

Modulación de la abundancia de acuaporinas 2 en el riñón de la rata: efecto del óxido nítrico durante el estado hipovolémico

ANDREA FELLET¹, NOELIA ARRECHE¹, MARGARITA LÓPEZ², JUAN LÓPEZ-COSTA², CRISTINA ARRANZ¹, ANA MARÍA BALASZCZUK¹

Recibido: 03/09/2007

Aceptado: 19/09/2007

Dirección para separatas:

Dra. Andrea L. Fellet
Departamento de Fisiología
Facultad de Farmacia y
Bioquímica
Universidad de Buenos Aires
Junín 956 - Piso 7
(C1113AAD) Buenos Aires,
Argentina
Tel. y fax: +(54-11) 4964-8280
e-mail: afellet@ffyb.uba.ar

RESUMEN

Hemos demostrado que el shock hemorrágico induce un incremento en la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa, isoforma específica y dependiente del tiempo. Dicha activación estaría involucrada en la modulación de la función cardiovascular. Parecería que la inhibición del sistema del óxido nítrico previene el aumento de la frecuencia cardíaca que se observa en las fases tardías del estado hipovolémico inducido por una pérdida aguda de sangre. En este estudio planteamos la hipótesis de que la inhibición del sistema del óxido nítrico altera la expresión y/o la localización de las acuaporinas 2 en los túbulos colectores renales de ratas sometidas a una hemorragia. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho, divididas en cuatro grupos (n = 15 por grupo): a) normotensas (grupo N), b) hipovolémicas (hemorragia 20% volemia) (grupo H), c) normotensas y tratadas con N^G-nitro-L-arginina metil éster (grupo L-NAME N) y d) hipovolémicas y tratadas con el inhibidor (grupo L-NAME H). La distribución y la expresión de las acuaporinas 2 se determinaron mediante análisis inmunohistoquímico y Western blot a los 120 minutos del sangrado. La hemorragia indujo un incremento en la expresión de las acuaporinas 2 a los 120 minutos del sangrado. La inmunolocalización mostró que las acuaporinas 2 se ubicaron en el citoplasma de las células principales de los túbulos colectores renales de las ratas sometidas a hemorragia. La inhibición del óxido nítrico aumentó los niveles de acuaporinas 2, principalmente en la membrana apical. Se demuestra así que el sistema del óxido nítrico estaría asociado con una disminución progresiva de la expresión de las acuaporinas 2 que contribuye a la alteración de la capacidad de concentración de la orina en respuesta al shock hemorrágico.

REV ARGENT CARDIOL 2008;76:35-41.

Palabras clave > Hemorragia - Óxido nítrico - Acuaporinas - Balance hídrico

Abreviaturas >

AQP2 Acuaporina 2	L-NAME N ^G -nitro-L-arginina metil éster
AQPs Acuaporinas	nNOS Óxido nítrico sintetasa neuronal
eNOS Óxido nítrico sintetasa endotelial	NO Óxido nítrico
FC Frecuencia cardíaca	PAM Presión arterial media
iNOS Óxido nítrico sintetasa inducible	

ANTECEDENTES

A pesar de que el óxido nítrico (NO) fue reconocido en principio como un mediador de la función vascular, actualmente se concibe como uno de los factores involucrados en la concentración urinaria renal. (1) Sin embargo, se comienza a comprender los mecanismos mediante los cuales el NO regula los canales de agua para la concentración urinaria luego del estado hipovolémico agudo inducido por la hemorragia. (2) Además, una cantidad considerable de trabajos han demostrado que los canales de agua acuaporinas

(AQPs) son importantes para la concentración urinaria y la homeostasis en diferentes modelos experimentales. (3, 4) La vasopresina facilita la reabsorción del agua en las células principales de los túbulos colectores renales mediante la activación del receptor de vasopresina V2 y la subsiguiente translocación de los canales de agua (acuaporina 2, AQP2) desde las vesículas intracelulares a la membrana plasmática. (5)

Nuestra hipótesis es que la producción de NO inducida por shock hemorrágico está asociada con una expresión alterada de la AQP2 renal, que tiene un papel importante en el desarrollo de la alteración del

Estudio realizado con la subvención B022 de la Universidad de Buenos Aires y el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) mediante el programa IQUIMEFA.

