influenzato tale risposta in condizioni ipossiche (**Fig. 11B**). Al contrario, il trattamento con nitriti non ha indotto alcun effetto in cuori perfusi in condizioni normossiche (**Fig. 11A**), mentre ha significativamente ridotto la risposta agli incrementi di preload di preparati perfusi con ringer ipossico, riportando la curva ai valori osservati in condizioni normossiche (**Fig. 11B**).

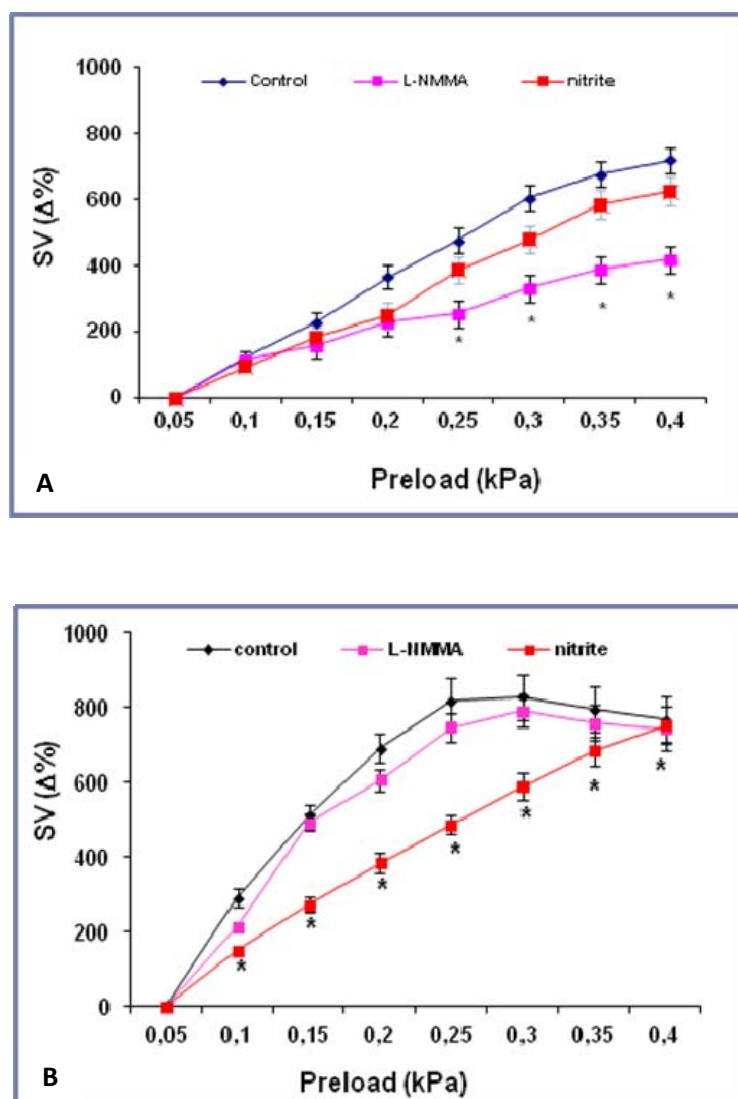


Fig. 11. Effetti del trattamento con L-NMMA ($10^{-5}M$; curva rosa) e nitrito ($10^{-6}M$; curva rossa) sulla risposta di Frank-Starling in condizioni normossiche (A) ed ipossiche (B).

4. DISCUSSIONE

Il presente lavoro ha permesso la caratterizzazione morfo-funzionale del cuore di goldfish, ed ha fornito le basi per l'analisi del ruolo dello NO sia come modulatore della performance cardiaca basale che come fattore coinvolto nei meccanismi di tolleranza a condizioni di ipossia.

Il cuore di *C. auratus* è composto da 4 camere: seno venoso, atrio, ventricolo e bulbo arterioso. Il seno venoso, che riceve il sangue venoso periferico, presenta una parete molto sottile e mostra, nella regione seno-atriale, anelli di tessuto nervoso organizzati in agglomerati di cellule gangliari che, come descritto in altri teleostei (*Yamauchi, 1980*), corrispondono probabilmente ad una regione pacemaker. L'atrio dei pesci presenta differenze specie-specifiche in termini di forma e dimensioni (*Farrell e Jones, 1992*). Nel cuore di *C. auratus*, l'atrio appare come un'ampia camera, con struttura trabecolata e ricca di fibre di collagene ed elastina. Come largamente dimostrato da *Icardo e Colvee (2011)*, la regione AV, cioè l'area del cuore che connette l'atrio al ventricolo, rappresenta un distinto segmento specie-specifico del cuore dei teleostei, che mostra una rilevante diversificazione evolutiva. L'abbondanza di miocardio compatto vascolarizzato nella regione AV di *C. auratus* rappresenta una caratteristica comune a vari teleostei con ventricolo di "tipo II" (*Icardo e Colvee, 2011*). Inoltre, come in altre specie di teleostei, anche nel goldfish questa regione è circondata da un anello di tessuto connettivo, formato da fibre collagene. Sulla base della mioarchitettura ventricolare e del rifornimento di sangue, e della presenza dello strato compatto e dello strato trabecolato, il cuore di goldfish può essere classificato come cuore "di tipo II" (*Tota et al., 1983, Tota, 1989*). La particolare localizzazione delle fibre collagene al confine tra strato compatto e strato trabecolato suggerisce una loro azione da collante tra i due strati di cardiomiociti, orientati in differenti direzioni (*Poupa et al., 1974; Tota, 1978; Icardo et al., 2005*). I cardiomiociti sono infatti disposti in maniera circolare lungo la circonferenza nello strato compatto, e

perpendicolarmente nello strato spugnoso. Al contrario, nel cuore dei salmonidi, Pieperhoff e collaboratori (2009) hanno mostrato l'assenza di uno strato continuo di fibre collagene ed una elevata presenza di strutture simili a desmosomi, che potrebbero fungere da strutture di ancoraggio tra lo strato compatto e quello spugnoso. Sulla base di queste osservazioni è plausibile che molte caratteristiche strutturali possano concorrere a fornire un legame morfologico tra i due strati muscolari. Le fibre collagene sono evidenti anche nello strato subepicardico, dove potrebbero agire limitando l'eccessiva espansione della camera ventricolare, incrementandone la resistenza (Icardo et al., 2005).

Recenti studi (Icardo et al., 2003; Icardo, 2006) hanno dimostrato, in teleostei antichi e moderni, la presenza di un cono arterioso muscolare e vascolarizzato, interposto tra ventricolo e bulbo. Nel cuore di goldfish, il cono arterioso, offrendo sostegno al complesso valvolare, appare come una corona di tessuto localizzata alla base del ventricolo. La valvola del seno venoso appare come elemento di continuità tra ventricolo, cono arterioso e bulbo. Inoltre, la sua struttura ricca in elastina suggerisce una elevata deformabilità durante il ciclo cardiaco e quindi un ruolo nel facilitare i movimenti meccanici del cuore. Infatti, l'elevata elasticità supporta sia la deformazione durante la dilatazione che il successivo ritorno del bulbo arterioso; allo stesso tempo, riducendo lo stress del cono arterioso, favorisce la chiusura delle valvole. Inoltre, l'elevata quantità di collagene ed elastina dello spesso strato fibroso ventricolare dei lembi valvolari, potrebbe esercitare una resistenza locale alla forza emodinamica dovuta alla sistole ventricolare. Come riportato nella carpa (Licht e Harris, 1973), la robusta camera bulbare contiene una elevata quantità di elastina, che rende questa camera cardiaca estremamente flessibile. Nei pesci, l'elevata *compliance* della parete bulbare è stata associata ad un elevato rapporto elastina/collagene (vedi ad esempio la trota: Serafini-Fracassini et al., 1978). Il graduale ritorno elastico del bulbo (effetto *windkessel*: Farrell e Jones, 1992), ben

evidenziato nel cuore di goldfish dai nostri esperimenti funzionali, assicura un flusso di sangue costante attraverso le branchie, prevenendo eventuali danni alla delicata vascolarizzazione branchiale, come già illustrato da Jones e collaboratori (1993) in altri teleostei. Allo stesso tempo, è verosimile pensare che il controllo dell'eccessiva dilatazione della camera bulbare durante la sistole sia garantito dall'elevata quantità di fibre collagene, localizzate in particolare a livello sub-epicardico.

La relazione tra il disegno strutturale della camera bulbare ed il suo comportamento morfodinamico è stata ampiamente studiata nei vertebrati. In molte specie di pesci questa relazione, valutata in termini di contributo relativo di pressione e lavoro ventricolare al volume sistolico, permette di fare una distinzione tra i ventricoli che producono prevalentemente lavoro volumetrico (pompe di volume) e quelli che producono prevalentemente lavoro pressorio (pompe di pressione) (Tota e Gattuso, 1996; Icardo et al., 2005). Il comportamento del cuore di *C. auratus* è assimilabile a quello di una pompa di volume. Infatti, nonostante in condizioni basali (Tab 1) il CO sia di 11.85 mL/min/kg, valore simile a quello riportato in altri teleostei (Farrell e Jones, 1992), inclusa la carpa (8,5 mL/min/kg ad 8°C Farrel e Stecyck, 2007), l'elevata sensibilità del cuore di goldfish a variazioni della pressione di riempimento, documentata dagli elevati valori di SV raggiunti in risposta ad incrementi di preload, evidenziano chiaramente l'abilità emodinamica di spostare grandi quantità di sangue a bassi valori pressori. Questa sensibilità al meccanismo di Starling diventa ancora più evidente quando il cuore è perfuso con ringer ipossico. In queste condizioni sperimentali infatti, il cuore di goldfish raggiunge il massimo valore di SV a valori di pressione di input decisamente più bassi (0.25kPa) rispetto a quelli ottenuti in condizioni normossiche (0.4kPa). Questa capacità di muovere elevati volumi a basse pressioni potrebbe essere il risultato di meccanismi adattativi del goldfish, finalizzati a favorire l'aumento del flusso sanguigno attraverso le branchie, facilitando così l'eliminazione

dell'etanolo. Il goldfish è infatti capace di fronteggiare l'acidosi lattica conseguente a condizioni ipossiche, trasformando il lattato in etanolo e CO₂, eliminati attraverso le branchie (Bickler e Buck 2007). Un maggiore flusso sanguigno potrebbe contribuire ad evitare la possibile intossicazione da etanolo dei tessuti e del delicato epitelio branchiale. In questo contesto, l'elevato rapporto tra la massa atriale e quella ventricolare (27,6%), molto più alto rispetto a quanto riportato in altri teleostei, associato all'elevata presenza di elastina e di spazi lacunari nella struttura cardiaca, ben si correlano al comportamento del cuore di goldfish come pompa di volume. D'altra parte, una tipica pompa di volume è adatta a mantenere un volume sistolico costante solo in un ristretto range di pressioni di afterload. Infatti, come evidenziato dal paradigma dei pesci antartici (icefish) (*in vivo*: Hemmingsen et al., 1972; *in vitro*: Tota et al., 1991), i valori di pressione di output al di sopra dei quali il lavoro cardiaco e la produzione di energia risultano alterati sono molto bassi. E' interessante notare che nella carpa (*C. carassius*), che è in grado di mantenere una normale performance cardiaca e un'autonoma regolazione vascolare per almeno 5 giorni in condizioni di anossia, la pressione dell'aorta ventrale *in vivo* è di circa 1.5 kPa (Stecyk et al., 2004). Analogamente alla carpa, il cuore di goldfish lavora a valori di pressioni di output molto bassi e, a differenza di altri teleostei in grado di sostenere elevati valori di pressione di afterload [fino a 5kPa (Farrell e Jones, 1992; Tota e Gattuso, 1996)], è incapace di mantenere una funzione sistolica costante in risposta ad elevati incrementi di afterload. In particolare, nei nostri esperimenti questi ultimi hanno causato un'evidente distensione ed una difficoltà di svuotamento della camera bulbare. Resta da definire se la difficoltà di svuotamento del bulbo sia correlata ad una particolare organizzazione fibrillare della parete di questa camera cardiaca (per altre specie di teleostei vedi: Braun et al., 2003).

Il comportamento del cuore di goldfish come pompa di volume risulta ben evidente se analizzato nel contesto comparato della performance meccanica di varie specie di teleostei, espressa in termini di pressioni sviluppate e volumi spostati (**Fig. 12**).

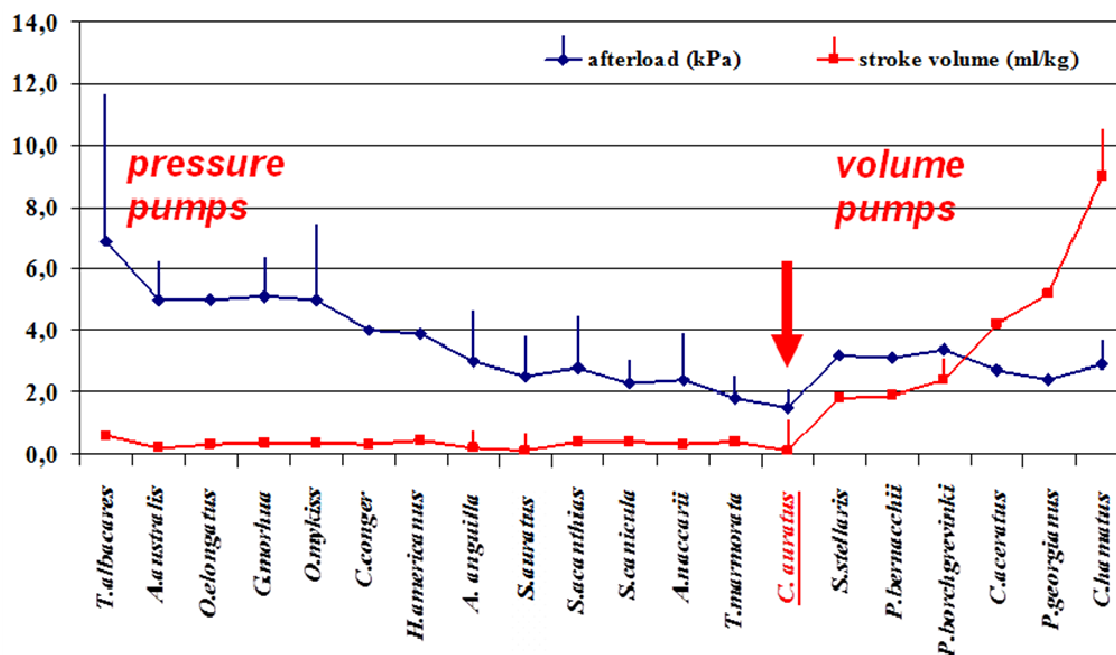


Fig. 12. Valori di afterload e gittata sistolica in elasmobranchi e teleostei. Il grafico mostra gli aumenti di afterload e di gittata sistolica in condizioni di massimo efflusso e pressione di input (modificata da Tota e Gattuso, 1996).

