

Papel de los glucocorticoides en la regulación de la actividad y la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible en células mesangiales de rata

M. Saura, M. Rodríguez Puyol*, D. Rodríguez Puyol y S. Lamas**

Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. * Departamento de Fisiología y Farmacología de la Universidad de Alcalá de Henares y ** Sección de Nefrología, Departamento de Medicina H. Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares.

RESUMEN

El óxido nítrico (NO) es un radical libre con diversas funciones como mediador biológico. Recientemente se ha descrito que las células mesangiales son capaces de expresar una isoforma inducible de la óxido nítrico sintetasa (NOS_i), enzima que cataliza la síntesis de NO a partir de la L-arginina. El papel del NO en el glomérulo podría ser importante en diversos procesos fisiopatológicos tales como la glomerulonefritis. Por tanto, la regulación de su síntesis es un problema de importancia biológica. En este trabajo se describe y analiza el efecto de un glucocorticoide, la dexametasona, sobre la síntesis de NO en células mesangiales de rata (CMR). Las células mesangiales fueron estimuladas con lipopolisacárido (LPS), factor de necrosis tumoral (TNF- α) o una combinación de ambas sustancias, lográndose una inducción de la síntesis de NO. El tratamiento con dexametasona (1 μ M) inhibió la inducción de la síntesis de NO en un 70 %. El análisis de Northern Blot mostró que la expresión del mRNA para NOS_i se inhibía significativamente en presencia de dexametasona, en concordancia con los estudios funcionales. El uso de un antagonista del receptor de los glucocorticoides (RU-486) permitió demostrar que el efecto inhibitorio de la dexametasona sobre la síntesis de NO y expresión de la NOS_i mesangial está mediado por la unión a un receptor específico. Globalmente estos resultados sugieren que la dexametasona es una herramienta útil para la inhibición de la síntesis del NO en el glomérulo y describen una vía potencial de regulación de la síntesis glomerular de NO en situaciones fisiopatológicas.

Palabras clave: **Shock séptico. Expresión génica. Dexametasona. RU-486.**

Recibido: 30-I-95.
En versión definitiva: 25-IV-95.
Aceptado: 27-IV-95.

Correspondencia: Dr. S. Lamas.
Dpto. Estructura y Función de Proteínas.
Centro de Investigaciones Biológicas /CSIC.
Velázquez, 144.
28006 Madrid.

ROLE OF GLUCOCORTICOIDS IN THE REGULATION OF THE ACTIVITY AND EXPRESSION OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE IN MESANGIAL CELLS OF RATS

SUMMARY

Nitric oxide (NO) is a ubiquitous gaseous messenger with diverse functions depending on the cell type where it is synthesized. Recently, the presence of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS) has been described in glomerular and mesangial cells, thus conferring on them the capability of synthesizing nitric oxide (NO) after stimulation with cytokines or lipopolysaccharide (LPS). The role of NO within the glomerulus seems to be important in several pathophysiological phenomena such as glomerulonephritis. Hence, regulation of its synthesis is biological significance. Here, we report and analyze the inhibitory effect on the induced synthesis of NO in rat mesangial cells (RMC) of an anti-inflammatory glucocorticoid, dexamethasone (DX). RMC were treated with LPS, tumor necrosis factor (TNF- α) or with a combination of both in order to induce NO synthesis. Treatment with DX (1 μ M) inhibited induced NO synthesis by more than 70%. Northern Blot analysis of the iNOS transcript in RMC treated with DX showed marked blunting of mRNA expression in concordance with functional studies. A glucocorticoid receptor antagonist (RU-486) significantly blunted the inhibitory effect of DX on NO synthesis and iNOS mRNA expression in RMC, thus establishing its dependence on specific receptor binding. Our results establish DX as a powerful tool for the inhibition of NO synthesis in the glomerulus and describe potential regulatory pathways for NO synthesis in pathophysiological situations.

Key Words: *Septic shock. Gene expression. Dexamethasone and RU-386.*

Introducción

El óxido nítrico (NO) es un radical libre de vida media muy corta que es producido por la oxidación enzimática de la L-arginina¹. Esta reacción es catalizada por una enzima denominada óxido nítrico sintetasa (NOS), de la que se conocen tres isoformas diferentes. Dos son constitutivas y requieren Ca^{2+} para su activación; la otra es inducible y actúa independientemente de Ca^{2+} . Las NOS constitutivas (NOS_c) han sido halladas principalmente en endotelio (NOS_e)² y cerebro (NOS_b)³. En estos tejidos el NO actúa como un mediador que induce la relajación de la musculatura lisa vascular y neurotransmisión respectivamente. La NOS inducible (NOS_i) se aisló por primera vez en macrófagos activados por endotoxina e interferón- γ ⁴ y desde entonces ha podido ser identificada en muchos tipos celulares, incluyendo hepatocitos⁵, células musculares lisas⁶ y células mesangiales^{7,8}, entre otras. El gen que codifica la NOS_i murina ha sido ya clonado⁹. Entre las acciones del NO se incluyen la regulación del tono vascular y la inhibición de la agregación plaquetaria y leucocitaria al endotelio vascular^{10,11}. El NO tiene también efectos tóxicos en patógenos y células tumorales que pueden resultar adversos para las células del huésped, produciendo fenómenos de apoptosis en los macrófagos y de daño tisular.

