



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Fisiologia
Facultat de Farmàcia

**ADAPTACIONS DEL CÒLON DE RATA
AL CONTINGUT EN SODI DE LA DIETA:
PAPER DEL SISTEMA
RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA
I DE LA VASOPRESSINA**

**ESTHER CRISTIÀ CIVIT
2006**

RESULTS AND DISCUSSION
RESULTATS I
DISCUSSIÓ

Les investigacions que s'han portat a terme han permès aprofundir en l'estudi de la regulació de les adaptacions funcionals i estructurals del còlon distal en resposta a canvis en la ingesta de sodi. Els objectius plantejats han permès identificar els mediadors responsables d'aquestes adaptacions. En aquest apartat hi ha un recull dels resultats exposats en els dos articles i en el manuscrit que s'adjunten i s'ofereix una discussió més global de tots ells.

Efectes del contingut en sodi de la dieta en la funció del còlon distal

En una primera fase s'han comprovat els efectes del contingut en la ingesta de sodi en la funció del còlon distal mitjançant un model animal d'activació del RAAS. En aquest model s'ha controlat l'aport de sodi dels animals mitjançant l'aigua de beguda. S'han utilitzat dues dietes, una amb baix contingut en sodi (LS; *low sodium*) i l'altra amb alt contingut en sodi (HS; *high sodium*), on la quantitat de sodi és 1000 cops superior a la dieta LS. L'objectiu és estudiar l'adaptació del còlon quan es disminueix el sodi de la dieta, per tant, s'han comparat animals adaptats a una dieta HS amb animals que han estat 3 dies amb una dieta LS.

Els resultats de les variables fisiològiques obtinguts en aquest model experimental es poden consultar en l'article 1 (Moretó *et al.*, 2005). La concentració d'aldosterona que s'obté en aquests grups experimentals està dins el rang d'experiments anteriors on s'ha descrit que en rates Wistar la concentració plasmàtica d'aldosterona és tres cops superior en rates HS que en rates LS, després de 10 dies de dieta (Abayasekara *et al.*, 1993; Naftalin *et al.*, 1999). En el nostre estudi, en 3 dies de dieta LS s'aconsegueix doblar la concentració plasmàtica d'aldosterona respecte la dieta HS. La concentració plasmàtica d'angiotensina II també és significativament més alta en el grup LS. La concentració plasmàtica

de sodi dels dos grups experimentals es manté en el rang considerat fisiològic, altament regulat entre 135 a 144 mEq/L pel RAAS. Pel que fa als ions en orina, en els animals alimentats amb dieta HS la concentració i la quantitat de sodi excretada és, naturalment, molt superior que en els animals amb dieta LS. Així doncs, es comprova la validesa de les dietes utilitzades en la posta a punt del model.

Per determinar les adaptacions del còlon distal en la permeabilitat epitelial i el transport de sodi s'ha estudiat l'expressió d'ENaC, l'acumulació de sodi en la zona pericriptal, la permeabilitat a macromolècules, l'estructura de les unions estretes i les variables elèctriques intestinals. En l'estudi de la beina de miofibroblasts de la zona pericriptal del còlon distal s'han determinat la densitat de les proteïnes que formen les unions adherents i les característiques estructurals de la zona pericriptal.

L'augment en l'absorció de sodi s'ha comprovat en observar que la transició d'una dieta HS a una dieta LS en el còlon de rata dóna lloc a l'activació del transport de Na⁺, com ho demostren l'augment en l'expressió de la subunitat γ -ENaC en els colonòcits, l'increment de la concentració de sodi a la zona pericriptal i l'augment de la diferència de potencial i de la intensitat de corrent de curt-circuit, que indiquen una activació del transport d'electròlits. En les variables elèctriques s'ha comprovat la implicació del canal ENaC amb l'amilorida, un inhibidor d'aquest canal, ja que aconsegueix revertir l'augment observat en aquestes variables. Resultats similars en les variables elèctriques i l'efecte del tractament amb amilorida s'han descrit en altres ocasions (Fromm i Hegel, 1978; Horster *et al.*, 1994). La inducció de l'expressió d'ENaC degut a una dieta LS ha estat descrit amb anterioritat tant en el còlon com en el ronyó (Asher *et al.*, 1996). El canal ENaC forma part dels mecanismes reguladors de que disposa l'organisme, augmentant l'absorció de sodi al còlon i la seva reabsorció al ronyó en situacions on la concentració plasmàtica de sodi es veu disminuïda. En els nostres estudis s'ha escollit la subunitat γ -

ENaC degut a que en el còlon l'aldosterona augmenta principalment la transcripció de les subunitats β i γ -ENaC mentre que la unitat α -ENaC està expressada de manera constitutiva (Snyder, 2005). L'acumulació de sodi en la zona pericriptal depèn de l'activitat ENaC, però també depèn de l'ATPasa Na^+/K^+ de la membrana basolateral, del retorn de Na^+ de l'espai pericriptal cap al lumen i de la seva sortida cap a l'espai intersticial.

En el còlon la xarxa pericriptal de miofibroblasts crea una barrera a la difusió que permet la creació d'un compartiment hipertònic que enlenteix el pas cap als capil·lars sanguinis i afavoreix l'absorció tant d'electròlits com d'aigua, creant la tensió de succió suficient per deshidratar les femtes en aquest segment intestinal (Naftalin *et al.*, 1999). En el grup LS, els resultats mostren una activació del creixement d'aquesta beina de miofibroblasts, amb un augment en l'expressió de α -SMA, proteïna que s'utilitza com a marcador de miofibroblasts (Jain *et al.*, 1998), d'OB-caderina, una de les molècules d'adhesió que uneixen els miofibroblasts entre si (Hinz *et al.*, 2004), i un increment en la deposició de col·lagen IV, un dels productes dels miofibroblasts (Mahida *et al.*, 1997). A més, també s'observa un increment de la densitat de l'ECA i dels receptors AT1 i TGF- β , tots ells elements implicats en la proliferació i creixement tissular (Weber i Brilla, 1991; Weber *et al.*, 1997). Aquests efectes de la dieta LS i del captopril sobre l' α -SMA, el col·lagen IV, l'ACE i els dos receptors, ja s'observen en els estudis de Thiagarajah i col·laboradors (2002). La diferència amb els nostres estudis radica en que en el seu estudi observen aquesta inducció en rates que s'han alimentat amb una dieta LS durant 10 dies. En el nostre cas, s'ha demostrat que aquesta inducció ja es produeix al cap de tan sols 3 dies de dieta LS. Aquests resultats posen de manifest que el creixement de la zona pericriptal durant l'adaptació a una dieta amb baix contingut en sodi és simultani a l'augment en el transport transepitelial de sodi, confirmant que la funció absortiva del còlon depèn tant de les cèl·lules luminals de la cripta com dels miofibroblasts.

La disminució de la permeabilitat de la paret

epitelial s'ha confirmat amb la comprovació que una dieta LS redueix la permeabilitat de la paret al dextrà, augmenta l'expressió de les unions estretes, concretament de la claudina 4, i incrementa la resistència elèctrica, que depèn de l'estructura de les unions intercel·lulars. Tot i que les unions estretes poden estar formades per tres elements, ocludines, claudines i per la molècula d'adhesió JAM, hi ha resultats que indiquen que la família de les claudines és suficient per formar aquestes unions estretes (Tsukita *et al.*, 2001). És per aquest motiu que es va decidir escollir un membre de la família de les claudines, la claudina 4, per estudiar aquesta estructura ja que ha estat identificada en còlon distal de rata (Tsukita *et al.*, 2001). La inducció que observem en el nostres estudis en l'expressió de claudina 4 reafirma la disminució en la permeabilitat al sodi que observen Van Itallie i col·laboradors (2001) al sobreexpressar aquesta proteïna, ja que amb l'increment de claudina 4 augmenta la densitat de l'estructura de les unions estretes, dificultant-se així el moviment dels ions a través de les unions intercel·lulars. L'increment en la densitat de les unions estretes concorda amb l'augment en la resistència de l'epiteli que observem en els animals amb dieta LS. La prova funcional de la disminució de la permeabilitat es realitza amb l'estudi de la permeabilitat al dextrà, que es relaciona tant amb el pas paracel·lular a través de les unions estretes com amb els miofibroblasts de la zona pericriptal. Thiagarajah i col·laboradors (2001b) van demostrar que la beina que conformen els miofibroblasts intestinals té un paper en el transport de macromolècules, comprovant l'acumulació de dextrà en la zona pericriptal de les criptes de còlon distal de rata i de ratolí. A més, s'ha comprovat que en el cec la permeabilitat al dextrà és superior que en el còlon (Thiagarajah *et al.*, 2001a), fet que es relaciona amb l'absència dels miofibroblasts pericriptals i amb la impossibilitat d'absorbir fluids en contra de gran resistència hidràulica d'aquesta zona intestinal (Naftalin i Pedley, 1999). La disminució de la permeabilitat, doncs, és coherent amb el reforç de l'estructura en les unions estretes, l'augment

en la resistència transepitelial i la proliferació de la zona pericriptal observats en el cas de la dieta LS, demostrant que l'activació del RAAS dificulta el retorn dels ions cap al lumen un cop absorbits.

La implicació del RAAS en totes aquestes adaptacions del còlon a una dieta LS respecte a una dieta HS s'ha comprovat mitjançant l'ús d'inhibidors d'aquest sistema en el grup LS. L'administració de captopril, un inhibidor de l'ECA, de losartan, un inhibidor del receptor d'angiotensina de tipus 1, i d'espironolactona, un antagonista del receptor mineralcorticoide, va revertir tots els efectes observats deguts a una dieta LS, demostrant la implicació de l'angiotensina II i l'aldosterona en aquestes adaptacions.

La posta a punt del model experimental d'activació del RAAS en rates, doncs, ha permès obtenir un model que reproduceix les adaptació del còlon distal quan es produeix una disminució del contingut en sodi de la dieta. Aquestes adaptacions consisteixen en l'augment en l'absorció de sodi, una disminució de la permeabilitat epitelial de les criptes, que impedeix el retorn de Na^+ de l'espai pericriptal cap al lumen, i l'activació del creixement miofibroblàstic a la zona pericriptal. Tot i que s'ha comprovat la implicació del RAAS en aquestes adaptacions, les accions concretes de l'aldosterona i l'angiotensina II en aquests efectes no es poden separar. L'aldosterona ha estat considerada com l'hormona clau que regula l'homeòstasi del sodi però ambdues hormones han estat implicades en el desenvolupament de fibrosi al cor i al ronyó, per tant, el seu possible paper en el creixement miofibroblàstic al còlon restava per establir.