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina

² Instituto de Biología y Neurociencia, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina

balance acuoso que sigue a la pérdida de sangre. Por lo tanto, examinamos si la inhibición del sistema NO induce cambios en la expresión y/o la localización del túbulo colector de AQP2 en la médula interna de ratas anestesiadas sujetas a hemorragia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo con ratas macho Sprague-Dawley de 2 meses de edad. Las ratas se alojaron en jaulas separadas dentro de una habitación con temperatura controlada y un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h. La alimentación se realizó con alimento estándar para ratas y agua potable a voluntad. Los animales fueron atendidos conforme a la Guía para el Uso y Cuidados de Animales de Laboratorio del Ministerio de Salud de los Estados Unidos (Guide for the Human Care and Use of Laboratory, Animals, National Research Council, National Institutes of Health, Publication No. 86-23, Washington, DC, 1985).

Preparación de los animales

Todas las ratas fueron anestesiadas con uretano (1,0 g/kg, ip) y mantenidas bajo anestesia mediante pequeñas dosis de uretano durante el experimento. Las ratas fueron colocadas sobre una mesa con control termostático de calor. Se controló la temperatura corporal con un termómetro rectal y se mantuvo entre 36 °C y 38 °C. Se realizó una traqueotomía con el empleo de tubos de polietileno (PE-240) a fin de asegurar la entrada de aire. Se midió la presión arterial a través de una cánula insertada en la arteria femoral derecha conectada a un transductor de presión (Statham P23 ID, Gould Inst. Cleveland, OH) y se registró mediante un polígrafo (Physiograph E & M Co, Houston, TX). Para la adquisición de datos se empleó el programa Labtech Notebook (Laboratory Tech., Wilmington, MD). La presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardíaca (FC) se registraron en forma continua durante todo el experimento. Se introdujo una cánula en la vena femoral derecha para la infusión de L-NAME - N-nitro-L-arginina-metil éster (1 mg/kg IV seguido de 0,5 mg/kg.h IV = 100 µl/h) (6) y una cánula en la arteria femoral izquierda para facilitar la extracción de sangre. Empleamos una dosis no hipertensiva de L-NAME debido a que no quisimos modificar la presión sanguínea mediante la inhibición de la sintetasa del NO antes de la extracción y de esa forma poder evaluar los efectos de la pérdida de sangre. El shock hemorrágico fue inducido mediante la extracción del 20% del volumen total de sangre a una tasa constante desde la arteria femoral durante 2 minutos. La extracción del volumen se estandarizó individualmente respecto del peso de las ratas a fin de producir un nivel constante de sangrado del 20% del volumen calculado de sangre total.

Protocolos experimentales

Se emplearon cuatro grupos experimentales para el estudio:

- 1) *Ratas normotensas* (N): luego de un período de estabilización de 30 minutos, se midieron los valores basales de PAM durante 5 minutos. De allí en adelante, se registraron continuamente los valores de PAM y FC durante 120 minutos (n = 15).
- 2) *Efecto de L-NAME en ratas normotensas* (L-NAME N): luego de un período de estabilización de 30 minutos, se inició la infusión de L-NAME previa medición de los valores de PAM y FC. *A posteriori* se registraron continuamente los valores de PAM y FC durante 120 minutos (n = 15).

- 3) *Ratas hipovolémicas* (H): luego de un período de estabilización de 30 minutos, se midieron los valores de PAM y FC durante 5 minutos y las ratas fueron sujetas a hemorragia arterial. *A posteriori* se registraron continuamente los valores de PAM y FC durante 120 minutos (n = 15).
- 4) *Efecto de L-NAME durante la hipotensión hemorrágica* (L-NAME H): luego de un período de estabilización de 30 minutos, se inició la infusión de L-NAME después de medir los valores basales de PAM y FC y la hemorragia se provocó 10 minutos luego de haber comenzado la infusión de L-NAME. *A posteriori* se registraron continuamente los valores de PAM y FC durante 120 minutos (n = 15).

Análisis de Western blot

A los fines de determinar el efecto del estado hipovolémico en los niveles de proteína AQP2, se aislaron los riñones frescos de todos los grupos experimentales. Todas las ratas fueron sacrificadas por decapitación 120 minutos posteriores al sangrado. De esta manera, se diseccionó la médula interna de cada riñón, se cortó en finas rodajas y se homogeneizó sobre hielo con un Tissue Tearor (Biospec Products Inc) en *buffer* de homogeneización (Cocktail de Roche Diagnostics de 50 mmol/L Tris, 0,1 mmol/L EDTA, 0,1 mmol/L EGTA, 1% Triton, 1 mmol/L PMSF, 1 µmol/L pepstatina, 2 µmol/L leupeptina, 1x inhibidor de proteasa). La concentración proteica en el sobrenadante soluble en Triton se determinó mediante la técnica de Lowry.