Nel cuore di varie specie di teleostei, una diffusa presenza dell'enzima eNOS è stata evidenziata a livello vascolare, dell'endotelio endocardico e dei cardiomiociti. Associata a dati fisiologico-farmacologici, questo indica un ruolo fondamentale del sistema NOS/NO nella regolazione della funzione cardiaca di questi vertebrati (*Imbrogno et al., 2011*). La presenza dell'enzima NOS nel cuore di goldfish, a livello dell'endotelio vascolare e dell'endotelio endocardico da noi osservata e i risultati ottenuti in seguito al trattamento con l'inibitore della NOS (L-NMMA) in presenza di adeguato rifornimento di ossigeno, evidenziano questo ruolo anche nel cuore di goldfish. Recenti studi hanno messo in evidenza, nel cuore di goldfish, l'importanza del

mantenimento dell'omeostasi intracellulare dello NO in condizioni ipossiche (*Hansen e Jensen, 2010; Pedersen et al., 2010, Jensen e Hansen, 2011*). In particolare, è stato ipotizzato che, quando la produzione di NO da parte della NOS è compromessa da una riduzione della disponibilità di ossigeno, un aumento compensatorio dell'espressione dell'enzima NOS contribuisce a mantenere stabili i livelli cellulari di NO (*Hansen e Jensen, 2010*). Sebbene le eventuali differenze di espressione dell'enzima NOS associate a variazioni del rifornimento di ossigeno non siano state valutate in questo studio, la diversa risposta osservata in seguito al trattamento con nitrito di sodio suggerisce l'esistenza di differenze nel controllo nitregico dipendenti dalla disponibilità di O₂. Infatti, il trattamento con nitrito esogeno ha indotto un effetto inotropo negativo in condizioni normossiche, mentre ha significativamente aumentato la performance cardiaca in condizioni ipossiche. Il meccanismo responsabile della risposta positiva al trattamento con nitrito non è ancora chiaro; è possibile ipotizzare una conversione dei nitriti a nitrosile piuttosto che ad NO (*Angelone et al., 2012*). Il nitrosile è un potente agente ossidante ed S-nitrosilante, prodotto da differenti sorgenti, sia NOS-dipendenti che NOS-indipendenti (*Williams et al., 2006*). Il nitrosile induce effetti inotropi opposti a quelli dello NO dal momento che, contrariamente agli effetti inotropi negativi del suo analogo ridotto, esso aumenta la contrattilità (*Irvine et al., 2008*).

Ulteriore conferma del differente ruolo dello NO in condizioni di normossia e di ipossia nel cuore di goldfish è stata ottenuta analizzando la risposta di Frank-Starling. Recenti studi hanno evidenziato l'importanza del sistema NOS/NO e dei nitriti nella modulazione della risposta nel cuore dei teleostei a variazioni di precarico (*Garofalo et al., 2009; Angelone et al., 2012*). Nei nostri preparati di cuore di goldfish, il trattamento con L-NMMA ha ridotto la risposta di Starling in condizioni normossiche, mentre non ha modificato tale risposta in condizioni ipossiche. Al contrario, il trattamento con nitrito di sodio non ha modificato la risposta di

Starling in condizioni normossiche, mentre ha significativamente ridotto la risposta agli incrementi di precarico, in condizioni ipossiche, inducendo una risposta analoga a quella ottenuta in normossia. Sebbene i dati a disposizione non siano sufficienti a chiarire il meccanismo specifico coinvolto in tale risposta, è possibile ipotizzare che la riduzione della risposta del cuore di goldfish agli incrementi della pressione di riempimento sia legata ad una eccessiva disponibilità di NO. È infatti verosimile pensare che, mentre il nitrito di natura endogena favorisce l'adattamento del cuore alle condizioni ipossiche, aumentando la risposta di Starling per aumentare l'escrezione dell'etanolo attraverso le branchie, il nitrito esogeno somministrato durante i nostri esperimenti, aumentando ulteriormente le concentrazioni di NO, potrebbe comportare un'alterazione dei fini meccanismi di attivazione dei target intracellulari dello NO.

5. CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti è plausibile ipotizzare che il disegno morfo-funzionale del cuore di goldfish sia strettamente correlato alla capacità di questo teleosteo di tollerare severe e prolungate condizioni ipossiche. Il goldfish, infatti, è in grado di fronteggiare condizioni di acidosi associate ad accumulo di prodotti di rifiuto, ad esempio l'acido lattico, convertendo il lattato ad etanolo e CO₂, eliminati attraverso le branchie (*Shoubridge e Hochachka, 1980; Bickler e Buck, 2007*). È verosimile pensare che, da un punto di vista morfo-funzionale, il comportamento del cuore di goldfish come pompa di volume, capace di spostare grandi quantità di sangue a bassi valori pressori, potrebbe favorire l'escrezione di etanolo attraverso le branchie, prevenendone l'accumulo e l'intossicazione tissutale.

I risultati ottenuti hanno inoltre evidenziato un ruolo del sistema NOS/NO nella modulazione della performance cardiaca sia basale che fisicamente stimolata, ed una sensibilità dei meccanismi NOS/NO-dipendenti a variazioni della concentrazione di ossigeno. Ulteriori studi, attualmente in corso nel nostro laboratorio, sono necessari per analizzare il ruolo di questo sistema nei meccanismi di tolleranza all'ipossia, analizzando eventuali differenze di espressione dell'enzima NOS in relazione alla disponibilità di ossigeno, ed identificando le specifiche cascate e gli effettori intracellulari attivati dallo NO in condizioni di normossia e di ipossia.

PARTE 3

***NOS e stress iperglicemico: ruolo della BH₄ sulla struttura e
funzionalità dell'enzima***

1. INTRODUZIONE

La 5,6,7,8-tetraidrobioterina (BH_4) è un cofattore essenziale per l'attività di tutte le forme enzimatiche della NOS (Cosentino et al., 1999; Schmidt e Alp, 2007). Nonostante il preciso ruolo di questa molecola non sia stato del tutto definito, la BH_4 sembra avere molteplici funzioni, tra cui facilitare il passaggio dell'elettrone dal dominio reduttasico a quello ossidasico dell'enzima, concorrere al mantenimento del gruppo eme prostetico nella sua forma ridotta attivata, e promuovere la formazione dell'omodimero enzimatico (Stuehr, 1999; Vasquez-Vivar et al., 1998; Stuehr et al., 2001; Tzeng et al., 1995). È stato ampiamente dimostrato che una deficienza di BH_4 porta a "disaccoppiamento" dell'enzima; ciò permette di distinguere 2 isoforme della NOS, quella "accoppiata", che esplica la sua attività in presenza di BH_4 , e quella "disaccoppiata", priva del cofattore, in cui il trasferimento elettronico è disaccoppiato, e l'ossigeno molecolare viene utilizzato per la sintesi del superossido (Landmesser et al., 2003; Vasquez-Vivar et al., 2003) (Fig. 1).

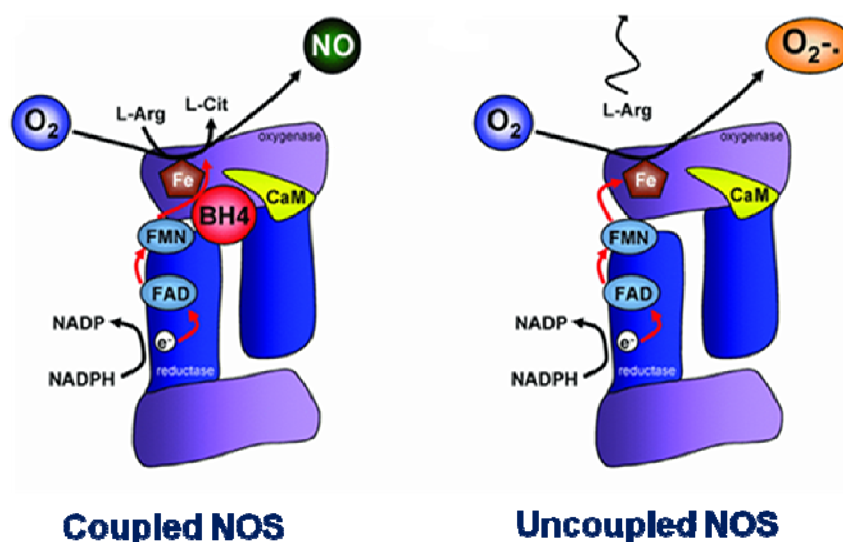


Fig. 1. (sinistra) la BH_4 , correttamente associata al dimero enzimatico, lo stabilizza e catalizza la produzione di NO; (destra) il dimero catalizza la reazione in assenza del cofattore BH_4 , generando anione superossido.

In vivo, i livelli di BH₄ sono regolati dall'attività di un pathway biosintetico (**Fig. 2**) in cui la GTP ciclo idrolasi (GCH), che catalizza la reazione di conversione del GTP a 7,8-diidroneopterin trifosfato, rappresenta l'enzima limitante (*Thony et al., 2000*). In studi condotti su cellule endoteliali è stato osservato che una over-espressione della GCH è correlata ad un aumento dei livelli di BH₄ (*Cai et al., 2002*).

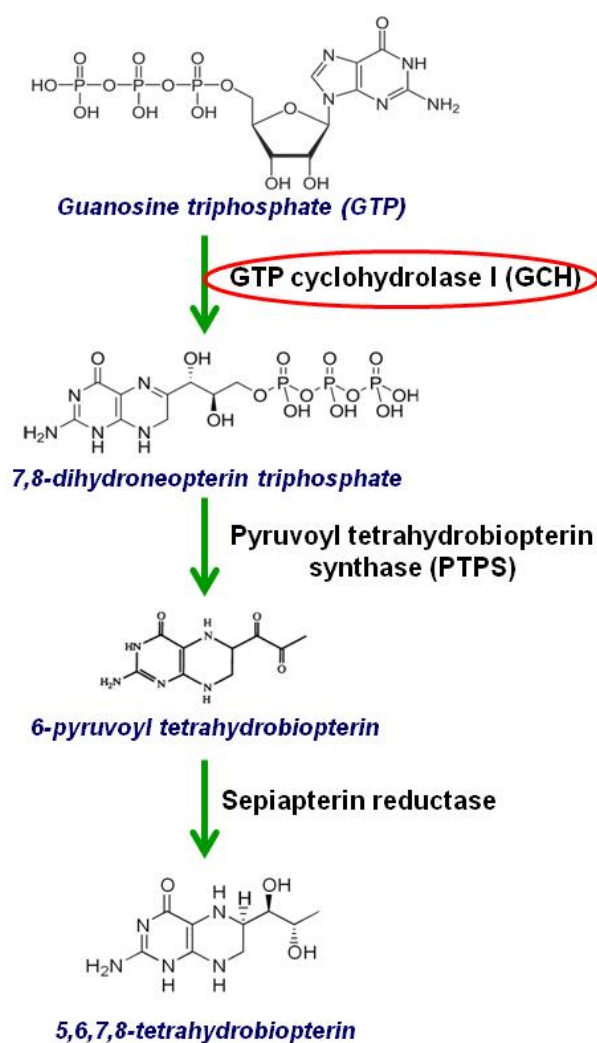


Fig. 2. Pathway di sintesi "de novo" della BH₄. Nella figura l'ovale rosso evidenzia l'enzima limitante la via sintetica, la GCH.

In cellule mesangiali di ratto è stato dimostrato che l'attività enzimatica della GCH è regolata da una fosforilazione PKC-indipendente (*Lapize et al., 1998*), ma il possibile ruolo della fosforilazione della GCH nei cardiomiociti non è ancora stato valutato. La fenilalanina, attraverso la proteina omopentamerica GFRP (GCH *feedback regulatory protein*) (*Milstien et al., 1996; Yoneyama et al., 1997, 1998*) esercita una regolazione positiva sull'attività della GCH, mentre la BH₄ esercita una regolazione negativa (*Harada et al., 1993*), attraverso l'induzione di variazioni conformazionali della struttura enzimatica (*Maita et al., 2004*).

Nei batteri (*Woo et al., 2002*) e nella *Drosophila* (*Krivi e Brown, 1979*), è stata dimostrata l'esistenza di un altro pathway sintetico per la BH₄, che prevede la conversione della 6-piruvolo tetraidrobiopterina a sepiapterina da parte di un enzima poco conosciuto, la sepiapterina sintasi. La presenza di questo enzima è stata evidenziata anche nei mammiferi (*Zorzi et al., 2002*).

La BH₄ è vulnerabile all'effetto dei radicali dell'ossigeno (ROS) e può essere ossidata dal superossido o, più avidamente, dal perossinitrito, a 7,8-diidrobiopterina (BH₂) e biopterina (B). La BH₂ compete con la BH₄ per il legame alla NOS, ma non stabilizza la forma dimerica attiva dell'enzima, favorendo la sintesi di superossido piuttosto che di NO (*Vasquez-Vivar et al., 2002*). Dunque, l'attività della forma accoppiata della NOS non dipende soltanto dalle concentrazioni assolute di BH₄ (*Bendall et al., 2005*), ma anche dal rapporto tra i livelli di BH₄ ed i suoi prodotti ossidati (BH₂ e B) (*Vasquez-Vivar et al., 2002*). La produzione di superossido da parte della NOS può quindi ulteriormente compromettere la funzionalità dell'enzima, poiché il superossido prodotto è in grado di catalizzare la riduzione della BH₄ a BH₂.

Il disaccoppiamento della NOS è associato ad una serie di patologie, quali ad esempio l'ipertensione e il diabete. Uno studio condotto su ratti spontaneamente ipertesi (SHR) mostra

che nell'aorta di animali pre-ipertensivi la eNOS è disaccoppiata, rappresentando, quindi, una sorgente di superossido. Ciò suggerisce che il superossido derivato dalla eNOS potrebbe contribuire allo sviluppo dell'ipertensione e all'insorgenza delle sue complicazioni vascolari (Cosentino et al 1998). Uno studio successivo su campioni aortici di topi con ipertensione da deossicortisterone acetato (DOCA) ha mostrato che un aumento della produzione di ROS da parte della NADPH ossidasi portava ad ossidazione e quindi deplezione di BH₄, causando il disaccoppiamento della eNOS; questo comportava una ridotta produzione di NO e un ulteriore incremento della produzione di superossido da parte della eNOS (Landmesser et al., 2003). Il trattamento dei topi con dosi orali di BH₄ (5mg/giorno) ha ridotto la produzione vascolare di superossido ed ha portato ad un aumento della produzione di NO.

Recenti studi hanno dimostrato che la biodisponibilità di BH₄ riveste un ruolo chiave nella riduzione delle concentrazioni di NO e nel conseguente aumento della produzione di superossido endoteliale osservato in condizioni di diabete. Il diabete è infatti associato a progressivo danno endoteliale, ed in particolare ad anomalie della funzionalità vascolare, relazionate ad aumento dello stress ossidativo ed a riduzione dell'attività dello NO (Alp et al., 2003).

Molti sono stati i modelli sperimentali utilizzati per studiare i meccanismi coinvolti nella disfunzione vascolare caratteristica del diabete, importante fattore di rischio per l'insorgenza di insufficienza cardiaca (Boudina e Abel, 2007). Hink e collaboratori (2001) hanno dimostrato che una singola dose di streptozocina (STZ, 65mg/kg), sostanza che distrugge le cellule beta del pancreas, per via endovenosa, induceva il caratteristico aumento della produzione di superossido e disfunzione endoteliale. La disponibilità di NO vascolare era ridotta in campioni

aortici di ratti diabetici, e la NADPH ossidasi e la NOS disaccoppiata sono state indicate come le maggiori fonti responsabili dell'incremento della produzione di superossido (*Hink et al., 2001*).