Efectes de la deshidratació en la funció del còlon distal

En aquest model animal d'activació del RAAS s'ha comprovat l'efecte del grau de deshidratació en les funcions del còlon distal. Els animals alimentats amb dietes HS i LS s'han sotmès a 24 h de restricció d'aigua i s'han estudiat les mateixes variables que en l'estudi de l'efecte del

contingut en sodi de la dieta. Els resultats es poden consultar en el manuscrit que s'adjunta. L'eficàcia del tractament de deshidratació ve confirmada per les variables fisiològiques. Els animals deshidratats, independentment de la dieta, presenten els efectes típics de la deshidratació descrits a la bibliografia (Desai *et al.*, 2005; Gottlieb *et al.*, 2006), una excreció menor d'orina amb una major osmolalitat i un augment en l'hematòcrit i en l'osmolalitat del plasma. L'osmolalitat del plasma està altament regulada en el rang de 280 a 292 mOsm/kg d'aigua (Robertson *et al.*, 1982), per tant, l'estímul osmòtic de l'augment de l'osmolalitat plasmàtica per sobre d'aquest rang és el causant de l'activació de la secreció de vasopressina, com s'observa en tots els nostres animals deshidratats. La deshidratació, en canvi, no afecta la síntesi d'aldosterona, com s'observa en el grup amb dieta HS i amb 24 h de restricció d'aigua; aquest fet ha estat descrit en altres estudis (Schneider *et al.*, 1985). L'augment en la concentració plasmàtica d'aldosterona en el grup LS és deguda a l'efecte de la dieta. Per tant, el grup LS deshidratat té concentracions plasmàtiques elevades tant d'aldosterona com de vasopressina. En aquest cas, per poder descartar l'efecte de l'aldosterona, s'ha administrat captopril als animals per evitar-ne la seva síntesi. A alguns animals, a més, se'ls ha administrat un antagonista específic per a cadascun dels receptors de vasopressina, per tal de comprovar la possible participació d'aquests receptors en cadascun dels efectes observats. Ambdós antagonistes reverteixen els efectes de la vasopressina en l'excreció i l'osmolalitat de l'orina.

Els efectes de la deshidratació en el còlon distal consisteixen en un augment de l'acumulació de sodi a l'espai pericriptal i una disminució de la permeabilitat al dextrà, i aquests efectes són independents del contingut en sodi de la dieta. Aquests efectes s'observen tant en animals amb concentracions plasmàtiques altes d'aldosterona i vasopressina, com en el cas de concentracions altes tan sols de vasopressina. La deshidratació, en canvi, no activa l'expressió d'ENaC. Respecte a l'efecte en el creixement miofibroblàstic, mitjançant la deshidratació hi ha un cert augment de l'expressió de α -SMA, i tot i que en tots els grups és significatiu respecte el grup control HS, aquest increment és superior quan hi ha presència

d'aldosterona. Aquests tres efectes es veuen revertits amb l'administració d'ambdós antagonistes, demostrant la implicació de la vasopressina.

Donat que la vasopressina està implicada en l'homeòstasi hídrica, s'ha estudiat l'efecte de la deshidratació en el moviment d'aigua al còlon distal a través de les aquaporines, canals específics pel pas de l'aigua. Es va triar l'AQP-2 ja que està regulada per vasopressina (Fushimi *et al.*, 1993) i s'ha descrit la seva presència en el còlon distal de rata (Gallardo *et al.*, 2001; Mobasher *et al.*, 2005). Els nostres resultats han confirmat que la deshidratació incrementa l'expressió d'aquesta aquaporina en el còlon distal, a través dels receptors V_2 , ja que tan sols l'administració de l'antagonista d'aquest receptor reverteix l'efecte. L'aldosterona, en canvi, no té cap efecte sobre l'expressió d'AQP-2 i, per tant, en el transport d'aigua, com es demostra en els grups d'animals que tan sols tenen concentracions plasmàtiques altes d'aldosterona. Gallardo i col·laboradors (2001) van demostrar que la restricció d'aigua en la rata augmenta l'expressió d'AQP-2 en la membrana apical de les cèl·lules absortives de la superfície mucosa, però no és present en les cèl·lules de l'interior de la cripta. La presència d'AQP-2 en les cèl·lules del còlon distal tal i com passa en el ronyó semblava lògica. Ambdós teixits participen en l'homeòstasi hídrica i, de fet, les cèl·lules principals de la nefrona distal i les cèl·lules absortives del còlon distal comparteixen similituds a nivell cel·lular. Així, en la membrana basolateral s'ha descrit la presència d'altres membres de la família d'aquaporines, l'AQP-3 i l'AQP-4, tant en el ronyó (Knepper, 1997) com en el còlon (Frigeri *et al.*, 1995; Ramírez-Lorca *et al.*, 1999). A més, ambdós tipus cel·lulars expressen les tres unitats del canal ENaC a la membrana apical (Duc *et al.*, 1994) i l'ATPasa Na^+/K^+ a la membrana basolateral (Verrey, 1995).

Per tant, els efectes de la deshidratació en el còlon distal de rata consisteixen en una disminució de la permeabilitat epitelial, una activació del creixement miofibroblàstic de la zona pericriptal i un augment del moviment d'aigua a la membrana

apical dels colonòcits.

Paper de l'angiotensina II, l'aldosterona i la vasopressina

Un cop descrits i confirmats els canvis funcionals i estructurals en el còlon distal deguts a l'adaptació a una dieta LS, s'ha estudiat el paper concret de tres hormones implicades en l'homeòstasi hídrica i electrolítica, l'angiotensina II, l'aldosterona i la vasopressina. La metodologia ha consistit en partir del model experimental d'activació del RAAS, establint grups experimentals on tan sols hi haguessin concentracions plasmàtiques elevades de cada una de les tres hormones. Els resultats s'han verificat mitjançant l'ús de tractaments inhibidors o antagonistes. En el cas de les hormones del RAAS, als animals se'ls ha realitzat una operació d'adrenalectomia i se'ls han administrat de manera exògena ambdues hormones. En el cas de la vasopressina, als animals se'ls ha administrat de manera exògena l'hormona, per estudiar si és la responsable dels efectes que s'observen mitjançant la deshidratació.

Els resultats obtinguts a partir del model experimental per augmentar les concentracions plasmàtiques d'aldosterona i angiotensina II es detallen en els dos primers articles (Moretó *et al.*, 2005; Cristià *et al.*, 2005). L'operació d'adrenalectomia, que consisteix en eliminar les glàndules adrenals, aconsegueix disminuir la concentració plasmàtica d'aldosterona a nivells inapreciables atès que les glàndules adrenals són el lloc principal de síntesi de l'aldosterona. Les dosis administrades d'aldosterona i angiotensina II mitjançant l'ús de bombes osmòtiques d'alliberació controlada, van permetre mantenir unes concentracions plasmàtiques elevades d'ambdues hormones.

El fet d'administrar una dosi alta d'aldosterona en el grup HS, que fisiològicament tindria una concentració molt baixa d'aquesta hormona, altera les variables fisiològiques de manera similar al cas de la síndrome de Conn, on l'excès d'aldosterona plasmàtica dóna lloc a una

deplecció intensa de K^+ que provoca poliúria i polidípsia (Fardella i Mosso, 2002). En efecte, aquest grup experimental presenta un increment substancial de la ingesta d'aigua i, consegüentment, de l'excreció d'orina, i una concentració plasmàtica de K^+ molt baixa en comparació amb els controls. En el grup amb dieta LS i administració d'aldosterona, tot i que pel fet de la dieta s'esperés una activació del RAAS i, per tant, un augment en la concentració plasmàtica d'angiotensina II, els resultats ens mostren que la concentració d'aquesta hormona no es veu alterada. Una possible explicació seria que en situacions on l'increment de la secreció d'aldosterona podria ser inapropiada fisiològicament, com en el cas de suplementació amb mineralcorticoids, el sistema renina angiotensina no s'activa (Muller, 1998). Pel que fa a l'increment de pes dels animals, el grup d'animals adrenalectomitzats amb dieta LS i sense suplementació hormonal presenten una reducció del 12% del pes corporal durant els tres dies de gàbia metabòlica, que es correlaciona amb el baix consum de pinso. Aquests efectes eren els esperats, ja que és el grup amb les condicions menys favorables per sobreviure, degut a que no disposa d'aldosterona per compensar la poca quantitat de sodi ingerida. A més, la manca d'aldosterona podria provocar una menor ingesta d'aliment, tal com s'ha descrit en babuïns (Shade *et al.*, 2002). No obstant això, el mateix grup experimental però amb dieta HS tampoc té aldosterona i, en canvi, els animals no presenten pèrdues de pes. Per tant, un altre factor que podria actuar com a responsable seria l'angiotensina II, ja que s'ha descrit que té efectes anorexígens en rata (Porter i Potratz, 2004) i està molt augmentada en aquest grup.

Els resultats de transport de Na^+ , permeabilitat epitelial i de proliferació de la beina miofibroblàstica han demostrat que l'aldosterona i la vasopressina estan implicades en les adaptacions del còlon distal a la ingesta de sodi de la dieta. Els efectes de l'aldosterona impliquen l'increment de l'expressió de γ -ENaC, l'acumulació de sodi a la zona pericriptal, la disminució de la permeabilitat de la paret al dextrà i l'augment

tant de la diferència de potencial i la intensitat de curt circuit com de la resistència elèctrica. Els estudis amb vasopressina demostren que també augmenta l'acumulació de sodi a la zona pericriptal i disminueix la permeabilitat al dextrà, però no té cap efecte en l'expressió d'ENaC. A més, la vasopressina incrementa l'expressió d'AQP-2 en el còlon distal. En canvi, l'angiotensina II no sembla intervenir directament en les adaptacions del còlon distal a una dieta LS ja que, per si sola, no aconsegueix reproduir-les.