Las células mesangiales (CMR) son células musculares lisas modificadas dispuestas entre los capilares del glomérulo renal. Debido a su naturaleza contráctil son capaces de responder a diferentes mediadores vasoactivos variando la superficie de filtración, regulando de este modo la filtración glomerular y el tráfico de macromoléculas¹². Las células mesangiales producen NO cuando son estimuladas con lipopolisacárido y/o citoquinas, ya que poseen una isoforma inducible de NOS^{7,8}. Dada la situación estratégica de estas células en el riñón, se encuentran expuestas a una gran variedad de estímulos proinflamatorios que pueden provocar diferentes reacciones por parte de las células mesangiales, incluyendo secreción de citoquinas, prostaglandinas y factores vasoactivos, entre los que se incluye el NO¹³. Estas características facilitan la participación de estas células en el inicio y progresión de la lesión glomerular. Hay datos que apuntan a un importante papel del NO en la regulación de la función glomerular en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas como la sepsis. El síndrome del shock séptico se desencadena con la entrada de endotoxina bacteriana en la circulación sanguínea¹⁴. El mediador central de los efectos de la endotoxina no se conoce con exactitud. Recientemente se ha implicado al NO como protagonista potencial de los cambios hemodinámicos que ocurren en la sep-

sis^{15, 16}. Por lo tanto, sería importante comprender la regulación de la expresión y actividad de la NOS glomerular, ya que podría tener potenciales implicaciones clínicas en situaciones como el fallo renal asociado al shock séptico.

La síntesis de NO puede ser inhibida indirectamente por diferentes sustancias, entre las que se incluyen los glucocorticoides¹⁷ y algunos factores de crecimiento como el factor de transformación del crecimiento (TGF- β)¹⁸. Sin embargo, poco es lo que se conoce del mecanismo por el que estas sustancias regulan la expresión de la NOS. En este trabajo hemos analizado el efecto de la dexametasona, un glucocorticoide antiinflamatorio, sobre la inhibición de la NOS en células mesangiales estimuladas con lipopolisacárido (LPS), factor de necrosis tumoral (TNF- α) o LPS/TNF- α estudiando, en parte, los mecanismos por los que esto tiene lugar, correlacionándolo con la expresión del mRNA para NOS.

Material y métodos

Materiales

El factor de necrosis tumoral (rHuTNF- α , act. específica $9,8 \times 10^6$ u/mg) fue donado por Knoll Pharmaceuticals (Whippany, NJ); el medio de cultivo fue de Bio-Whittaker (Walkersville, MD); el suero de ternera fetal y los suplementos de cultivo se obtuvieron de ICN-Flow (High Wycombe, UK); el enzima Taq polimerasa fue suministrado por Promega (Southampton, UK) y los desoxinucleótidos por Gibco-BRL (Middlesex, UK); el resto de los reactivos incluyendo el lipopolisacárido E. Coli serotipo 055:B5 y la dexametasona fueron de Sigma.

Métodos

• Cultivo de células mesangiales

Las células mesangiales de rata se obtuvieron y caracterizaron, como se ha descrito previamente, basándonos en el método del tamizado diferencial^{19, 20}. Las células se usaron en cultivo primario entre los días 14 y 21 después de sembradas o en el primer pase. Fueron cultivadas en placas de 100 mm de diámetro o en placas de 6 pocillos con 5 % de CO₂ y cambiadas cada 48 horas con RPMI 1.640 suplementado con un 15 % de suero de ternera fetal, L-glutamina (1 mM), penicilina (50 U/ml) y estreptomina (50 μ g/ml). La toxicidad potencial de los reactivos utilizados sobre las células mesangiales fue ensayada mediante las técnicas de la exclusión de azul tripán y de la liberación de LDH al medio de cultivo, no encontrando toxicidad significativa con ninguno de los reactivos.

• Determinación de NO₂⁻

El día del experimento, las células se lavaron dos veces con RPMI sin rojo fenol, debido a que este compuesto podría interferir con la medida de los NO₂⁻, y se dejaron en su medio habitual con la excepción del suero y del rojo fenol. La concentración de L-arginina habitualmente presente en el medio de cultivo (0,9 mM) no fue variada. Las células fueron incubadas con los reactivos que se describen para cada experimento; al final de cada uno de ellos, los sobrenadantes se recogieron para determinar en ellos la cantidad de NO₂⁻. Este procedimiento está basado en la reacción de Griess²¹. Los nitritos representan un estado de oxidación más avanzado y estable que el NO y, por tanto, la determinación de los mismos es un reflejo de la síntesis de NO. Para llevar a cabo la medida se mezclaron 200 μ l del sobrenadante del cultivo con un volumen igual del reactivo de Griess (0,1 % N-(1-naftil)etilendiamina en agua; 1 % de sulfanilamida en 5 % de ácido fosfórico, 1:1). Después de un período de incubación de 10 minutos las absorbancias se midieron a una longitud de onda de 540 nm. La concentración de NO₂⁻ se valoró usando nitrito sódico como estándar. Se usaron como blanco muestras de RPMI que no habían estado expuestas a células mesangiales y los valores obtenidos se restaron a los determinados en los sobrenadantes de cada condición experimental.