Recentemente, Alp e collaboratori (*2003*) hanno sviluppato un topo transgenico in grado di aumentare la disponibilità di BH₄ grazie ad una over-espressione endotelio-specifica dell'enzima limitante la sintesi di questa molecola, la GTP ciclo idrolasi (GCH). Il trattamento con una singola dose intraperitoneale di STZ (160mg/kg) ha indotto aumento dello stress ossidativo e conseguente perdita ossidativa di BH₄ (a BH₂) in topi diabetici WT. Al contrario, nei topi diabetici eGCH-Tg la produzione di superossido era ridotta, ed associata a mantenimento delle concentrazioni di BH₄ e della vasodilatazione NO-dipendente (*Alp et al., 2003*).

Ad oggi pochi sono i dati riguardanti il ruolo della BH₄ nel mantenimento della funzionalità cardiaca sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Pertanto, scopo della terza parte del presente lavoro di tesi, realizzata presso il Dipartimento di Medicina Cardiovascolare dell'Università di Oxford, sotto la supervisione della Prof.ssa Barbara Casadei, è stato quello di valutare il ruolo cardiaco della disponibilità di BH₄ nei meccanismi ossidativi associati allo stress iperglicemico.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Animali

Sono stati utilizzati topi maschi transgenici che esprimevano il gene umano della GCH1 (contenente il tag per l'emagglutinina, HA, sul sito N-terminale), sotto la regolazione del promotore della catena alfa della mioglobina (alfa-MHC). I topi transgenici (mGCH-Tg) ed i loro controlli wild-type (WT) sono stati stabulati in ambienti a temperatura e ciclo luce-buio controllati presso gli stabulari dell'Università di Oxford. Tutti i protocolli sono stati effettuati in accordo con la "UK Home Office Guidance on the Operation of Animals (Scientific Procedures)". Tutti gli animali sono stati sacrificati mediante dislocazione cervicale, in accordo con i protocolli riportati nella "Schedule 1".

2.2 Isolamento di cardiomiociti di ventricolo sinistro

L'isolamento dei miociti è stato effettuato mediante tecnica di dispersione enzimatica standardizzata (*Sears et al., 2003*). I cuori sono stati perfusi con una soluzione ossigenata, priva di calcio, a 37°C per 3 minuti, e poi con una soluzione di collagenasi 1 (*vedi sezione 1.2.8*) in perfusione per ulteriori 9 minuti. Al termine della perfusione, il ventricolo sinistro di ogni campione è stato isolato, pesato, tagliato in piccoli pezzi e conservato in beute contenenti 5 ml di soluzione di collagenasi 2 (*vedi sezione 1.2.8*), in rotazione per 5 minuti in un bagnetto termostato a 37°C. Al termine dei 5 minuti il sovrnatante è stato recuperato e centrifugato, mentre il tessuto rimanente è stato nuovamente trattato con soluzione di collagenasi 2. La procedura è stata ripetuta 3 volte. Al sovrnatante sono stati aggiunti 5 ml di soluzione 1% di BSA, e il tutto è stato centrifugato a 600rpm per 3 minuti, dopo i quali il pellet è stato rimosso,

risospeso in 5 ml della stessa soluzione e centrifugato nuovamente. Il sovranatante è stato rimosso ed il pellet, contenente miocardiociti di ventricolo sinistro, è stato risospeso in 5 ml di “storage solution” (vedi sezione 1.2.8), in cui le cellule sono risultate stabili per un periodo di circa 6 ore dopo l’isolamento.

2.3 Misurazione della produzione di superossido

La produzione extracellulare di superossido ad opera dei miociti di ventricolo sinistro è stata misurata mediante metodo “lucigenin-enhanced chemiluminescence”, utilizzando un luminometro a singola provetta (Berthold FB12) modificato per mantenere la soluzione ed il campione a 37°C, come descritto in letteratura (Kim et al., 2005). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in una camera oscura. La lucigenina reagisce con il superossido, formando un diossietano instabile, che si decompone in due molecole di metil-acridone, una delle quali si troverà in uno stato eccitato ed emetterà un fotone, misurato dal luminometro.

2.4 Preparazione omogenati di tessuto ventricolare

I cuori sono stati rapidamente rimossi dall’animale e pesati. Il ventricolo sinistro è stato rimosso, lavato in PBS e incluso in provette rapidamente immerse in azoto liquido e conservate a -80°C. I campioni sono stati successivamente omogenati in buffer di lisi (vedi sezione 1.2.8) mediante omogenatore Politron (PT2100, Kinematica, Switzerland).

2.5 Western Blotting

I miociti isolati sono stati centrifugati e risospesi in buffer di lisi (*vedi sezione 1.2.8*) ed incubati in ghiaccio per 30 minuti. Dopo valutazione della concentrazione proteica, le proteine sono state solubilizzate a 95°C per 5 minuti e separate mediante elettroforesi, trasferite su membrana di nitrocellulosa incubate con una soluzione PBST allo 0.1% di Tween 20 ed al 5% di latte in polvere per bloccare i siti di legame non specifici. Le membrane sono state quindi incubate con anticorpi monoclonali specifici preparati in PBST al 5% di latte in polvere, a temperatura ambiente per 1-2 ore. Sono stati effettuati 3 lavaggi da dieci minuti con PBST e le membrane sono state nuovamente incubate con anticorpi secondari coniugati con sistema HRP (Horse Radish Peroxidase). Dopo ulteriori 3 lavaggi, la rilevazione del segnale è stata effettuata mediante Kit di chemiluminescenza (Pierce-ThermoScientific).

2.6 Valutazione della concentrazione di biopterina (BH₄, BH₂, B)

I livelli di BH₄, BH₂ e B sono stati misurati mediante HPLC (High Performance Liquid Chromatography) come descritto in letteratura (*Alp et al., 2003*). La concentrazione di BH₄ è stata misurata mediante rilevazione elettrochimica, che prevede l'ossidazione della BH₄ a quinidone diidrobiopterina (qBH₂) da parte del primo elettrodo e la successiva riduzione, da parte dell'elettrodo 2, a BH₄. Il rilevatore misura la concentrazione di BH₄ utilizzando la corrente generata dalla reazione di riduzione.

Standards

La concentrazione delle soluzioni standard di BH_4 e BH_2 (Schirks, Zurich), conservate a $-80^\circ C$, erano approssimativamente di 10mmol/L in 20 mmol/L di HCl. Le concentrazioni finali utilizzate per gli esperimenti sono state di 100, 10, 7.5, 5, 2.5 ed 1 nmol/L.

Tessuti

I campioni di tessuto sono stati prelevati dagli animali e rapidamente congelati in azoto liquido, per poi essere conservati a $-80^\circ C$. 20-30 mg di tessuto congelato sono stati omogenati, come precedentemente descritto, per 30 secondi in 500 uL di buffer freddo utilizzando una sonda Politron, e mantenuti in ghiaccio secco per minimizzare l'ossidazione della BH_4 . I tessuti omogenati sono stati centrifugati in camera fredda per 5 minuti a 13000 rpm. Il sovratanante è stato trasferito in nuovi tubi pre-raffreddati.

Processamento dei campioni

A 180 uL di soluzione standard e campione sono stati aggiunti 20 uL di buffer di precipitazione freddo. La soluzione così ottenuta è stata centrifugata in camera fredda a 13000rpm per rimuovere i detriti cellulari; 150 uL del sovratanante così ottenuto sono stati trasferiti in piastre per HPLC. La separazione mediante HPLC è stata eseguita utilizzando una colonna di 250mm ACE-C18 (Hichrome, UK) ed una fase mobile a flusso costante di 1.3mm/min.

2.7 Valutazione dell'attività della GCH

L'attività dell'enzima GCH è stata valutata mediante HPLC ad inversione di fase, utilizzando un protocollo simile a quello precedentemente descritto, analizzando però il picco per la 7,8-diidroneopterina trifosfato, intermedio prodotto dalla GCH a partire dal GTP.

Standard

Le soluzioni di neopterina a concentrazione di 10 mmol/L, e conservate a -80°C, sono state diluite alle concentrazioni finali di 100, 50, 10, 5, 1, 0.5 e 0.1 nmol/L. Gli standard sono stati conservati in ghiaccio.

Preparazione dei campioni

I campioni sono stati prelevati e processati come precedentemente descritto. A 250uL del sovrinatante ottenuto sono stati aggiunti 50uL di GTP 10mmol/L ed incubati a 37°C per 1 ora. Successivamente sono stati aggiunti 10uL di HCl 1mol/L e poi 10uL di soluzione allo 1% di iodina e al 2% di iodato di potassio. Il campione è stato nuovamente incubato a 37°C per 1 ora, centrifugato per 2 minuti a 10000g e sono stati prelevati 300uL del sovrinatante. Sono stati quindi aggiunti 10uL di soluzione di acido ascorbico 100mmol/L, che ha causato il viraggio del colore del campione da marrone a trasparente. Infine, sono stati aggiunti 10uL di NaOH 1mol/L e 20uL di fosfatasi alcalina (16 unità/ml, Invitrogen #18009-027) ed il campione è stato di nuovo incubato a 37°C per 1 ora. 150uL del campione così ottenuto sono stati trasferiti in una piastra per HPLC.

2.8 Soluzioni standard

“Isolation Solution” (in mmol/L): NaCl 130, KCl 5.4, MgCl₂ 3.5, glucosio 10, HEPES 5, Na₂HPO₄ 0.4, taurina 20; pH = 7.4 (gli aggiustamenti sono stati effettuati con NaOH o HCl);

Soluzione di collagenasi I: 1 mg/mL collagenasi I (Worthington Biochemical Corp.), 0.133 mg/mL proteasi, 1.65 mg/mL albumina di siero bovino (BSA), 50 μmol/L CaCl₂; ossigenata a 37°C;

Soluzione di collagenasi II: 1 mg/mL collagenasi II, 1.65 mg/mL BSA, 50 μmol/L CaCl₂; ossigenata a 37°C;

“Storage Solution” (in mmol/L): NaCl 120, KCl 5.6, MgSO₄ 5, glucosio 20, HEPES 10, taurina 20, Na-piruvato 5, CaCl₂ 0.2; pH = 7.4 (gli aggiustamenti sono stati effettuati con NaOH o HCl);

Soluzione di perfusione (in mmol/L): NaCl 140, KCl 4, MgCl₂ 1, glucosio 10, HEPES 5, CaCl₂ (concentrazione variabile compresa tra 1 e 5); pH = 7.4 (gli aggiustamenti sono stati effettuati con NaOH o HCl);

Soluzione di perfusione priva di Ca²⁺ e NA⁺: (in mmol/L): LiCl 140, KCl 4, MgCl₂ 1, glucosio 10, HEPES 5, EGTA 10; pH = 7.4 (gli aggiustamenti sono stati effettuati con NaOH o HCl);

“Krebs’ HEPES Buffer” (KHB, in mmol/L): NaCl 118, HEPES 10, NaHCO₃ 25, glucosio 5.6, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.1, CaCl₂ (concentrazione variabile compresa 1.4 e 4); gasificata con 95% O₂ / 5% CO₂, pH = 7.4 (gli aggiustamenti sono stati effettuati con NaOH o HCl);

Buffer di lisi cellulare: CellLytic™ MT Cell Lysis Reagent (Sigma Aldrich, Cat. # C3228) con inibitore delle proteasi: cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche Applied Science, Cat. # 11836153001);

Buffer di corsa per elettroforesi: Tris-Acetate SDS Running Buffer (Invitrogen, Cat. # LA0041)

oppure MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen, Cat. # NP0001);

Buffer di trasferimento per Western Blotting: (in mmol/L): Tris-base 25, glicina 192; 20% metanolo.

2.9 Analisi statistiche

Tutti i dati sono stati espressi come media \pm SEM, e la significatività è stata assegnata mediante test T-Student a due code o mediante analisi ANOVA. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Caratterizzazione del fenotipo dei topi mGCH-Tg

Valutazione dell'espressione proteica della GCH

Le analisi di Western Blotting hanno evidenziato una over-espressione della GCH altamente specifica a livello miocardico (**Fig. 3A**), con una leggera over-produzione aspecifica della proteina in tessuti extracardiaci quali aorta e polmoni (**Fig. 3B, C**), confermando quanto già osservato nel modello di topo transgenico eGCH-Tg (*Alp et al., 2003*) Nessuna differenza di espressione è stata invece osservata negli altri tessuti analizzati (**Fig. 3D, E, F**).

Valutazione dell'attività enzimatica della GCH

Al fine di valutare se l'isoforma della proteina over-espressa fosse anche funzionante abbiamo analizzato, mediante tecnica HPLC, l'attività enzimatica della GCH. I risultati mostrano un significativo incremento di attività enzimatica in omogenati di miocardio di topi mGCH-Tg rispetto ai topi WT (**Fig. 4**).

Valutazione delle concentrazioni di BH₄ e biopterine

La GCH costituisce l'enzima limitante la sintesi di BH₄ (*Thony et al., 2000*). Le analisi di HPLC hanno evidenziato un significativo aumento delle concentrazioni di BH₄ e dei suoi prodotti ossidati in campioni cardiaci di topi mGCH-Tg rispetto ai topi WT (**Fig. 5**). I presenti risultati, in linea con l'analisi dei livelli proteici di m-GCH e dell'attività enzimatica della proteina, confermano ulteriormente la specificità dell'over-produzione di una isoforma funzionante della GCH.

La forma parzialmente ossidata della BH₄, la BH₂, compete con la BH₄ per il legame alla NOS, ma non è in grado di stabilizzare l'enzima (Vasquez-Vivar et al., 2002). Dunque, l'attività della forma "accoppiata" della NOS non dipende soltanto dalle concentrazioni assolute di BH₄ (Bendall et al., 2005), ma anche dal rapporto tra i livelli di BH₄ ed i suoi prodotti ossidati (BH₂+B) (Vasquez-Vivar et al., 2002). Nei nostri esperimenti, la concentrazione di BH₄ e delle biopterine totali è risultata significativamente aumentata in omogenati ventricolari di topi mGCH-Tg rispetto ai topi WT (**Fig. 5A**). Tuttavia è stato osservato un analogo incremento delle concentrazioni di BH₂ e B (**Fig. 5B**), che comporta una riduzione del rapporto BH₄ / (BH₂+B) (**Fig. 5C**). Le concentrazioni di BH₄ e di biopterine sono risultati significativamente aumentati anche in tessuto aortico di topi mGCH-Tg (**Fig. 6A**), ed un trend di incremento è stato evidenziato dalle analisi condotte su tessuto polmonare (**Fig. 6B**). Al contrario, non sono state osservate differenze di espressione di tali molecole negli altri tessuti analizzati (plasma, fegato, muscolo scheletrico e cervello) (**Fig. 6C-F**), confermando ancora una volta l'elevata specificità dell'over-produzione di una isoforma funzionante dell'enzima GCH.

Specificità dell'over-espressione miocardica di GCH

Al fine di avere conferma diretta della specificità dell'over-produzione della GCH a livello miocitario, i miociti ventricolari sono stati enzimaticamente isolati e centrifugati, per ottenere una frazione ricca ed una povera in miociti. Successive analisi di HPLC hanno dimostrato che l'espressione di biopterina era specifica per la frazione ricca di miociti (**Fig. 7**).

