

Mecanismes d'acció de l'aldosterona i de la vasopressina en la regulació de les funcions del còlon

M^a Lluïsa Miró Martí



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



Grup de Fisiologia Digestiva i Adaptacions Nutricionals

Departament de Fisiologia

Facultat de Farmàcia

Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària de la UB

Mecanismes d'acció de l'aldosterona i de la vasopressina en la regulació de les funcions del còlon

Programa de doctorat: Biotecnologia

Directors:

Dr. Miquel Moretó Pedragosa,

Catedràtic de Fisiologia

Dra. Anna Pérez Bosque,

Professora Associada de Fisiologia

Coordinadora del programa de doctorat:

Josefa Badia Palacin

M^a Lluïsa Miró Martí

Barcelona, 2012

V. DISCUSSION



L'ió Na^+ és l'element majoritari del LEC (líquid extracel·lular) i el principal determinant de l'osmolalitat del plasma així com també del volum del LEC. La seva concentració plasmàtica presenta un rang força estret que es troba entre 135 i 144 mM. La regulació del volum i de la concentració de Na^+ del LEC es duu a terme, principalment, a través del Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAAS) i de l'hormona vasopressina, que actuen de forma coordinada sobre els seus teixits diana que són, principalment, el ronyó i el segment distal del còlon.

Al còlon hi ha un gran nombre de transportadors d'ions que s'encarreguen de moure soluts i aigua des de la llum de la cripta als vasos sanguinis, com també a l'inrevés. El Na^+ entra a favor de gradient electroquímic, principalment, a través del canal específic ENaC (acrònim de *Epithelial Na⁺ Channel*) present a la membrana apical dels colonòcits de la regió proximal de les criptes. Quan la ingesta de Na^+ disminueix, el còlon s'adapta per absorbir el Na^+ amb major eficàcia i evitar la pèrdua d'aquest ió. Això s'aconsegueix mitjançant l'augment de l'expressió apical de l'ENaC i també incrementant l'activitat de la Na^+ , K^+ -ATPasa de la membrana basolateral, que bombeja Na^+ cap a l'espai intersticial (Garty i Palmer, 1997). La resposta adaptativa a una dieta baixa en Na^+ , no solament augmenta la capacitat de transport del Na^+ sinó que també incrementa el gruix de la capa de miofibroblasts situada immediatament per sota de les cèl·lules epitelials. En aquesta situació, la capa de miofibroblasts, juntament amb el col·lagen secretat, formen els components principals de la beina pericriptal. Aquesta beina actua com una barrera i dificulta la difusió del Na^+ cap als capil·lars sanguinis, la qual cosa permet mantenir una elevada concentració del catió en l'espai pericriptal (Naftalin i Pedley, 1999). En aquestes condicions, s'assoleix un elevat gradient osmòtic que afavorirà l'absorció de l'aigua des de la llum de la cripta cap a l'espai pericriptal (Naftalin, 2004).

D'altra banda, l'activació del RAAS desencadena un ampli nombre de patologies que afecten als sistemes cardiovascular i renal entre d'altres. Al cor, dietes amb alt contingut en Na^+ en presència d'aldosterona, dona lloc a un augment en la proliferació de miofibroblasts i de la síntesi de col·lagen (Brilla, 2000). L'hiperaldosteronisme té efectes pro-inflamatoris a mig-llarg termini que provoquen fibrosi perivascular i l'alliberació de citocines pro-inflamatòries com el TNF- α (Sun *et al.*, 2000), que contribueix al deteriorament progressiu de la funció renal (Brewster i Perazella, 2004). Així doncs, l'increment de la concentració de vasopressina que acompanya a l'hiperaldosteronisme (Goldsmith i Gheorghide, 2005) augmenta la permeabilitat de la membrana a l'aigua contribuint, d'aquesta manera, a l'augment de la tensió tissular induïda per l'aldosterona (Verbalis, 2003).

S'han descrit noves accions de l'aldosterona que li confereixen noves funcions al SNC i, sobretot, accions no genòmiques al ronyó i al còlon (Álvarez de la Rosa, 2005; Oberleithner, 2004). En altres teixits no epitelials com ara el cervell, el cor i els vasos sanguinis (Connell i Davies, 2005; Oberleithner, 2007; Teiwes i Toto, 2007) s'ha vist que presenten l'MR (*Mineralocorticoid receptor*) i, per tant, l'aldosterona pot exercir la seva funció. L'aldosterona va ser descoberta per Zwemer i Sullivan l'any 1934 i té múltiples accions en el còlon relacionades amb el balanç hidroelectrolític de l'organisme, que es poden resumir en l'estimulació de la reabsorció de Na⁺ i aigua. El mecanisme pel qual l'aldosterona exerceix els seus efectes és complex i hi intervenen els diferents elements que formen part de les criptes del còlon distal (Cristià *et al.*, 2005).

Els estudis *in vivo* en un model d'hiperaldosteronisme secundari en rata, Moretó *et al.*, 2005, van demostrar que l'adaptació a una dieta amb baix contingut de Na⁺ augmenta l'absorció d'aquest catió, disminueix la permeabilitat de la paret de la cripta i estimula el creixement dels miofibroblasts de la beina pericriptal, amb un increment de l'actina associada al múscul llis (α -SMA), del col·lagen IV i de la cadherina 11 (Cristià *et al.*, 2005; 2007). Aquests efectes són atribuïts a l'aldosterona actuant a través de l'MR ja que són inhibibles per l'espironolactona (SPI, *Spironolactone*) (Moretó *et al.*, 2005; Cristià *et al.*, 2005). No obstant això, en alguns teixits l'aldosterona estimula l'alliberació de productes cel·lulars que es comporten com a mediadors. L'aldosterona té efectes profibròtics al ronyó i al còlon que són, en part, deguts al TGF β (Briet i Schiffrin, 2010, Thiagarajah *et al.*, 2002). En el teixit cardíac s'ha vist que una dieta amb un baix contingut en Na⁺, en situacions d'hiperaldosteronisme o amb una concentració elevada d'angiotensina, incrementen el grau de fibrosi cardíaca (Rickard i Fuller, 2011; Messaoudi *et al.*, 2011) quan es produeix la transformació de fibroblasts a miofibroblasts (Powell *et al.*, 2011). Alguns factors de creixement com el TGF β , l'endotelina 1 i el factor de creixement del teixit connectiu (CTGF; *connective tissue growth factor*), estan desregulats en les lesions fibròtiques (Moulin, 1995; Trojanowska *et al.*, 1998). Hi ha també evidència de que la unió de l'aldosterona amb l'MR està associada a un increment de l'activació de la senyalització del TGF β (Juknevičius *et al.*, 2004; Wickert *et al.*, 2004). Lai *et al.*, (2006) veuen en el ronyó que l'aldosterona incrementa en part la concentració del TGF β , que indueix un increment de l'expressió de la fibronectina a través del factor de transcripció Smad2. El TGF β és el responsable de desencadenar estats fibròtics en diferents òrgans com és el cas del còlon (Thiagarajah *et al.*, 2002), del ronyó (Lai *et al.*, 2006) i del fetge (Rosenbloom *et al.*, 2010). Per tant, els canvis morfològics i funcionals que es produeixen a la mucosa del còlon distal

durant l'adaptació a una dieta en baix contingut de Na^+ atribuïts a l'aldosterona no exclouen la participació d'altres mecanismes de regulació. L'objectiu principal d'aquesta tesi és estudiar el mecanisme d'acció de l'aldosterona i de la vasopressina en els canvis adaptatius que es produeixen en el còlon distal, en passar d'una dieta amb alt contingut de Na^+ a una dieta amb baix contingut de Na^+ i identificar els mediadors responsables d'aquestes adaptacions.

Per estudiar el paper de l'aldosterona i de la vasopressina s'ha treballat *in vitro* amb dues línies cel·lulars diferents, colonòcits T84 i miofibroblasts CCD-18Co. En la caracterització de les cèl·lules CCD-18Co hem comprovat amb diferents tècniques que presenten el fenotip característic dels miofibroblasts subepitelials. És a dir, aquestes cèl·lules expressen l' α -SMA, la vimentina i la cadherina-11 tal i com ho havien descrit Simon *et al.*, (1999 i 2002) i Mahida *et al.*, (1997). A més, s'observa que els miofibroblasts expressen l'MR i el receptor de tipus 1 de la vasopressina. Per tant, la presència d'aquests receptors contribueix que sigui una línia cel·lular òptima per realitzar l'estudi del paper de les hormones aldosterona i vasopressina sobre aquesta línia cel·lular.

Respecte a les cèl·lules T84, originàries d'un adenocarcinoma de còlon humà, els resultats obtinguts de la seva caracterització ens ha permès conèixer que aquesta línia presenta els marcadors específics dels colonòcits. Les cèl·lules creixen de forma adherent i formen unes monocapes estables al cap de 15 dies que permet reproduir els estudis de permeabilitat. El cultiu de colonòcits, s'utilitza com a model en els estudis de transport electrolític que està regulat per diferents hormones i neurotransmissors (Dharmasathaphorn *et al.*, 1984; Madara *et al.*, 1987). Amb les immunolocalitzacions realitzades s'ha vist que un cop han format aquesta monocapa el marcatge de proteïnes del complex d'unió com claudina IV, la β -catenina, l'E-cadherina i la ZO-1 és uniforme i ben definit, tal i com estava descrit (Prasad *et al.*, 2005).

Les cèl·lules T84, un cop formen la monocapa, presenten propietats típiques dels epitelis, és a dir, són capaces de generar un corrent de curt circuit i de mantenir un flux de Na^+ des del cantó mucosal al serosal. Quan s'addiciona amilorida, que és un inhibidor específic de l'ENaC, el corrent no es modifica, indicant que ENaC es troba poc expressat en aquesta línia cel·lular. Un altre aspecte important abans de seguir amb l'estudi era saber si T84 expressen l'MR en les nostres condicions de treball, atès que hi havia informacions contradictòries (Tsugita *et al.*, 2009; Fukushima *et al.*, 2004). Els nostres estudis demostren que les cèl·lules T84 expressen l'MR i la subunitat γ de l'ENaC, indicant per tant que és una línia cel·lular adequada per

realitzar l'estudi de l'aldosterona. Ara bé, a diferència del què s'ha observat *in vivo* (Cristià *et al.*, 2005) l'aldosterona no modifica l'expressió d'ENaC. Per aquest motiu es va voler estudiar si es podia estimular per algun altre mecanisme, com havia demostrat Fukushima *et al.*, (1999) emprant butirat com agent estimulador. En el nostre cas, la incubació amb butirat va generar un petit increment de la corrent de curt circuit (Miró *et al.*, 2008). Això confirma les observacions de Fukushima *et al.*, (1999) en les quals les cèl·lules T84 tractades amb butirat de Na⁺ incrementaven l'expressió de l'MR i de les subunitats α i γ de l'ENaC (Iordache i Duszyk, 2007). El butirat és un àcid gras produït per l'intestí prim en condicions de fermentació anaeròbiques (Young *et al.*, 2005). És la principal font d'energia pels colonòcits i té efectes antitumorals en les línies cel·lulars de còlon, en les quals estimula la diferenciació i l'apoptosi (Heerdt *et al.*, 1994). A part, s'ha vist que té un paper important en l'absorció de Na⁺ a través de l'intercanviador Na⁺/H⁺ (Musch *et al.*, 2001). A la línia cel·lular HT-29/B6 i al còlon distal de rata, el butirat incrementa l'expressió de les subunitats α , β i γ de l'ENaC augmentant l'absorció de Na⁺. En aquest cas, el mecanisme d'acció és conseqüència de l'activació de factors de transcripció (Zeissig *et al.*, 2007) i alhora es produeix un increment de l'absorció de Na⁺. Els resultats obtinguts de la incubació de l'aldosterona en els colonòcits indiquen que, tot i que aquestes cèl·lules expressen l'MR, no responen a l'aldosterona de la mateixa manera que els colonòcits de rata *in vivo* (Cristià *et al.*, 2005).