• Aislamiento de mRNA y análisis de Northern Blot

El RNA total de cada muestra se aisló siguiendo el método del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo²². Para el análisis de Northern Blot, 10 μ g de cada muestra de RNA fueron sometidos a electroforesis en un gel al 1 % de agarosa que contenía 0,66 M de formaldehído, transfiriéndose posteriormente a membranas de nylon (Hybond N, Amersham, UK). El RNA se inmovilizó por UV antes de la hibridación. Las sondas utilizadas en todos los experimentos fueron marcadas con [α -³²P]dCTP usando el Random Primed Labelling Kit (Boehringer Mannheim, Alemania). Debido a que las hibridaciones iniciales llevadas a cabo con la longitud total de la sonda de cDNA de iNOS de macrófago murino (MAC-NOS)²³, generosamente cedida por los Dres. Lowenstein y Snyder, dieron como resultado una señal de escasa calidad, se utilizó como sonda un fragmento de 700 pares de bases (pb) obtenido por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (ver más adelante). Este fragmento se usó como sonda en los ensayos de Northern Blot. Las hibridaciones se realizaron a 42° C durante 12-16 h., al cabo de las cuales las membranas se lavaron con unas condiciones finales de $0,2 \times$ SSC/0,1 % SDS. Posteriormente se expusieron a peli-

cula de autorradiografía (Kodak XAR) usando dobles pantallas intensificadoras. Para corregir las deficiencias de carga y comprobar que las diferencias en la expresión del mRNA eran específicas para NOS β , cada blot se rehibridó con una sonda de β -actina de rata²⁴. Los análisis densitométricos se efectuaron en un escáner Apple usando un programa de análisis de imagen de dominio público (Image.1.3, NIH, Bethesda, MD). Los resultados finales fueron expresados en unidades arbitrarias como el cociente de la expresión NOS β / β -actina.

- Preparación de una sonda de cDNA de NOS

Para la síntesis de un fragmento de cDNA del gen de NOS β se llevó a cabo la preparación del plásmido recombinante que contiene toda la secuencia del cDNA de NOS β murino (MAC-NOS), y mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa se obtuvo un fragmento de 700 pb. La secuencia de oligonucleótidos utilizada fue: sentido 5'->3':5' GAG AGA TCC GAT TTA GAG TCT 3'; sentido 3'->5':5' GCA GAT TCT GCT GGG ATT TCA 3'. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 94° C 3 min, seguido de 30 ciclos con las siguientes etapas: 94° C 30 segundos, 55° C 30 seg. y 72° C 30 seg. Para excluir la posibilidad de contaminación se realizó Southern Blot usando como sonda MAC-NOS. Esta hibridación se realizó durante 16-24 h. a 65° C y los lavados se realizaron todos a 65° C, terminando con unas condiciones finales de 0,1 \times SSC/0,1 % SDS.

- Análisis estadístico

Cada experimento se llevó a cabo al menos tres veces con duplicados dentro de cada condición. Las comparaciones se efectuaron mediante el análisis de la varianza seguida de la modificación de Dunnett de la t de Student cuando existía un control común y mediante el test de Student de dos colas no pareado para otras comparaciones. El nivel de significación fue definido como $p < 0,05$. Cuando el número de datos no era suficiente se utilizaron test no paramétricos (Kruskal-Wallis).

Resultados

Efectos del LPS y TNF- α sobre la actividad de la NOS β en células mesangiales de rata

Se ha demostrado que tanto el lipopolisacárido como el factor de necrosis tumoral estimulan la producción de NO en células mesangiales, aunque en especies diferentes. Por ello, nosotros exploramos el

efecto de estas sustancias de forma aislada o en combinación sobre las células mesangiales de rata (CMR). Se llevaron a cabo experimentos de dosis-respuesta, determinándose como dosis más efectivas 10 μ g/ml para el LPS y 100 ng/ml para el TNF- α (datos no mostrados) y así fueron seleccionadas para llevar a cabo el resto de los experimentos. La **figura 1A** muestra los efectos del LPS y del TNF- α sobre la síntesis de NO, representado como el nivel de NO $_2^-$ en el medio de incubación de las CMR. Ambos compuestos fueron capaces de estimular la síntesis de NO significativamente. El LPS (10 μ g/ml, 8 h.) induce la síntesis de NO aproximadamente 2-4 veces; el TNF- α (100 ng/ml, 8 h.), 2-3 veces, y la combinación de ambos mostró un aumento de 3-6 veces. La **figura 1B** muestra como la combinación de LPS + TNF- α (L/T) a las concentraciones citadas produjo un incremento en la producción de NO $_2^-$ sobre el control (CT) de forma dependiente del tiempo. Aunque después de 4 h. de tratamiento con L/T aparecía ya un significativo aumento en la cantidad de NO $_2^-$ cuando se comparaba con el control, se alcanzó un máximo a las 8 h. del tratamiento, no encontrándose un incremento significativo en la cantidad de NO $_2^-$ producido tras 24 h. de incubación con L/T. De esta forma se seleccionó el tiempo de 8 h. como el período de estimulación con L/T para los experimentos que conciernen a la regulación de la síntesis de NO y la expresión de iNOS.