Expresión de la proteína AQP2

Se separaron muestras de proteína en cantidades iguales (100 µg) en 7,5% SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, Munchen, Alemania), seguido de una incubación primaria con anticuerpo policlonal de conejo anti-AQP2 (dilución 1:500) y una inmunorreacción secundaria con anticuerpo de cabra anticonejo conjugado a peroxidasa de rábano (dilución 1:5.000). Las muestras fueron reveladas mediante quimioluminiscencia empleando reagente ECL durante 2-4 minutos. La densidad de las respectivas bandas se cuantificó mediante evaluación densitométrica de los Western blots con un escáner Hewlett-Packard, una *software* Totallab analyser (Biodynamics Corp., Seattle, WA) y se estimaron las cantidades de proteína en comparación con los valores estándares correspondientes. Los niveles de proteína se expresaron como un porcentaje de las densidades ópticas de las bandas de AQP2 y de la banda de β-actina para controlar cualquier inexactitud en la carga de proteína.

Estudio inmunohistoquímico

Para el estudio inmunohistoquímico, el tejido renal de todos los grupos de animales fue fijado por perfusión intercardíaca con una solución que contenía paraformaldehído 4% en un *buffer* fosfato de 0,1 M a 4 °C. Se extrajeron los riñones, se cortaron y posteriormente se fijaron durante una noche en la misma solución fijadora y posteriormente se lavaron exhaustivamente. Los bloques renales fueron infiltrados durante una noche en sucrosa al 30% y congelados a -80 °C. Se obtuvieron/realizaron cortes criostáticos (espesor: 16 µm) con un crióstato Leitz y se colocaron sobre portaobjetos recubiertos con gelatina. Las secciones de la médula interna se preincubaron en 10% de suero normal de cabra en PBS durante 60 min, se incubaron en anticuerpo policlonal de conejo AQP2 (dilución 1:1.000) a 4 °C durante una noche. Luego de tres lavados con PBS de 10 min cada uno, los portaobjetos se incubaron en anticonejo IgG marcado con rodamina (dilución 1:50) a 37 °C durante 60 minu-

tos. Posteriormente, los cortes se lavaron tres veces en PBS (10 minutos c/u) y se montaron en solución de PBS/glicerol (3/1 vol/vol) antes de la observación con microscopio de fluorescencia y confocal (Olympus Van OX).

Materiales

Se emplearon anticuerpos contra anti AQP2 de Sigma-Aldrich y anti β -actina de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El sistema de detección Western blot y las membranas Hybond-ECL de Amersham Pharmacia Biotech. Biochemicals de Sigma Chemical Co (Saint Louis, MO).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm SEM. Se empleó el análisis de la varianza seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se usó la prueba de la *t* de Student para evaluar las comparaciones entre los dos grupos. El nivel de probabilidad del 5% se empleó como criterio de significancia. Para el análisis estadístico se usó el *software* Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Cambios en la presión arterial sistémica durante el shock hemorrágico y luego de él

Las mediciones de la PAM basal (mm Hg) y la FC (lpm) no fueron significativamente distintas entre los cua-

tro grupos de ratas: N = 89 ± 4 ; 332 ± 7 ; L-NAME N = 94 ± 5 ; 326 ± 8 ; H = 90 ± 5 ; 322 ± 6 ; L-NAME H = 93 ± 6 ; 328 ± 10 ($p = ns$). La Figura 1 (paneles A, B, C y D) ilustra el curso del tiempo de la PAM en los cuatro grupos de ratas. El primero de los puntos en cada gráfico representa los valores basales para cada grupo. La infusión L-NAME no afectó significativamente la PAM en los animales normotensos en comparación con los valores basales. La hemorragia indujo una disminución pronunciada en la PAM en el grupo H, la cual alcanzó un valor de 27 ± 3 mm Hg a los 5 min posteriores al período de sangrado ($p < 0,001$ versus valores basales), con la consiguiente estabilización en alrededor de 50 ± 5 mm Hg a los 15 min ($p < 0,01$ versus valores basales). Esta hipotensión se mantuvo durante todo el curso del experimento. La infusión de L-NAME no atenuó la hipotensión inmediata inducida por hemorragia. La presión sanguínea en este grupo fue de 36 mm Hg ($p < 0,01$ versus valores basales y versus el grupo H al mismo tiempo) a los 5 min de hemorragia, elevándose a 87 ± 3 ($p = ns$ versus valores basales, $p < 0,01$ versus grupo H al mismo tiempo), 104 ± 4 ($p < 0,01$ versus valores basales, $p < 0,01$ versus grupo H al mismo tiempo) y $106 \pm$