3.2 Valutazione della produzione di superossido

L'attività della NOS è strettamente correlata alla presenza di BH₄. In presenza di tale molecola infatti l'enzima funziona correttamente e produce NO. In assenza di BH₄, l'enzima è in forma disaccoppiata, e predilige la produzione di superossido piuttosto che di NO. Al fine di valutare il corretto funzionamento dell'enzima NOS, abbiamo misurato, mediante "lucigenin-enhanced chemiluminescence" la produzione basale di superossido, che è risultata ridotta in omogenati cardiaci di topi mGCH-Tg rispetto ai topi WT (in RLU/mg proteina: 63.4 ± 5.2 in WT vs. 45.7 ± 4.8; n = 7 & 6; p = 0.03) (**Fig. 8**). Tali risultati indicano la presenza dell'isoforma accoppiata dell'enzima NOS in maggiore percentuale nei topi mGCH-Tg.

Questi risultati dimostrano che una over-espressione miocardio-specifica della GCH induce un incremento miocardio-specifico delle concentrazioni di BH₄ e di biopterina nella frazione miocitaria. Inoltre, nonostante il significativo incremento della concentrazione miocardica di BH₄ osservato, la riduzione del rapporto tra la BH₄ ed i suoi prodotti ossidati indica che una frazione considerevole delle biopterine miocardiche subisce ossidazione. Queste evidenze sperimentali, associate alla riduzione della produzione miocardica di superossido, suggeriscono il mantenimento della forma accoppiata dell'enzima NOS.

È stato dimostrato che a livello plasmatico la BH₄ viene ossidata a BH₂ e trasportata nelle cellule, dove viene nuovamente convertita a BH₄ ad opera dell'enzima diidrofolato reduttasi (*Hasegawa et al., 2005*). Tuttavia, l'incremento delle concentrazioni di BH₄ osservato esclusivamente nella frazione miocitaria suggerisce che le biopterine sintetizzate nei miociti ventricolari rimangono confinate all'interno della cellula. Questo ci permette di ipotizzare una unidirezionalità del trasporto di BH₄ attraverso la membrana plasmatica.

Nelle cellule endoteliali, il funzionamento e l'accoppiamento della NOS sono strettamente dipendenti dalla disponibilità di BH₄ e dei suoi prodotti ossidati (*Vasquez-Vivar et al., 2002; Crabtree et al., 2009*). I nostri risultati indicano che, in topi mGCH-Tg, la riduzione del rapporto BH₄/(BH₂+B) non comporta alterazioni della funzionalità della NOS. Questo è in linea con recenti dati ottenuti in campioni con fibrillazione atriale, in cui la riduzione del rapporto BH₄/(BH₂+B) non è risultata sufficiente a causare il disaccoppiamento della NOS in assenza di una significativa riduzione di BH₄ (*Reilly et al., 2011*). L'analisi della produzione di superossido in topi mGCH-Tg conferma, anche se indirettamente, un aumento di attività della NOS.

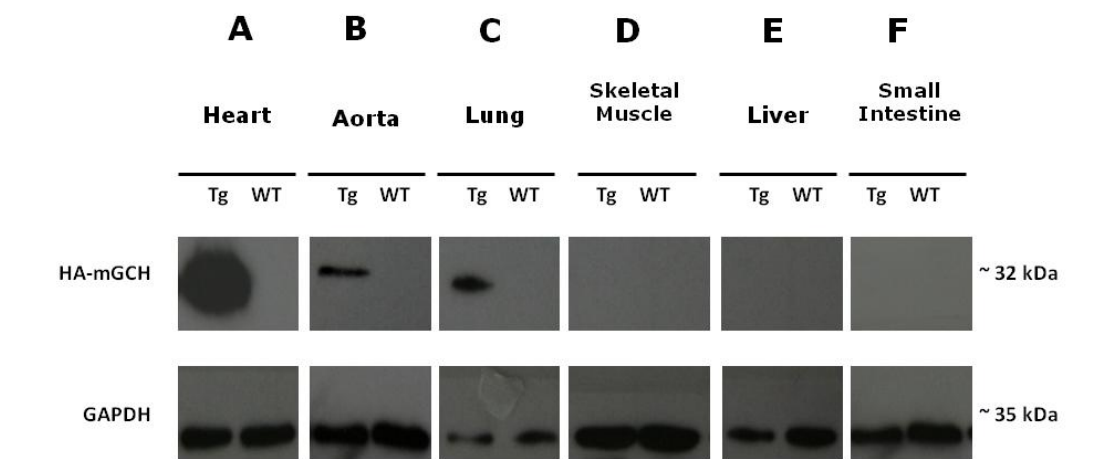


Fig. 3. Valutazione dell'espressione della proteina HA-mGCH (32 kDa) in campioni di cuore (A), aorta (B), tessuto polmonare (C), muscolo scheletrico (D), fegato (E) e intestino tenue (F) provenienti da topi wild-type (WT) e topi mGCH-Tg (Tg). Come controllo proteico è stato utilizzato il GAPDH.

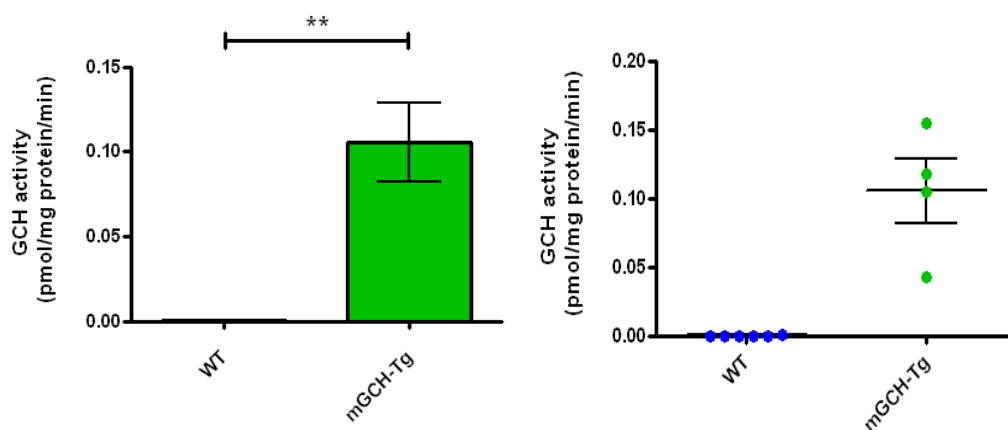


Fig. 4. Valutazione dell'attività enzimatica della GCH mediante HPLC in topi wild-type (WT) e mGCH-Tg (Tg). **= $p < 0.01$

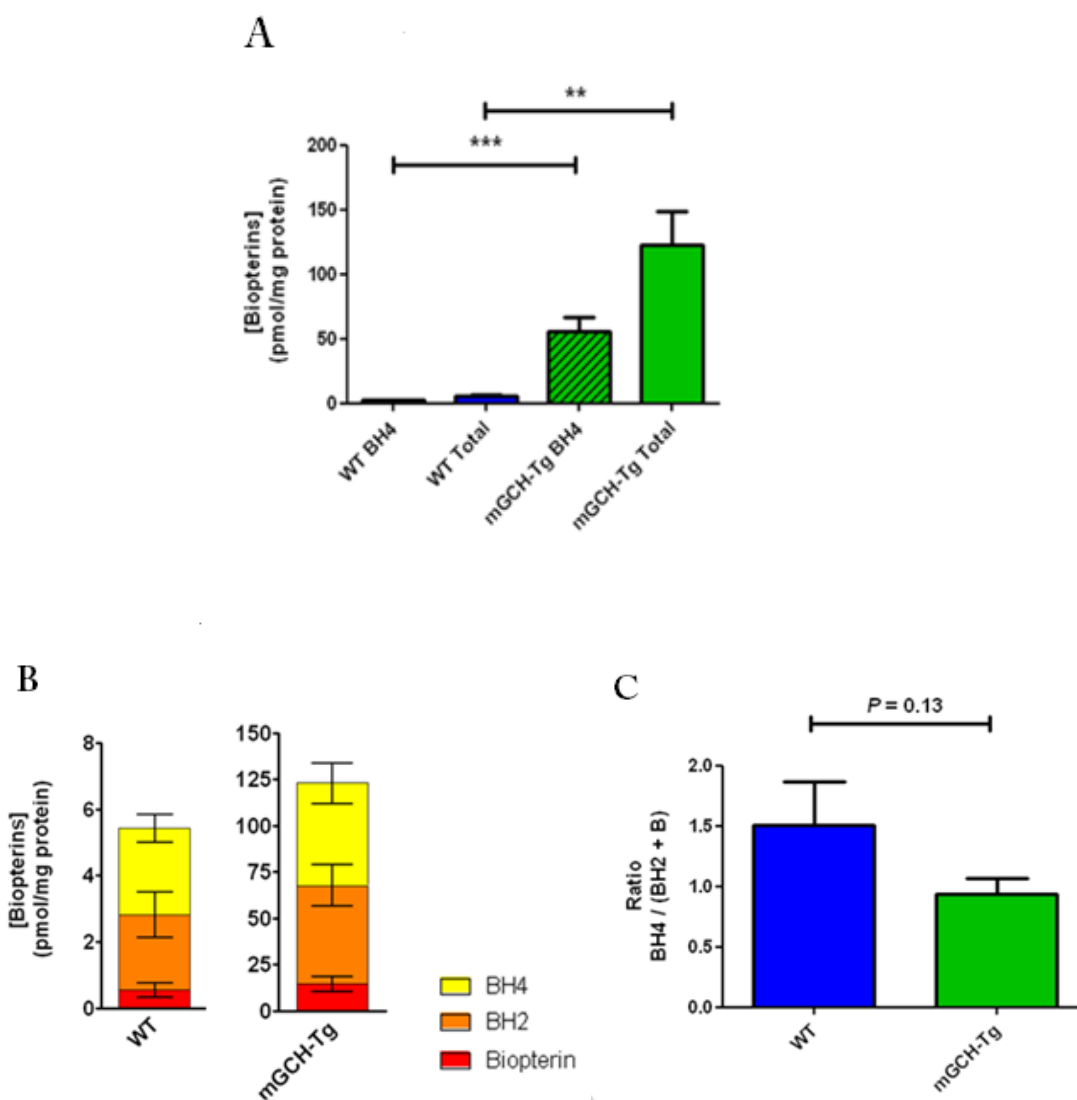


Fig. 5. (A) Valutazione delle concentrazioni di BH₄ e di biopterine totali in topi wild-type (WT) e mGCH-Tg (Tg). (B) Valutazione delle concentrazioni singole di BH₄, BH₂ e B. (C) Valutazione del rapporto BH₄/(BH₂+B). **=p<0.01; ***=p<0.001

Fig. 6. Valutazione della concentrazione di BH₄ e delle biopterine totali in tessuto aortico (A), polmonare (B), plasmatico (C), epatico (D), muscolare scheletrico (E) e cerebrale (F) di topi wild-type (WT) e mGCH-Tg (Tg). *=p<0.05; **=p<0.01

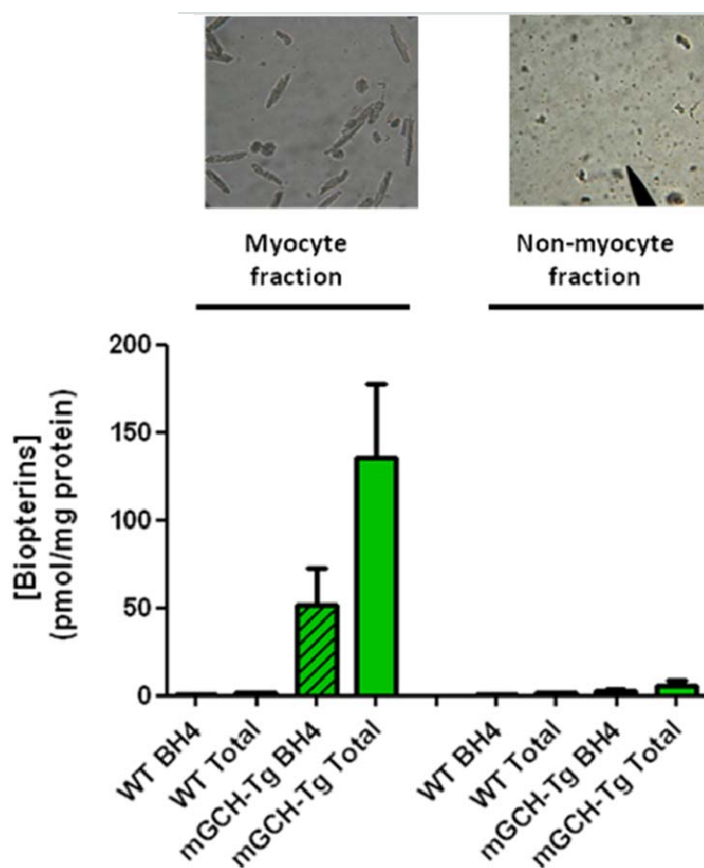


Fig. 7. Valutazione della concentrazione di BH₄ e biopterine totali in frazioni miocitarie e non miocitarie di tessuto ventricolare di topi wild-type (WT) e mGCH-Tg (Tg).

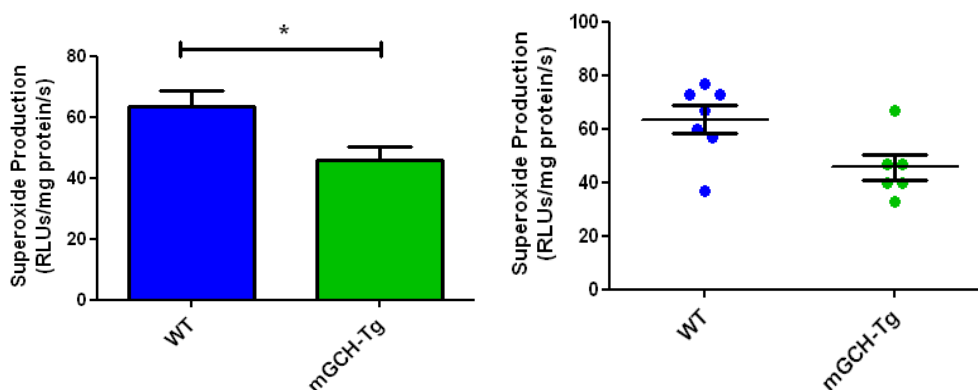


Fig. 8. Valutazione della produzione di superossido in estratti ventricolari di topi wild-type (WT) e mGCH-Tg (Tg).

3.3 Induzione a breve termine del diabete di tipo 1

E' stato dimostrato che varie condizioni di stress, tra cui stress ipossico, ossidativo e rapide variazioni di temperatura, possono alterare la stabilità della forma dimerica della NOS (Tóth et al., 1998; Delgado-Esteban et al., 2002). È stato inoltre riportato che il disaccoppiamento dell'enzima è associato ad una serie di patologie correlate a disfunzione cardiaca, tra cui il diabete. Pertanto abbiamo deciso di utilizzare un modello di topo mGCH-Tg per l'induzione del diabete di tipo1 a breve termine, al fine di valutare il ruolo della BH₄ nel disaccoppiamento dell'enzima NOS associato ad iperglicemia.

Topi mGCH-Tg e topi WT sono stati trattati con streptozocina (iniezione intraperitoneale di 140mg/kg peso corporeo) (STZ) o con soluzione di citrato di sodio (CTR). Il peso corporeo e le concentrazioni plasmatiche di glucosio sono state controllate regolarmente per tutta la durata del protocollo (21 giorni).