L'aldosterona participa en malalties cardiovasculars com la hipertensió, l'arteriosclerosi i la fibrosi cardíaca, en que es produeix un increment de la proliferació dels fibroblasts i un augment de la síntesi i l'alliberament de col·lagen. L'administració d'inhibidors específics reverteix aquests estats fibròtics (Pearce *et al.*, 2003, Bravo, 2003). El tractament amb aldosterona *in vitro* sobre les cèl·lules CCD-18Co estimula la proliferació cel·lular i aquests efectes tenen lloc a través de l'MR. Els miofibroblasts subepiteliaus regulen les funcions importants de les cèl·lules epitelials per diferents mecanismes com pot ser la secreció de citocines o autocines (Powell *et al.*, 2011). Per això, s'ha estudiat la resposta secretora de les cèl·lules CCD-18Co quan són tractades amb aldosterona. Entre el gran nombre de candidats per estudiar la interacció dels miofibroblasts s'ha escollit el TGF β 1, l'EGF i el VEGFa. Pel que fa al TGF β 1, s'ha descrit que en cultius primaris de miofibroblasts subepiteliaus millora la funció de barrera (Belting *et al.*, 1999), i que també participa en resposta a les lesions per radiacions ionitzants (Thiagarajah *et al.*, 2000). La fibrosi induïda per radiació incrementa la quantitat del TGF β 1, TGF β 2 i TGF β 3 a l'intestí prim tant en les cèl·lules mesotelials com en les endotelials. El factor de creixement endotelial vascular (VEGF) és l'altre factor escollit, ja que

participa en la reparació epitelial i és secretat pels CCD-18Co sota regulació hormonal (Bulut *et al.*, 2008). El darrer factor en el cas de l'aldosterona va ser l'EGF, ja que és indispensable per a l'activació de la proliferació de les cèl·lules intestinals epitelials (Suzuki *et al.*, 2010). Els resultats obtinguts mostren que l'aldosterona incrementa l'expressió de l'EGF en les cèl·lules CCD-18Co i que aquest efecte és mediat per l'MR.

L'aldosterona no modifica l'expressió dels receptors de l'EGF ni la del receptor de tipus 1 del TGF β dels miofibroblasts. El fet que l'EGFR no es vegi modificat concorda amb els resultats obtinguts per Han *et al.*, (2011) en cèl·lules pancreàtiques. Pel que fa al TGF β , s'ha demostrat que rates tractades amb una dieta LS presenten un increment de l'expressió del TGF β R1 en els miofibroblasts del còlon descendent (Thiagarajah *et al.*, 2002). Aquest increment es produeix al cap d'1 a 3 mesos i va acompanyat per un increment de α -SMA, de col·lagen i del TGF β . Per tant, és probable que sigui un fenomen que es produeix a mig o llarg termini, lluny dels períodes de temps emprats en el present estudi, de 24 i 48 h. Els estudis realitzats *in vivo*, en rates amb hiperaldosteronisme secundari, s'observa un increment de la proliferació dels miofibroblasts de la beina pericriptal (Naftalin i Pedley, 1999). Aquest efecte s'ha pogut reproduir *in vitro*, on l'aldosterona estimula la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co al voltant del 70%. A més, afegint l'EGF de forma exògena s'obté una resposta de la proliferació cel·lular de la mateixa magnitud que amb l'aldosterona. S'ha descrit que l'aldosterona pot actuar a través de l'MR o mitjançant la fosforilació de l'EGFR (Grossmann i Gekle 2008, McEneaney *et al.*, 2010). Davant d'aquesta possibilitat, el pre-tractament amb l'anticòs neutralitzant de l'EGF o l'inhibidor de l'EGFR (AG1478) fa que els efectes de l'addició de l'aldosterona quedin atenuats. Aquests resultats confirmen que el mecanisme d'acció de l'aldosterona a través de l'MR requereix la secreció de l'EGF i l'activació de l'EGFR. Aquest mecanisme és similar al que havien descrit Huang *et al.*, (2009) que demostren que l'EGFR regula la proliferació induïda per l'aldosterona en les cèl·lules mesangials.

L'EGFR és capaç d'activar diferents vies de senyalització com la PI3K/AKT o la Ras/Raf/MAKP desencadenant respostes de proliferació (Zhang *et al.*, 2011), de migració, d'invasió, d'angiogènesi i de metastasi (Wheatley-Price i Shepherd, 2008; Hirsch *et al.*, 2006). El tractament amb aldosterona incrementa la proliferació cel·lular en diferents tipus cel·lulars com ara, les cèl·lules M1-CCD (McEneaney *et al.*, 2010), les cèl·lules mesangials (Huang *et al.*, 2009) i les cèl·lules RASM (Ishizawa *et al.*, 2005). En totes aquestes línies cel·lulars el pre-tractament amb un inhibidor de la MEK anomenat PD98059, bloqueja la proliferació cel·lular.

La via Raf/Ras/MAPK té un paper important en el control del creixement i la diferenciació. Una altra via de senyalització cel·lular de l'aldosterona a les cèl·lules mesangials és la via PI3K/AKT (Huang *et al.*, 2009). Es coneix que aquesta via participa en processos de proliferació i de supervivència (Klippel *et al.*, 1998). Yuan *et al.*, (2011) descriuen que l'aldosterona estimula la proliferació de les cèl·lules mesangials a través de la via PI3K/AKT. L'aldosterona en cèl·lules epitelials dels conductes tubulars de ratolí, estimula l'expressió de l'ENaC a través de PI3K/AKT (Helms *et al.*, 2005). En aquesta tesi s'ha observat que el LY294002, que és un inhibidor de PI3K, bloqueja completament els efectes de l'aldosterona sobre la proliferació cel·lular, demostrant la importància d'aquesta via en la proliferació de les cèl·lules CCD-18Co. Aquests resultats donen suport al mecanisme d'acció de l'aldosterona en la proliferació dels miofibroblasts subepitelials el qual té lloc a través de l'MR, afavorint l'alliberació de l'EGF en el medi de cultiu per part de les cèl·lules CCD-18Co i l'activació de l'EGFR. Aquest mecanisme s'ha identificat en la proliferació de les cèl·lules mesangials tractades amb aldosterona (Huang *et al.*, 2009) i en l'estimulació cardíaca per l'intercanviador de Na^+/H^+ (De Guisti *et al.*, 2011). Grossmann *et al.*, (2007) descriuen que l'aldosterona actua a través de l'EGFR interaccionant amb el promotor de l'EGFR, el qual és específic per l'MR ja que es pot bloquejar amb l'SPI.

Atès que l'addició d'aldosterona sobre els colonòcits T84 no modifica ni la proliferació cel·lular ni l'expressió de les proteïnes d'unió, fa pensar que els efectes de l'aldosterona són conseqüència d'algun producte secretat pels miofibroblasts que seria el que actuaria sobre els colonòcits. Així doncs, la incubació dels colonòcits amb medi condicionat procedent dels miofibroblasts tractats amb aldosterona presenten un increment significatiu de la proliferació cel·lular. En canvi, aquest efecte no es veu quan els miofibroblasts s'incuben conjuntament amb l'aldosterona i l'SPI. A més, d'aquest increment de la proliferació cel·lular, també hi ha canvis en l'expressió de les proteïnes del complex d'unió dels colonòcits com ara la β -catenina i la claudina IV. Aquest efecte no s'observa quan el medi condicionat prové dels miofibroblasts tractats amb aldosterona i SPI. Per determinar si el producte alliberat és l'EGF, s'afegeix al medi condicionat l'inhibidor de l'EGFR o bé l'anticòs neutralitzant de l'EGF (α -EGF), observant-se, en ambdós casos, que la proliferació cel·lular dels colonòcits queda inhibida. Així doncs, aquests resultats suggereixen que l'EGF és el producte secretat pels miofibroblasts al medi de cultiu i aquest EGF és capaç d'estimular la proliferació de les cèl·lules T84 i modular les propietats de la permeabilitat epitelial.

Hi ha evidència que l'aldosterona afecta l'expressió de l'EGFR (Florian *et al.*, 2001; Dorrance *et al.*, 2001) i té un efecte dosi-depenent en la fosforilació de l'EGFR (Krug *et al.*, 2003). En cèl·lules MDCK, l'aldosterona incrementa l'expressió de l'EGFR i aquest efecte s'inhibeix per l'SPI (Krug *et al.*, 2003). D'acord amb aquests resultats i els obtinguts *in vitro*, s'ha reproduït *in vivo*, el model d'hiperaldoesteronisme secundari utilitzat per Moretó *et al.* (2005), per estudiar la implicació de l'EGF i la fosforilació de l'EGFR. Els resultats obtinguts amb els animals tractats amb una dieta amb baix contingut en Na⁺, mostren que l'expressió de l'RNA de l'EGF a la mucosa del còlon no es troba modificat. L'expressió de l'EGFR total no canvia en les rates adaptades a la dieta amb baix contingut en Na⁺. Ara bé, l'anàlisi de la fosforilació de l'EGFR es troba incrementada un 23% respecte al grup control sotmès a una dieta amb alt contingut de Na⁺. Aquests resultats indiquen que l'aldosterona present en còlon, actua a través de l'MR, estimula la fosforilació de l'EGFR que està implicat en els efectes observats en l'adaptació a la dieta amb baix contingut de Na⁺. D'acord amb els resultats, es confirma les observacions vistes anteriorment que en rates amb infusió d'aldosterona dona lloc a un increment de la fosforilació de l'EGFR en el teixit renal (Sinphitukkul *et al.*, 2011).