Els resultats obtinguts en l'estudi del paper de les tres hormones en l'expressió d'ENaC concorden amb la bibliografia. La regulació d'ENaC en el còlon distal per part de l'aldosterona és ben coneguda (Asher *et al.*, 1996). Aquesta acció és predominantment genòmica però també està regulada post transcripcionalment per proteases com la prostasina (Narikiyo *et al.*, 2002) i la sgk (McCormick *et al.*, 2004). No hi ha antecedents que l'angiotensina II tingui un paper directe estimulant l'expressió d'ENaC. En canvi, la vasopressina estimula la síntesi d'ENaC en el ronyó (Machida *et al.*, 2003), però no s'ha aconseguit demostrar en el còlon (Nicco *et al.*, 2001). De fet, la regulació d'ENaC es caracteritza per ser heterogènia segons l'òrgan, el teixit i l'hormona (Stokes i Sigmund, 1998). Per tant, aquests resultats estan d'acord amb l'acció clàssica de l'aldosterona, que augmenta el transport de Na^+ al còlon distal i al ronyó mitjançant l'augment de l'activitat d'ENaC i de l'ATPasa Na^+/K^+ .

La regulació del moviment d'aigua és una qüestió que encara presenta moltes incògnites. En els nostres estudis en el còlon distal la implicació de la vasopressina és clara ja que s'ha vist un augment en l'expressió d'AQP-2 en el còlon distal de rata en el cas tant d'animals deshidratats durant 24h com en animals tractats amb vasopressina exògena. En el ronyó també s'ha demostrat que tant la deshidratació (Nielsen *et al.*, 1995; Kishore *et al.*, 2005) com l'administració de vasopressina (Kishore *et al.*, 1996; Terris *et al.*, 1996) augmenten l'expressió d'AQP-2. La vasopressina regula aquesta aquaporina a través dels receptors V_2 mitjançant dos mecanismes: un efecte agut que controla el tràfic intracel·lular de l'AQP-2 i, en segon lloc, un efecte transcripcional que s'observa a les 24h de la deshidratació. La major

novetat dels nostres resultats radica en la demostració de la implicació dels receptors V_2 de vasopressina en el còlon, ja que un antagonista selectiu per aquests receptors, el Tolvaptan, reverteix l'acció de la vasopressina en l'expressió d'aquesta aquaporina mentre que un antagonista V_1 no té cap efecte. El Tolvaptan és un antagonista selectiu pels receptors V_2 , no peptídic i, per tant, amb bona disponibilitat oral. La seva administració oral a rates incrementa el volum d'orina, disminueix l'osmolaritat de manera dosi-depenent i, a més, incrementa l'excreció de sodi (Yamamura *et al.*, 1998; Hirano *et al.*, 2000). En els nostres estudis hem observat aquests mateixos efectes. L'AQP-2 està relacionada amb situacions patològiques, com en la fallada cardíaca, l'activació dels receptors V_2 degut a l'augment en la concentració de vasopressina dona lloc a l'increment d'expressió d'AQP-2, que provoca retenció d'aigua (Goldsmith i Gheorghiadu, 2005). En l'actualitat s'estan portant a terme diferents estudis clínics en humans per determinar els beneficis de l'administració de Tolvaptan en els casos de fallada cardíaca (Sanghi *et al.*, 2005).

Pel que fa a l'efecte en l'estimulació del creixement miofibroblàstic de la zona pericriptal en el còlon distal, la principal hormona implicada és l'aldosterona, ja que reproduïx els efectes de la dieta LS en l'increment de l'expressió de α -SMA. La vasopressina tot i no tenir una acció fibròtica tan potent com l'aldosterona, aconsegueix incrementar l'expressió de α -SMA en comparació a una dieta HS, en animals administrats amb vasopressina o deshidratats durant 24h. En canvi, l'angiotensina II no actua directament en l'activació d'aquest estat de fibrosi, ja que en animals amb concentracions plasmàtiques altes d'aquesta hormona, sense aldosterona, no aconsegueix incrementar l'expressió de α -SMA ni de col·lagen IV. En el cas de les tres hormones, s'ha descrit la seva acció fibròtica en altres teixits. L'aldosterona incrementa la proliferació fibroblàstica en el cor (Chun i Pratt, 2004) i en el ronyó (Nagai *et al.*, 2005), promovent la síntesi de col·lagen. En el cas de l'angiotensina s'ha descrit el seu efecte fibròtic en teixits com el cor (Schulz i Heusch, 2005), el ronyó (Ruiz-Ortega *et al.*, 2006) i el

fetge (Bataller *et al.*, 2005). L'angiotensina II estimula la formació de TGF- β (Campbell i Katwa, 1997) i promou la deposició de col·lagen mitjançant la inhibició de proteases i, per tant, evitant la degradació proteica (Wolf, 2000). En el cas de la vasopressina s'ha vist que també pot augmentar l'expressió de i TGF- β el seu mRNA en el ronyó (Harada *et al.* 1998). Aquests autors suggereixen que la vasopressina pot estar involucrada en la proliferació glomerular i en l'expansió de la matriu extracel·lular *in vivo* (Sanghi *et al.*, 2005). En aquesta línia, s'ha demostrat que la vasopressina estimula la hipertròfia cel·lular miocàrdica en rates, tal i com poden fer les hormones del RAAS (Tahara *et al.*, 1998).

En el cas de l'angiotensina II, aquesta acció heterogènia segons el teixit es pot explicar pel diferent paper que el creixement fibròtic desenvolupa en cada òrgan i per diferents factors implicats. Així doncs, en el còlon el creixement miofibroblàstic forma part d'un mecanisme fisiològic adaptatiu. En canvi, en el cor o el ronyó l'estat de fibrosi és patològic, degut a l'acció paracrina de l'Ang II sintetitzada localment. A més, l'angiotensina II podria fins i tot inhibir la formació de col·lagen degut a l'activació de la síntesi d'adrenomedulina (Minamino *et al.*, 1995), que activa les col·lagenases de la matriu extracel·lular (Mishima *et al.*, 2003; Tsuruda *et al.*, 2004) i s'expressa en el còlon d'humans i rates (Washimine *et al.*, 1995). L'adrenomedulina s'ha vist que inhibeix la proliferació i la síntesi de col·lagen induïda per angiotensina II en fibroblasts cardíacs de rata *in vitro* (Horio *et al.*, 1999; Tsuruda *et al.*, 1999), el que suggereix un possible paper d'aquest factor com a atenuant de la remodelació cardíaca. No es pot descartar tampoc la implicació de l'Ang (1-7), ja que antagonitza les accions proliferatives de l'angiotensina II (Chappell *et al.*, 2004). Tant l'augment de la permeabilitat al dextrà que hem trobat en els animals amb altes concentracions plasmàtiques d'angiotensina II com la disminució de la diferència de potencial que s'ha descrit anteriorment (De los Rios *et al.*, 1980) es podrien

explicar per aquesta inhibició de la proliferació de la matriu extracel·lular quan no hi ha aldosterona.

Així doncs, tant l'aldosterona com la vasopressina intervenen en la creació de la barrera al pas de soluts del lumen a la circulació sistèmica, que en el còlon distal permet l'absorció eficaç d'aigua i electròlits. Degut a que en el còlon el moviment de l'aigua es troba amb una forta oposició degut a l'alta osmolalitat de les femtes (Ma i Verkman, 1999) sembla que la beina de miofibroblasts actua de barrera per als soluts, dificultant la difusió del Na^+ cap als capil·lars sanguinis, de manera que es crea un espai hipertònic en aquesta zona de la paret intestinal (Naftalin i Pedley, 1999). La pressió negativa dóna lloc a un gradient osmòtic que afavoreix l'absorció d'aigua i electròlits des de la llum de la cripta. Aquesta teoria concorda amb les accions de l'aldosterona i de la vasopressina disminuint la permeabilitat a macromolècules i incrementant l'acumulació de sodi a l'espai pericriptal.

Per tant, els resultats d'aquest treball demostren que l'aldosterona és la responsable directa de l'augment en el transport de Na^+ , de la disminució de la permeabilitat i del creixement miofibroblàstic, al disminuir la ingesta de sodi de la dieta. En condicions de deshidratació, la vasopressina també disminueix la permeabilitat de l'epiteli i afavoreix el desenvolupament de la beina pericriptal, a més de regular el moviment d'aigua a través d'aquaporines mitjançant els seus receptors V_2 al còlon distal de rata.

Els resultats obtinguts demostren la gran complexitat dels mecanismes que intervenen en les adaptacions funcionals i estructurals del còlon distal al contingut en sodi de la dieta i la connexió entre l'epiteli i la capa de miofibroblasts subjacent. El coneixement fisiològic dels mecanismes de regulació del transport hídric i electrolític al còlon permet entendre les situacions fisiopatològiques i el desenvolupament de noves estratègies en el tractament dels processos patològics del còlon, com poden ser les malalties inflamatòries intestinals, el carcinoma de còlon o, menys greu,

els estats de diarrea. A més, el coneixement dels agents que intervenen en els mecanismes reguladors en el còlon, es pot aplicar a altres teixits i òrgans on intervenen aquests mateixos mecanismes, com poden ser el cor i el ronyó. A partir d'aquí, seria interessant aprofundir en els mecanismes d'acció implicats en tots aquests fenòmens, especialment en la relació existent entre l'epiteli i la capa de miofibroblasts de la zona pericriptal, per obtenir més informació sobre el mecanisme d'acció de l'aldosterona i la vasopressina, a més de la possibilitat de la implicació d'altres mediadors.



CONCLUSIONS
CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

La posta a punt del model animal d'activació del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) mitjançant l'adaptació a dietes amb diferent contingut en sodi (alt sodi, HS; baix sodi, LS) permet concloure:

- Una disminució en la ingesta de sodi augmenta el transport electrogènic d'aquest ió a la membrana apical mitjançant un augment en l'expressió del canal epitelial de sodi (ENaC), augmenta l'acumulació de sodi a la zona pericriptal i redueix la permeabilitat paracel·lular de l'epiteli mitjançant un augment en l'expressió de claudina 4 intercel·lular.
- El desenvolupament miofibroblàstic de la zona pericriptal, caracteritzat per un augment de l'expressió d' α -actina de múscul llis (α -SMA) i de col·lagen IV, en la dieta LS, contribueix a l'acumulació de sodi en aquesta zona i a la disminució de la permeabilitat paracel·lular.
- L'administració de captopril, inhibidor de l'enzim convertidor d'angiotensina, de losartan, inhibidor dels receptors d'angiotensina de tipus 1, o d'espironolactona, antagonista del receptor mineralcorticoide, reverteix els efectes de la dieta LS en el còlon distal, demostrant el paper essencial del RAAS en aquesta resposta adaptativa.