La incubación de las células estimuladas (LPS, 10 μ g/ml + TNF- α , 100 ng/ml, 8 h.) con dos antagonistas diferentes de la NOS, el L-NMA (N G -Metil-L-Arginina 500 μ M, 8h) y L-NNA (N ω -Metil-L-Arginina 500 μ M, 8h), en experimentos separados consiguió inhibir completamente la inducción provocada por LPS + TNF- α (**tabla I**). Este dato identifica, por tanto, los NO $_2^-$ determinados como procedentes de la oxidación del NO sintetizado por la acción de la NOS sobre la L-arginina.

Efectos de la dexametasona (DX) sobre la producción de NO $_2^-$ por CMR estimuladas con LPS, TNF- α o LPS + TNF- α

Para estudiar los efectos de la dexametasona (DX) sobre la síntesis de NO, las células mesangiales estimuladas con LPS, TNF α , o la combinación de ambos fueron tratadas con DX. En la **figura 2** se muestra como la dexametasona (10 $^{-6}$ M, 8 h) es capaz de reducir la producción de NO $_2^-$ a la mitad en CMR estimuladas con LPS (10 μ g/ml, 8h); con el TNF- α (100 ng/ml,8h) se obtuvo una disminución de proporciones similares y ésta fue mucho más acusada (60-70 %) cuando se estimuló con la combinación de LPS + TNF- α .

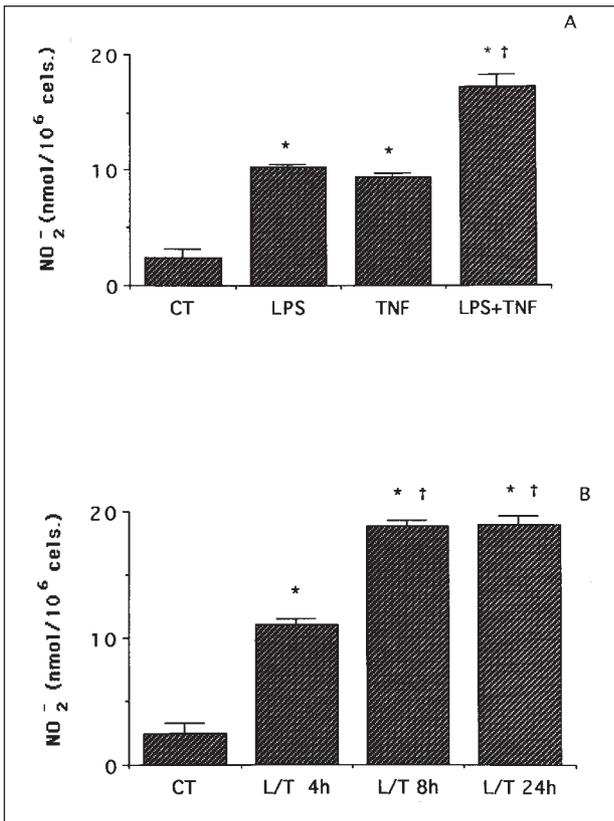


Fig. 1.—Efecto del LPS, TNF- α y LPS + TNF- α sobre la actividad de la NOSi en CMR. A) Las células mesangiales de rata fueron incubadas con el vehículo (CT), LPS (10 μ g/ml, 8 h), TNF- α (100 ng/ml, 8 h) o la combinación de ambos a las dosis indicadas (8 h). Las columnas representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado, * p < 0,05 vs. CT, † p < 0,05 vs. LPS y TNF. B) Las CMR fueron incubadas con el vehículo (CT) y LPS (10 μ g/ml, 8 h)+ TNF- α (100 ng/ml, 8 h) (L/T) durante los períodos citados de tiempo. Los niveles de NO₂⁻ fueron medidos como se describe en Material y Métodos. Las columnas representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado, * p < 0,05 vs. CT, † p < 0,05 vs. L/T 4 h.