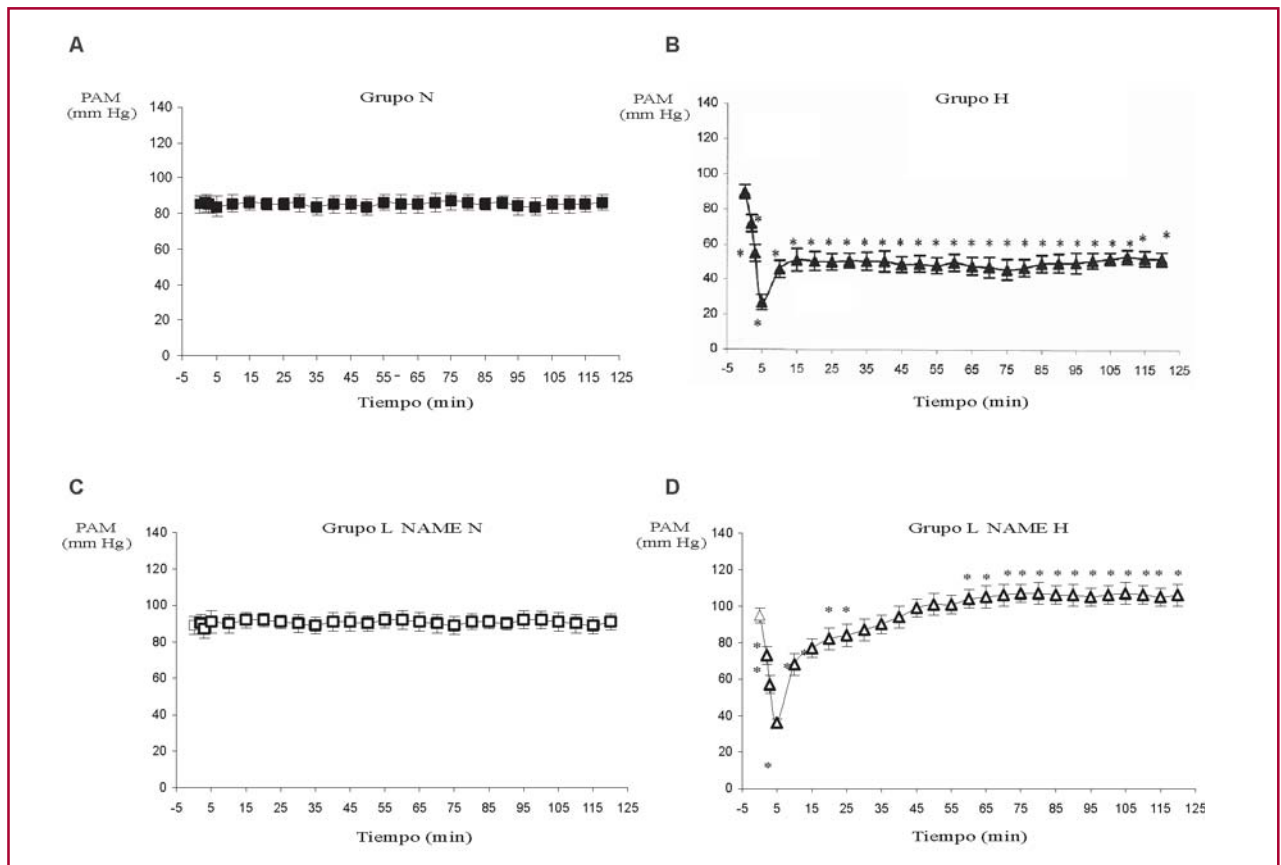


Fig. 1. Efecto del L-NAME sobre la PAM en ratas normotensas (N) e hipovolémicas (H) (paneles A, B, C y D). ■ Grupo N; ▲ Grupo H; □ Grupo L-NAME N; ▲ Grupo L-NAME H. El punto son valores medios (las barras de error representan el SEM) ($n = 14$ por grupo). * $p < 0,05$ versus basal.

2 mm Hg ($p < 0,01$ versus valores basales, $p < 0,01$ versus grupo H al mismo tiempo) durante 30, 60 y 120 min, respectivamente, a continuación del sangrado.

La Figura 2 (paneles A, B, C y D) ilustra el curso de tiempo para la FC en los cuatro grupos de ratas. La hemorragia, luego de la respuesta refleja, dio por resultado un breve descenso de la FC en el primer estadio seguido de un incremento gradual a los 60 y 120 min (FC basal = 322 ± 6 ; FC 60 min = $352 \pm 7^*$; FC 120 min = $382 \pm 6^*$ [$*p < 0,01$ versus valores basales]). La infusión de L-NAME mitigó la respuesta cronotrópica inducida por la hemorragia (FC basal = 328 ± 10 , FC 60 min = 334 ± 15 , FC 120 min = 335 ± 17).