3.4 Monitoraggio variazioni di peso corporeo e livelli di glucosio

I topi di controllo di entrambi i genotipi (WT e mGCH-Tg) non hanno mostrato significative variazioni di peso durante i 21 giorni di trattamento, mentre in entrambi i gruppi iniettati con STZ è stata osservata una significativa (10-20%) riduzione della massa corporea (da 26.7 g ± 0.95 a 24.5 g ± 0.64 per i topi WT, e da 30.3 g ± 1.23 a 24.9 g ± 0.99 per i topi mGCH-Tg; n = 11; p = 0.001 e < 0.0001 rispettivamente) (**Fig. 9**).

La valutazione delle concentrazioni plasmatiche di glucosio non ha evidenziato significative variazioni nei topi di controllo, mentre è stato osservato un significativo incremento della glicemia nei topi di entrambi i gruppi iniettati con STZ (**Fig. 10**) (da 7.26 mmol/L ± 0.29 a 26.01

mmol/L \pm 2.57 in topi WT, e da 7.31 mmol/L \pm 0.22 a 24.62 mmol/L \pm 2.23 in topi mGCH-Tg; $n = 11$; $p < 0.0001$ in ogni gruppo). I nostri risultati mostrano inoltre che i topi iniettati con STZ risultavano iperglicemici a partire già dal settimo giorno di trattamento (**Fig. 10**), suggerendo che il trattamento induce una significativa e persistente iperglicemia, associata ad evidente perdita di peso.

3.5 Effetti dell'induzione del diabete a breve termine sui livelli di BH₄ e sulla produzione di superossido

È stato precedentemente dimostrato che le concentrazioni ventricolari di BH₄ e biopterine totali, così come le concentrazioni individuali dei prodotti (BH₄, BH₂ e B) sono significativamente maggiori in topi mGCH-Tg rispetto ai topi WT (**Fig. 5**); non è stata tuttavia osservata alcuna differenza di espressione in tessuto ventricolare di topi diabetici rispetto ai loro controlli (**Fig. 11A-B**). Le analisi HPLC hanno inoltre evidenziato che il rapporto BH₄/(BH₂+B) è ridotto in tessuto ventricolare di topi mGCH-Tg rispetto ai topi WT, ma che tale riduzione non è influenzata dal diabete (**Fig. 11C**). Al contrario, l'analisi dello stesso rapporto in tessuto aortico non ha evidenziato alcuna differenza tra i topi di controllo WT e Tg ma, come precedentemente dimostrato in modelli di ratti diabetici (*Shinozaki et al., 2000*), è stata osservata una significativa riduzione in campioni di topi diabetici rispetto ai loro controlli in entrambi i genotipi (rapporto: 2.94 ± 0.2 in WT + CTR vs. 2.02 ± 0.2 in WT + STZ; $n = 11$ & 14 ; $p = 0.007$; e 3.50 ± 0.4 in mGCH-Tg + CTR vs. 2.29 ± 0.2 in mGCH-Tg + STZ; $n = 8$ & 8 ; $p = 0.02$) (**Fig. 11C**).

Il trattamento con STZ non ha indotto variazioni della produzione di superossido miocardico in nessuno dei due genotipi, risultato in linea con il mantenimento dei livelli assoluti di BH_4 e del rapporto $BH_4/(BH_2+B)$ di topi diabetici rispetto ai loro controlli (**Fig. 12**).

Nel complesso, i presenti dati suggeriscono che, nel modello sperimentale di diabete a breve termine da noi utilizzato, l'effetto dell'iperglicemia è evidente in tessuto aortico, in cui il rapporto $BH_4/(BH_2+B)$ risulta significativamente ridotto, ma pare non avere implicazioni a livello cardiaco. Infatti, nel miocardio di topi mGCH-Tg diabetici il rapporto tra la BH_4 e le sue forme ossidate è preservato, e la produzione di superossido resta invariata, suggerendo un ruolo cardioprotettivo della BH_4 nel disaccoppiamento dell'enzima NOS e nella relativa disfunzione endoteliale caratteristica della condizione iperglicemica.

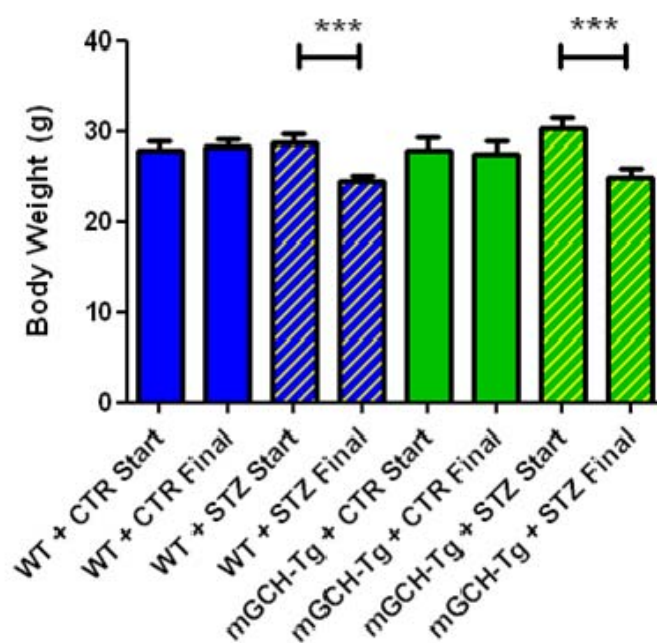


Fig. 9. Variazioni di massa corporea di topi wild-type e mGCH-Tg trattati con streptozocina (STZ) e con soluzione di citrato di sodio (CTR).

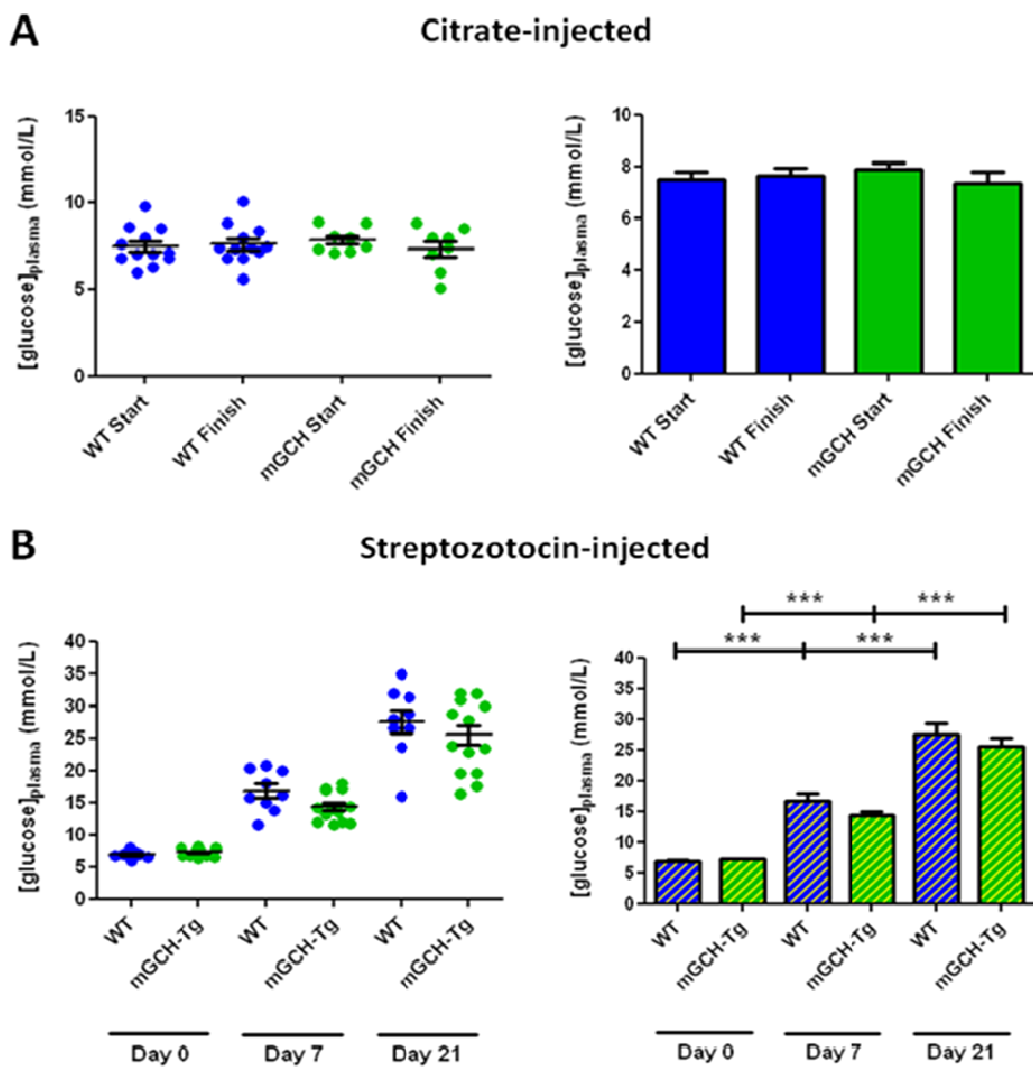


Fig. 10. Valutazione delle concentrazioni di glucosio plasmatico in topi trattati con streptozocina (STZ) e con soluzione di citrato di sodio (CTR). ***= $p < 0.001$

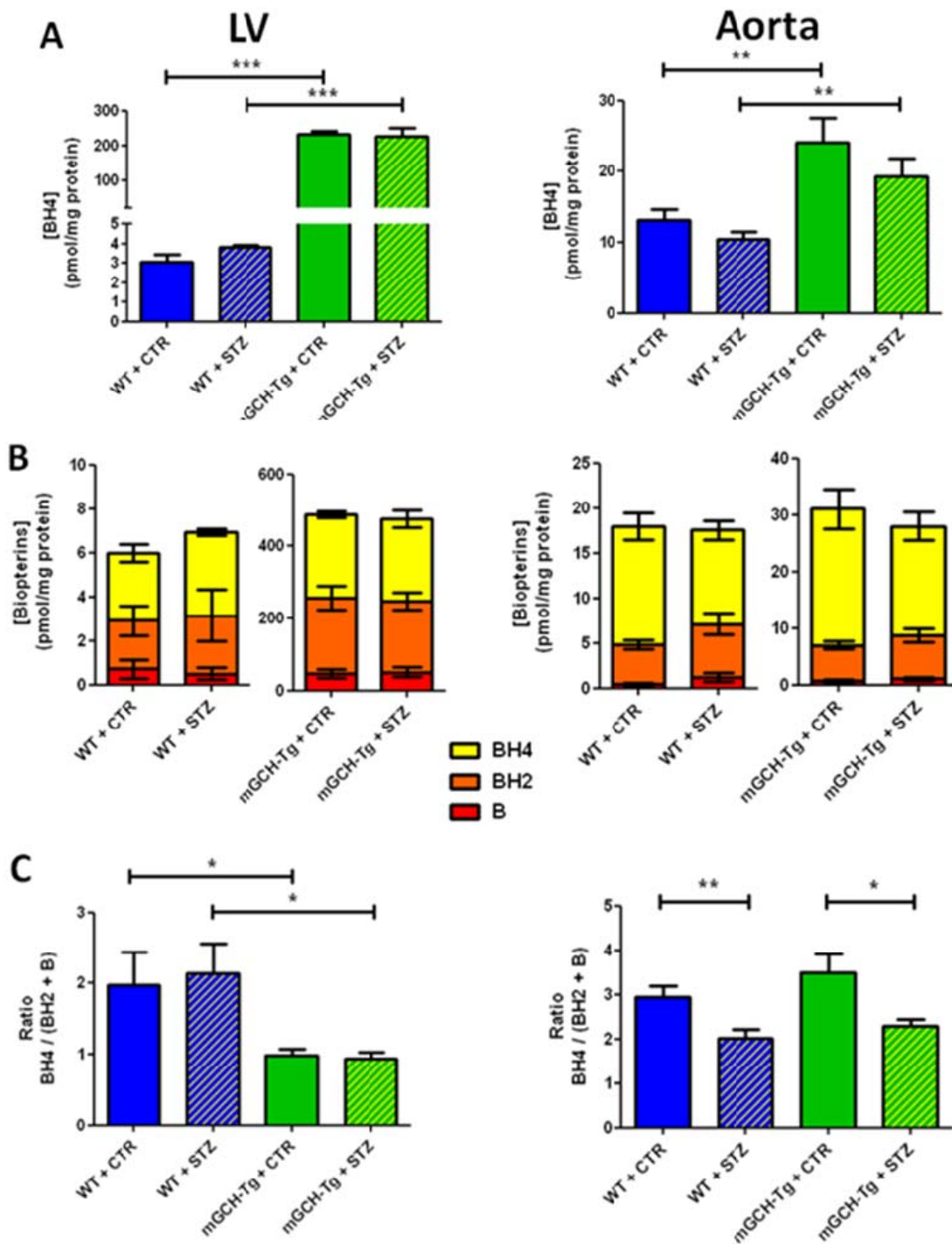


Fig. 11. Analisi HPLC dei livelli di BH₄ (A), delle concentrazioni individuali di BH₄, BH₂ e B (B), e del rapporto BH₄/(BH₂+B) (C), in tessuto ventricolare (sinistra) ed aortico (destra) di topi WT e mGCH-Tg di controllo e trattati con streptozocina

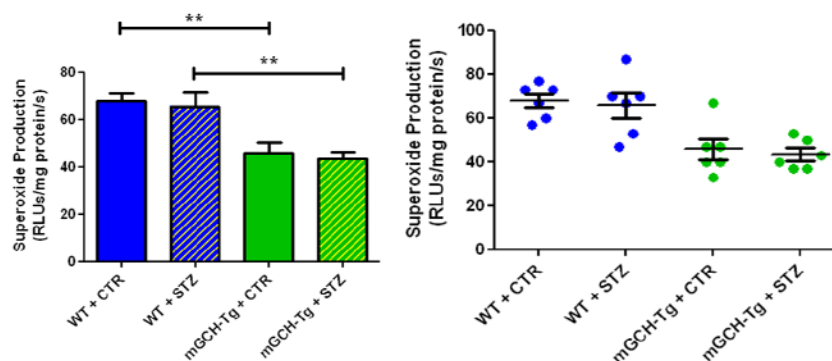


Fig. 12. Valutazione della produzione di superossido in estratti di tessuto ventricolare di topi WT e mGCH-Tg di controllo (CTR) e trattati con streptozocina (STZ).

3.6 Induzione a lungo termine del diabete di tipo 1

Al fine di confermare i dati precedentemente ottenuti anche in un modello di diabete di tipo 1 a lungo termine, topi WT e mGCH-Tg sono stati trattati con 5 dosi consecutive di STZ (40mg/kg peso corporeo) per via intraperitoneale. I topi di controllo sono stati trattati con 5 iniezioni intraperitoneali consecutive di soluzione di citrato di sodio. Il peso corporeo e le concentrazioni di glucosio plasmatico sono state controllate regolarmente per tutta la durata del protocollo (10 settimane).

3.7 Analisi delle variazioni di peso corporeo e glicemia

I topi di controllo di entrambi i genotipi non hanno mostrato significative variazioni di peso corporeo durante il periodo di trattamento, mentre in entrambi i gruppi iniettati con STZ è stato osservato un trend di riduzione di massa corporea (**Fig. 13, 14**). Il trattamento con STZ ha indotto, dopo 7 giorni, insorgenza di iperglicemia sia nei topi WT che in topi mGCH-Tg; l'iperglicemia è perdurata fino alla fine delle 10 settimane di trattamento, e non è stata osservata alcuna variazione dei livelli glicemici plasmatici nei topi di controllo (**Fig. 15**).