Efectos de la DX sobre la expresión del mRNA de NOSi en CMR estimuladas con LPS+TNF- α

En un intento de clarificar los mecanismos por los cuales la DX es capaz de inhibir la producción de NO en las CMR, llevamos a cabo análisis de Northern Blot con RNA total de CMR estimuladas con LPS + TNF- α . Como se muestra en la figura 3, la combinación de LPS+TNF- α fue capaz de inducir la expresión de un RNA mensajero de 4,5 Kb que corresponde a NOSi. No se detectó ninguna otra banda en estos experimentos, sugiriendo, además de una alta especificidad de la sonda empleada la existencia de una sola especie de mRNA. Esta estimulación fue inhibida por la dexametasona (10⁻⁶ M) entre un 60-

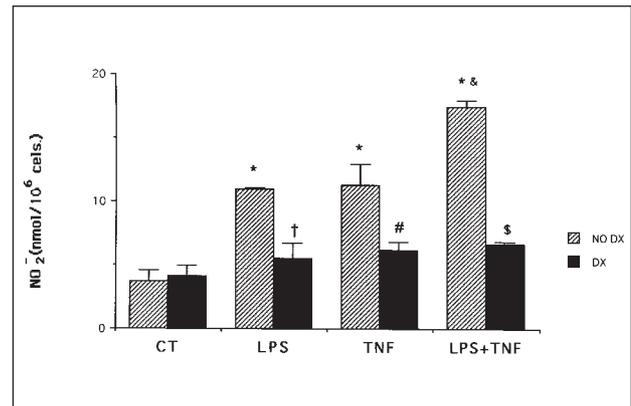


Fig. 2.—Efecto de la dexametasona (DX) sobre la actividad de NOSi inducida por LPS, TNF- α y LPS + TNF- α en CMR. Las células se incubaron con vehículo (CT), LPS (10 μ g/ml, 8 h), TNF- α (100 ng/ml, 8h) y LPS + TNF- α (LPS + TNF, a las dosis indicadas, 8 h) en presencia y ausencia de dexametasona (DX) (10⁻⁶ M, 8h). Los niveles de NO₂⁻ se determinaron por el método de Griess como se describe en Material y Métodos. Las columnas representan la media \pm EEM de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. * p < 0,05 vs. CT, † p < 0,05 vs. LPS, # p < 0,05 vs. TNF, \$ p < 0,05 vs. LPS + TNF, & p < 0,05 vs. LPS y TNF.

80 %, un efecto que se correlaciona perfectamente con lo observado en la producción de NO₂⁻. La dexametasona por si misma fue incapaz de producir ningún efecto sobre la expresión de NOSi.

Efecto de un antagonista del receptor de los glucocorticoides sobre la inhibición de la expresión del mRNA de NOSi en CMR estimuladas producida por la DX

Para demostrar si el efecto de la dexametasona está mediado por la unión a su receptor o es consecuencia de la puesta en marcha de otros mecanismos celulares se incubaron las CMR con un antagonista del receptor de los glucocorticoides (RG), el RU-3486 (donativo de Roussel Pharma), determinándose su efecto tanto en la producción de NO como en la expresión del mRNA de NOSi. En la figura 4 se muestra la expresión de un transcrito de 4,5 Kb correspondiente al mRNA de NOSi cuando se estimuló con LPS + TNF- α . Esta estimulación fue inhibida en un 50-60 % por la DX (10⁻⁵ M) cuando se compara con las células control. La inhibición fue revertida totalmente cuando las células se incubaron con DX + LPS/TNF en presencia de RU-3486 (10 μ M, 8 h). Ni la DX ni el RU 3486 modificaron los niveles basales de expresión de NOSi. Los resultados del análisis de Northern Blot confirman los obtenidos en la producción de NO₂⁻ por las células mesangiales que se representan debajo de cada calle.