Les conclusions que s'extreuen del model animal d'administració exògena tant d'aldosterona com d'angiotensina II en animals adrenalectomitzats i alimentats amb dietes HS i LS, que permet separar les accions d'ambdues hormones, són les següents:

- L'aldosterona, independentment del contingut en sodi de la dieta i de la concentració d'angiotensina II, reproduïen tots els efectes de la dieta LS en el còlon distal, disminuint la permeabilitat paracel·lular, incrementant la resistència epitelial, induint l'acumulació de sodi a la beina pericriptal i augmentant l'expressió d'ENaC, de claudina 4 i de α -SMA.
- L'angiotensina II, per si sola, no té un paper directe en la permeabilitat ni induïx el creixement miofibroblàstic de la zona pericriptal, ja que no aconseguïx reproduir cap dels efectes de la dieta LS.

De l'estudi de l'efecte del grau de deshidratació en el model animal d'activació del RAAS se n'extreuen les conclusions següents:

- L'adaptació del còlon distal a la deshidratació va acompanyada d'una disminució de la permeabilitat de l'epiteli i d'un augment del creixement miofibroblàstic, que afavoreixen l'acumulació de sodi a la zona pericriptal. Aquest fenomen és independent de la ingesta de sodi.
- La supressió d'aigua durant 24 hores incrementa l'expressió d'aquaporina-2 (AQP-2) en la membrana apical de les cèl·lules epitelials del còlon distal.

A partir del model animal d'administració exògena de vasopressina en rates alimentades amb dietes HS i LS s'extreuen les següents conclusions:

- L'administració de vasopressina, independentment del contingut en sodi de la dieta i de la concentració plasmàtica d'aldosterona, reproduïx els efectes de la deshidratació en el còlon distal disminuint la permeabilitat de l'epiteli, incrementant l'acumulació de sodi a la zona pericriptal i augmentant l'expressió d' α -SMA i d'AQP-2.
- La vasopressina disminueix la permeabilitat epitelial i induïx el creixement miofibroblàstic per via tant dels receptors V_1 com V_2 , però no regula l'expressió d'ENaC en el còlon distal.
- La inducció d'AQP-2 per part de la vasopressina està mediada per receptors V_2 , ja que està inhibida pel Tolvaptan, un antagonista específic d'aquests receptors. En canvi, els receptors V_1 no intervenen en la regulació de l'expressió d'AQP-2.

Així doncs, l'estudi de la regulació de l'adaptació del còlon distal al contingut en sodi de la dieta destaca l'aldosterona com la responsable directa de l'augment en el transport de Na^+ , de la disminució de la permeabilitat i del creixement miofibroblàstic al disminuir la ingesta de sodi de la dieta, descartant un paper directe de l'angiotensina II en aquests efectes. En condicions de deshidratació, la vasopressina també disminueix la permeabilitat de l'epiteli i induïx el desenvolupament de la beina pericriptal, a més de regular el moviment d'aigua a través d'aquaporines mitjançant els seus receptors V_2 al còlon distal de rata.



REFERENCES
BIBLIOGRAFIA

REFERENCES BIBLIOGRAFIA

- A**bayasekara DRE, Onyezili NI, Whitehouse BJ, Laird SM, Winson GP (1993) Effects of chronic corticotropin treatment on aldosterone metabolism in the rat. *Journal of Endocrinology* 137:445-455.
- Aijaz S, Balda MS, Matter K (2006) Tight Junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol* 248:261-298.
- Albiston AL, Obeyesekere VR, Smith RE, Krozowski ZS (1994) Cloning and tissue distribution of the human 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 enzyme. *Mol Cell Endocrinol* 105:11-17.
- Alvarez de la Rosa D, Canessa CM, Fyfe GK, Zhang P (2000) Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol* 62:573-594.
- Anderson JM (2001) Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci* 16:126-130.
- 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.
- Andries PG, Neri G, Prayer-Galetti T, Rossi GP, Gottardo G, Malendowicz LK, Nussdorfer GG (1997) Effects of adrenomedullin on the human adrenal glands: an in vitro study. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1167-1170.
- Antunes-Rodrigues J, De Castro M, Elias LLK, Valença MM, McCann S (2004) Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84: 169-208.
- Asher C, Wald H, Rossier BC, Garty H (1996) Aldosterone-induced increase in the abundance of Na⁺ channel subunits. *Am J Physiol* 271:C605-C611.
- B**ader M, Ganten D (2000) Regulation of renin: new evidence from cultured cells and genetically modified mice. *J Mol Med* 78:130-139.
- Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D (2001) Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med* 79:76-102.
- Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Brenner DA (2005) Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxid Redox Signal* 7:1346- 1355.
- Beguin P, Crambert G, Guennoun S, Garty H, Horisberger JD, Geering K (2001) CHIF, a member of the FXYP protein family, is a regulator of Na,K-ATPase distinct from the gamma-subunit. *EMBO J* 20:3993-4002.

- Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R, Schultz G **(1998)** Mineralcorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9424-9429.
- Berry C, Touyz R, Dominiczak AF, Webb RC, Johns DG **(2001)** Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H2337-H2365.
- Bhardwaj A **(2006)** Neurological impact of vasopressin dysregulation and hyponatremia. *Ann Neurol* 59:229-236.
- 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.
- Boon WC, Coghlan JP, Curnow KM, McDougall JG **(1997)** Aldosterone secretion, a molecular perspective. *Trends Endocrinol Metab* 8:346-354.
- Boyd C, Naray-Fejes-Toth A **(2005)** Gene regulation of ENaC subunits by serum and glucocorticoid inducible kinase-1 (SGK1). *Am J Physiol* 288:F505-F512.
- Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Muñoz JZ **(1940)** The substance causing renal hypertension. *J Physiol* 98:283-298.
- Brayden DJ, Jepson MA, Baird AW **(2005)** Intestinal Peyer's patch M cells and oral vaccine targeting. *Drug Discov Today* 10:1145-1157.
- Breitwieser GE **(2004)** G protein-coupled receptor oligomerization: implication for 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.
- Brilla CG, Weber KT **(1992)** Mineralcorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 120:893-901.
- Buda A, Sands C, Jepson MA **(2005)** Use of fluorescence imaging to investigate the structure and function of intestinal M cells. *Adv Drug Deliver Rev* 57:123-134.
- Campbell SE, Katwa LC **(1997)** Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 29:1947-1958.
- Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC **(1994)** Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits.

Nature 367:463-467.

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

Chappell MC, Modrall JG, Diz DI, Ferrario CM (**2004**) Novel aspects of the renal renin-angiotensin system: Angiotensin (1-7), ACE2 and blood pressure regulation. *Contrib Nephrol* 143:77-89.

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.

Cheroutre H (**2005**) IELs: enforcing law and order in the court of the intestinal epithelium. *Immunol Rev* 206:114-131.

Cheroutre H, Madakamutil L (**2005**) Mucosal effector memory T cells: the other side of the coin. *Cell Mol Life Sci* 62:2853-2866.

Chun TY, Pratt JH (**2004**) Non-genomic effects of aldosterone: new actions and questions. *Trends Endocrinol Metab* 15:353-354.

Clayburgh DR, Shen L, Turner JR (**2004**) A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest* 84:282-291.

Colegio OR, Van Itallie C, McCrea H, Rahner C, Anderson JM (**2002**) Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C142-C147.

Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J (**2006**) Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 7:349-359.

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 co-ordinated cell movement. *J Cell Sci* 111:3323-3332.

Davies E, MacKenzie S (**2003**) Extra-adrenal production of corticosteroids. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 30:437-445.

Delahunty T, Hollander D (**1986**) Liquid-chromatographic method for estimating urinary sugars: applicability to studies of intestinal permeability. *Clin Chem* 32:1542-1544.

De los Rios AD, Labajos M, Manteca A, Morell M, Souviron A (**1980**) Stimulatory action of angiotensin II on water and electrolyte transport by the proximal colon of the rat. *J Endocrinol* 86:35-43.

Desai M, Gayle D, Kalichanda N, Ross MG (**2005**) Gender specificity of programmed plasma hypertonicity and hemoconcentration in adult offspring of water-restricted rat dams. *J Soc Synecol Investig* 12:409-415.

- Diakov A, Korbmacher C **(2004)** A novel pathway of epithelial sodium channel activation involves a serum- and glucocorticoid-induced kinase consensus motif in the C terminus of the channel's α -subunit. *J Biol Chem* 279:38134-38142.
- Dolman D, Edmonds CJ **(1975)** The effect of aldosterone and the renin-angiotensin system on sodium, potassium and chloride transport by proximal and distal rat colon in vivo. *J Physiol* 250:597-611.
- Duc C, Farman N, Canessa CM, Bonvalet JP, Rossier BC **(1994)** Cell-specific expression of epithelial sodium channel α , β , and γ subunits in aldosterone-responsive epithelia from the rat: localization by *in situ* hybridization and immunocytochemistry. *J Cell Biol* 127:1907-1921.
- Duprez DA **(2006)** Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in vascular remodeling and inflammation: a clinical review. *J Hypertens* 24:983-991.
- E**celbarger CA, Kim GH, Terris J, Masilamani S, Mitchell C, Reyes I, Verbalis JG, Knepper MA **(2000)** Vasopressin-mediated regulation of epithelial sodium channel abundance in rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F46-F53.
- Edmonds CJ **(1981)** Water and ionic transfer pathways of mammalian large intestine. *Clinical Science* 61:257-263.
- Emanuel RL, Cain JP, Williams GH **(1973)** Double antibody radioimmunoassay of renin activity and angiotensin II in human peripheral plasma. *J Lab Clin Med* 81:632-640.
- Engeli S, Negrel R, Sharma AM **(2000)** Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension* 35:1270-1277.
- Erhardt LR **(2005)** A review of the current evidence for the use of angiotensin-receptor blockers in chronic heart failure. *Int J Clin Pract* 59:571-578.
- F**ardella CE, Mosso L **(2002)** Primary aldosteronism. *Clin Lab* 48:181-190.
- Farman N, Rafestin-Oblin ME **(2001)** Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F181-F192.
- 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.
- Fitzsimons JT, Wirth JB **(1978)** The renin-angiotensin system and sodium appetite. *J Physiol* 274:63-80.
- Fitzsimons JT **(1998)** Angiotensin thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 78:583-686.