Análisis por Western blot

La Figura 3 ilustra un análisis Western blot representativo de la médula interior de todos los grupos de animales. Los histogramas que acompañan ilustran el porcentaje (%) de las densidades de las bandas de AQP2:β-actina para estos grupos. El pretratamiento de las ratas normotensas con L-NAME incrementó los niveles de AQP2 en los animales jóvenes. La hemo-

rragia incrementó la expresión de AQP2 en el grupo de 2 meses de edad (100%) en comparación con el grupo N. La inhibición del sistema de NO incrementó los efectos inducidos por la hemorragia sobre la expresión del canal de agua en ratas jóvenes (64%).

Localización celular de AQP2

El estudio inmunohistoquímico del riñón de rata mostró que la tinción de AQP2 estaba localizada en las células del túbulo colector de la médula interna (Figura 4). El estudio inmunohistoquímico con anticuerpo AQP2 mostró que la tinción de AQP2 estaba localizada en las membranas apicales y en el citoplasma de las células del túbulo colector en las ratas jóvenes normotensas. La administración de L-NAME incrementó la localización de AQP2 en el lado apical de las células del túbulo colector en animales jóvenes. Además, la pérdida de sangre incrementó la inmunomarcación de los canales de agua AQP2 en las vesículas distribuidas en todo el citoplasma de las ratas jóvenes. La proteína AQP2 también se encontró en la membrana apical a los 120 minutos de sangrado. Incluso, el pretratamiento con L-NAME incrementó la