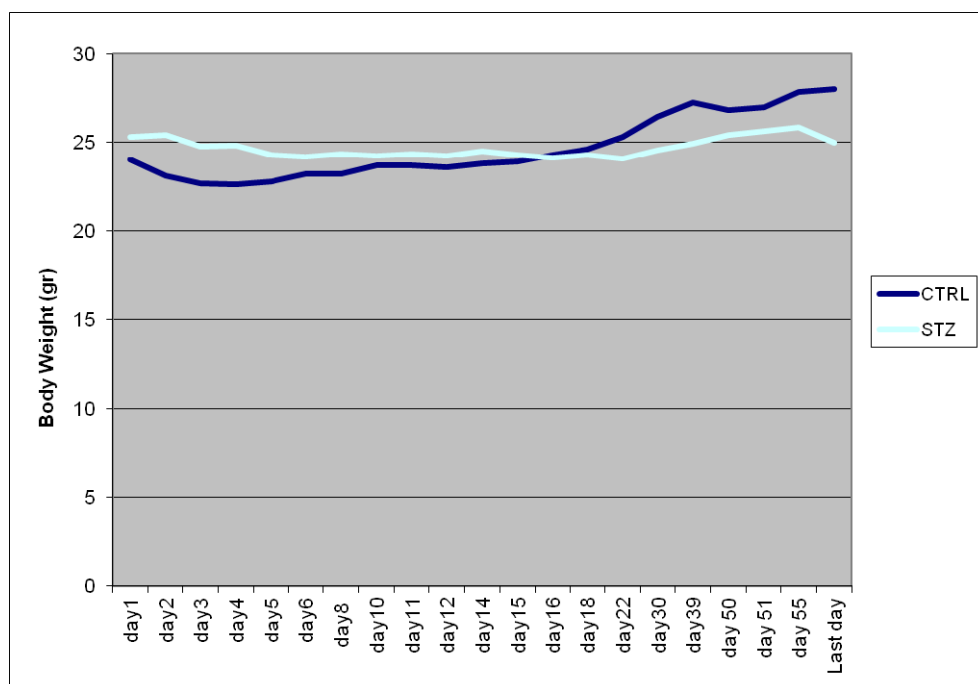


Fig. 13. Variazioni di peso corporeo dei topi WT di controllo (curva blu) e dopo trattamento con STZ (40mg/kg)

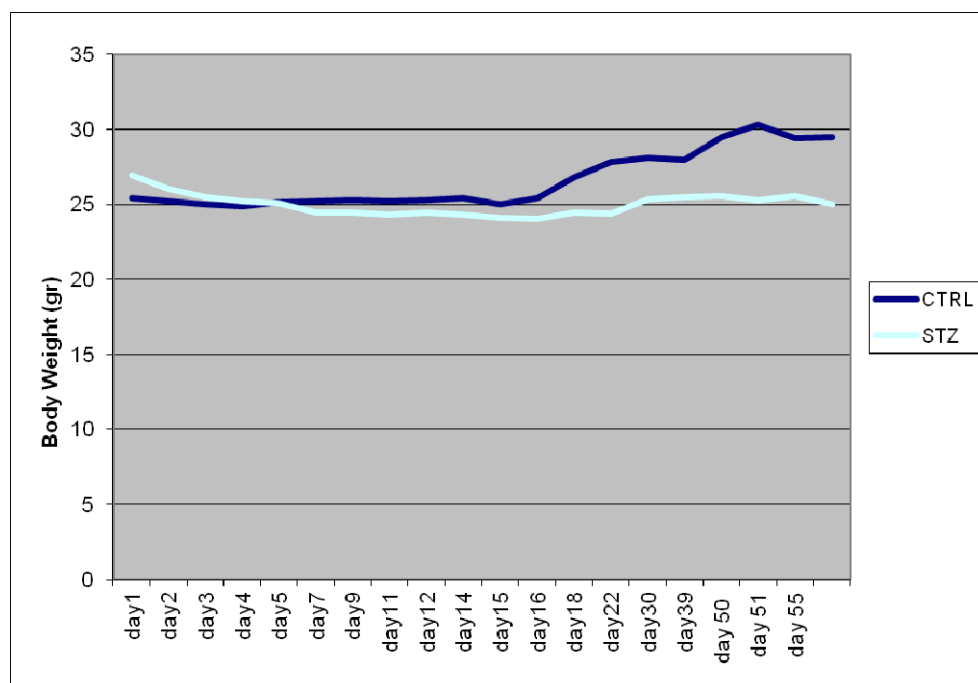


Fig. 14. Variazioni di peso corporeo dei topi mGCH-Tg di controllo (curva blu) e dopo trattamento con STZ (40mg/kg)

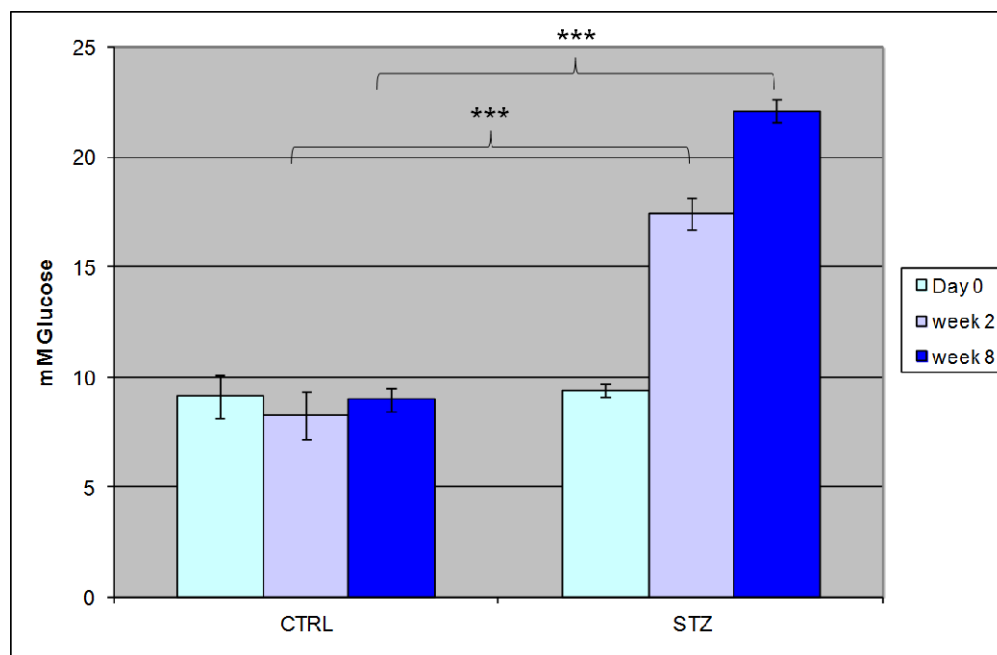


Fig. 15. Valutazione delle concentrazioni di glucosio plasmatico in topi WT e mGCH-Tg di controllo (CTRL) e trattati con streptozocina (40mg/kg peso corporeo) (STZ) al giorno 0 (barra azzurra), dopo 2 settimane (barra grigia) ed alla fine del trattamento (barra blu).***= $p < 0.001$

Questa parte del lavoro è in corso presso i laboratori del Dipartimento di Medicina Cardiovascolare dell'Università di Oxford. Se i risultati ottenuti nel modello di diabete a breve termine dovessero essere confermati nel modello di diabete a lungo termine, risulterà di particolare interesse una analisi più approfondita dei meccanismi di protezione cardiaca che si attivano in condizioni di stress iperglicemico.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi di dottorato hanno evidenziato la relazione esistente tra varie condizioni di stress e il sistema NOS/NO cardiaco.

In particolare, è stato dimostrato che, nel cuore isolato e perfuso di *A. anguilla*, la modulazione nitrgica della risposta di Frank-Starling è abolita da acute variazioni di temperatura. Questo è evidenziato dalla riduzione della risposta di Starling osservata in condizioni di shock termico e confermata dal trattamento con l'inibitore della NOS (L-NIO), che è risultato incapace di esercitare i suoi effetti quando la perfusione era condotta a temperature diverse (sia maggiori che minori) da quella di acclimatazione. L'abolizione del controllo NO-dipendente della risposta di Frank-Starling in condizioni di stress termico avviene attraverso la modulazione di proteine kinasi, designando la kinasi Akt come elemento termosensibile nella cascata che porta alla produzione di NO. Eventuali effetti diretti della temperatura sulla struttura e sulla funzionalità delle isoforme enzimatiche della NOS dovranno essere valutati da studi futuri.

Inoltre, abbiamo dimostrato che l'architettura morfo-funzionale del cuore di goldfish è strettamente correlata alla capacità di questo teleosteo di tollerare severe e prolungate condizioni ipossiche. L'ampiezza dell'atrio, l'elevata *compliance* del bulbo e la presenza di molti spazi trabecolati all'interno della struttura atriale ci permettono infatti di definire il comportamento del cuore di goldfish come pompa di volume, in grado di spostare elevate quantità di sangue. Abbiamo inoltre dimostrato che il sistema NOS/NO modula la performance cardiaca del cuore di goldfish in maniera dipendente da variazioni della concentrazione di ossigeno. In condizioni basali, il trattamento con L-NMMA (inibitore della NOS) ha esercitato un effetto inotropo positivo sia in normossia che in ipossia, mentre il trattamento con nitrito ha indotto un effetto inotropo negativo in condizioni normossiche ed un effetto inotropo positivo in condizioni ipossiche. In risposta agli incrementi di precarico, il trattamento con L-

NMMA ha significativamente ridotto la curva di Starling in normossia, mentre non ha esercitato alcun effetto in ipossia; al contrario, il nitrito non ha modificato la risposta di Starling in condizioni normossiche, mentre ha ridotto tale risposta in condizioni ipossiche, riportandola ai valori di controllo ottenuti in normossia. Questi risultati hanno evidenziato un ruolo del sistema NOS/NO nella modulazione della performance cardiaca sia basale che fisicamente stimolata, ed una sensibilità dei meccanismi NOS/NO-dipendenti a variazioni della concentrazione di ossigeno. Ulteriori studi, sono necessari per meglio definire il ruolo del sistema NOS/NO nei meccanismi di tolleranza all'ipossia, analizzando eventuali differenze di espressione dell'enzima NOS in relazione alla disponibilità di ossigeno, ed identificando le specifiche cascate trasduzionali e gli effettori intracellulari attivati dallo NO in condizioni di normossia e di ipossia.

L'ultima parte del presente lavoro ha evidenziato, mediante l'utilizzo di topi mGCH-Tg, il ruolo della BH₄ nel mantenimento della forma accoppiata dell'enzima NOS e quindi dell'omeostasi dello NO, e le influenze sui meccanismi ossidativi tipici del diabete.

I risultati ottenuti hanno infatti evidenziato una over-espressione miocardio specifica dell'enzima GCH, associata ad un aumento delle concentrazioni di BH₄ e dei suoi prodotti ossidati (BH₂ e B) ed ad una riduzione della produzione di superossido in tessuto ventricolare di topi mGCH-Tg rispetto ai topi WT, confermando l'ipotesi che la BH₄ riveste un ruolo fondamentale nella stabilizzazione della forma dimerica dell'enzima NOS. Inoltre la concentrazione di BH₄ e dei suoi prodotti ossidati, così come la produzione di superossido in tessuto ventricolare di topi mGCH-Tg, non sono state modificate dall'insorgenza di iperglicemia, supportando l'ipotesi che un aumento della disponibilità di BH₄ favorisce l'accoppiamento dell'enzima NOS anche in condizioni di stress iperglicemico.

Nell'insieme, i dati ottenuti suggeriscono che nel cuore dei vertebrati il sistema NOS/NO rappresenta un punto nodale su cui convergono segnali attivati da condizioni di stress (ad esempio, variazioni di temperatura, stress ipossico ed iperglicemico), e da cui si dipartono cascate trasduzionali fondamentali per il mantenimento dell'omeostasi cardiaca in tali condizioni.

BIBLIOGRAFIA

Aho, E., Vornanen, M., 1998. CaATPase activity and Ca uptake by sarcoplasmic reticulum in fish heart: effects of thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* 201, 525-532.

Aho, E., Vornanen, M., 1999. Contractile properties of atrial and ventricular myocardium of the heart of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effects of thermal acclimation. *J. Exp. Biol.* 202, 2663-2677.

Alp, N.J., Mussa, S., Khoo, J., Cai, S., Guzik, T., Jefferson, A., Goh, N., Rockett, K.A., Channon, K.M., 2003. Tetrahydrobiopterin-dependent preservation of nitric oxide-mediated endothelial function in diabetes by targeted transgenic GTP-cyclohydrolase I overexpression. *J. Clin. Invest.* 112, 725-735

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

Amelio, D., Garofalo, F., Brunelli, E., Loong, A.M., Wong, W.P., Ip, Y.K., Tota, B., Cerra, M.C., 2008. Differential NOS expression in freshwater and aestivating *Protopterus dolloi* (lungfish): heart vs kidney readjustments. *Nitric Oxide*.18,1-10.

Anderson, R.G., 1993. Caveolae: where incoming and outgoing messengers meet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 10909-10913.

Angelone, T., Filice, E., Quintieri, A.M., Imbrogno, S., Amodio, N., Pasqua, T., Pellegrino, D., Mulè, F., Cerra, M.C., 2010. Receptor identification and physiological characterisation of glucagon-like peptide-2 in the rat heart. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 22, 486-494.

Angelone, T., Gattuso, A., Imbrogno, S., Mazza, R., Tota, B., 2012. Nitrite is a positive modulator of the Frank-Starling response in the vertebrate heart. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 302, 1271-1281.

Arad, Z., Mizrahi, T., Goldenberg, S., Heller, J., 2010. Natural annual cycle of heat shock protein expression in land snails: desert versus Mediterranean species of *Sphincterochila*. *J. Exp. Biol.* 213, 3487-3495.

Arstall, M.A., Bailey, C., Gross, W.L., Bak, M., Balligand, J.L., Kelly, R.A., 1998. Reversible S-nitrosation of creatine kinase by nitric oxide in adult rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 979-88.

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, 10089-10093.

Balligand, J.L., Kobzik, L., Han, X., Kaye, D.M., Belhassen, L., O'Hara, D.S., Kelly, R.A., Smith, T.W., 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.

Balligand, J.L., Cannon, P.J., 1997. Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1846-1858.

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.

Bendall, J.K., Alp, N.J., Warrick, N., Cai, S., Adlam, D., Rockett, K., Yokoyama, M., Kawashima, S., Channon, K.M., 2005. Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase (eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. *Circ. Res.* 97, 864-871.

Benjamin, I.J., Williams, R.S., 1994. Expression and function of stress proteins in the ischemic heart. In: Morimoto, R.I., Tisserees, A., Georgopoulo, C., (Eds.), *The Biology of Heat Shock*

Proteins and Molecular Chaperones, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 533-552.

Bickler, P.E., Buck, L.T., 2007. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 145–170.

Block, B.A., Booth, D., Carey, F.G., 1992. Direct measurements of swimming speed and depth of blue marlin. *J. Exp. Biol.* 166, 267–284.