Els animals sotmesos a una restricció d'aigua durant 24 h presenten un augment de Na⁺ a l'espai pericriptal i una disminució de la permeabilitat pericriptal, que són independents del contingut de Na⁺ de la dieta (Cristià *et al.*, 2007). Als animals als quals se'ls hi indueix una deshidratació no presenten modificacions en l'expressió de l'ENaC. Ara bé, quan s'estudia la proliferació cel·lular dels miofibroblasts s'observa que la deshidratació comporta un lleuger increment de l'expressió de l' α -SMA i que aquest efecte és revertit per l'administració de dos antagonistes de la vasopressina, el tolvaptan i el *manning compound*, demostrant la implicació de la vasopressina en l'augment del gruix de la beina pericriptal. Els animals, als quals se'ls restringeix l'aigua de beguda tenen incrementada l'expressió de les aquaporines (AQP-2) en el còlon distal i l'administració dels antagonistes de la vasopressina atenua aquest efecte. La regulació de l'expressió de l'ENaC és molt heterogènia i varia segons l'òrgan, el teixit i l'hormona (Stokes i Sigmund, 1998). A nivell cerebral, la vasopressina incrementa el transport de Na⁺ a través dels receptors V₁ (O'Donnell *et al.*, 2005). Al ronyó, la vasopressina estimula l'expressió de l'ENaC (Machida *et al.*, 2003); en canvi, no s'han observat efectes en el còlon (Nicco *et al.*, 2001; Cristià *et al.*, 2007). Aquests estudis recolzen els resultats obtinguts en incubar les cèl·lules T84 a diferents concentracions de vasopressina en què no s'observen modificacions de l'expressió de l'ENaC.

A part dels mecanismes homeostàtics en el control hídric i electrolític de la vasopressina, aquesta hormona també pot actuar com un factor de creixement, estimulant diferents tipus cel·lulars, incloent-hi cèl·lules mesangials (Tahara *et al.*, 2007), hepatòcits (Bhora *et al.*, 1994), cèl·lules osteoblàstiques (Lagumdzija *et al.*, 2005) i cèl·lules epitelials (Chiu *et al.*, 2002). Tahara *et al.*, (1998) descriuen que la vasopressina estimula la hipertròfia miocardiaca en rates, de forma similar a com ho fan les hormones del RAAS. Posteriorment, Sanghi *et al.*, (2005) han demostrat *in vivo* que la vasopressina està involucrada en la proliferació glomerular i l'expansió de l'ECM (*Extracellular matrix*). El tractament amb la vasopressina sobre els miofibroblasts intestinals incrementa la proliferació cel·lular en tant sols 24 h. Aquest efecte en la proliferació cel·lular no s'observa quan en el medi de cultiu hi ha la presència dels inhibidors de la vasopressina. Per tant, els resultats recollits en la secció 3 indiquen que el mecanisme d'acció de la vasopressina té lloc a través dels receptors V_1 i V_2 .

Per a l'estudi dels factors de creixement implicats en la proliferació induïda per la vasopressina, s'ha triat com a candidats el PDGFA, el PDGFB i l'EGF. Els membres de la família dels PDGFs tenen un paper important durant el desenvolupament embrionari perquè estimulen la diferenciació i la proliferació de determinats tipus de cèl·lules mesenquimals en els diferents òrgans, com ara les cèl·lules musculars llises, les cèl·lules mesangials a ronyó, els miofibroblasts alveolars dels pulmons i les cèl·lules gials del SNC (Smith i Tallquist, 2011). Per aquesta raó, s'analitza l'expressió del PDGFA, perquè aquest factor estimula el creixement dels fibroblasts cardíacs i estimula la síntesi de col·lagen (Liao *et al.*, 2010). El segon factor escollit és el PDGFB, per que s'ha descrit que és l'inductor de la proliferació de les cèl·lules mesangials (Van Roeyen *et al.*, 2005). El darrer factor és l'EGF perquè la seva expressió estava incrementada pel tractament hormonal amb l'aldosterona i és indispensable per a l'activació de la proliferació de les cèl·lules intestinals epitelials (Suzuki *et al.*, 2010). Els resultats obtinguts indiquen que la vasopressina afavoreix, significativament, l'increment de l'expressió del PDGFA en les cèl·lules CCD-18Co. Quan s'addiciona el factor de creixement de forma exògena s'obtenen valors de proliferació similars als obtinguts amb la incubació amb la vasopressina. Per tant, la vasopressina pot actuar a través dels seus receptors V_1 i V_2 (Cristià *et al.*, 2007) o bé, a través del PDGFR. Per confirmar que el PDGFA participava en aquest procés de proliferació s'utilitza un anticòs neutralitzant d'aquest factor de creixement i s'inhibeix el PDGFR amb AG1296. La inhibició del factor de creixement present en el medi de cultiu com el bloqueig del PDGFR, fa que la proliferació dels CCD-18Co quedi atenuada, tot i la presència de

la vasopressina en el medi de cultiu. Així doncs, el PDGFR participa en la regulació de la proliferació cel·lular induïda per la vasopressina.

Certs efectes observats de la vasopressina estan mediatos a través de l'activació de la via de la Ras/Raf/MAPK, com és el cas de les cèl·lules aòrtiques de múscul llis (Akamatsu *et al.*, 2004; Kaida *et al.*, 1999) i dels fibroblasts cardíacs de rata (Yang-Ping *et al.*, 2008). Pel que fa al paper de la vasopressina en l'activació cel·lular mitjançant la via de senyalització PI3K/AKT, hi ha pocs estudis realitzats. Suga *et al.*, (2005) estudien que els efectes de la vasopressina a cèl·lules aòrtiques de múscul llis té lloc a través d'aquesta via reguladora. A causa dels pocs estudis disponibles, s'ha analitzat si l'addició d'inhibidors de les vies esmentades anteriorment afectaria en la resposta causada per la vasopressina en els CCD-18Co, i entendre el mecanisme d'acció d'aquesta hormona a nivell del còlon. El pre-tractament amb el PD98059 o amb LY294002 atenua la proliferació dels miofibroblasts. Per tant, en el decurs de l'adaptació a una dieta amb baix contingut en Na⁺, les vies Ras/Raf/MAPK i la PI3K/AKT participen en l'activació de la proliferació dels miofibroblasts.

Tal i com havia succeït amb l'aldosterona, el tractament dels colonòcits amb la vasopressina no ha modificat l'expressió de les proteïnes del complex d'unió, ni la subunitat γ de l'ENaC com tampoc ha canviat la proliferació cel·lular, suggerint que tot i expressar-se, el receptor AVPR1 no és funcional en aquest tipus cel·lular. Ara bé, quan els colonòcits s'han tractat amb el medi condicionat procedent dels miofibroblasts tractats amb vasopressina ha incrementat la proliferació cel·lular de les cèl·lules T84. També s'ha observat un increment de l'expressió de les proteïnes del complex d'unió, concretament de la β -catenina i de la claudina IV. Quan la incubació dels colonòcits és amb medi condicionat procedent de miofibroblasts tractats amb vasopressina i els seus inhibidors de forma conjunta, tant la proliferació cel·lular com l'expressió de les proteïnes del complex d'unió són similars de la condició control. Aquests resultats indiquen que hi ha quelcom en el medi de cultiu responsable d'aquests efectes. Per poder esbrinar si el factor de creixement implicat és el PDGFA s'ha bloquejat el receptor del PDGFA en els colonòcits com també s'ha inhibit el PDGFA present en el medi condicionat. Fent aquestes incubacions la proliferació dels colonòcits queda inhibida respecte la condició amb vasopressina indicant que el PDGFA és el responsable dels efectes observats.

D'acord amb els resultats obtinguts en aquesta tesi, es pot concloure que l'aldosterona estimula la proliferació dels miofibroblasts i, alhora, indueix l'alliberament de substàncies reguladores al medi, com ara l'EGF, responsables de modificar les proteïnes d'unió intercel·lular i incrementar

la proliferació cel·lular en els colonòcits per tal de regular la permeabilitat de les criptes. En el cas de la vasopressina, sembla que el mediador implicat en el seu mecanisme d'acció és el PDGFA, si bé es necessiten experiments addicionals per corroborar-ho. Tant l'aldosterona com la vasopressina estimulen la proliferació dels miofibroblasts que dona com a resultat l'engruiximent de la beina pericriptal, la qual cosa alenteix la difusió del Na^+ que es mou a favor de gradient, des del compartiment pericriptal, molt hipertònic a causa de l'acumulació de Na^+ , cap als capil·lars sanguinis.

Existeix evidència que l'aldosterona i la vasopressina es complementen en la regulació general del volum i la pressió osmòtica del LEC; en canvi, no es coneix amb precisió el grau i el tipus d'interaccions que es produeixen a nivell del còlon. Així, les rates amb hiperaldosteronisme, bé sigui induït per una dieta amb baix contingut en Na^+ o bé per infusió d'aldosterona, tenen incrementada la concentració plasmàtica de vasopressina (Fukushima *et al.*, 2005; Cristià *et al.*, 2007). A més, la vasopressina potencia algunes accions dutes a terme per l'aldosterona, com la producció de prostasina, una serin-transferasa que està implicada en el transport de Na^+ (Fukushima *et al.*, 2004), i de 11- β -HSD2, que és l'enzim que transforma els glucocorticoides en metabòlits amb poca afinitat pels MR (Fukushima *et al.*, 2005). Al ronyó, la vasopressina estimula la reabsorció de Na^+ al tub col·lector (Schafer i Hawk, 1992) on també té efectes sinèrgics amb l'aldosterona (Hawk *et al.*, 1996). És interessant destacar que al ronyó la vasopressina és capaç, per si sola, d'incrementar l'expressió apical de l'ENaC (Machida *et al.*, 2003) que és una funció típica de l'aldosterona. A més, en rates congènitament deficientes en vasopressina, s'ha observat que l'aldosterona disminueix l'expressió apical de les AQP al tub col·lector del ronyó (Nielsen *et al.*, 2006), que és una funció típica de la vasopressina. Aquestes observacions indiquen que ambdues hormones poden actuar de forma sinèrgica, compartint certes funcions a determinats teixits diana.

Tant l'aldosterona com la vasopressina tenen un paper fisiològic molt important en el manteniment de l'homeòstasi hídrica i electrolítica. Ambdues estan també implicades en la fisiopatologia cardíaca i renal amb efectes tròfics que desencadenen un creixement exagerat dels fibroblasts que pot alterar la funció d'aquests dos òrgans (He *et al.*, 2008a; Blasi *et al.*, 2003). En el model d'adaptació a dietes amb baix contingut en Na^+ , s'ha vist que la concentració de l'aldosterona i de la vasopressina estan elevades, regulant l'homeòstasi hídrica i salina; els efectes tròfics sobre els miofibroblasts de la mucosa no tenen conseqüències patològiques, sinó que reforcen el seu paper homeostàtic regulador del transport de Na^+ i

l'expressió d'aquaporines. L'estudi de l'aldosterona i de la vasopressina realitzat *in vitro* ha demostrat que ambdues hormones tenen un mecanisme d'acció similar. Totes dues incrementen la proliferació dels miofibroblasts intestinals i estimulen l'alliberació de factors reguladors (com EGF i PDGFA) que seran els mediadors encarregats de modular la permeabilitat dels colonòcits presents en la cripta.