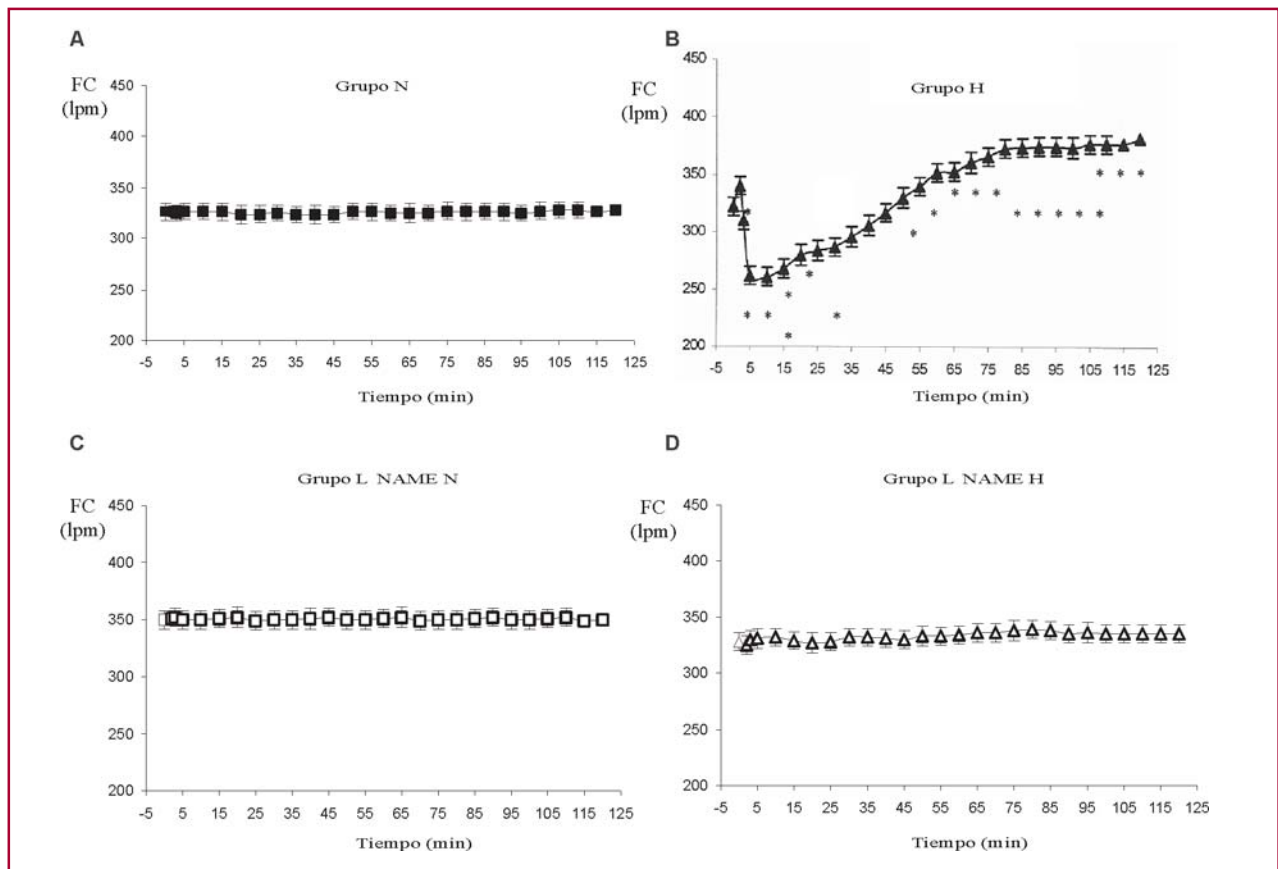


Fig. 2. Efecto de L-NAME sobre la FC en ratas normotensas (N) e hipovolémicas (H) (paneles A, B, C y D). ■ Grupo N; ▲ Grupo H; □ Grupo L-NAME N; ▲ Grupo L-NAME H. El punto son valores medios (las barras de error representan el SEM) (n = 14 por grupo). * $p < 0,05$ versus basal.

marcación de AQP2 inducida por hemorragia. El grupo H con L-NAME mostró un área inmunorreactiva localizada principalmente en la región apical de las células principales. Estos hallazgos se encuentran en consonancia con los resultados del Western blot que se muestran en la Figura 3.

DISCUSIÓN

En el presente estudio examinamos los efectos de la inhibición de la NOS sobre la expresión de AQP2 renal en ratas anestesiadas luego de hemorragia aguda. Los valores basales de PAM fueron similares en todos los grupos experimentales de animales al inicio de los experimentos, por lo que reflejan condiciones hemodinámicas similares. La infusión de L-NAME no alteró la presión basal.

Además, hemos demostrado que la hemorragia generó disminución de la presión arterial dentro de los 5 minutos posteriores al sangrado con respecto a los valores basales en el grupo H (71%). El pretratamiento con L-NAME no modificó la respuesta hipotensora inducida por la pérdida de sangre en las ratas sujetas a hemorragia. Sin embargo, el tiempo de recuperación de la presión a los valores basales fue más rápido en estos animales. Estos hallazgos sugieren que la hipotensión inmediata inducida por la extracción no sería independiente del sistema NO. Por otra parte, el NO parece estar involucrado en la hipotensión mantenida luego de la pérdida de sangre. Debido a que la respuesta hemodinámica al shock

hemorrágico está relacionada con el pasaje de NO, (7, 8) fue interesante evaluar el manejo del agua en todos los grupos experimentales. Se identificaron tres tipos diferentes de NOS en el riñón: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) y NOS inducible (iNOS). (9) Es sabido que el NO es un regulador importante de la hemodinamia renal y que también que está involucrado en la regulación del sodio y el manejo del agua. (10) La permeabilidad de agua inducida por vasopresina así como la transubicación de la AQP2 desde las vesículas intracelulares a la membrana plasmática apical en las células principales del túbulo colector está bien caracterizada en el túbulo colector medular interno. (11) Se desconoce si el NO se halla involucrado en los cambios de la expresión de AQP2 de ratas en respuesta al estado hipovolémico. La inmunohistoquímica con anticuerpo AQP2 mostró que la tinción de AQP2 estaba localizada en las membranas apicales y el citoplasma de las células del túbulo colector en ratas normotensas. En este estudio mostramos que la inhibición del sistema NO incrementó la expresión de los canales de AQP2 que se encontraban localizados principalmente en el lado apical de las células del túbulo colector en animales normotensos.

La alteración del pasaje de NO modifica los niveles de proteína de los canales de agua y es una causa probable de alteración en la homeostasis del agua que se informó con una condición de la depleción del agua. Los cambios en la producción de NO en esta condición experimental se informaron como un factor contribuyente a la función renal alterada y al balance acuoso. (12)

Además, el análisis de Western blot demostró una acentuada sobreexpresión de la expresión de AQP2 a los 120 minutos de la hemorragia en las ratas anestesiadas. Las técnicas de inmunolocalización mostraron que los canales AQP2 estaban ubicados en el citoplasma de las células principales de los túbulos colectores internos de los animales sujetos a hemorragia. Más aún, la inhibición del sistema NO incrementó los efectos inducidos por hemorragia sobre los niveles de proteína AQP2 en las ratas. La inmunolocalización de AQP2 mostró que la tinción/marcación se hallaba principalmente dentro del dominio de la membrana plasmática apical. Nuestros resultados demuestran que el sistema NO está involucrado en la modulación de los niveles proteicos y el tráfico de AQP2 hacia el lado apical de las células recolectoras renales en la hipovolemia inducida por hemorragia a pesar de que se infundiera L-NAME sistémicamente.