Block, B.A., Keen, J.E., Castillo, B., Dewar, H., Freund, E.V., Marcinek, D.J., Brill, R.W., Farwell, C., 1997. Environmental preferences of yellowfin tuna at the northern extent of their range. *Mar. Biol.* 130, 119-132.

Boudina, S. and Abel, E.D., 2007. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation.* 115, 3213-3223.

Bowditch, H.P., 1871. Über die Eigenthuumlichkeitin der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber. Sächs. Akad. Wiss.* 23, 652-689.

Braun, M.H., Brill, R.W., Gosline, J.M., Jones, D.R., 2003. Form and function of the bulbus arteriosus in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and blue marlin (*Makaira nigricans*): static properties. *J. Exp. Biol.* 206, 3311–3326.

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

Bredt, D.S., Ferris, C.D., Snyder, S.H., 1992. Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J. Biol. Chem.* 267, 10976-10981.

Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., Froehner, S. C. et al., 1996. Interaction of nitric oxide synthase with

the postsynaptic density protein PSD-95 and -1 syntrophin mediated by PDZ motifs. *Cell* 84, 757-767.

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

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

Brett, J.R., 1971. Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Am. Zool.* 11, 99-113.

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.

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.

Burggren, W.W., Farrell, A.P., Lillywhite, H., 1997. Vertebrate cardiovascular systems. In: Dantzler, W.H. (Ed.), *Handbook of Physiology, sect. 13, Comparative Physiology, vol. 1.* Oxford University Press, New York, pp. 215–308.

Cai, S., Alp, N.J., McDonald, D., Smith, I., Kay, J., Canevari, L., Heales, S., Channon, K.M., 2002. GTP cyclohydrolase I gene transfer augments intracellular tetrahydrobiopterin in human endothelial cells: effects on nitric oxide synthase activity, protein levels and dimerisation. *Cardiovasc. Res.* 55, 838-849.

Cerra, M.C., Imbrogno, S., Amelio, D., Garofalo, F., Colvee, E., Tota, B., Icardo, J.M., 2004. Cardiac morphodynamic remodeling in the growing eel. *J. Exp. Biol.* 207, 2867-2875.

- 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. USA.* 92, 11514-11518.
- Christopherson, K. S., Hillier, B. J., Lim, W. A., Brecht, D. S., 1999.** PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J. Biol. Chem.* 274, 27467 -27473.
- Corson, M.A., James, N.L., Latta, S.E., Nerem, R.M., Berk, B.C., Harrison, D.G., 1996.** Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ. Res.* 79, 984-991.
- Cosentino, F., Patton, S., d’Uscio, L.V., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Moreau, P., Malinski, T., Luscher, T.F., 1998.** Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J. Clin. Invest.* 101, 1530–1537.
- Cosentino, F. and Luscher, T. F., 1999.** Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc. Res.* 43, 274-278.
- Cossins, A.R., Bowler, K., 1987.** *Temperature Biology of Animals*, Chapman & Hall, London.
- 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, 6525-6533.
- Crabtree, M.J., Tatham, A.L., Al-Wakeel, Y., Warrick, N., Hale, A.B., Cai, S., Channon, K.M., Alp, N.J., 2009.** Quantitative regulation of intracellular endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) coupling by both tetrahydrobiopterin-eNOS stoichiometry and biopterin redox status: insights from cells with tet- regulated GTP cyclohydrolase I expression. *J. Biol. Chem.* 284, 1136–1144.
- Cunha, F.Q., Moncada, S., Liew, F.Y., 1992.** Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon γ in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 1155-1159.

de Weerd, W.F., Leeb-Lundberg, L.M., 1997. Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 272, 17858-17866.

Delgado-Esteban, M., Almeida, A., Medina, J.M., 2002. Tetrahydrobiopterin deficiency increases neuronal vulnerability to hypoxia. *J. Neurochem.* 82, 1148-1159.

Di Felice, V., Cappello, F., Montalbano, A., Ardizzone, N.M., De Luca, A., Macaluso, F., Amelio, D., Cerra, M.C., Zummo, G., 2007. HSP90 and eNOS partially co-localize and change cellular localization in relation to different ECM components in 2D and 3D cultures of adult rat cardiomyocytes. *Biol. Cell.* 99, 689-699.

Di Maio, A., Block, B.A., 2008. Ultrastructure of the sarcoplasmic reticulum in cardiac myocytes from Pacific bluefin tuna. *Cell. Tissue Res.* 334, 121–134.

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.

Driedzic, W.R., Gesser, H., 1994. Energy metabolism and contractility in ectothermic vertebrate hearts: hypoxia, acidosis and low temperature. *Physiol. Rev.* 74, 221-258.

Driedzic, W.R., Bailey, J.R., Sephton, D.H., 1996. Cardiac adaptations to low temperature in non-polar teleost fish. *J. Exp. Biol.* 275, 186-195.

Dun, N.J., Dun, S.L., Forstermann, U., Tseng, L.F., 1992. Nitric oxide synthase immunoreactivity in rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 147, 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, 51-54.

- Dun, N.J., Huang, R., Dun, S.L., Forstermann, U., 1994.** Infrequent co-localization of nitric oxide synthase and calcium binding proteins immunoreactivity in rat neocortical neurons. *Brain. Res.* 666, 289-294.
- Farrell, A.P., Jones, D.R., 1992.** The heart. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrell, A.P., (Eds.), *Fish Physiology*, vol. XIA. Academic Press, NY, London, pp. 1-88.
- Farrell, A.P., Stecyk, J.A.W., 2007.** The heart as a working model to explore themes and strategies for anoxic survival in ectothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. A* 147, 300–312.
- Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T. W., Kelly, R. A. and 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.
- Fleming, I., Bauersachs, J., Fisslthaler, B., Busse, R., 1998.** Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res.* 82, 686-695.
- 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.
- 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.
- Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C., 1999.** Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597 -601.
- Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond.)* 288, 373–376.

Furchgott, R.F., 1990. The 1989 Ulf von Euler lecture. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol. Scand.* 139, 257-70.

Galli, G.L., Lipnick, M.S., Block, B.A., 2009. Effect of thermal acclimation on action potentials and sarcolemmal K⁺ channels from Pacific bluefin tuna cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* 297, R502-R509.

Gamperl, A.K., Farrell, A.P., 2004. Cardiac Plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *J. Exp. Biol.* 207, 2539-2550.

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

Garofalo, F., Parisella, M.L., Amelio, D., Tota, B., Imbrogno, S., 2009. Phospholamban S-nitrosylation modulates Starling response in fish heart. *Proc. Biol. Sci.* 276, 4043-4052.

Garofalo, F., Imbrogno, S., Tota, B., Amelio, D., 2012. Morpho-functional characterization of the goldfish (*Carassius auratus* L.) heart. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 163, 215-222.

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

Gauthier, L., Dziak, R., Kramer, D.J., Leishman, D., Song, X., Ho, J., Radovic, M., Bentley, D., Yankulov, K., 2002. *Genetics.* 162, 1117-1129.

Gillespie, J.S., Liu, X., 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.

Gratton, J. P., Fontana, J., O'Connor, D. S., Garcia-Cardena, G., McCabe, T. J. and 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.

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.

Han, X., Kobzik, L., Balligand, J.L., Kelly, R.A., Smith, T.W., 1996. Nitric oxide synthase (NOS3)-mediated cholinergic modulation of Ca²⁺ current in adult rabbit atrioventricular nodal cells. *Circ. Res.* 78, 998-1008.

Hanington, P.C., Barreda, D.R., Belosevic, M., 2006. A novel hematopoietic granulin induces proliferation of goldfish (*Carassius auratus* L.) macrophages. *J. Biol. Chem.* 281, 9963–9970.

Hansen, M.N., Jensen, F.B., 2010. Nitric oxide metabolites in goldfish under normoxic and hypoxic conditions. *J. Exp. Biol.* 213, 3593–3602.

Harada, T., Kagamiyama, H., Hatakeyama, K., 1993. Feedback regulation mechanisms for the control of GTP cyclohydrolase I activity. *Science.* 260, 1507-1510.

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

Hasegawa, H., Sawabe, K., Nakanishi, N., Wakasugi, O.K., 2005. Delivery of exogenous tetrahydrobiopterin (BH4) to cells of target organs: role of salvage pathway and uptake of its precursor in effective elevation of tissue BH4. *Mol. Genet. Metab.* 86, S2–S10.

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-diaphorase activity in a subpopulation of intrinsic neurones of the guinea pig heart. *Neurosci. Lett.* 143, 65-68.

Haverinen, J., Vornanen, M., 2009. Responses of action potential and K⁺ currents to temperature acclimation in fish hearts: phylogeny or thermal preferences? *Physiol. Biochem. Zool.* 82, 468-482.

Hazel, J.R., Prosser, C.L., 1974. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol. Rev.* 54, 620-677.

Hemmingsen, E.A., Douglas, E.L., Johansen, K., Millard, R.W., 1972. Aortic blood flow and cardiac output in the hemoglobin-free fish *Chaenocephalus aceratus*. *Comp. Biochem. Physiol.* A 43, 1045–1051.

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.

Huesa, G., van den Pol, A.N., Finger, T.E., 2005. Differential distribution of hypocretin (orexin) and melanin-concentrating hormone in the goldfish brain. *J. Comp. Neurol.* 488, 476–491.

Icardo, J.M., Imbrogno, S., Gattuso, A., Colvee, E., Tota, B., 2005. The heart of *Sparus auratus*: a reappraisal of cardiac functional morphology in teleosts. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 303, 665-675.

Icardo, J.M., 2006. Conus arteriosus of the teleost heart: dismissed, but not missed. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 288, 900–908.

Icardo, J.M., Colvee, E., 2011. The atrioventricular region of the teleost heart. A distinct heart segment. *Anat. Rec.* 294, 236–242.

Icardo, J.M., Schib, J.L., Ojeda, J.L., Duràn, A.C., 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., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G., 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9265–9269.

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

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.

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., Angelone, T., Corti, A., Adamo, C., Helle, K.B., Tota, B., 2004. Influence of vasostatsins, the chromogranin A-derived peptides, on the working heart of the eel (*Anguilla anguilla*): negative inotropy and mechanism of action. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 20-8.

Imbrogno, S., Angelone, T., Adamo, C., Pulera, E., Tota, B., Cerra, M.C., 2006. Beta3-Adrenoceptor in the eel (*Anguilla anguilla*) heart: negative inotropy and NO-cGMP-dependent mechanism. *J. Exp. Biol.* 209, 4966-4973.

Imbrogno, S., Garofalo, F., Cerra, M.C., Mahata, S.K., Tota, B., 2010. The catecholamine releaseinhibitory peptide catestatin (Chromogranin A344-364) modulates myocardial function in fish. *J. Exp. Biol.* 213, 3636–3643.

Imbrogno, S., Tota, B., Gattuso, A., 2011. The evolutionary functions of cardiac NOS/NO in vertebrates tracked by fish and amphibian paradigms. *Nitric Oxide* 25, 1–10.

Irvine, J.C., Ritchie, R.H., Favaloro, J.L., Andrews, K.L., Widdop, R.E., Kemp-Harper, B.K., 2008. Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 601–608.

Jensen, F.B., Hansen, M.N., 2011. Differential uptake and metabolism of nitrite in normoxic and hypoxic goldfish. *Aquat. Toxicol.* 101, 318–325.

Johnson, T., Bennett, A., 1995. The thermal acclimation of burst escape performance in fish: an integrated study of molecular and cellular physiology and organismal performance. *J. Exp. Biol.* 198, 2165-2175.

Johnston, I.A., Temple, G.K., 2002. Thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behavior. *J. Exp. Biol.* 205, 2305-2322.

Jones, D.R., Brill, R.W., Bushnell, P.G., 1993. Ventricular and arterial dynamics of anaesthetised and swimming tuna. *J. Exp. Biol.* 182, 97–112.

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

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.

Keen, J.E., Vianzon, D.M., Farrell, A.P., Tibbits, G.F., 1993. Thermal acclimation alters both adrenergic sensitivity and adrenoceptor density in cardiac tissue of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 181, 27-47.

Keen, J.E., Vianzon, D.M., Farrell, A.P., Tibbits, G.F., 1994. Effect of temperature and temperature acclimation on the ryanodine sensitivity of the trout myocardium. *J. Comp. Physiol.* 164, 438-443.

Khan, M. T., Furchgott, R. F., 1987: Additional evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In *Pharmacology*, ed. by M. J. Rand and C. Raper, pp. 341–344, Elsevier, Amsterdam.

Kim, Y.M., Guzik, T.J., Zhang, Y.H., Zhang, M.H., Kattach, H., Ratnatunga, C., Pillai, R., Channon, K.M., Casadei, B., 2005. A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ. Res.* 97, 629-636.

Klaiman, J.M., Fenna, A.J., Shiels, H.A., Macri, J., Gillis, T.E., 2011. Cardiac remodeling in fish: strategies to maintain heart function during temperature change. *PLoSOne.* 6: e24464.

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, 3687-3695.

Klimaschewski, L., Kummer, W., Mayer, B., Couraud, J.Y., Preissler, U., Philippin, B., Heym, C., 1992. Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. *Circ. Res.* 71, 1533-1537.

Knowles, R.G., Moncada, S., 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298, 249-258. Lee, W.C., Lin, K.Y., Chen, C.M., Chen, Z.T., Liu, H.J., Lai, Y.K., 1991. Induction of heat-shock response and alteration of protein phosphorylation by a novel topoisomerase II inhibitor, with angulatin A, in 9L rat brain tumor cells. *J. Cell Physiol.* 149, 66-76.

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

Krivi, G.G. and Brown, G.M., 1979. Purification and properties of the enzymes from *Drosophila melanogaster* that catalyze the synthesis of sepiapterin from dihydroneopterin triphosphate. *Biochem. Genet.* 17, 371-390.

- 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.
- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S.R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S.M., Mitch, W.E., Harrison, D.G., 2003.** Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. J. Clin. Invest. 111, 1201–1209.
- Lapize, C., Plüss, C., Werner, E.R., Huwiler, A., Pfeilschifter, J., 1998.** Protein kinase C phosphorylates and activates GTP cyclohydrolase I in rat renal mesangial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 251, 802-805.
- Lee, L.E., Caldwell, S.J., Gibbons, J., 1997.** Development of a cell line from skin of goldfish, *Carassius auratus*, and effects of ascorbic acid on collagen deposition. Histochem. J. 29, 31–43.
- Liao, F., Andalibi, A., Qiao, J.H., Allayee, H., Fogelman, A.M., Lusis, A.J., 1994.** Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice. J. Clin. Invest. 94, 877-884.
- Licht, J.H., Harris, W.S., 1973.** The structure, composition and elastic properties of the teleost bulbus arteriosus in the carp, *Cyprinus carpio*. Comp. Biochem. Physiol. A 46 699–670.
- Lindquist, S., Craig, E.A., 1988.** The heat-shock proteins. Ann. Rev. Genet. 22, 631-677.
- Luo, J., Lang, M., Salzburger, W., Siegel, N., Stölting, K.N., Meyer, A., 2006.** A BAC library for the goldfish *Carassius auratus auratus* (Cyprinidae, Cypriniformes). J. Exp. Zool. B 306, 567–574.
- Luscher, T.F., 1991.** Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. Eur. Heart. J. 12, Suppl E,2-11.

Lyons, C.R., Orloff, G.J., Cunningham, J.M., 1992. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.* 267, 6370-6374.