Aquest estudi posa de manifest que aldosterona i vasopressina, actuen conjuntament en la regulació de variables sistèmiques, també ho fan en el control local de variables que contribuiran a l'estabilitat de les primeres. Dels tres principals teixits que participen en la regulació del volum del LEC (digestiu, renal, tegumentari) hem estudiat el còlon, emprant un model *in vitro* molt simple en el que s'ha pogut demostrar que aldosterona i vasopressina no actuen directament sobre l'epiteli, sinó que ho fan mitjançant mediadors secretats pels miofibroblasts que l'envolten. Serà interessant estudiar si altres mediadors també hi estan implicats i quin és el seu paper; quina serà la resposta quan les dues hormones es trobin simultàniament en contacte amb els miofibroblasts; quina importància relativa tenen les vies genòmica i no genòmica en les accions de l'aldosterona; i, finalment, quin és el grau de cooperació o de sinèrgia entre aldosterona i vasopressina no solament al còlon sinó també al ronyó i a la pell. Les respostes a aquestes preguntes ens permetran entendre millor els mecanismes reguladors generals i el paper fisiològic i fisiopatològic d'ambdues hormones.

VI. CONCLUSIONS

De l'estudi dels efectes de l'aldosterona en models *in vitro* i *in vivo* es pot concloure que:

- L'aldosterona estimula la proliferació dels miofibroblasts mitjançant l'alliberació d'EGF, que actua de forma autocrina a través de l'EFGR per un mecanisme en el que participen les vies reguladores Ras/Raf/MAPK i PI3K/AKT.
- L'EGF, alliberat pels miofibroblasts en resposta a l'aldosterona, redueix la permeabilitat de la monocapa epitelial de colonòcits ja que incrementa l'expressió de proteïnes del complex d'unió intercel·lulars.
- L'estudi *in vivo* en el model d'hiperaldosteronisme secundari en rata indica que l'aldosterona incrementa la fosforilació del receptor de l'EGF a la mucosa del còlon distal, resultat comparable en les observacions *in vitro*.

De l'anàlisi dels efectes de la vasopressina es poden extreure les següents conclusions:

- La vasopressina estimula la proliferació dels miofibroblasts a través de la producció del PDGFA pels propis miofibroblasts. Aquest factor de creixement actua a través del PDGFR mitjançant les vies reguladores Ras/Raf/MAPK i PI3K/AKT.
- El PDGFA està implicat en la proliferació dels colonòcits i així com també incrementa l'expressió de proteïnes del complex d'unió, així regula el flux d'aigua i soluts per la via paracel·lular.

Aquest estudi demostra que l'aldosterona i la vasopressina actuen conjuntament en la regulació de l'osmolalitat i el volum del LEC. Ambdues hormones regulen la permeabilitat i el transport d'ions al còlon a través de factors locals secretats per la beina pericriptal.

VII. BIBLIOGRAFIA

A

Akamatsu S, Nakajima K, Ishisaki A, Matsuno H, Tanabe K, Takei M, Takenaka M, Hirade K, Yoshimi N, Suga H, Oiso Y, Kato K, Kozawa O. (2004) Vasopressin phosphorylates HSP27 in aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem.* 92:1203-1211.

Alonso G, Galibert E, Boulay V, Guillou A, Jean A, Compan V, Guillon G. (2009) Sustained elevated levels of circulating vasopressin selectively stimulate the proliferation of kidney tubular cells via the activation of V2 receptors. *Endocrinology.* 150:239-250.

Álvarez de la Rosa D. (2005) Aldosterona: ¿Algo más que un mineralcorticoide? *Fisiologia* 8:10-12.

Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. (2006) Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc.* 81:1241-1257.

Andoh A, Bamba S, Fujiyama Y, Brittan M, Wright NA. (2005) Colonic subepithelial myofibroblasts in mucosal inflammation and repair: contribution of bone marrow-derived stem cells to the gut regenerative response. *J Gastroenterol.* 40:1089-1099.

Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 22:1276-1312.

Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valença MM, McCann SM. (2004) Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev.* 84:169-208.

Asakura M, Kitakaze M, Takashima S, Liao Y, Ishikura F, Yoshinaka T, Ohmoto H, Node K, Yoshino K, Ishiguro H, Asanuma H, Sanada S, Matsumura Y, Takeda H, Beppu S, Tada M, Hori M, Higashiyama S. (2002) Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med.* 8:35-40.

B

Bader M, Ganten D. (2000) Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mol Med (Berl).* 78:130-139.

Balda MS, Matter K. (2009) Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta*. 1788:761-767.

Banon LJ, Goldfinger LE, Jones JCR, Green KJ. (2002) Desmosomes and hemidesmosomes. A: Cell adhesion. Beckerle MC, Ed. Oxford University Press, New York, pp:324-368.

Béguin P, Crambert G, Guennoun S, Garty H, Horisberger JD, Geering K. (2001) CHIF, a member of the FXFD protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the gamma-subunit. *EMBO J*. 20:3993-4002.

Beltinger J, McKaig BC, Makh S, Stack WA, Hawkey CJ, Mahida YR. (1999) Human colonic subepithelial myofibroblasts modulate transepithelial resistance and secretory response. *Am J Physiol*. 277:C271-C279.

Bernat A, Hoffmann P, Dumas A, Serradeil-le Gal C, Raufaste D, Herbert JM. (1997) V2 receptor antagonism of DDAVP-induced release of hemostasis factors in conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther*. 282:597-602.

Bhargava A, Fullerton MJ, Myles K, Purdy TM, Funder JW, Pearce D, Cole TJ. (2001) The serum- and glucocorticoid-induced kinase is a physiological mediator of aldosterone action. *Endocrinology*. 142:1587-1594.

Bhora FY, Kothary PC, Imanishi H, Eckhauser FE, Raper SE. (1994) Vasopressin stimulates DNA synthesis in cultured rat hepatocytes. *J Surg Res*. 57:706-710.

Blasi ER, Rocha R, Rudolph AE, Blomme EA, Polly ML, McMahon EG. (2003) Aldosterone/salt induces renal inflammation and fibrosis in hypertensive rats. *Kidney Int*. 63:1791-1800.

Boldyreff B, Wehling M. (2003) Rapid aldosterone actions: from the membrane to signaling cascades to gene transcription and physiological effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 85:375-381.

Boldyreff B, Wehling M. (2004) Aldosterone: refreshing a slow hormone by swift action. *News Physiol Sci*. 19:97-100.

Bonner JC. (2004) Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*. 15:255-273.

- Boon WC, Coghlan JP, Curnow KM, McDougall JG. (1997) Aldosterone secretion: a molecular perspective. *Trends Endocrinol Metab.* 8:346-354.
- Boyd C, Naray-Fejes-Toth A. (2005) Gene regulation of ENaC subunits by serum- and glucocorticoid-inducible kinase-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 288:F505-F512.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Brady RC, Karnaky KJ Jr, Dedman JR. (1984) Reserpine-induced alterations in mucus production and calmodulin-binding proteins in a human epithelial cell line. *Exp Cell Res.* 150:141-151.
- Bravo EL. (2003) Aldosterone and specific aldosterone receptor antagonists in hypertension and cardiovascular disease. *Curr Hypertens Rep.* 5:122-125.
- Breitwieser GE. (2004) G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ Res.* 94:17-27.
- Brewster UC, Perazella MA. (2004) The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med.* 116:263-272.
- Briet M, Schiffrin EL. (2010) Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol.* 6:261-273.
- Brilla CG, Weber KT. (1992) Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med.* 120:893-901.
- Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. (1993) Anti-aldosterone treatment and the prevention of myocardial fibrosis in primary and secondary hyperaldosteronism. *J Mol Cell Cardiol.* 25:563-575.
- Brilla CG. (2000) Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz.* 25:299-306.
- Brown NJ, Nakamura S, Ma L, Nakamura I, Donnert E, Freeman M, Vaughan DE, Fogo AB. (2000) Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo. *Kidney Int.* 58:1219-1227.
- Brown NJ. (2003) Eplerenone: cardiovascular protection. *Circulation.* 107:2512-2518.

Bulut K, Pennartz C, Felderbauer P, Meier JJ, Banasch M, Bulut D, Schmitz F, Schmidt WE, Hoffmann P. (2008) Glucagon like peptide-2 induces intestinal restitution through VEGF release from subepithelial myofibroblasts. *Eur J Pharmacol.* 578:279-285.

C

Cachofeiro V, Miana M, de Las Heras N, Martín-Fernández B, Ballesteros S, Fernández-Tresguerres J, Lahera V. (2008) Aldosterone and the vascular system. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 109:331-335.

Callera GE, Touyz RM, Tostes RC, Yogi A, He Y, Malkinson S, Schiffrin EL. (2005) Aldosterone activates vascular p38MAP kinase and NADPH oxidase via c-Src. *Hypertension.* 45:773-779.

Carey RM. (2010) Aldosterone and cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 17:194-198.

Carmichael MC, Kumar R. (1994) Molecular biology of vasopressin receptors. *Semin Nephrol.* 14:341-348.

Chen SY, Bhargava A, Mastroberardino L, Meijer OC, Wang J, Buse P, Firestone GL, Verrey F, Pearce D. (1999) Epithelial sodium channel regulated by aldosterone-induced protein sgk. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:2514-2519.

Chiu T, Wu SS, Santiskulvong C, Tangkijvanich P, Yee HF Jr, Rozengurt E. (2002) Vasopressin-mediated mitogenic signaling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282:C434-C450.

Chun TY, Chander PN, Kim JW, Pratt JH, Stier CT Jr. (2008) Aldosterone, but not angiotensin II, increases profibrotic factors in kidney of adrenalectomized stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295:E305-E312.

Connell JM, Davies E. (2005) The new biology of aldosterone. *J Endocrinol.* 186:1-20.

Corzo C, Petzold M, Mayol X, Espinet B, Salido M, Serrano S, Real FX, Solé F. (2003) RxFISH karyotype and MYC amplification in the HT-29 colon adenocarcinoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer.* 36:425-426.

Cristià E, Afzal-Ahmed I, Pérez-Bosque A, Amat C, Naftalin RJ, Moretó M. (2005) Pericryptal myofibroblast growth in rat descending colon induced by low-sodium diets is mediated by aldosterone and not by angiotensin II. *J Membrane Biol.* 206:53-59.