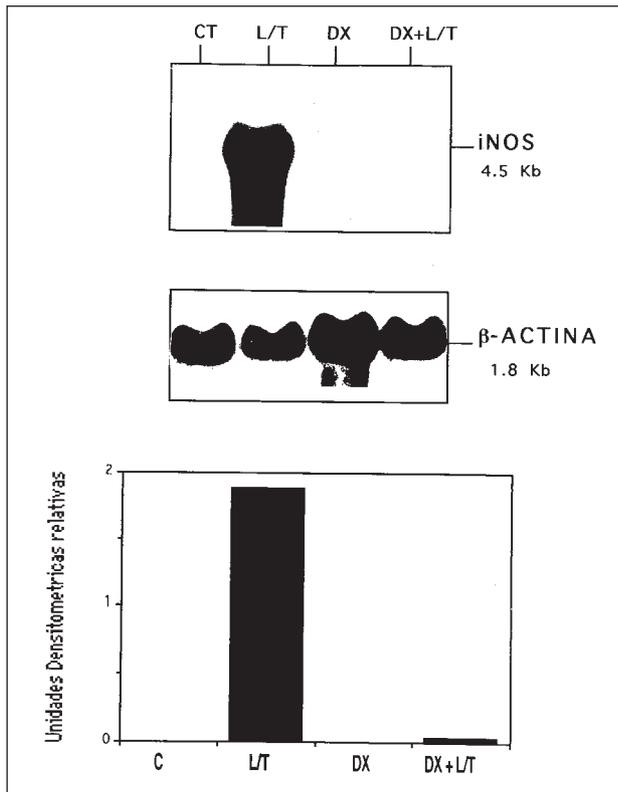


Fig. 3.—Efecto de la dexametasona sobre la expresión del mRNA de NOS i en CMR estimuladas con LPS+TNF- α . Los análisis de Northern Blot fueron llevados a cabo con RNA total (10 μg por calle) aislado de CMR, hibridándolo con una sonda de 700 bp de MAC-iNOS. Se detectó la presencia de un transcrito de 4,5 Kb en las células tratadas con LPS + TNF (L/T) (parte superior del panel). La expresión de β -actina de rata de la misma membrana está representada en la mitad del panel, y los análisis densitométricos que muestran la expresión de NOS i corregidos por la expresión de β -actina están representados debajo. Las CMR fueron tratadas con vehículo (CT), LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8 h) + TNF- α (100 ng/ml, 8 h) (L/T) DX (10 $^{-6}$ M, 8h) y DX + L/T (a las concentraciones indicadas, 8 h). Se muestra un experimento representativo de tres diferentes.

Discusión

Este trabajo propone vías de regulación potencial de la expresión de NOS i en células mesangiales de rata. La síntesis inducida de NO en CMR es un hecho bien establecido en al menos tres especies: rata^{7, 8, 25}, bovina²⁶ y humana²⁷ con estímulos diferentes; LPS, TNF- α , interleuquina 1- β (IL-1 β) o combinaciones de los mismos. Nosotros hemos demostrado que la combinación del LPS con el TNF- α se mostró más efectiva a la hora de provocar la inducción de NOS i que los dos estímulos de forma aislada, lo cual permite afirmar que estas dos sustancias actúan de forma sinérgica activando la NOS i mesangial. Asimismo hemos demostrado que la dexametasona fue capaz de

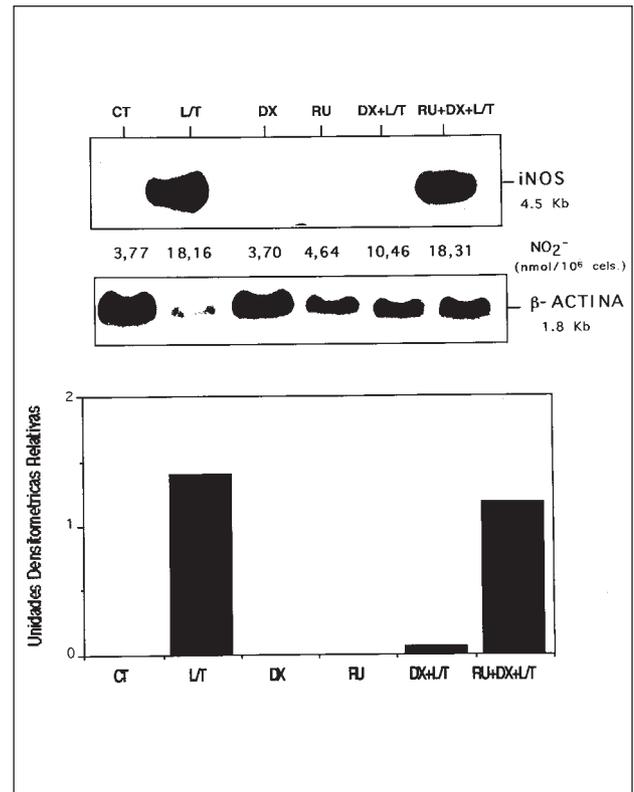


Fig. 4.—Efecto del RU-3486 sobre la inhibición de la expresión del mRNA de NOS i provocada por dexametasona en CMR estimuladas con LPS + TNF- α . Las células fueron tratadas con vehículo (CT), LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8h) + TNF- α (100 ng/ml, 8h) (L/T), DX (10 $^{-6}$ M, 8h), RU-3486 (10 μM , 8h), DX + L/T (8h) y DX (10 $^{-6}$ M, 8h) + LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8h) + TNF- α (100 ng/ml, 8h) + RU-3486 (10 μM , 8h) (RU + DX + L/T). Para los análisis de Northern Blot se aisló RNA total (10 μg por calle) de CMR, hibridándolo con una sonda de 700 bp de MAC-iNOS. Se detectó la presencia de un transcrito de 4,5 Kb en las células tratadas con L/T (parte superior del panel). La expresión de β -actina de rata de la misma membrana está representada en la mitad del panel y los análisis densitométricos que muestran la expresión de NOS i corregidos por la expresión de β -actina están representados debajo. Los niveles de NO $_2^-$ de cada condición experimental se midieron como se indica en el Material y Métodos y se encuentran representados debajo de cada banda de mRNA de NOS i expresados en nmoles/10 6 células. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

inhibir de forma significativa la producción de NO $_2^-$ inducida en las células mesangiales por la estimulación con LPS, TNF- α o la combinación de ambos estímulos. Además, la dexametasona inhibió la expresión del mRNA de NOS i en células estimuladas con LPS + TNF y este efecto es dependiente de la unión a su receptor, ya que un antagonista del receptor de los glucocorticoides, el RU-3486, revertió completamente esta inhibición.