- 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.
- Fraser CL, Arieff AI **(1997)** Epidemiology, pathophysiology, and management of hyponatremic encephalopathy. *Am J Med* 102:67-77.
- Frigeri A, Gropper MA, Umenishi F, Kawashima M, Brown D, Verkman AS **(1995)** Localization of MIWC and GLIP water channel homologs in neuromuscular, epithelial and glandular tissues. *J Cell Sci* 108:2993-3002.
- Fromm M, Hegel U **(1978)** Segmental heterogeneity of epithelial transport in rat large intestine. *Pflugers Arch* 378:71-78.
- Fukushima K, Naito H, Funayama Y, Yonezawa H, Haneda S, Shibata C **(2004)** In vivo induction of prostasin 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 mineralcorticoid action. *Hypertension* 46:1227-1235.
- Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI **(1988)** Mineralcorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242:583-585.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S **(1993)** Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 127:1617-1626.
- Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S **(1998)** Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141:1539-1550.
- 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**adsby DC, Vergani P, Csanády L (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440:477-483.
- 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:G856-863.

- Ganguly A, Hampton T (1985) Calcium-dependence of serotonin-mediated aldosterone secretion and differential effects of calcium antagonists. *Life Sci* 36:1459-1464.
- Gardner DG, Newman ED, Nakamura KK, Nguyen KP (1991) Endothelin increases the synthesis and secretion of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 261:H177-H182.
- Garvin JL (1991) Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat proximal straight tubules. *J Am Soc Nephrol* 1:1146-1152.
- Ghandehari H, Smith PL, Ellens H, Yeh PY, Kopecek J (1997) Size-dependent permeability of hydrophilic probes across rabbit colonic epithelium. *J Pharmacol Exp Ther* 280:747-753.
- Goldsmith SR, Gheorghiade M (2005) Vasopressin antagonism in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 46:1785-1791.
- Gomez-Sanchez CE, Cozza EN, Foecking MF, Chiou S, Ferris MW (1990) Endothelin receptor subtypes and stimulation of aldosterone secretion. *Hypertension* 15:744-747.
- Gormley K, Dong Y, Sagnella GA (2003) Regulation of the epithelial sodium channel by accessory proteins. *Biochem J* 371:1-14.
- Gottlieb HB, Ji LL, Jones H, Penny ML, Fleming T, Cunningham JT (2006) Differential effects of water and saline intake on water deprivation-induced c-Fos staining in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1251-R1261.
- Greig ER, Baker EH, Mathialahan T, Boot-Handford RP, Sandle GI (2002) Segmental variability of ENaC subunit expression in rat colon during dietary sodium depletion. *Pflugers Arch* 444:476-483.
- 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* 74:11-8.
- 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:S35-41.
- Helmer OM, Page IH (1939) Purification and some properties of renin. *J Biol Chem* 127:757-763.

- Himathongkam T, Dluhy RG, Williams GH (1975) Potassium-aldosterone-renin interrelationships. *J Clin Endocrinol Metab* 41:153-159.
- Hinson JP, Kapas S, Teja R, Vinson GP (1991) Effect of the endothelins on aldosterone secretion by rat zona glomerulosa cells in vitro. *J Steroid Biochem Mol Bio* 40:437-439.
- Hinz B, Pittet P, Smith-Clerc J, Chaponnier C, Meister JJ (2004) Myofibroblasts development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. *Mol Biol Cell* 15:4310-4320.
- Hirano T, Yoshitaka Y, Nakamura S, Onogawa T, Mori T (2000) Effects of the V2-receptor antagonist OPC-41061 and the loop diuretic furosemide alone and in combination in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 292:288-294.
- Hirasawa K, Sato Y, Hosoda Y, Yamamoto T, Hanai H (2002) Immunohistochemical localization of angiotensin II receptor and local rennin-angiotensin system in human colonic mucosa. *J Histochem Cytochem* 50:275-282.
- Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K (1999) Effects of adrenomedullin on cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 382:1-9.
- Horster M, Fabritius J, Buttner M, Maul R, Weekwerth P (1994) Colonic-crypt-derived epithelia express induced ion transport differentiation in monolayer cultures on permeable matrix substrata. *Pflugers Arch* 426:110-120.
- Jain MK, Layne MD, Watanabe M, Chin MT, Feinberg MW, Sibinga NE, Hsieh CM, Yet SF, Stemple DL, Lee ME (1998) In vitro system for differentiating pluripotent neural crest cells into smooth muscle cells. *J Biol Chem* 273:5993-5996.
- Jayaraman S, Song Y, Vetrivel L, Shankar L, Verkman AS (2001) Non-invasive fluorescence measurement of salt concentration in the airway surface liquid. *J Clin Invest* 107:317-324.
- Jodal M, Lundgren O (1983) Intestinal water transport. *Acta Paediatrica Scandinavica* 305:49-55.
- Kalra PR, Anker SD, Coats A (2001) Water and sodium regulation in chronic heart failure: the role of natriuretic peptides and vasopressin. *Cardiovasc Res* 51:495-509.
- Khan WI, Collins SM (2004) Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. *Parasite Immunology* 26:319-326.
- Kifor I, Moore TJ, Fallo F, Sperling E, Menachery A, Chiou CY, Williams GH (1991) The effect of sodium intake on angiotensin content of the rat adrenal gland. *Endocrinology* 128:1277-1284.

- Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, Berin MC, Taminiou JA, Groot JA, Perdue MH **(1998)** Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 38:G1037-1044.
- Kishore BK, Terris JM, Knepper MA **(1996)** Quantitation of aquaporin-2 abundance in microdissected collecting ducts: axial distribution and control by AVP. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 271:F61-F70.
- Kishore BK, Krane CM, Miller RL, Shi H, Zhang P, Hemmert A, Sun R, Nelson RD **(2005)** P2Y2 receptor mRNA and protein expression is altered in inner medullae of hydrated and dehydrated rats: relevance to avp-independent regulation of IMCD function. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F1164-F1172.
- Knepper MA **(1997)** Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin. *Am J Physiol* 72:F3-F12.
- Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K, Kihara I **(1999)** Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 276:621-627.
- Kunzelmann K, Mall M **(2002)** Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 82:245-289.
- Kurdi M, De Mello WC, Booz GW **(2005)** Working outside the system: an update on the unconventional behavior of the renin-angiotensin system components. *Int J Biochem Cell B* 37:1357-1367.
- Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T **(2002)** Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 106:130-135.
- L**aforenza U, Gastaldi G, Grazioli M, Cova E, Tritto S, Faelli A, Calamita G, Ventura U **(2005)** Expression and immunolocalization of aquaporin-7 in rat gastrointestinal tract. *Biol Cell* 97:605-613.
- Lászlo FA, Laszlo F, DeWied D **(1991)** Pharmacology and clinical perspectives of vasopressin antagonists. *Pharmacol Rev* 43:73-108.
- Lavoie JL, Sigmund CD **(2003)** Minireview: overview of the renin-angiotensin system – an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 144:2179-2183.
- Le Moellic C, Boulkroun S, González-Núñez D, Dublineau I, Cluzeaud F, Fay M, Blot-Chabaud M, Farman N **(2005)** Aldosterone and tight junctions: modulation of claudin-4 phosphorylation in renal collecting duct cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C1513-C1521.
- Levy BI **(2004)** Can angiotensin II type 2 receptors have deleterious effects in cardiovascular disease? Implications for therapeutic blockade of the renin-

- angiotensin system. *Circulation* 109:8-13.
- Lijnen P, Petrov V, Rumilla K, Fagard R (2003) Transforming growth factor-beta 1 promotes contraction of collagen gel by cardiac fibroblasts through their differentiation into myofibroblasts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 25:79-86.
- Liu FY, Cogan MG (1989) Angiotensin II stimulates early proximal bicarbonate absorption in the rat by decreasing cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest* 84:83-91.
- Lockett MF (1967) Hormonal actions of the heart and of lungs on the isolated kidney. *J Physiol* 193:661-669.
- Lockett MF, Retallack RW (1970) The influence of heart rate on the secretion of a substance closely resembling the 18-monoacetate of D-aldosterone by the hearts of cats under chloralose anaesthesia. *J Physiol* 208:21-32.
- Lockett MF, Retallack RW (1972) The isolation of a renally active substance from arterial blood. *J Physiol* 223:49-57.
- Lolait SJ, O'Carroll AM, McBride OW, Konig M, Morel A, Brownstein MJ (1992) Cloning and characterization of a vasopressin V₂ receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* 357: 336-339.
- Loo DDF, Zeuthen T, Chandy G, Wright EM (1996) Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13367-13370.
- Lösel R, Schultz A, Wehling M (2004) A quick glance at rapid aldosterone action. *Mol Cell Endocrinol* 217:137-141.
- Luft FC (2002) Proinflammatory effects of angiotensin II and endothelin: targets for progression of cardiovascular and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11:59-66.
- Lutz KL, Siahaan TJ (1997) Molecular structure of the apical junction complex and its contribution to the paracellular barrier. *J Pharm Sci* 86:977-984.
- Ma T, Verkman AS (1999) Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J Physiol* 517:317-326.
- 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.
- Mahida YR, Beltinger J, Makh S, Goke M, Gray T, Podolsky DK (1997) Adult human colonic subepithelial myofibroblasts express extracellular matrix proteins and cyclooxygenase-1 and -2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 36:G1341-G1348.
- Malik B, Price SR, Mitch WE, Yue Q, Eaton DC (2006) Regulation of epithelial sodium channels by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* 290:F1285-F1294.