Cristià E, Amat C, Naftalin RJ, Moretó M. (2007) Role of vasopressin in rat distal colon function. *J Physiol.* 578:413-424.

D

Danjo Y, Gipson IK. (1998) Actin 'purse string' filaments are anchored by E-cadherin-mediated adherens junctions at the leading edge of the epithelial wound, providing coordinated cell movement. *J Cell Sci.* 111:3323-3332.

Davies E, MacKenzie SM. (2003) Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 30:437-445.

De Giusti VC, Nolly MB, Yeves AM, Caldiz CI, Villa-Abrille MC, Chiappe de Cingolani GE, Ennis IL, Cingolani HE, Aiello EA. (2011) Aldosterone stimulates the cardiac Na(+)/H(+) exchanger via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Hypertension.* 58:912-919.

Del Buono R, Beltinger J, Jackson L, Hawkey CJ, Mahida YR. (1998) Primary adult human colonic subepithelial myofibroblasts induce morphological and cytological differentiation in T84 colonic epithelial cells (Abstract). *Gastroenterology.* 114:A584.

Descorbeth M, Anand-Srivastava MB. (2010) Role of growth factor receptor transactivation in high glucose-induced increased levels of Gq/11alpha and signaling in vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 49:221-233.

Dharmasathaphorn K, McRoberts JA, Mandel KG, Tisdale LD, Masui H. (1984) A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am J Physiol.* 246:G204-G208.

Diakov A, Korbmacher C. (2004) A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-inducible kinase consensus motif in the C terminus of the channel's alpha-subunit. *J Biol Chem.* 279:38134-38142.

Dorrance AM, Osborn HL, Grekin R, Webb RC. (2001) Spironolactone reduces cerebral infarct size and EGF-receptor mRNA in stroke-prone rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281:R944-R950.

E

Eyden B. (2008) The myofibroblast: phenotypic characterization as a prerequisite to understanding its functions in translational medicine. *J Cell Mol Med.* 12:22-37.

F

Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. (2003) Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 18:479-497.

Farman N, Rafestin-Oblin ME. (2001) Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280:F181-F192.

Farquhar MG, Palade GE. (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol.* 17:375-412.

Fasano A, Shea-Donohue T. (2005) Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2:416-422.

Fiebeler A, Nussberger J, Shagdarsuren E, Rong S, Hilfenhaus G, Al Saadi N, Dechend R, Wellner M, Meiners S, Maser-Gluth C, Jeng AY, Webb RL, Luft FC, Muller DN. (2005) Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage. *Circulation.* 111:3087-3094.

Flemström G, Sjöblom M. (2005) Epithelial cells and their neighbors. II. New perspectives on efferent signaling between brain, neuroendocrine cells, and gut epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 289:G377-G380.

Florian JA, Dorrance A, Webb RC, Watts SW. (2001) Mineralocorticoids upregulate arterial contraction to epidermal growth factor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281:R878-R886.

- Fogh J, Trempe G. (1975) Human Tumour Cells In Vitro. Fogh, J. Ed. Oxford University Press, New York: Plenum Press. pp:115-141.
- Fogh J. (1975) Human tumor cells in vitro. Ed. Oxford University Press, New York and London: Plenum Press. pp:115-159.
- Folny V, Raufaste D, Lukovic L, Pouzet B, Rochard P, Pascal M, Serradeil-Le Gal C. (2003) Pancreatic vasopressin V1b receptors: characterization in In-R1-G9 cells and localization in human pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285:E566-E576.
- Förster C. (2008) Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol.* 130:55-70.
- Fukushima K, Sasaki I, Sato S, Sasano H, Krozowski Z, Matsuno S. (1999) Induction of mineralocorticoid receptor by sodium butyrate in small intestinal (IEC6) and colonic (T84) epithelial cell lines. *Dig Dis Sci.* 44:1571-1578.
- Fukushima K, Naito H, Funayama Y, Yonezawa H, Haneda S, Shibata C. (2004) In vivo induction of prostaticin mRNA in colonic epithelial cells by dietary sodium depletion and aldosterone infusion in rats. *J Gastroenterol.* 39:940-947.
- Fukushima K, Funayama Y, Yonezawa H, Takahashi K, Haneda S, Suzuki T, Sasano H, Naito H, Shibata C, Krozowski ZS, Sasaki I. (2005) Aldosterone enhances 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in colonic epithelial cells in vivo. *Scand J Gastroenterol.* 40: 850-857.
- Fuller PJ, Young MJ. (2005) Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension.* 46:1227-1235.
- Funa K, Uramoto H. (2003) Regulatory mechanisms for the expression and activity of platelet-derived growth factor receptor. *Acta Biochim Pol.* 50:647-658
- Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. (1988) Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science.* 242:583-585.
- Fushimi K, Uchida S, Hara Y, Hirata Y, Marumo F, Sasaki S. (1993) Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature.* 361:549-552.

G

Gallardo P, Cid LP, Vio CP, Sepulveda FV. (2001) Aquaporin-2, a regulated water channel, is expressed in apical membranes of rat distal colon epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281:G856-G863.

Garty H, Palmer LG. (1997) Epithelial sodium channels: function, structure and regulation. *Physiol Rev.* 77: 359-396.

Gekle M, Freudinger R, Mildenerger S, Schenk K, Marschitz I, Schramek H. (2001) Rapid activation of Na^+/H^+ exchange in MDCK-cells by aldosterone involves MAP-kinases ERK1/2. *Pflügers Arch.* 441:781-786.

Goldsmith SR, Gheorghide M. (2005) Vasopressin antagonism in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 46:1785-1791.

Goncharova EA, Ammit AJ, Irani C, Carroll RG, Eszterhas AJ, Panettieri RA, Krymskaya VP. (2002) PI3K is required for proliferation and migration of human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283:L354-L363.

Gottardi CJ, Niessen CM, Gumbiner BM. (2002) The adherens junction. A: Cell adhesion. Beckerle MC, Ed. Oxford University Press, New York. pp:259-287.

Grossmann C, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Voelker K, Gekle M. (2007) Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292:E1790-E1800.

Grossmann C, Gekle M. (2008) Nongenotropic aldosterone effects and the EGFR: interaction and biological relevance. *Steroids.* 73:973-978.

Gumbiner BM. (2005) Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:622-634.

H

Halbleib JM, Nelson WJ. (2006) Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 20:3199-3214.

- Halttunen T, Marttinen A, Rantala I, Kainulainen H, Mäki M. (1996) Fibroblasts and transforming growth factor beta induce organization and differentiation of T84 human epithelial cells. *Gastroenterology*. 111:1252-1262.
- Han KH, Kang YS, Han SY, Jee YH, Lee MH, Han JY, Kim HK, Kim YS, Cha DR. (2006) Spironolactone ameliorates renal injury and connective tissue growth factor expression in type II diabetic rats. *Kidney Int*. 70:111-120.
- Han L, Ma Q, Li J, Liu H, Li W, Ma G, Xu Q, Zhou S, Wu E. (2011) High glucose promotes pancreatic cancer cell proliferation via the induction of EGF expression and transactivation of EGFR. *PLoS One*. 6:e27074.
- Hansson GK. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 352:1685-1695.
- Harada K, Ogura T, Yamauchi T, Otsuka F, Mimura Y, Hashimoto M, Oishi T, Makino H. (1998) Effect of continuous infusion of vasopressin on glomerular growth response in spontaneously hypertensive rats. *Regul Pept*. 74:11-18.
- Harada E, Yoshimura M, Yasue H, Nakagawa O, Nakagawa M, Harada M, Mizuno Y, Nakayama M, Shimasaki Y, Ito T, Nakamura S, Kuwahara K, Saito Y, Nakao K, Ogawa H. (2001) Aldosterone induces angiotensin-converting-enzyme gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation*. 104:137-139.
- Hatakeyama H, Miyamori I, Fujita T, Takeda Y, Takeda R, Yamamoto H. (1994) Vascular aldosterone. Biosynthesis and a link to angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 269:24316-24320.
- Hawk CT, Li L, Schafer JA. (1996) AVP and aldosterone at physiological concentrations have synergistic effects on Na⁺ transport in rat CCD. *Kidney Int Suppl*. 57:S35-S41.
- Hayashi H, Kobara M, Abe M, Tanaka N, Gouda E, Toba H, Yamada H, Tatsumi T, Nakata T, Matsubara H. (2008) Aldosterone nongenomically produces NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species and induces myocyte apoptosis. *Hypertens Res*. 31:363-375.

He YP, Zhao LY, Zheng QS, Liu SW, Zhao XY, Lu XL, Niu XL, Li X. (2008a) Involvement of ERK and AKT signaling in the growth effect of arginine vasopressin on adult rat cardiac fibroblast and the modulation by simvastatin. *Mol Cell Biochem.* 317:33-41.

He YP, Zhao LY, Zheng QS, Liu SW, Zhao XY, Lu XL, Niu XL. (2008b) Arginine vasopressin stimulates proliferation of adult rat cardiac fibroblasts via protein kinase C-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway. *Sheng Li Xue Bao.* 60:333-340.

Heerdts BG, Houston MA, Augenlicht LH. (1994) Potentiation by specific short-chain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 54:3288-3293.

Helms MN, Liu L, Liang YY, Al-Khalili O, Vandewalle A, Saxena S, Eaton DC, Ma HP. (2005) Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate mediates aldosterone stimulation of epithelial sodium channel (ENaC) and interacts with gamma-ENaC. *J Biol Chem.* 280:40885-40891.

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* 96:736-749.

Hirasawa K, Sato Y, Hosoda Y, Yamamoto T, Hanai H. (2002) Immunohistochemical localization of angiotensin II receptor and local renin-angiotensin system in human colonic mucosa. *J Histochem Cytochem.* 50:275-282.

Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr, Franklin WA, Dziadziuszko R, Thatcher N, Chang A, Parikh P, Pereira JR, Ciuleanu T, von Pawel J, Watkins C, Flannery A, Ellison G, Donald E, Knight L, Parums D, Botwood N, Holloway B. (2006) Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 24:5034-5042.

Holthöfer B, Windoffer R, Troyanovsky S, Leube RE. (2007) Structure and function of desmosomes. *Int Rev Cytol.* 264:65-163.

Huang W, Xu C, Kahng KW, Noble NA, Border WA, Huang Y. (2008) Aldosterone and TGF-beta1 synergistically increase PAI-1 and decrease matrix degradation in rat renal mesangial and fibroblast cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294:F1287-F1295.

Huang S, Zhang A, Ding G, Chen R. (2009) Aldosterone-induced mesangial cell proliferation is mediated by EGF receptor transactivation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 296:F1323-F1333.