El mecanismo por el que la dexametasona actúa sobre la NOS i mesangial es desconocido hasta el

momento. Nuestros resultados demuestran que la inhibición que esta sustancia ejerce sobre la producción de NO y la expresión del mRNA de NOS α es dependiente de la unión de la DX a su receptor. Los glucocorticoides se unen a un receptor específico que se denomina receptor de los glucocorticoides (RG), el cual actúa como factor de transcripción translocándose al núcleo²⁸. Allí, el RG activado se une a secuencias específicas de DNA dentro de la región promotora de los genes capaces de responder a glucocorticoides denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), modulando así la transcripción del gen. Aunque por el momento no se dispone de la secuencia del promotor del gen de NOS α en rata, estudios realizados en el promotor murino no muestran la existencia de ningún GRE^{29, 30}. Este hecho sugiere que la DX debe estar utilizando mecanismos alternativos de inhibición, como podría ser la interacción del RG con otros factores de transcripción activadores presentes en el núcleo inhibiendo su efecto, alterando la estabilidad del mRNA de NOS α o mediante vías de señalización intracelular que aún habrán de ser establecidas. En células musculares lisas se ha descrito que la DX inhibe la tasa de transcripción de NOS α moderadamente, pero a su vez aumenta la estabilidad del mRNA, por lo que solamente se producen inhibiciones importantes en la expresión total del mRNA cuando la DX es administrada antes de la activación de NOS α ³¹. Nuestros resultados están de acuerdo con estudios previos llevados a cabo a nivel funcional en macrófagos³² y CMR¹⁷ y con estudios que muestran el efecto de la dexametasona sobre la expresión del mRNA de NOS α en hepatocitos⁵ y diferentes tejidos en estudios realizados *in vivo*³³.

Para una mejor comprensión del papel de NOS α en las distintas condiciones fisiológicas y patológicas en las que se encuentra implicado el NO se ha de resolver una cuestión clave, y es cómo se controla la expresión del enzima. Las vías intracelulares de señalización del LPS y del TNF- α responsables de la activación de NOS α no están bien establecidas. Está aceptado que la activación de los macrófagos por LPS produce la liberación de gran cantidad de mediadores, entre los que se incluyen el TNF y el NO³⁴. Algunos investigadores han sugerido que un posible mecanismo de activación de los macrófagos por LPS podría producirse a través de la fosforilación por proteínas tirosin-quinásas³⁵; otros han demostrado que las proteínas G podrían regular diferencialmente dos vías bioquímicas diferentes: una que controla la síntesis de NO y otra la del TNF- α ³⁶. El TNF- α por sí mismo es capaz de provocar la expresión de moléculas inflamatorias por vías dependientes e independientes de proteína quinasa C^{35, 37}. En CMR, tanto el LPS como el TNF inducen la síntesis de NO y ésta es

individualmente inhibida por DX. Incluso aunque es conocido que ambas sustancias pueden actuar por vías diferentes se ha descrito que las dos son capaces de activar un factor de transcripción, el NF- κ B, que controla la expresión de múltiples moléculas proinflamatorias³⁸. En observaciones recientes se sugiere la interacción entre este factor y el receptor de los glucocorticoides indicando otro posible mecanismo para la inhibición producida por dexametasona^{39, 40}. De esta forma y de acuerdo con nuestros resultados, se puede decir que LPS y TNF- α pueden ejercer sus efectos por múltiples vías tanto comunes como independientes, de forma que la dexametasona debe estar interfiriendo en algunas de estas vías de señalización. Creemos que este trabajo aporta nuevas posibilidades de manipulación terapéutica en los eventos que conducen a la disfunción renal que ocurre en la sepsis.

Agradecimientos y observaciones

Aspectos complementarios, pero no idénticos, de este trabajo han sido aceptados para su publicación en *Kidney International* (ref. 7) y fueron comunicados y publicados en forma de abstract en el XII Congreso Internacional de Nefrología (Israel, junio de 1993) y el III Congreso sobre Biología del Oxido Nítrico (Colonia, octubre 1993). La financiación para estos estudios se obtuvo de la CICYT SAL-89-0875 y DGICYT 93 PB-0044. Asimismo algunos aspectos de este trabajo se incluyeron en la memoria que obtuvo el premio HOSPAL de la Sociedad Española de Nefrología en su vertiente de investigación básica de la convocatoria de 1994.