- Manning PT, Schwarz D, Katsube NC, Holmberg SW, Needleman P (1985) Vasopressin-stimulated release of atriopeptin: endocrine antagonists in fluid homeostasis. *Science* 229:395-397.
- Manning M, Sawyer WH (1989) Discovery, development and some uses of vasopressin and oxytocin antagonist. *J Lab Clin Med* 114: 617-632.
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142:117-127.
- Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, Aoki T, Hagiwara H, Takata K (2004) Aquaporins in the digestive system. *Med Electron Microsc* 37:71-80.
- McCormick JA, Bhalla V, Pao AC, Pearce D (2004) SGK1: a rapid aldosterone-induced regulator of renal sodium reabsorption. *Physiology* 20:134-139.
- Meinild AK, Klaerke DA, Loo DDF, Wright EM, Zeuthen T (1998) The human Na⁺/glucose cotransporter is a molecular water pump. *J Physiol* 508:15-21.
- Menachery A, Braley LM, Kifor I, Gleason R, Williams GH (1991) Dissociation in plasma renin and adrenal ANG II and aldosterone responses to sodium restriction in rats. *Am J Physiol* 261:E487-E494.
- Minamino N, Shoji H, Sugo K, Kangawa K, Matsuo H (1995) Adrenocortical steroids, thyroid hormones and retinoic acid augment the production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 211:686-693.
- Mishima K, Kato J, Kuwasako K, Imamura T, Kitamura K, Eto T (2003) Angiotensin II modulates gene expression of adrenomedullin receptor components in rat cardiomyocytes. *Life Sci* 73:1629-1635.
- 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.
- Mobasher A, Wray S, Marples D (2005) Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays. *J Mol Histol* 36:1-14.
- Morimoto S, Sigmund CD (2002) Angiotensin mutant mice: a focus on the brain renin-angiotensin system. *Neuropeptides* 36:194-200.
- Muller J (1998) Regulation of aldosterone biosynthesis, the end of the road? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25:S79-S85.
- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE (1991) Isolation of a

cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351:233-236.

- N**aftalin RJ, Pedley KC (1990) Video-enhanced imaging of the fluorescent Na⁺ probe SBFI indicates that colonic crypts absorb fluid by generating a hypertonic interstitial fluid. *FEBS Lett* 260:187-194.
- Naftalin RJ, Pedley KC (1995) The sodium concentration of lateral intercellular spaces. *J Memb Biol* 147:105-106.
- Naftalin RJ, Pedley KC (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* 541:201-210.
- 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.
- Naray-Fejes-Toth A, Canessa C, Cleaveland ES, Aldrich G, Fejes-Toth G (1999) Sgk is an aldosterone-induced kinase in the renal collecting duct. Effects on epithelial Na⁺ channels. *J Biol Chem* 274:16973-16978.
- Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M, Miyoshi T, Iwashita K, Shiraishi N, Nonoguchi H, Chen L, Chai KX, Chao J, Tomita K (2002) Regulation of prostaticin by aldosterone in the kidney. *J Clin Invest* 109:401-408.
- Newberry RD, Lorenz RG (2005) Organizing a mucosal defense. *Immunol Rev* 206:6-21.
- 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 AH, Schauser KH, Poulsen K (2000) The uteroplacental renin-angiotensin system. *Placenta* 21:468-477.
- Noda Y, Sasaki S (2006) Regulation of aquaporin-2 trafficking and its binding protein complex. *Biochim Biophys Acta*. En prensa.
- Noda Y, Sasaki S (2005) Trafficking mechanism of water channel aquaporin-2. *Biol Cell* 97:885-892.

- Nonoguchi H, Sands JM, Knepper MA **(1988)** Atrial natriuretic factor inhibits vasopressin-stimulated osmotic water permeability in rat inner medullary collecting duct. *J Clin Invest* 82:1383-1390.
- Norregaard R, Uhrenholt TR, Bistrup C, Skott O, Jensen BL **(2003)** Stimulation of 11 α -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**'Brien DP, Nelson LA, Kemp CJ **(2002)** Intestinal permeability and bacterial translocation are uncoupled after small bowel resection. *J Pediatr Surg* 37:390-394.
- Oman H, Blomquist L, Henriksson AE, Johanson SG **(1995)** Comparison of polysucrose 15000, 51Cr-labelled ethylenediaminetetraacetic acid, and 14C-mannitol as markers of intestinal permeability in man. *Scand J Gastroenterol* 30:1172-1177.
- Outdit GY, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM **(2003)** The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc Med* 13:93-101.
- P**ascal RR, Kaye I, 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.
- Pedley KC, Naftalin RJ **(1993)** Evidence from fluorescence microscopy and comparative studies that rat, ovine and bovine colonic crypts are absorptive. *J Physiol* 460:525-547.
- Perazella MA, Setaro JF **(2003)** Renin-angiotensin-aldosterone system: fundamental aspects and clinical implications in renal and cardiovascular disorders. *J Nucl Cardiol* 10:184-196.
- Pitt B, Williams G, Remme W, Martinez F, Lopez-Sendon J, Zannad F, Neaton J, Roniker B, Hurley S, Burns D, Bittman R, Kleiman J **(2001)** The EPHEsus trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. *Cardiovasc Drugs Ther* 15:79-87.
- Porter JP, Potratz KR **(2004)** The effect of icv angiotensin II on body weight and food intake in adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287:R422-R428.
- Powell DW **(1981)** Barrier function of epithelia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 241:G275-G288.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB **(1999)** Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 46: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.

- Provost E, Rimm DL **(1999)** Controversies at the cytoplasmic face of the cadherin-based adhesion complex. *Curr Opin Cell Biol* 11:567-572.
- R**abinstein AA **(2006)** Vasopressin antagonism: potential impact on neurologic disease. *Clin Neuropharmacol* 29:87-93.
- Ramírez-Lorca R, Vizuete ML, Venero JL, Revuelta M, Cano J, Ilundáin AA, Echevarría M **(1999)** Localization of aquaporin-3 mRNA and protein along the gastrointestinal tract of Wistar rats. *Pflügers Arch* 438:94-100.
- Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P **(2005)** The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 99:S57-S65.
- Reudelhuber TL **(2005)** The continuing saga of the AT₂ receptor. *Hypertension* 46:1261-1262.
- Robbins ME, Diz DI **(2006)** Pathogenic role of the renin-angiotensin system in modulating radiation-induced late effects. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 64:6-12.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS **(1986)** Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4167-4171.
- Robertson GL, Aycinena P, Zerbe RL **(1982)** Neurogenic disorders of osmoregulation. *Am J Med* 72:339-353.
- Rocha AS, Kudo LH **(1990)** Atrial peptide and cGMP effects on NaCl transport in inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 259:F258-F268.
- Rogerson FM, Brennan FE, Fuller PJ **(2004)** Mineralcorticoid receptor binding, structure and function. *Mol Cell Endocrinol* 217:203-212.
- 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.
- Rossier BC, Pradervand S, Schild L, Hummler E **(2002)** Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu Rev Physiol* 64:877-897.
- Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Carvajal G, Egido J **(2006)** Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 21:16-20.
- S**aito 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 AQP2 by removal of AVP stimulation in collecting duct cells of dehydrated rats. *Am J Physiol Renal 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, Ordog T, Ward SM **(2002)** Physiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: from bench to bedside IV. *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. *Ann 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.
- Sanghi P, Uretsky BF, Schwarz ER **(2005)** Vasopressin antagonism: a future treatment option in heart failure. *Eur Heart J* 26, 538-543.
- Sasaki K, Yamano Y, Bardhan S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T **(1991)** Cloning and expression of a complementary cDNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor. *Nature* 351:230-232.
- Sato A, Hayashi K, Naruse M, Saruta T **(2003)** Effectiveness of aldosterone blockade in patients with diabetic nephropathy. *Hypertension* 41:64-68.
- Schafer JA, Hawk CT **(1992)** Regulation of Na⁺ channels in the cortical collecting duct by AVP and mineralocorticoids. *Kidney Int* 41:255-268.
- Schneider EG, Radke KJ, Ulderich DA, Taylor RE **(1985)** Effect of osmolality on aldosterone secretion. *Endocrinology* 116:1621-1626.
- Schulz R, Heusch G **(2005)** Angiotensin II in the failing heart. *Kidney Blood Press Res* 28:349-352.
- 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.
- Seely EW, Conlin PR, Brent GA, Dluhy RG **(1989)** Adrenocorticotropin stimulation of aldosterone: prolonged continuous versus pulsatile infusion. *J Clin Endocrinol Metab* 69:1028-1032.
- Sernia C **(2001)** A critical appraisal of the intrinsic pancreatic angiotensin-generating system. *J Pancreas* 2:50-55.
- Shade RE, Blair-West JR, Carey KD, Madden LJ, Weisinger RS, Denton DA **(2002)** Synergy between angiotensin and aldosterone in evoking sodium appetite in baboons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283:R1070-R1078.

- Shigaev A, Asher C, Latter H, Garty H, Reuveny F **(2000)** Regulation of sgk by aldosterone and its effects on the epithelial Na⁺ channel. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F613-F619.
- Shrier RW, Berl T, Anderson RJ **(1979)** Osmotic and non-osmotic control of vasopressin release. *Am J Physiol* 236:F321-F332.
- Simpson SA, Tait JF, Wettstein A **(1954)** Konstitution des Aldosterons des neuen Mineralcorticoids. *Experientia* 10:132-133.
- 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.
- 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.
- Snyder PM **(2005)** Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking. *Endocrinology* 146:5079-5085.
- Song L, Healy DP **(1999)** Kidney aminopeptidase A and hypertension, part II: effects of angiotensin II. *Hypertension* 33:746-752.
- Soubrier F, Nadaud S, Williams TA **(1994)** Angiotensin I converting enzyme gene: regulation, polymorphism and implications in cardiovascular diseases. *Eur Heart J* 15:24-29.
- Speth RC, Daubert DL, Grove KL **(1999)** Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regul Pept* 79:25-40.
- Stanton B, Giebisch G, Klein-Robbenhaar G, DeFronzo R, Giebisch G, Wade J **(1985)** Effects of adrenalectomy and chronic adrenal corticosteroid replacement on potassium transport in rat kidney. *J Clin Invest* 75:1317-1326.
- Staruschenko A, Adams E, Booth RE, Stockand JD **(2005)** Epithelial Na⁺ channel subunit stoichiometry. *Biophys J* 88:3966-3975.
- 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.
- 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 JO, Ramires FJ **(2000)** Local angiotensin II and transforming growth factor-beta 1 in renal fibrosis of rats. *Hypertension* 35:1078-84.
- Szalay KSz, Beck M, Toth M, Chatel R **(1998)** Interactions between ouabain, atrial natriuretic

peptide, angiotensin II and potassium: effects on rat zona glomerulosa aldosterone production. *Life Sci* 62:1845-1852.

Tagesson C, Sjödahl R, Thorén B (1978) Passage of molecules through the wall of the gastrointestinal tract. *Scand J Gastroent* 13:519-524.

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.

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

Taylor MM, Samson WK (2002) Adrenomedullin and the integrative physiology of fluid and electrolyte balance. *Microsc Res Tech* 57:105-109.

Terris J, Ecelbarger CA, Nielsen S, Knepper MA (1996) Long-term regulation of four renal aquaporins in rats. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol* 271:F414-F422.