Huber O. (2003) Structure and function of desmosomal proteins and their role in development and disease. *Cell Mol Life Sci.* 60:1872-1890.

Hunter T. (1998) The Croonian Lecture 1997. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 353:583-605.

I

Imamura Y, Itoh M, Maeno Y, Tsukita S, Nagafuchi A. (1999) Functional domains of α -catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *J Cell Biol.* 144:1311-1322.

Iordache C, Duszyk M. (2007) Sodium 4-phenylbutyrate upregulates ENaC and sodium absorption in T84 cells. *Exp Cell Res.* 15:305-311.

Ishizawa K, Izawa Y, Ito H, Miki C, Miyata K, Fujita Y, Kanematsu Y, Tsuchiya K, Tamaki T, Nishiyama A, Yoshizumi M. (2005) Aldosterone stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via big mitogen-activated protein kinase 1 activation. *Hypertension.* 46:1046-1052.

Iwashima F, Yoshimoto T, Minami I, Sakurada M, Hirono Y, Hirata Y. (2008) Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells. *Endocrinology.* 149:1009-1014.

J

Juknevičius I, Segal Y, Kren S, Lee R, Hostetter TH. (2004) Effect of aldosterone on renal transforming growth factor-beta. *Am J Physiol Renal Physiol.* 286:F1059-F1062.

K

Kaida T, Kozawa O, Ito T, Tanabe K, Ito H, Matsuno H, Niwa M, Miyata H, Uematsu T, Kato K. (1999) Vasopressin stimulates the induction of heat shock protein 27 and alphaB-crystallin via protein kinase C activation in vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res.* 246:327-337.

Kalra PR, Anker SD, Coats AJ. (2001) Water and sodium regulation in chronic heart failure: the role of natriuretic peptides and vasopressin. *Cardiovasc Res.* 51:495-509.

Kam PC, Williams S, Yoong FF. (2004) Vasopressin and terlipressin: pharmacology and its clinical relevance. *Anaesthesia.* 59:993-1001.

Kawano Y, Matsuoka H, Nishikimi T, Takishita S, Omae T. (1997) The role of vasopressin in essential hypertension. Plasma levels and effects of the V1 receptor antagonist OPC-21268 during different dietary sodium intakes. *Am J Hypertens.* 10:1240-1244.

Khan WI, Collins SM. (2004) Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. *Parasite Immunol.* 26:319-326.

Klippel A, Escobedo MA, Wachowicz MS, Apell G, Brown TW, Giedlin MA, Kavanaugh WM, Williams LT. (1998) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient for cell cycle entry and promotes cellular changes characteristic of oncogenic transformation. *Mol Cell Biol.* 18:5699-5711.

Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. (2008) Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta.* 1778:631-645.

Krug AW, Grossmann C, Schuster C, Freudinger R, Mildemberger S, Govindan MV, Gekle M. (2003) Aldosterone stimulates epidermal growth factor receptor expression. *J Biol Chem.* 278:43060-43066.

L

Lacolley P, Labat C, Pujol A, Delcayre C, Benetos A, Safar M. (2002) Increased carotid wall elastic modulus and fibronectin in aldosterone-salt-treated rats: effects of eplerenone. *Circulation.* 106:2848-2853.

Lai L, Chen J, Hao CM, Lin S, Gu Y. (2006) Aldosterone promotes fibronectin production through a Smad2-dependent TGF-beta1 pathway in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 348:70-75.

- Lagumdzija A, Pernow Y, Bucht E, Gonon A, Petersson M. (2005) The effects of arg-vasopressin on osteoblast-like cells in endothelial nitric oxide synthase-knockout mice and their wild type counterparts. *Peptides*. 26:1661-1666.
- Landau D. (2006) Epithelial paracellular proteins in health and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 15:425-429.
- Laragh JH. (1960) Aldosterone in fluid and electrolyte disorders: hyper- and hypoaldosteronism. *J Chronic Dis*. 11:292-318.
- Laragh JH. (1962) Hormones and the pathogenesis of congestive heart failure: vasopressin, aldosterone, and angiotensin II. Further evidence for renal-adrenal interaction from studies in hypertension and in cirrhosis. *Circulation*. 25:1015-1023.
- László F, Karácsony G, Szabó E, Láng J, Baláspiri L, László FA. (1991) The role of vasopressin in the pathogenesis of ethanol-induced gastric hemorrhagic erosions in rats. Is vasopressin an endogenous aggressor toward the gastric mucosa? *Gastroenterology*. 101:1242-1248.
- Lesuffleur T, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A. (1990) Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Res*. 50:6334-6343.
- Liao CH, Akazawa H, Tamagawa M, Ito K, Yasuda N, Kudo Y, Yamamoto R, Ozasa Y, Fujimoto M, Wang P, Nakauchi H, Nakaya H, Komuro I. (2010) Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. *J Clin Invest*. 120:242-253.
- Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC. (2001) Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol*. 3:802-808.
- Lockett MF, Retallack RW. (1972) The isolation of a renally active substance from arterial blood. *J Physiol*. 223:49-57.
- Lombès M, Alfaidy N, Eugene E, Lessana A, Farman N, Bonvalet JP. (1995) Prerequisite for cardiac aldosterone action. Mineralocorticoid receptor and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *Circulation*. 92:175-182.

Lösel R, Schultz A, Wehling M. (2004) A quick glance at rapid aldosterone action. *Mol Cell Endocrinol.* 217:137-141.

M

Ma J, Weisberg A, Griffin JP, Vaughan DE, Fogo AB, Brown NJ. (2006) Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects against aldosterone-induced glomerular injury. *Kidney Int.* 69:1064-1072.

Machida K, Nonoguchi H, Wakamatsu S, Inoue H, Yosifovska T, Inoue T, Tomita K. (2003) Acute regulation of the epithelial sodium channel gene by vasopressin and hyperosmolality. *Hypertens Res.* 26:629-634.

Madara JL, Stafford J, Dharmasathaphorn K, Carlson S. (1987) Structural analysis of a human intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology.* 92:1133-1145.

Mahida YR, Beltinger J, Makh S, Göke M, Gray T, Podolsky DK, Hawkey CJ. (1997) Adult human colonic subepithelial myofibroblasts express extracellular matrix proteins and cyclooxygenase-1 and -2. *Am J Physiol.* 273:G1341-G1348.

Manning M, Sawyer WH. (1989) Discovery, development, and some uses of vasopressin and oxytocin antagonists. *J Lab Clin Med.* 114:617-632.

Martinez DV, Rocha R, Matsumura M, Oestreicher E, Ochoa-Maya M, Roubanthisuk W, Williams GH, Adler GK. (2002) Cardiac damage prevention by eplerenone: comparison with low sodium diet or potassium loading. *Hypertension.* 39:614-618.

Matter K, Balda MS. (2003) Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:225-236.

Matter K, Aijaz S, Tsapara A, Balda MS. (2005) Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol.* 17:453-458.

McCormick JA, Bhalla V, Pao AC, Pearce D. (2004) SGK1: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption. *Physiol.* 20:134-139.

- McEneaney V, Harvey BJ, Thomas W. (2007) Aldosterone rapidly activates protein kinase D via a mineralocorticoid receptor/EGFR trans-activation pathway in the M1 kidney CCD cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 107:180-190.
- McEneaney V, Dooley R, Harvey BJ, Thomas W. (2010) Protein kinase D stabilizes aldosterone-induced ERK1/2 MAP kinase activation in M1 renal cortical collecting duct cells to promote cell proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 118:18-28.
- McNamara B, Winter DC, Cuffe JE, O'Sullivan GC, Harvey BJ. (1999) Basolateral K⁺ channel involvement in forskolin-activated chloride secretion in human colon. *J Physiol.* 519:251-260.
- Meinild A, Klaerke DA, Loo DD, Wright EM, Zeuthen T. (1998) The human Na⁺-glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol.* 508:15-21.
- Messaoudi S, Azibani F, Delcayre C, Jaisser F. (2011) Aldosterone, mineralocorticoid receptor, and heart failure. *Mol Cell Endocrinol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.038>.
- Mifflin RC, Pinchuk IV, Saada JI, Powell DW. (2011) Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 300:G684-G696.
- Min LJ, Mogi M, Li JM, Iwanami J, Iwai M, Horiuchi M. (2005) Aldosterone and angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 97:434-442.
- Min LJ, Mogi M, Iwanami J, Li JM, Sakata A, Fujita T, Tsukuda K, Iwai M, Horiuchi M. (2007) Cross-talk between aldosterone and angiotensin II in vascular smooth muscle cell senescence. *Cardiovasc Res.* 76:506-516.
- Miró L, Pérez-Bosque A, Maijó M, Naftalin RJ, Moretó M. (2008) Co-culture of colonic epithelial T84 and CCD-18Co myofibroblast cell lines as a model to study the regulation of colon functions. *J Physiol Biochem.* 64:333.
- Moal VL, Servin AL. (2006) The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides and microbiota. *Clin Microbiol Rev.* 19:315-337.
- Mobasherri A, Wray S, Marples D. (2005) Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays. *J Mol Histol.* 36:1-14.

Moretó M, Cristià E, Pérez-Bosque A, Afzal-Ahmed I, Amat C, Naftalin RJ. (2005) Aldosterone reduces crypt colon permeability during low-sodium adaptation. *J Membrane Biol.* 206:43-51.

Moulin V. (1995) Growth factors in skin wound healing. *Eur J Cell Biol.* 68:1-7.

Mukherjee TM, Swift JG, Henderson DW. (1988) Freeze-fracture study of intercellular junctions in benign and malignant mesothelial cells in effusions and a comparison with those seen in pleural mesotheliomas (solid tumour). *J Submicrosc Cytol Pathol.* 20:195-208.

Musch MW, Bookstein C, Xie Y, Sellin JH, Chang EB. (2001) SCFA increase intestinal Na absorption by induction of NHE3 in rat colon and human intestinal C2/bbe cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 280:G687-G693.

N

Naftalin RJ, Pedley K. (1999) Regional crypt function in rat large intestine in relation to fluid absorption and growth of the pericryptal sheath. *J Physiol.* 514:211-227.

Naftalin RJ, Zammit PS, Pedley KC. (1999) Regional differences in rat large intestinal crypt function in relation to dehydrating capacity in vivo. *J Physiol.* 514:201-210.

Naftalin RJ. (2004) Alterations in colonic barrier function caused by a low sodium diet or ionizing radiation. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 23:79-97.

Nagai Y, Miyata K, Sun GP, Rahman M, Kimura S, Miyatake A, Kiyomoto H, Kohno M, Abe Y, Yoshizumi M, Nishiyama A. (2005) Aldosterone stimulates collagen gene expression and synthesis via activation of ERK1/2 in rat renal fibroblasts. *Hypertension.* 46:1039-1045.