Bibliografía

1. Marletta MA: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *JBiol Chem* 268:12231-12234, 1993.
2. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S y Michel T: Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS letters* 307:287-293, 1992.
3. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR y Snyder SH: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718, 1991.
4. Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH y Russell SW: Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. *JBiol Chem* 268:1908-1913, 1993.
5. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio MJC, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL y Billiar TR: Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:522-526, 1993.
6. Koide M, Kawahara Y, Tsuda T y Yokoyama M: Cytokine-induced expression of an inducible type of nitric oxide synthase

- se in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS letters* 318: 213-217, 1993.
7. Saura M, López S, Rodríguez Puyol M, Rodríguez Puyol D y Lamas S: Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in rat mesangial cells and isolated glomeruli. *Kidney Int* 47:500-509, 1995.
 8. Shultz PJ, Archer SL y Rosenberg ME: Inducible nitric oxide synthase mRNA and activity in glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 46:683-689, 1994.
 9. Xie Q-W, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T y Nathan C: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:225-228, 1992.
 10. Furchgott R y Vanhoutte PM: Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *The FASEB Journal* 3:2007-2018, 1989.
 11. Ignarro LJ: Biological Actions and Properties of Endothelium-Derived Nitric Oxide Formed and Released From Artery and Vein. *Circulation Research* 65:1-21, 1989.
 12. Mené P, Simonson MS y Dunn MJ: Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev* 69:1347-1425, 1989.
 13. Shultz PJ y Tayeh MA: Synthesis and action of nitric oxide in rat glomerular mesangial cells. *Am J Soc Physiol* F600-F606, 1991.
 14. Bone RC: The pathogenesis of sepsis. *Ann Int Med* 115:457-469, 1991.
 15. Kilbourn RG, Bran A, Gross SS, Griffith OW, Levi R, Adams J y Lodato RF: Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 172:1132-1138, 1990.
 16. Thiemeermann C y Vane J: Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur J Pharmacol* 182:591-595, 1990.
 17. Pfeilschifter J: Anti-inflammatory steroids inhibit cytokine induction of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 195:179-180, 1991.
 18. Pfeilschifter J y Vosbeck K: Transforming growth factor β -2 inhibits interleukin 1b-and tumour necrosis factor α -induction of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 175:372-379, 1991.
 19. Rodríguez-Puyol D, Lamas S, Olivera A, Ortega G, López-Farré A, Hernando L y López-Novoa JM: Actions of cyclosporin A on cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 35:632-637, 1989.
 20. Olivera A, Lamas S, Rodríguez-Puyol D y López-Novoa JM: Adenosine induces mesangial cell contraction by an A1-type receptor. *Kidney Int* 35:1300-1305, 1989.
 21. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS y Tannenbaum SR: Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15 N] Nitrate in Biological Fluids. *Anal Biochem* 126:131-138, 1982.
 22. Chomczynski P y Sacchi N: Single-Step Method of RNA Isolation by Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987.
 23. Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS y Snyder SH: Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:6711-6715, 1992.
 24. Alonso S, Minty A, Bourlet Y y Buckingham M: Comparison of three actin-coding sequences in the mouse: Evolutionary relationships between the actin genes of warmblooded vertebrates. *J Mol Evol* 23:11-22, 1986.
 25. Pfeilschifter JPR, Mulsch A, Fandrey J, Vosbeck K y Busse R: Interleukin 1 β and tumour necrosis factor α induce a macrophage-type of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Eur J Biochem* 203:251-255, 1992.
 26. Marsden PA y Ballermann BJ: Tumor necrosis factor activates soluble guanylate cyclase in bovine glomerular mesangial cells via an L-arginine-dependent mechanism. *J Exp Med* 172:1843-52, 1990.
 27. Nicolson AG, Haites NE, McKay NG, Wilson HM, MacLeod AM y Benjamin N: Induction of nitric oxide synthase in human mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 193:1269-1274, 1993.
 28. Barnes PJ y Adcock I: Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *TIPS Reviews* 14:436-441, 1993.
 29. Xie QW, Whisnant R y Nathan C: Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177:1779-1784, 1993.
 30. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW y Murphy WJ: Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate the induction by interferon γ and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9730-9734, 1993.
 31. Perrella MA, Yoshizumi M, Fen Z, Tsai J, Hsieh C, Kourembanas S y Lee M: Transforming growth factor- β 1, but not dexamethasone, down-regulates nitric-oxide synthase mRNA after its induction by interleukin-1 β in rat smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269:14595-14600, 1994.
 32. Di Rosa M, Radomski M, Carnuccio R y Moncada S: Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 172:1246-1252, 1990.
 33. Liu S, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ y Evans TW: Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 196:1208-1213, 1993.
 34. Ding AH, Nathan CF y Stuehr DJ: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 141:2407-2412, 1988.
 35. Wertheimer SJ, Myers CL y Wallace RW: Intracellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267:12030-12035, 1992.
 36. Zhang X y Morrison DC: Pertussis toxin-sensitive factor differentially regulates lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 150:1011-1018, 1993.
 37. Vilcek J y Lee TH: Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanism of its multiple actions. *J Biol Chem* 266:7313-7316, 1991.
 38. Baeuerle PA: The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits. *Biochimica et Biophysica Acta* 1072:63-80, 1991.
 39. Ray A y Prefontaine KE: Physical association and functional antagonism between the P65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:752-756, 1994.
 40. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T y Matsushima K.: Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. *J Biol Chem* 269:16289-16295 1994.