Maita, N., Hatakeyama, K., Okada, K., Hakoshima, T., 2004. Structural basis of biopterin-induced inhibition of GTP cyclohydrolase I by GFRP, its feedback regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 279, 51534-51540.

Marletta, M.A., 1998. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem. Res. Toxicol.* 1, 249-257

Matthews, K.R., Berg, N.H., 1997. Rainbow trout responses to water temperature and dissolved oxygen stress in two southern California streampools. *J. Fish. Biol.* 50, 50-67.

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, 215-219.

McCabe, T.J., Fulton, D., Roman, L.J., Sessa, W.C., 2000. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain 'calcium-independent' eNOS activation by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275, 6123-6128.

McKenzie, D.J., Wong, S., Randall, D.J., Egginton, S., Taylor, E.W., Farrell, A.P., 2004. The effects of sustained exercise and hypoxia upon oxygen tensions in the red muscle of rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 207, 3629-3637.

Mebazaa, A., Mayoux, E., Maeda, K., Martin, L.D., Lakatta, E.G., Robotham, J.L., Shah, A.M., 1993. Paracrine effects of endocardial endothelial cells on myocyte contraction mediated via endothelin. *Am. J. Physiol.* 265, 1841-1846.

Méry, P.F., Lohmann, S.M., Walter, U., Fischmeister, R., 1991. Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88, 1197-1201.

Méry, P., Riou, B., Chemla, D., Lecarpentier, Y., 1994. Cardiotoxicity of colchicine in the rat. *Intensive Care Med.* 20, 119-123.

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

Michel, J. B., Feron, O., Sacks, D. and Michel, T., 1997. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J. Biol. Chem.* 272, 15583–15586.

Milstien, S., Jaffe, H., Kowlessur, D., Bonner, Tl., 1996. Purification and cloning of the GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein, GFRP. *J. Biol. Chem.* 271, 19743-19751.

Moens, A.N., Kass, D., 2006. Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2439-2444.

Moncada, S., Palmer, R. M. J. and 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,.

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

Murray, H.W., Nathan, C.F., 1999. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J. Exp. Med.* 189, 741-746.

Nakane, M., Schdmit, H., Pollock, J.S., Forstermann, U., Murad, F., 1993. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 316, 175-180.

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

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

Nathan, C., Shiloh, M.U., 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8841- 8848.

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, 2092-2096.

Nisticò, G, Bagetta, G., Mollace, V., 1996. Farmacologia del nitrossido. In: "Farmacologia generale e molecolare". (Paoletti R, Nicosia S, Clementi F e Fumagalli G. ed. UTET, Torino).

Nussler, A.K., Billiar, T.R., 1993. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.* 54, 171-178.

Oddis, C.V., Simmons, R.L., Hattler, B.G., Finkel, M.S., 1995. cAMP enhances inducible nitric oxide synthase mRNA stability in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 269, 2044-2050

Oehler-Jänne, C., von Bueren, A.O., Vuong, V., Hollenstein, A., Grotzer, M.A., Pruschy, M., 2008. Temperature sensitivity of phospho-Ser(473)-PKB/AKT. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 399-404.

Olson, R.K., 1998. The cardiovascular system. In: Evans, H.D., (Ed.), *The physiology of fishes*, CRC Press, Boca Raton, NY, pp. 129-154.

Olson, E.N., 2006. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* 313, 1922–1927.

Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature (Lond.)* 327, 524–526.

Palmer, R.M., Ashton, D.S., Moncada, S., 1988. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 333, 664-666.

Papapetropoulos, A., Rudic, R.D., Sessa, W. C., 1999. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc. Res.* 43, 509-520.

Parton, R.G., 1996. Caveolae and caveolins. *Curr Opin Cell Biol.* 8, 542-548.

Pedersen, C.L., Faggiano, S., Helbo, S., Gesser, H., Fago, A., 2010. Roles of nitric oxide, nitrite and myoglobin on myocardial efficiency in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and goldfish (*Carassius auratus*): implications for hypoxia tolerance. *J. Exp. Biol.* 213, 2755–2762.

Pieperhoff, S., Bennett, W., Farrell, A.P., 2009. The intercellular organization of the two muscular systems in the adult salmonid heart, the compact and the spongy myocardium. *J. Anat.* 215 (5), 536–547.

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., 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, 1379-1387.

Poupa, O., Gesser, H., Jonsson, S., Sullivan, L., 1974. Coronary-supplied compact shell of ventricular myocardium in salmonids: growth and enzyme pattern. *Comp. Biochem. Physiol. A* 48, 85–95.

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.

Preuss, T., Osei-Bonsu, P.E., Weiss, S.A., Wang, C., Faber, D.S., 2006. Neural representation of object approach in a decision-making motor circuit. *J. Neurosci.* 26, 3454–3464.

Rand, M.J., 1992. Nitrogenic transmission: nitric oxide as mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 19, 132-143.

Randall, D. J., Daxboeck, C., 1982. Cardiovascular changes in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) during exercise. *Can. J. Zool.* 60, 1135-1140.

Reid, S.D., McDonald, D.G., Wood, C.M., 1997. Interactive effects of temperature and pollutant stress. In: Wood, C.M., McDonald, D.G., (Eds), *Global Warming: Implications for Freshwater and Marine Fish*, Cambridge University Press, pp. 325-349.

Reilly, S.N., Jayaram, R., Nahar, K., Antoniadis, C., Verheule, S., Channon, K.M., Alp, N.J., Schotten, U., Casadei, B., 2011. Atrial sources of reactive oxygen species vary with the duration and substrate of atrial fibrillation: Implications for the antiarrhythmic effect of statins. *Circulation.* 124, 1107–1117.

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, 233-239.

Rosenthal, J.C., Bezanilla, F., 2002. A comparison of propagated action potentials from tropical and temperate squid axons: different durations and conduction velocities correlate with ionic conductance levels. *J. Exp. Biol.* 205, 1819-1830.

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, 333-336.

Santer, R.M., Greer Walker, M., Emerson, L., Witthames, P.R., 1983. On the morphology of the heart ventricle in marine teleost fish (teleostei). *Comp. Biochem. Physiol. A* 76, 453–457.

Santer, R.M., 1985. Morphology and innervation of the fish heart. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 89, 1–102.

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

Satchell, G.H., 1991. *Physiology and Form of Fish Circulation.* Cambridge University Press, Cambridge.

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, 365-369.

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, T.S. and Alp, N. J., 2007. Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin. Sci. (Lond).* 113, 47-63.

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.

Sears, C.E., Bryant, S.M., Ashley, E.A., Lygate, C.A., Rakovic, S., Wallis, H.L., Neubauer, S., Terrar, D.A., Casadei, B., 2003. Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. *Circ. Res.* 92, e52–e59.

- 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.
- Serafini-Fracassini, A., Field, J.M., Spina, J., Garbia, S., Stuart, R.J., 1978.** The morphological organization and ultrastructure of elastin in the arterial wall of trout (*Salmo gairdneri*) and salmon (*Salmo salar*). *J. Ultrastruct. Res.* 65, 1-12.
- 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. and Michel, T., 1996.** Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.* 271, 6518-6522.
- Shen, W., Xu, X., Ochoa, M., Zhao, G., Wolin, M.S., Hintze, T.H., 1994.** Role of nitric oxide in the regulation of oxygen consumption in conscious dogs. *Circ. Res* 75, 1086-1095.
- 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, 343-5.
- Sheng, H., Gagne, G.D., Matsumoto, T., Miller, M.F., Forstermann, U., Murad, F., 1993.** Nitric oxide synthase in bovine superior cervical ganglion. *J. Neurochem.* 61, 1120-1126.
- Shiels, H.A., Farrell, A.P., 1997.** The effect of temperature and adrenaline on the relative importance of the sarcoplasmic reticulum in contributing Ca²⁺ to force development in isolated ventricular trabeculae from rainbow trout. *J. Exp. Biol.* 200, 1607-1621.

Shiels, H.A., Vornanen, M., Farrell, A.P., 2002. The force-frequency relationship in fish hearts. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 132, 811-826.

Shiels, H.A., Calaghan, S.C., White E., 2006. The cellular basis for enhanced volume-modulated output in fish hearts. *J. Gen. Physiol.* 128, 37-44.

Shiloh, M.U., MacMicking, J.D., Nicholson, S., Brause, J.E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinuer, M., Nathan, C., 1999. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 10, 29-38.

Shinozaki, K., Nishio, Y., Okamura, T., Yoshida, Y., Maegawa, H., Kojima, H., Masada, M., Toda, N., Kikkawa, R., Kashiwagi, A., 2000. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats. *Circ. Res.* 87, 566-573.

Shoubridge, E.A., Hochachka, P.W., 1980. Ethanol: novel end product of vertebrate anaerobic metabolism. *Science* 209, 308-309.

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.

Snyder, S.H., Bredt, D.S., 1992. Biological roles of nitric oxide. *Sci. Am.* 266, 68-71, 74-7.

Stecyk, J.A., Stensløkken, K.O., Farrell, A.P., Nilsson, G.E., 2004. Maintained cardiac pumping in anoxic crucian carp. *Science* 306, 77.

Stuehr, D.J., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weise, M.F., Nathan, C.F., 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88, 7773-7777.

Stuehr, D.J., Griffith, O.W., 1992. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 65, 287-346.

Stuehr, D.J., 1997. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 339-359.

Stuehr, D.J., 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1411, 217-230.

Stuehr, D., Pou, S., Rosen, G. M., 2001. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J. Biol. Chem.* 276, 14533-14536.

Tesch, F.W., 2003. The eel. Blackwell Science. Oxford.

Thomas, G.D., Victor, R.G., 1998. Nitric oxide mediates contraction-induced attenuation of sympathetic vasoconstriction in rat skeletal muscle. *J Physiol.* 506, 817-26.

Thony, B., Auerbach, G., Blau, N., 2000. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem. J.* 347, 1-16.

Tota, B., 1978. Functional cardiac morphology and biochemistry in Atlantic bluefin tuna. In: Sharp, G., Dizon, A. (Eds.), *The Physiological Ecology of Tuna*. Academic Press, New York, pp. 89–112.

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

Tota, B., 1989. Myoarchitecture and vascularization of the elasmobranch heart ventricle. *J. Exp. Zool.* 2, 122–135.

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

Tota, B., Gattuso, A., 1996. Heart ventricle pumps in teleosts and elasmobranchs: a morphodynamic approach. *J. Exp. Zool.* 275, 162-171.

- Tóth, M., Kukor, Z., Sahin-Tóth, M., 1998.** Differential response of basal and tetrahydrobiopterin stimulated activities of placental type III nitric oxide synthase to sodium dodecyl sulphate: relation to dimeric structure. *Mol. Hum. Reprod.* 4, 1165-1172.
- 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, 722-727.
- 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. USA.* 92, 11771-11775.
- Van Ginneken, V., Antonissen, E., Muller, U.K., Booms, R., Eding, E., Verreth, J., Van der Thillart, G., 2005.** Eel migration to the Sargasso: remarkably high swimming efficiency and low energy costs. *J. Exp. Biol.* 208, 1329-1335.
- Vane, J.R., Anggard, E.E., Botting, R.M., 1990.** Regulatory functions of the vascular endothelium. *N. Engl. J. Med.* 323, 27-36.
- Vanhoutte, P.M., 1989.** Endothelium and control of vascular function: State of the art lecture. *Hypertension* 13, 658-667.
- Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martásek, P., Hogg, N., Masters, B.S., Karoui, H., Tordo, P., Pritchard, K.A. Jr., 1998.** Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 9220-9225.
- Vasquez-Vivar, J., Martasek, P., Whitsett, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., 2002.** The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem. J.* 362, 733-739.

- Vásquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Martásek, P., 2003.** The role of tetrahydrobiopterin in superoxide generation from eNOS: enzymology and physiological implications. *Free Radic. Res.* 37, 121-127.
- Vornanen, M., Shiels, H.A., Farrell A.P., 2002a.** Plasticity of excitation contraction coupling in fish cardiac myocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 132A, 827-846.
- Vornanen, M., Ryokkynen, A., Murmi, A., 2002b.** Temperature dependent expression of sarcolemmal K(+) currents in rainbow trout atrial and ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 282, 1191-1199.
- Wahler, G.M. and Dollinger, S.J., 1995.** Nitric oxide donor SIN-1 inhibits mammalian cardiac calcium current through cGMP-dependent protein kinase. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 268, C45-C54.
- Wakeling, J.M., Cole, N.J, Kemp, K.M., Johnston, I.A., 2000.** The biomechanics and evolutionary significance of thermal acclimation in the common carp *Cyprinus carpio*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, 657-665.
- Watabe, S., 2002.** Temperature plasticity of contractile proteins in fish muscle. *J. Exp. Biol.* 205, 2231-2236.
- Williams, J.C., Armesilla, A.L., Mohamed, T.M., Hagarty, C.L., McIntyre, F.H., Schomburg, S., Zaki, A.O., Oceandy, D., Cartwright, E.J., Buch, M.H., Emerson, M., Neyses, L., 2006.** The sarcolemmal calcium pump, alpha-1 syntrophin, and neuronal nitric-oxide synthase are parts of a macromolecular protein complex. *J. Biol. Chem.* 281, 23341–23348.
- Woo, H.J., Kang, J.Y., Choi, Y.K., Park, Y.S., 2002.** Production of sepiapterin in *Escherichia coli* by coexpression of cyanobacterial GTP cyclohydrolase I and human 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3138-3140.

- Wood, C.M., Pieprzak, P., Trott, J.N., 1979.** The influence of temperature and anaemia on the adrenergic and cholinergic mechanisms controlling heart rate in the rainbow trout. *Can. J. Zool.* 57, 2440-2447.
- Xia, Y., Zweier, J.L., 1997.** Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 94, 12705-12710.
- 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 L, Meissner G, Eu JP and Stamler JS. 1998.** Poly S-nitrosylation activates the cardiac Ca release channel (ryanodine receptor). *Science* 278: 234-237.
- Xu, K.Y., Huso, D.L., Dawson, T.M., Brecht, D. S., Becker, L. C., 1999.** Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Medical Sciences.* 96, 657-662.
- Yamauchi, A., 1980.** Fine structure of the fish heart. In: Bourne, G. (Ed.), *Heart and Heart-like Organs*, vol. 1. Academic Press, New York, pp. 119–148.
- Yoneyama, T., Brewer, J.M., Hatakeyama, K., 1997.** GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein is a pentamer of identical subunits. Purification, cDNA cloning, and bacterial expression. *J. Biol. Chem.* 272, 9690-9696.
- Yoneyama, T. and Hatakeyama, K., 1998.** Decameric GTP cyclohydrolase I forms complexes with two pentameric GTP cyclohydrolase I feedback regulatory proteins in the presence of phenylalanine or of a combination of tetrahydrobiopterin and GTP. *J. Biol. Chem.* 273, 20102-20108.
- Zorzi, G., Redweik, U., Trippe, H., Penzien, J.M., Thöny, B., Blau, N., 2002.** Detection of sepiapterin in CSF of patients with sepiapterin reductase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 75, 174-177.

Zweier, J.L., Wang, P., Samouilov, A., Kuppusamy, P., 1995. Enzymatic/non-enzymatic formation of nitric oxide, *Nat. Med.* 1, 1103-1104.

Zweier, J.L., Samouilov, A., Kuppusamy, P., 1999. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta.* 1411, 250-262.