Nakamura Y, Haneda T, Osaki J, Miyata S, Kikuchi K. (2000) Hypertrophic growth of cultured neonatal rat heart cells mediated by vasopressin V(1A) receptor. *Eur J Pharmacol.* 391:39-48.

Nakamura T, Kataoka K, Fukuda M, Nako H, Tokutomi Y, Dong YF, Ichijo H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. (2009) Critical role of apoptosis signal-regulating kinase 1 in aldosterone/salt-induced cardiac inflammation and fibrosis. *Hypertension.* 54:544-551.

Nakano S, Kobayashi N, Yoshida K, Ohno T, Matsuoka H. (2005) Cardioprotective mechanisms of spironolactone associated with the angiotensin-converting enzyme/epidermal growth factor

receptor/extracellular signal-regulated kinases, NAD(P)H oxidase/lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1, and rho-kinase pathways in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertens Res.* 28:925-936.

Náray-Fejes-Tóth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Tóth G. (1999) Sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na⁺ channels. *J Biol Chem.* 274:16973-16978.

Natarajan A, Wagner B, Sibilica M. (2007) The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104:17081-17086.

Neves MF, Amiri F, Viridis A, Diep QN, Schiffrin EL. (2005) Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hypertrophy. *Can J Physiol Pharmacol.* 83:999-1006.

Nicco C, Wittner M, DiStefano A, Jounier S, Bankir L, Bouby N. (2001) Chronic exposure to vasopressin upregulates ENaC and sodium transport in the rat renal collecting duct and lung. *Hypertension.* 38:1143-1149.

Nielsen S, Chou CL, Marples D, Christensen EI, Kishore BK, Knepper MA. (1995) Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:1013-1017.

Nielsen S, Kwon TH, Christensen BM, Promeneur D, Frøkiaer J, Marples D. (1999) Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *J Am Soc Nephrol.* 10:647-663.

Nielsen J, Kwon T-H, Praetorius J, Frøkiær J. (2006) Aldosterone increases urine production and decreases apical APQ2 expression in rats with diabetes mellitus. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290:F438-F449.

Nieset JE, Redfield AR, Jin F, Knudsen KA, Johnson KR, Wheelock MJ. (1997) Characterization of the interactions of α -catenin with α -actinin and β -catenin/plakoglobin. *J Cell Sci.* 110:1013-1022.

Nishimura T, Takeichi M. (2009) Remodeling of the adherens junctions during morphogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 89:33-54.

Nishiyama A, Yao L, Nagai Y, Miyata K, Yoshizumi M, Kagami S, Kondo S, Kiyomoto H, Shokoji T, Kimura S, Kohno M, Abe Y. (2004) Possible contributions of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase to renal injury in aldosterone/salt-induced hypertensive rats. *Hypertension*. 43:841-848.

Nørregaard R, Uhrenholt TR, Bistrup C, Skøtt O, Jensen BL. (2003) Stimulation of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat colon but not in kidney by low dietary NaCl intake. *Am J Physiol Renal Physiol*. 285:F348-F358.

O

Oberleithner H. (2004) Unorthodox sites and modes of aldosterone action. *News Physiol Sci*. 19:51-54.

Oberleithner H. (2007) Is the vascular endothelium under the control of aldosterone? Facts and hypothesis. *Pflugers Arch*. 454:187-193.

O'Donnell ME, Duong V, Suvatne J, Foroutan S, Johnson DM. (2005) Arginine vasopressin stimulation of cerebral microvascular endothelial cell Na-K-Cl cotransporter activity is V1 receptor and [Ca] dependent. *Am J Physiol Cell Physiol*. 289:C283-C292.

O'Neil RG, Hayhurst RA. (1985) Sodium-dependent modulation of the renal Na-K-ATPase: influence of mineralocorticoids on the cortical collecting duct. *J Membr Biol*. 85:169-179.

Oseini AM, Roberts LR. (2009) PDGFRalpha: a new therapeutic target in the treatment of hepatocellular carcinoma? *Expert Opin Ther Targets*. 13:443-454.

Otani H, Otsuka F, Inagaki K, Takeda M, Miyoshi T, Suzuki J, Mukai T, Ogura T, Makino H. (2007) Antagonistic effects of bone morphogenetic protein-4 and -7 on renal mesangial cell proliferation induced by aldosterone through MAPK activation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 292:F1513-F1525.

P

Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. (2000) Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodelling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:931-936.

Pascal RR, Kaye GI, Lane N. (1968) Colonic pericryptal fibroblast sheath: replication, migration, and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. I. Autoradiographic studies of normal rabbit colon. *Gastroenterology*. 54:835-851.

Pearce D, Bhargava A, Cole TJ. (2003) Aldosterone: its receptor, target genes, and actions. *Vitam Horm*. 66:29-76.

Persson PB (2003). Renin: origin, secretion and synthesis. *J Physiol*. 552:667-671.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay M, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell*. 47:323-330.

Pippal JB, Fuller PJ. (2008) Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol*. 41:405-413.

Potten CS, Loeffler M. (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 110:1001-1020.

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. (1999) Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol*. 277:C183-C201.

Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC. (2005) Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 289:G2-G7.

Powell DW, Pinchuk IV, Saada JI, Chen X, Mifflin RC. (2011) Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol*. 73:213-237.

Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT, Collins JE. (2005) Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest*. 85:1139-1162.

Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, Ullrich A. (1999) EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*. 402:884-888.

Q

Quante M, Wang TC. (2009) Stem cells in gastroenterology and hepatology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 6:724-737.

R

Rabinstein AA. (2006) Vasopressin antagonism: potential impact on neurologic disease. *Clin Neuropharmacol*. 29:87-93.

Raines EW. (2004) PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 15:237-254.

Rickard AJ, Fuller PJ. (2011) Mineralocorticoid and epidermal growth factor receptors: partners in vivo. *Hypertension*. 57:144-145.

Robert V, Silvestre JS, Charlemagne D, Sabri A, Trouvé P, Wassef M, Swynghedauw B, Delcayre C. (1995) Biological determinants of aldosterone-induced cardiac fibrosis in rats. *Hypertension*. 26:971-978.

Rocha R, Rudolph AE, Friedrich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EA, McMahon EG, Delyani JA. (2002) Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 283:H1802-H1810.

Rosenbloom J, Castro SV, Jimenez SA. (2010) Narrative review: fibrotic diseases: cellular and molecular mechanisms and novel therapies. *Ann Intern Med*. 152:159-166.

Rossi NF. (1993) Effect of endothelin-3 on vasopressin release in vitro and water excretion in vivo in Long-Evans rats. *J Physiol*. 461:501-511.

Rubin DC. *Textbook of gastroenterology*. (1999) Ed. Yamada T, Alpers DH, Laine L, Owyang C, Powell DM. pp:1561-1571.

S

Saito T, Ishikawa SE, Sasaki S, Fujita N, Fushimi K, Okada K, Takeuchi K, Sakamoto A, Ookawara S, Kaneko T, Marumo F. (1997) Alteration in water channel AQP-2 by removal of AVP stimulation in collecting duct cells of dehydrated rats. *Am J Physiol.* 272:F183-F191.

Sanders KM. (1996) A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 111:492-515.

Sanders KM, Ordög T, Ward SM. (2002) Physiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: from bench to bedside. IV. Genetic and animal models of GI motility disorders caused by loss of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 282:G747-G756.

Sanders KM, Koh SD, Ward SM. (2006) Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol.* 68:307-343.

Sandle GI, Hayslett JP, Binder HJ. (1984) Effect of chronic hyperaldosteronism on the electrophysiology of rat distal colon. *Pflugers Arch.* 401:22-26.

Sands JM, Nonoguchi H, Knepper MA. (1987) Vasopressin effects on urea and H₂O transport in inner medullary collecting duct subsegments. *Am J Physiol.* 253:F823-F832.

Sanghi P, Uretsky BF, Schwarz ER. (2005) Vasopressin antagonism: a future treatment option in heart failure. *Eur Heart J.* 26:538-543.

Sawada N, Murata M, Kikuchi K, Osanai M, Tobioka H, Kojima T, Chiba H. (2003) Tight junctions and human diseases. *Med Electron Microsc.* 36:147-156.

Schafer JA, Hawk CT. (1992) Regulation of Na⁺ channels in the cortical collecting duct by AVP and mineralocorticoids. *Kidney Int.* 41:255-268.

Schlessinger J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 103:211-225.

Schrier RW, Berl T, Anderson RJ. (1979) Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release. *Am J Physiol.* 236:F321-F332.

Seckl JR, Chapman KE. (1997) The 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase system, a determinant of glucocorticoid and mineralocorticoid action-medical and physiological aspects of the 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase system. *Eur J Biochem.* 249:361-364.

Share L. (1988) Role of vasopressin in cardiovascular regulation. *Physiol Rev.* 68:1248-1284.

Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawachi H, Fujita T. (2007) Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension.* 49:355-364.

Shigaev A, Asher C, Latter H, Garty H, Reuveny E. (2000) Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na⁺ channel. *Am J Physiol Renal Physiol.* 278:F613-F619.

Sibilia M, Wagner EF. (1995) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science.* 269:234-238.

Simmons JG, Pucilowska JB, Lund PK. (1999) Autocrine and paracrine actions of intestinal fibroblast-derived insulin-like growth factors. *Am J Physiol.* 276:G817-G827

Simmons JG, Pucilowska JB, Keku TO, Lund PK. (2002) IGF-I and TGF-1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283:G809-G818.

Simpson SA, Tait JF, Wettstein A, Neher R, Von Euw J, Schindler O, Reichstein T. (1954) Constitution of aldosterone, a new mineralocorticoid. *Experientia.* 10:132-133.

Sinphitukkul K, Eiam-Ong S, Manotham K, Eiam-Ong S. (2011) Nongenomic effects of aldosterone on renal protein expressions of pEGFR and pERK1/2 in rat kidney. *Am J Nephrol.* 33:111-120.

Slight SH, Ganjam VK, Gómez-Sánchez CE, Zhou MY, Weber KT. (1996) High affinity NAD(+)-dependent 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 28:781-787.

Smith CL, Tallquist MD. (2011) PDGF function in diverse neural crest cell populations. *Cell Adh Migr.* 4:561-566.

Snyder PM, Olson DR, Thomas BC. (2002) Serum and glucocorticoid-regulated kinase modulates Nedd4-2-mediated inhibition of the epithelial Na⁺ channel. *J Biol Chem.* 277:5-8.

Stacey DW. (2003) Cyclin D1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. *Curr Opin Cell Biol.* 15:158-163.

Stas S, Whaley-Connell A, Habibi J, Appesh L, Hayden MR, Karuparthi PR, Qazi M, Morris EM, Cooper SA, Link CD, Stump C, Hay M, Ferrario C, Sowers JR. (2007) Mineralocorticoid receptor blockade attenuates chronic overexpression of the renin-angiotensin-aldosterone system stimulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and cardiac remodeling. *Endocrinology.* 148:3773-3780.