En resumen, los datos que se presentan en este estudio brindan evidencia de que la producción de NO modula la abundancia de AQP2 y su localización en las células principales más interiores del túbulo colector en respuesta al estado hipotensor inducido por la hemorragia. La pérdida de sangre desencadenó cambios en la expresión/tráfico de AQP2 al modular la reabsorción de agua y, consecuentemente, la concentración urinaria en este modelo experimental.

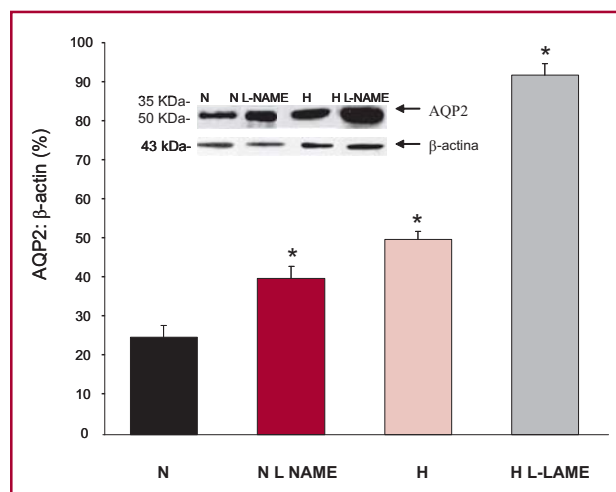


Fig. 3. Western blots representativos de AQP2 realizados sobre proteínas de la médula interna de ratas anestesiadas a los 120 minutos luego del sangrado. Los histogramas ilustran los valores medios de proteína AQP2 para cada grupo normalizado con la expresión de β -actina proveniente de los mismos geles.

■ Grupo N ■ Grupo L-NAME ■ Grupo H ■ L-NAME H. Los datos son la media \pm SEM. $n = 5$ por grupo. * $p < 0,05$ versus grupo N. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

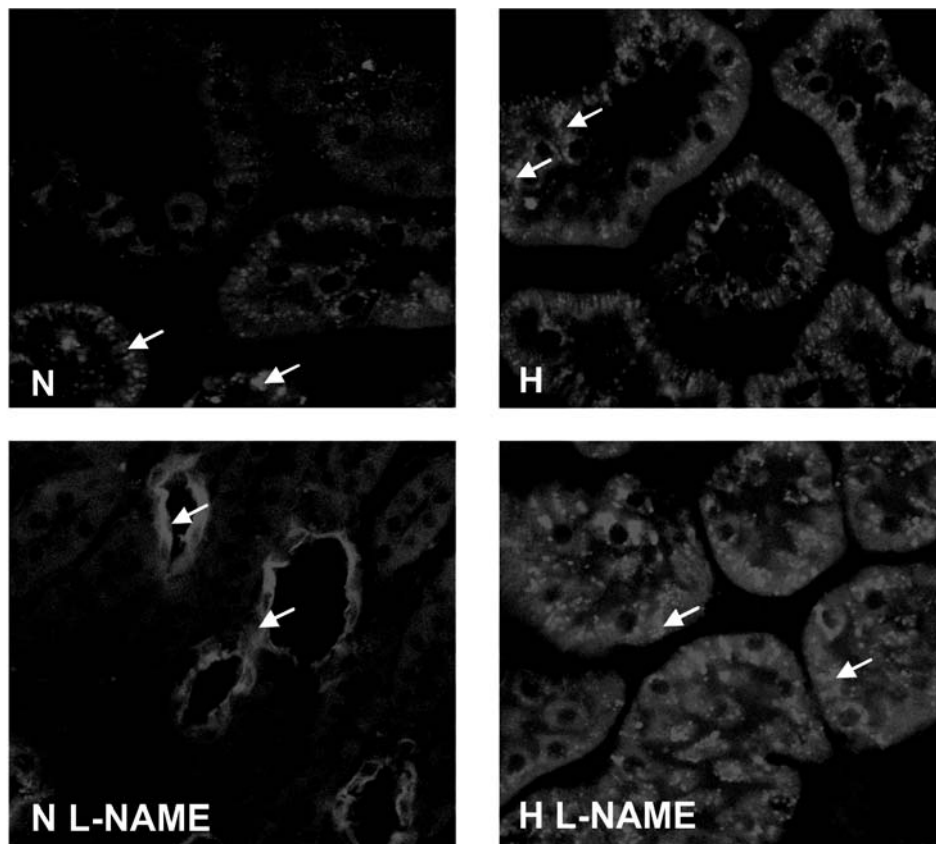


Fig. 4. Tinción por inmunofluorescencia indirecta de AQP2 en los túbulos colectores de la médula interna de ratas anestesiadas a los 120 minutos luego del sangrado (X40). Grupo N: ratas normotensas; Grupo H: ratas hipovolémicas; Grupo L-NAME N: ratas normotensas tratadas con L-NAME; Grupo L-NAME H: ratas hipovolémicas tratadas con L-NAME. n = 5 por grupo. La marcación fue confinada a la membrana plasmática apical y a las vesículas apicales (flechas).