Thiagarajah JR, Gourmelon P, Griffiths NM, Lebrun F, Naftalin RJ, Pedley KC (2000) Radiation-induced cytochrome c releases causes loss of rat colonic fluid absorption by damage to crypts and pericryptal myofibroblasts. *Gut* 47:675-684.

Thiagarajah JR, Pedley KC, Naftalin RJ (2001a) Evidence of amiloride sensitive fluid absorption in rat descending colonic crypts from confocal microscopic studies of fluorescence recovery after photobleaching. *J Physiol* 536:541-553.

Thiagarajah JR, Jayaraman S, Naftalin RJ, Verkman AS (2001b) In vivo fluorescence measurement of Na⁺ concentration in the pericryptal space of mouse descending colon: direct evidence for accumulation of a hypertonic absorbate. *Am J Physiol Cell* 281:C1898-C1903.

Thiagarajah JR, Griffiths NM, Pedley KC, Naftalin RJ (2002) Evidence for modulation of pericryptal sheath myofibroblasts in rat descending colon by transforming growth factor and angiotensin II. *BMC Gastroenterol* 2:4-15.

Tremblay A, Waterman MR, Parker KL, Lehoux JG (1991) Regulation of rat adrenal messenger RNA and protein levels for cytochrome P-450s and adrenodoxin by dietary sodium depletion or potassium intake. *J Biol Chem* 266:2245-2251.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews* 2:285-293.

Tsukita S, Furuse M (2002) Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Current Opinion in Cell Biology* 14:531-536.

- Tsuruda T, Kato J, Kitamura K, Kawamoto M, Kuwasako K, Imamura T, Koiwaya Y, Tsuji T, Kangawa K, Eto T (1999) An autocrine or a paracrine role of adrenomedullin in modulating cardiac fibroblast growth. *Cardiovasc Res* 43:958-967.
- Tsuruda T, Kato J, Cao YN, Hatakeyama K, Masuyama H, Imamura T, Kitamura K, Asada Y, Eto T (2004) Adrenomedullin induces matrix metalloproteinase-2 activity in rat aortic adventitial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 325:80-84.
- Turnamian SG, Binder HJ (1988) Electrolyte transport in distal colon of sodium-depleted rats: effect of sodium depletion.
- 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.
- Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM (2001) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107:1319-1327.
- Van Itallie C, Anderson JM (2004) The role of claudins in determining paracellular charge selectivity. *Proc Am Thorac Soc* 1:38-41.
- Verrey F (1995) Transcriptional control of sodium transport in tight epithelial by adrenal steroids. *J Membr Biol* 144:93-110.
- Wang Q, Fang CH, Hasselgren P (2001) Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 281:R1013-R1023.
- Washimine H, Asada Y, Kitamura K, Ichiki Y, Hara S, Yamamoto Y, Kangawa K, Sumiyoshi A, Eto T (1995) Immunohistochemical identification of adrenomedullin in human, rat, and porcine tissue. *Histochemistry* 103:251-254.
- Weber KT, Brilla CG (1991) Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: fibrosis and renin angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83:1849-1865.
- Weber KT, Sun Y, Katwa LC (1997) Myofibroblasts and local angiotensin II in rat cardiac tissue repair. *Int J Biochem Cell Biol* 29:31-42.
- Weber KT (2003) Aldosteronism revisited: perspectives on less well-recognized actions of aldosterone. *J Lab Clin Med* 142:71-82.
- Williams GH (2005) Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. *Heart Failure Rev* 10:7-13.
- Wolf G, Mueller E, Stahl RA, Ziyadeh FN (1993) Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-. *J Clin Invest* 92:1366-1372.
- Wolf G (2000) Angiotensin II as a mediator of tubulointerstitial injury. *Nephrol Dial Transplant* 15:61-63.
- Wormmeester L, Sánchez de Medina F, Kokke F, Tse C-M, Khurana S, Bowser J, Cohen ME, Donowitz M (1998) Quantitative contribution of NHE2 and NHE3 to rabbit ileal brush-border Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol* 274:C1261-C1272.
- Yagi T, Takeichi M (2000) Cadherin superfamily genes: functions, genomic organizations and neurologic diversity. *Genes & Dev* 14:1169-1180.

- Yamaguchi T, Baba K, Doi Y, Yano K, Kitamura K, Eto T **(1996)** Inhibition of aldosterone production by adrenomedullin, a hypotensive peptide, in the rat. *Hypertension* 28:308-314.
- 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 T, Kimura T, Ota K, Shoji M, Inoue M, Sato K, Ohta M, Yoshinaga K **(1991)** Central effects of endothelin 1 on vasopressin and atrial natriuretic peptide release and cardiovascular and renal function in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 17:316-318.
- Z**achos NC, Tse M, Donowitz M **(2005)** Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ Exchange. *Annu Rev Physiol* 67:411-443.
- Zannad F, Alla F, Dousset B, Perez A, Pitt B **(2000)** Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldactone evaluation study (RALES). *Circulation* 102:2700-6.
- Zwemer RL, Sullivan RC **(1934)** Blood chemistry of adrenal insufficiency in cats. *Endocrinology* 18:97-106.



ANNEXE
ANNEX

THE KEY ROLE OF ALDOSTERONE IN COLONIC PERMEABILITY AND PERICRYPTAL MYOFIBROBLASTS GROWTH

Esther Cristià, Miquel Moretó, Richard J. Naftalin

La revisió que s'inclou a continuació està en fase de revisió a la revista "Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition".

The following review has been sent to the "Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition" for its revision.



The Key role of Aldosterone in colonic permeability and pericryptal myofibroblasts growth

*Esther Cristià, *Miquel Moretó, Richard J. Naftalin

*Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain
Physiology Division, King's College London, Guy's Campus London, UK

ABSTRACT

When sodium intake diminishes, both the kidney and distal colon contribute directly to sodium homeostasis. In response to a diet with low amounts of sodium the body hormonal profile changes to produce different effects on crypt colon permeability and absorption and in the pericryptal sheath surrounding distal colonic crypts. This adaptation produces an increase in Na^+ absorption, a decreased crypt wall permeability and an activation of the pericryptal myofibroblasts growth. The separate roles of the two main hormones implicated in the process, aldosterone and angiotensin II, till now have been unclear. Experiments conducted on adrenalectomized rats on low and high sodium diets, implanted with osmotic pumps perfusing either aldosterone or angiotensin II, allow us to discriminate between the effects of these hormones. In the distal colon aldosterone acts as a trophic agent on the myofibroblasts layer and is the key hormone controlling colonic permeability, but angiotensin II alone has no discernable direct role in the process.

Key words: distal colon, aldosterone, myofibroblasts, permeability

Address correspondence to Dr. Richard Naftalin (e-mail: richard.naftalin@kcl.ac.uk)

INTRODUCTION

The distal colon has a key function in NaCl and water absorption. It has been demonstrated that distal colon absorptive function depends both on crypt luminal cells and on the myofibroblast cells of the surrounding pericryptal sheath (1). This layer of myofibroblasts generates collagen IV and is held together predominantly by intercellular adhesion molecules (2) which links with the cytoskeletal smooth muscle actin (α -SMA) (3) via adherens junctions in the cell membrane (4). Colonic Na^+ absorption is influenced by a low sodium (LS) diet

following activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) by increasing renin secretion. This in turn activates a process which generates angiotensin II (ANG II), which stimulates aldosterone (ALDO) production and secretion within the adrenal cortex (5). Aldosterone stimulates the sodium absorption by distal colon and renal distal tubule by enhancing expression of the epithelial Na^+ channel (ENaC) in apical membranes and increasing the Na^+/K^+ ATPase activity in the basolateral membrane (6). Another consequence is that the crypt wall permeability to both Na^+ and dextran (mol wt 10 kDa) is decreased, as determined by monitoring the rates of equilibration of fluorescein labelled dextran across the crypt wall using confocal microscopy of tissue in vitro taken from adrenalectomised rats pre-treated with aldosterone via an osmotic minipump (7). RAAS-related events in the distal colon also stimulate myofibroblast growth (8) in the pericryptal sheath, as determined by increased expression of smooth muscle actin in these cells. Animals fed a LS diet accumulate high sodium concentrations in the pericryptal space, whereas animals fed on HS diet do not accumulate hypertonic Na^+ in the pericryptal sheath. The presence of this stable hypertonic solution surrounding the crypts provides a large driving force for water absorption across the crypt wall (9) and is used to create a suction tension within the crypt lumen which is employed to dehydrate faeces in the colonic lumen.

As a LS diet increases plasma levels of both aldosterone and angiotensin II, it is difficult to discriminate between the effects of each hormone in colonic permeability and in pericryptal myofibroblasts growth so their specific role or the possibility of a synergic action has till now been unclear.

Both aldosterone and angiotensin II have been shown to have roles in fibrosis in other tissues like the heart and the kidney. Mineralocorticoid receptors have been detected in cardiac myocytes and endothelial cells (10). The RALES trial (11), which evaluated the benefits of spironolactone therapy on congestive heart failure, showed that aldosterone-receptor blockade decreased morbidity and mortality associated with excessive intracardiac

myofibroblast stimulation. On the other hand, angiotensin-converting enzyme (ACE) activity (12, 13) and ANG II type 1 receptors (ATr1) have been observed at sites of fibrosis (14). In cardiac myofibroblasts ANG II has trophic effects, increasing α -SMA expression after 2 days, and increasing collagen synthesis after 14 days of infusion (15,16). As ACE inhibitors do not inhibit aldosterone synthesis completely, prolonged exposure or increased sensitivity aldosterone results in cardiac remodelling and eventual failure (17).

ROLES OF ALDOSTERONE AND ANGIOTENSIN II

Post adrenalectomy (ADX) osmotic mini-pumps were implanted to Sprague-Dawley rats to maintain plasma concentrations of both hormones, as described (18, 19). The actions of aldosterone and ANG II are followed during the three days after changing from high sodium (HS, 150 mM NaCl in drinking water) to a low sodium diet (LS, 150 μ M NaCl). To study the transport and permeability properties of the crypt wall the following variables were observed: Na^+ accumulation in the pericryptal space, dextran permeability across the crypt wall, the electrical variables, transmural potential difference (PD), short-circuit current (Isc) and transepithelial electrical resistance (TER) in the presence or absence of amiloride, and expression of ENaC in colonocytes. Myofibroblast growth was studied by the tissue growth factor β receptor (TGF β r) and ANG II type 1 receptor (ATr1) expression, E- and OB-cadherin expression, ACE activity, α -SMA and claudin IV expression and collagen IV production. To corroborate that each hormone is active, separate groups of animals received the ACE inhibitor, captopril; the angiotensin II receptor type I inhibitor, losartan; or the aldosterone antagonist, spironolactone.