Steed E, Balda MS, Matter K. (2010) Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol.* 20:142-149.

Stokes JB, Sigmund RD. (1998) Regulation of rENaC mRNA by dietary NaCl and steroids: organ, tissue, and steroid heterogeneity. *Am J Physiol.* 274:C1699-C1707.

Struthers A, Krum H, Williams GH. (2008) A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone. *Clin Cardiol.* 31:153-158.

Suga H, Nakajima K, Shu E, Kanno Y, Hirade K, Ishisaki A, Matsuno H, Tanabe K, Takai S, Akamatsu S, Kato K, Oiso Y, Kozawa O. (2005) Possible involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal pathway in vasopressin-induced HSP27 phosphorylation in aortic smooth muscle A10 cells. *Arch Biochem Biophys.* 438:137-145.

Sugimoto T, Saito M, Mochizuki S, Watanabe Y, Hashimoto S, Kawashima H. (1994) Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the human V1b vasopressin receptor. *J Biol Chem.* 269:27088-27092.

Sun Y, Zhang J, Zhang JQ, Ramires FJ. (2000) Local angiotensin II and transforming growth factor-beta1 in renal fibrosis of rats. *Hypertension.* 35:1078-1084.

Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. (2002) Aldosterone-induced inflammation in the rat heart: role of oxidative stress. *Am J Pathol.* 161:1773-1781.

Suzuki A, Sekiya S, Gunshima E, Fujii S, Taniguchi H. (2010) EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. *Lab Invest.* 90:1425-1436.

T

Tahara A, Tomura Y, Wada K, Kusayama T, Tsukada J, Ishii N, Yatsu T, Uchida W, Tanaka A. (1998) Effect of YM087, a potent nonpeptide vasopressin antagonist, on vasopressin-induced protein synthesis in neonatal rat cardiomyocyte. *Cardiovasc Res.* 38:198-205.

Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, Suzuki T, Yatsu T, Shibasaki M. (2007) Effect of YM218, a nonpeptide vasopressin V(1A) receptor-selective antagonist, on rat mesangial cell hyperplasia and hypertrophy. *Vascul Pharmacol.* 46:463-469.

Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, Suzuki T, Yatsu T, Shibasaki M. (2008a) Vasopressin stimulates the production of extracellular matrix by cultured rat mesangial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35:586-593.

Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, Yatsu T, Shibasaki M. (2008b) Vasopressin increases type IV collagen production through the induction of transforming growth factor-beta secretion in rat mesangial cells. *Pharmacol Res.* 57:142-150.

Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, Yatsu T, Shibasaki M. (2011) Vasopressin induces human mesangial cell growth via induction of vascular endothelial growth factor secretion. *Neuropeptides.* 45:105-111.

Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Iki K, Hatakeyama H, Blair IA, Hsieh FY, Takeda R. (1995) Production of aldosterone in isolated rat blood vessels. *Hypertension.* 25:170-173.

Takeda Y, Miyamori I, Yoneda T, Hatakeyama H, Inaba S, Furukawa K, Mabuchi H, Takeda R. (1996) Regulation of aldosterone synthase in human vascular endothelial cells by angiotensin II and adrenocorticotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* 81:2797-2800.

Teiwes J, Toto RD. (2007) Epithelial sodium channel inhibition in cardiovascular disease. A potential role for amiloride. *Am J Hypertens.* 20:109-117.

Terada Y, Kobayashi T, Kuwana H, Tanaka H, Inoshita S, Kuwahara M, Sasaki S. (2005) Aldosterone stimulates proliferation of mesangial cells by activating mitogen-activated protein kinase 1/2, cyclin D1, and cyclin A. *J Am Soc Nephrol.* 16:2296-2305.

- Thiagarajah JR, Gourmelon P, Griffiths NM, Lebrun F, Naftalin RJ, Pedley KC. (2000) Radiation induced cytochrome c release causes loss of rat colonic fluid absorption by damage to crypts and pericryptal myofibroblasts. *Gut*. 47:675-684.
- Thiagarajah JR, Griffiths NM, Pedley KC, Naftalin RJ. (2002) Evidence for modulation of pericryptal sheath myofibroblasts in rat descending colon by transforming growth factor beta and angiotensin II. *BMC Gastroenterol*. 2:4-15.
- Thomas WG, Brandenburger Y, Autelitano DJ, Pham T, Qian H, Hannan RD. (2002) Adenoviral-directed expression of the type 1A angiotensin receptor promotes cardiomyocyte hypertrophy via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Circ Res*. 90:135-142.
- Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD. (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev*. 45:205-251.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76:4350-4354.
- Tsugita M, Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T, Shinahara M, Taniguchi Y, Kambayashi M, Nishiyama A, Gomez-Sanchez CE, Terada Y, Hashimoto K. (2009) Glucocorticoid receptor plays an indispensable role in mineralocorticoid receptor-dependent transcription in GR-deficient BE(2)C and T84 cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 302:18-25.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M. (2002) The tight junction. A: Cell adhesion. Beckerle MC, Ed. Oxford University Press, New York. pp: 369-395.
- Trojanowska M, LeRoy EC, Eckes B, Krieg T. (1998) Pathogenesis of fibrosis: type 1 collagen and the skin. *J Mol Med*. 76:266-274.
- Tung WH, Lee IT, Hsieh HL, Yang CM. (2010) EV71 induces COX-2 expression via c-Src/PDGFR/PI3K/Akt/p42/p44 MAPK/AP-1 and NF-kappaB in rat brain astrocytes. *J Cell Physiol*. 224:376-386.
- Turnamian SG, Binder HJ. (1988) Electrolyte transport in distal colon of sodium-depleted rats: effect of sodium repletion. *Am J Physiol*. 255:G329-G338.

U

Ussing HH, Zerahn K. (1951) Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand.* 23:110-127.

V

Van Roeyen CR, Eitner F, Martinkus S, Thielges SR, Ostendorf T, Bokemeyer D, Lüscher B, Lüscher-Firzlauff JM, Floege J, Mertens PR. (2005) Y-box protein 1 mediates PDGF-B effects in mesangioproliferative glomerular disease. *J Am Soc Nephrol.* 16:2985-2996.

Verbalis JG. (2003) Disorders of body water homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 17:471-503.

Voisin L, Foisy S, Giasson E, Lambert C, Moreau P, Meloche S. (2002) EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol -Cell Physiol.* 283:C446-C455.

W

Wagner B, Natarajan A, Grünaug S, Kroismayr R, Wagner EF, Sibia M. (2006) Neuronal survival depends on EGFR signaling in cortical but not midbrain astrocytes. *EMBO J.* 25:752-762.

Wang KS, Ma T, Filiz F, Verkman AS, Bastidas JA. (2000) Colon water transport in transgenic mice lacking aquaporin-4 water channels. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279:G463-G470.

Watabe-Uchida M, Uchida N, Imamura Y, Nagafuchi A, Fujimoto K, Uemura T, Vermeulen S, Van Roy F, Adamson ED, Takeichi M. (1998) α -Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol.* 142:847-857.

Weber KT. (2003) Aldosteronism revisited: perspectives on less well-recognized actions of aldosterone. *J Lab Clin Med.* 142:71-82.

Wheatley-Price P, Shepherd FA. (2008) Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of lung cancer: reality and hopes. *Curr Opin Oncol.* 20:162-175.

White PC. (1994) Disorders of aldosterone biosynthesis and action. *N Engl J Med.* 331:250-258.

Wickert L, Abiaka M, Bolkenius U, Gressner AM. (2004) Corticosteroids stimulate selectively transforming growth factor (TGF)-beta receptor type III expression in transdifferentiating hepatic stellate cells. *J Hepatol.* 40:69-76.

Williams GH. (2005) Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. *Heart Fail Rev.* 10:7-13.

Wong RW, Guillaud L. (2004) The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15:147-156.

X

Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. (2003) Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood.* 102:972-980..

Y

Yamamura Y, Nakamura S, Itoh S, Hirano T, Onogawa T, Yamashita T, Yamada Y, Tsujimae K, Aoyama M, Kotosai K, Ogawa H, Yamashita H, Kondo K, Tominaga M, Tsujimoto G, Mori T. (1998) OPC-41061, a highly potent human vasopressin V2-receptor antagonist: pharmacological profile and aquaretic effect by single and multiple oral dosing in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 287:860-867.

Yamamoto A, Keil LC, Reid IA. (1991) Activation of renal mechanoreceptors increases vasopressin release in rabbits. *Am J Physiol.* 261:R484-R490.

Yang XD, Zhao LY, Zheng QS, Li X. (2003) Effects of arginine vasopressin on growth of rat cardiac fibroblasts: role of V1 receptor. *J Cardiovasc Pharmacol.* 42:132-135.

Yan-Ping H, Lian-you Z, Qiang-sun Z, Shao-wei L, Xiao-yan Z, Xiao-long L, Xiao-lin N, Xia L. (2008) Mitogenic effect of arginine vasopressin on adult rat cardiac fibroblast: involvement of PKC-erk1/2 pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* 52:72-81.

Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J. (1994) Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest.* 93:2578-2583.

Young GP, Hu Y, Le Leu RK, Nyskohus L. (2005) Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment gene interactions. *Mol Nutr Food Res.* 49:571-584.

Yuan Y, Zhang A, Huang S, Ding G, Chen R. (2011) A PPARgamma agonist inhibits aldosterone-induced mesangial cell proliferation by blocking ROS-dependent EGFR intracellular signaling. *Am J Physiol Renal Physiol.* 300:F393-F402.

Z

Zeissig S, Fromm A, Mankertz J, Weiske J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. (2007) Butyrate induces intestinal sodium absorption via Sp3-mediated transcriptional up-regulation of epithelial sodium channels. *Gastroenterology.* 132:236-248.

Zhang A, Jia Z, Guo X, Yang T. (2007) Aldosterone induces epithelial-mesenchymal transition via ROS of mitochondrial origin. *Am J Physiol Renal Physiol.* 293:F723-F731.

Zhang Y, Zheng L, Zhang J, Dai B, Wang N, Chen Y, He L. (2011) Antitumor activity of taspine by modulating the EGFR signaling pathway of Erk1/2 and Akt in vitro and in vivo. *Planta Med.* 77:1774-1781.

Zhao LY, Chen YQ, Tian JW, Wang SW, Peng YH, Yang XD, Xu L, Fan YH. (2003) Effects of chelerythrine on cell proliferation and p27 expression of cardiac fibroblasts modulated by arginine vasopressin. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 83:421-424.

Zwemer RL, Sullivan RC. (1934) Blood chemistry of adrenal insufficiency in cats. *Endocrinology.* 18:97-106.