SUMMARY

Aquaporin-2 Abundance Modulation in the Kidney of the Rat: The Effect of Nitric Oxide During the Hypovolemic State

We have previously demonstrated that hemorrhagic shock induces a time-dependent increase in the activity of nitric oxide synthase specific isoform. Such activation might be involved in modulation of cardiovascular function. It seems that the inhibition of the nitric oxide system prevents hemorrhage-induced heart rate changes seen in late stages of hypovolemic shock. The objective of this study was to assess if the inhibition of the nitric oxide system alters aquaporin-2 expression and/or location in the collecting-duct systems in kidneys of bleeding rats. Male Sprague-Dawley rats were used, divided in four groups (n = 15 for each group): a) normotensive rats (group N), b) hypovolemic rats (animals subjected to a 20% loss of the total volemia) (group H), c) normotensive rats pretreated with the nitric oxide synthase inhibitor N^G-nitro-L-arginine-methyl ester (group L-NAME N), and d) hypovolemic rats pretreated with the inhibitor (group L-NAME H). The distribution and the expression of aquaporin-2 were assessed 120 minutes after bleeding by immunohistochemical and Western blot analysis. An increase in aquaporin-2 expression was seen 120 after blood loss. Immunolocalization showed aquaporin-2 inside the cytoplasm of collecting-duct main cells in kidneys of bleeding rats. Nitric oxide inhibition increased aquaporin-2 levels, especially in the apical membrane. Thus, the nitric oxide

system might be associated with a progressive decrease in the expression of aquaporin-2 which may alter urine concentration as a response to hemorrhagic shock.

Key words > Hemorrhage - Nitric Oxide - Aquaporins - Water Balance

Agradecimientos

Este estudio contó con la subvención B022 de la Universidad de Buenos Aires y el apoyo del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) mediante el programa IQUIMEFA. Los autores desean agradecer a Patricia Arza, María Paula Da Rosa, Ana Laura Canil y Gisella Valli por su asistencia técnica y a Sandra Landín por las tareas de secretaría, todas pertenecientes a la Facultad Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

BIBLIOGRAFÍA

1. Park F, Zou AP, Cowley AW Jr. Arginine vasopressin-mediated stimulation of nitric oxide within the rat renal medulla. *Hypertension* 1998;32:896-901.
2. Brown D. The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F893-901.
3. Balaszczuk AM, Arreche ND, Mc Laughlin M, Arranz C, Fellet AL. Nitric oxide synthases are involved in the modulation of cardiovascular adaptation in hemorrhaged rats. *Vascul Pharmacol* 2006; 44:417-26.

4. Gong H, Wang W, Kwon TH, Jonassen T, Frøkiaer J, Nielsen S. Reduced renal expression of AQP2, p-AQP2 and AQP3 in haemorrhagic shock-induced acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2551-9.
5. Nielsen S, Frøkiaer J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 2002;82:205-44.
6. Minami N, Imai Y, Nishiyama H, Abe K. Role of nitric oxide in the development of vascular alpha 1-adrenoreceptor desensitization and pressure diuresis in conscious rats. *Hypertension* 1997;29:969-75.
7. Moreno C, López A, Llinás MT, Rodríguez F, López-Farré A, Nava E, et al. Changes in NOS activity and protein expression during acute and prolonged ANG II administration. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2002;282:R31-R37.
8. Fujisawa Y, Mori N, Yube K, Miyataka H, Miyatake A, Abe Y. Role of nitric oxide in regulation of renal sympathetic nerve activity during hemorrhage in conscious rats. *Am J Physiol* 1999;277:H8-14.
9. Kone BC. Localization and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney. *Semin Nephrol* 1999;19:230-41.
10. Gabbai FB. Effects of nitric oxide synthase blockers on renal function. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:10-3.
11. Marples D, Knepper MA, Christensen EI, Nielsen S. Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 1995;269:C655-64.
12. DiGiovanni SR, Nielsen S, Christensen EI, Knepper MA. Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8984-8.