Our results showed that aldosterone alone reproduced all the typical effects of a LS diet in the distal colon, without angiotensin II present and independent of salt intake. Aldosterone infusion decreased crypt wall permeability to dextran (Fig. 2) and increased Na^+ accumulation in the pericryptal sheath (Fig. 1) and raised the expression of ENaC in colonocytes (Fig. 3). Increases in PD, Isc and TER were observed with aldosterone perfusion (18). The aldosterone-sensitive decrease in crypt wall permeability to dextran correlates with the aldosterone-dependent increase in TER and these changes relate to the increased Na^+ accumulation in the pericryptal space as Na^+ accumulates in part because its leakage across the crypt wall is diminished. In contrast, angiotensin II perfusion had no effect on these electrical variables and increased dextran permeability across the crypt wall (18). The ANG II-dependent rise in dextran permeability may possibly result from ANG II-dependent activation of adrenomedullin, which in turn is known to activate matrix metalloproteinases, thereby causing breakdown of the

extracellular matrix (20) and hence increased leakage of dextran across the crypt wall and a reduced TER.

Increased pericryptal sheath growth, relating to pericryptal sheath myofibroblasts was observed within 3 days of LS diet. We studied the separate roles of aldosterone and ANG II on the myofibroblast growth, expression of α -SMA, a myofibroblast specific protein, collagen IV, an exclusive product of myofibroblasts, and claudin IV, a junctional protein that participates in epithelial barrier function and regulates paracellular permeability (21). The trophic effects of aldosterone were demonstrated in the adrenalectomized animals with aldosterone infusion, as it increased α -SMA (Fig. 3) and claudin IV expression and collagen IV production in the same extend as a LS diet, where both aldosterone and angiotensin II are present (19). Angiotensin II perfusion has no positive trophic effect on the extracellular matrix.

It has also been reported in cardiac muscle that aldosterone alone can stimulate myofibroblasts growth (22). Angiotensin II in the absence of raised aldosterone, inhibits collagen synthesis and this increases the view that angiotensin II could activate adrenomedullin, which in turn it has been demonstrated that activates collagenases in the extracellular matrix (23).

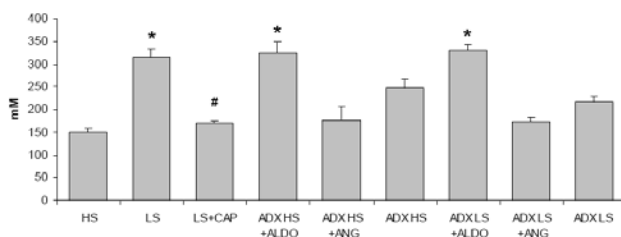


Fig. 1. Pericryptal sodium results in control and ADX groups fed HS or LS and supplemented with ALDO, ANG II or vehicle. *HS* and *LS*: control groups; *LS+CAP*: effect of captopril in a LS group. *ADX*: animals adrenalectomized and supplemented with aldosterone (*ADX+ALDO*), angiotensin II (*ADX+ANG II*) or vehicle (*ADX*). Values are mean \pm SEM (n=4-5 animals). *P < 0.05 vs HS #P < 0.05 marks captopril effect

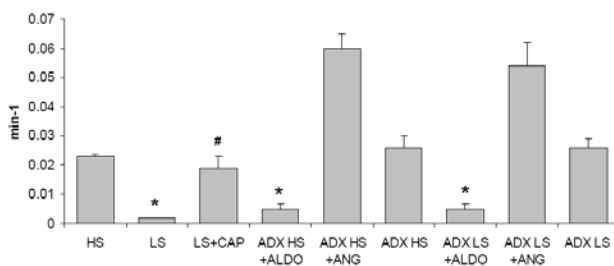


Fig. 2. Dextran permeability results in control and ADX groups fed HS or LS and supplemented with ALDO, ANG II or vehicle. *HS* and *LS*: control groups; *LS+CAP*: effect of captopril in a LS group. *ADX*: animals adrenalectomized and supplemented with aldosterone (*ADX+ALDO*), angiotensin II (*ADX+ANG II*) or vehicle (*ADX*). Values are mean \pm SEM (n=4-5 animals). *P < 0.05 vs HS #P < 0.05 marks captopril effect

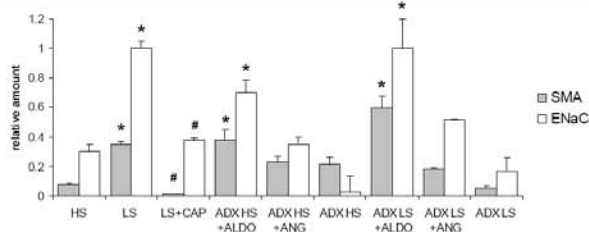


Fig. 3. Expression of α -SMA and ENaC in control and ADX groups fed HS or LS and supplemented with ALDO, ANG II or vehicle. HS and LS: control groups; LS+CAP: effect of captopril in a LS group. ADX: animals adrenalectomized and supplemented with aldosterone (ADX+ALDO), angiotensin II (ADX+ANG II) or vehicle (ADX). Values are mean \pm SEM (n=4-5 animals). *P < 0.05 vs HS #P < 0.05 marks captopril effect

CONCLUSION

It is evident from these studies that aldosterone is the primary effector of both colonic absorptive function and of the trophic response of pericryptal myofibroblasts to LS. ANG II has no direct effect on these functions. Aldosterone not only induces the proteins which control transcellular Na^+ transport, but also the junctional proteins necessary to maintain vectorial transport across epithelia; without which, neither net fluid, nor electrolyte flow can exist. The aldosterone effect on myofibroblasts may result from a direct genomic response on adhesion molecule expression between adjacent colonocytes and between the colonocytes and the myofibroblasts adhering to the colonocytes basal membranes. Alternatively the myofibroblast growth may be an indirect response related to stretch, resulting from enhanced fluid absorption distending the pericryptal space between the myofibroblasts and basal membranes of the colonocytes and the lateral intercellular spaces, as has been observed with myofibroblasts in culture (24). Although our results unequivocally show that aldosterone is the key hormone in colonic permeability and pericryptal myofibroblasts growth, further work is required to establish possible synergisms between aldosterone and other factors implicated in sodium and water homeostasis, such as vasopressin.

This work was supported by projects BFI2003-05124 (Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain) and 2001SGR0124 (Generalitat de Catalunya, Spain) and the Wellcome Trust, UK. Esther Cristià was recipient of a grant from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

REFERENCES

1. Naftalin RJ, Pedley KC. Regional crypt function in rat large intestine in relation to fluid absorption and growth of the pericryptal sheath. *J Physiol* 1999; 514:211-227.
2. Danjo Y, Gipson IK. Actin 'purse string' filaments are anchored by E-cadherin-mediated adherens junctions at the

3. Gabbiani G, Badonnel MC. Contractile events during inflammation. *Agents Actions* 1976; 6:277-280.
4. Taliana L, Benezra M, Greenberg RS, et al. ZO-1: amellipodial localization in a corneal fibroblast wound model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:96-103.
5. Peart WS. The renin-angiotensin system: a history and review of the rennin-angiotensin system. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1969; 173:317-325.
6. Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure and regulation. *Physiol Rev* 1997; 77:359-396.
7. Thiagarajah JR, Pedley KC, Naftalin RJ. Evidence of amiloride-sensitive fluid absorption in rat descending colonic crypts from fluorescence recovery of FITC-labeled dextran after photobleaching. *J Physiol* 2001; 536:541-553.
8. Thiagarajah JR, Griffiths NM, Pedley KC, et al. Evidence for modulation of pericryptal sheath myofibroblasts in rat descending colon by transforming growth factor b and angiotensin II. *Gastroenterology* 2002; 2:4-15.
9. Naftalin RJ. Alterations in colonic barrier function caused by a low sodium diet or ionizing radiation. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2004; 23:79-97.
10. Lombèd M, Alfaidy N, Eugene E, et al. Prerequisite for cardiac aldosterone action. *Circulation* 1995; 92:175-182.
11. Zannad F, Alla F, Dousset B, et al. Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldosterone evaluation study (RALES). *Circulation* 2000; 102:2700-2706.
12. Falkenhahn M, Franke F, Bohle RM, et al. Cellular distribution of angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction. *Hypertension* 1995; 25:219-226.
13. Mezzano SA, Aros CA, Droguett A, et al. Renal angiotensin II up-regulation and myofibroblasts activation in human membranous nephropathy. *Kidney Int* 2003; Suppl 86:39-45.
14. Sun Y, Ramirez FJ, Weber KT. Fibrosis of atria and great vessels in response to angiotensin II or aldosterone infusion. *Cardiovasc Res* 1997; 35:138-147.
15. Campbell SE, Janicki JS, Weber KT. Temporal differences in fibroblast proliferation and phenotype expression in response to chronic administration of angiotensin II or aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:1545-1560.
16. Campbell SE, Katwa LC. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:1947-1958.
17. Soberman J, Chafin CC, Weber KT. Aldosterone antagonists in congestive heart failure. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3:1024-1028.
18. Moretó M, Cristià E, Pérez-Bosque A, et al. Aldosterone reduces crypt colon permeability during low-sodium adaptation. *J Membrane Biol* 2005; 206:43-51.
19. Cristià E, Afzal-Ahmed I, Pérez-Bosque A, et al. Pericryptal myofibroblast growth in rat descending colon induced by low-sodium diets is mediated by aldosterone and not by angiotensin II. *J Membrane Biol* 2005; 206:53-59.
20. Tsuruda, T., Kato, J., Cao, et al. Adrenomedullin induces matrix metalloproteinase-2 activity in rat aortic adventitial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325:80-84.

22. Funder JW. Mineralcorticoids and cardiac fibrosis: the decade in review. *Uni Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28:1002-1006.
23. Mishima K, Kato J, Kuwasako K, et al. Angiotensin II modulates gene expression of adrenomedullin receptor components in rat cardiomyocytes. *Life Sci* 2003; 73:1629-1635.
24. Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* 2003; 13:264-269.