

# Avances en el estudio de la regulación de la síntesis de NO en la célula mesangial

M. Saura, C. Zaragoza, R. Martínez-Dalmau, D. Pérez-Sala y S. Lamas

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la célula mesangial ha sido objeto de intenso estudio en cuanto a su capacidad para producir óxido nítrico (NO) en determinadas condiciones. Esta sustancia actúa como un importante mediador biológico que regula gran cantidad de funciones en diversos tejidos<sup>1</sup>. Desde 1990 se sabe que las células mesangiales, al igual que las células musculares lisas, son capaces de sintetizar NO tras ser tratadas con citoquinas o lipopolisacárido bacteriano<sup>2,3</sup>. La vía genéricamente más aceptada para esta síntesis inducida de NO transcurre a través de la expresión *de novo* de una isoforma inducible de la óxido nítrico sintetasa (NOS<sub>i</sub>), enzima que cataliza la síntesis de NO a partir de la L-arginina. La expresión de la NOS<sub>i</sub> produce la liberación de grandes cantidades de NO, que ejerce funciones citotóxicas y citostáticas.

Desde el punto de vista fisiopatológico es importante resaltar que el NO sintetizado en el glomérulo ha sido relacionado con la regulación de algunos procesos de gran relevancia homeostática, como la regulación de la hemodinámica renal y glomerular, la secreción de renina, el feedback túbulo-glomerular<sup>4</sup> y la prevención de la trombosis glomerular en situaciones de isquemia o infección<sup>5</sup>. Nuestro interés en el estudio de la regulación de la síntesis de NO y expresión de la NOS<sub>i</sub> en células mesangiales de rata y humanas deriva de los efectos de esta sustancia sobre la fisiología de las células mesangiales. El NO sintetizado por ellas contribuye al mantenimiento de la tasa de filtración glomerular en condiciones basales y actúa de manera autocrina, regulando la respuesta glomerular en condiciones de inflamación y endotoxemia<sup>6</sup>. Una relación de los efectos del NO sobre la célula mesangial se muestra en la tabla I. Si bien el NO juega claramente un papel en las alteraciones hemodinámicas del shock séptico<sup>7</sup>, la contribución relativa de las células mesangiales desde el

punto de vista cuantitativo a la producción total de NO glomerular ha sido discutida por algunos autores, quienes sostienen que las células esencialmente responsables de la síntesis de NO son aquellos macrófagos glomerulares no residentes que infiltran al glomérulo durante el proceso infeccioso<sup>8</sup>.

Debido a la implicación del NO en la fisiopatología renal, el estudio de la regulación de la NOS<sub>i</sub> mesangial resulta imprescindible para así comprender el papel de la síntesis de NO en condiciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas. Los problemas principales que hemos abordado son:

1. Caracterización molecular y funcional de la NOS<sub>i</sub> en células mesangiales de rata tratadas con

**Tabla I.** Efectos del NO sobre las células mesangiales

Acción	Mecanismo	Efecto en la CM
Inhibición de la proliferación	Inhibición de la RN reductasa Inhibición PDGF	Modificación de las respuestas celulares a citoquinas y factores de crecimiento
Disminución del tono mesangial	GMPC	Microcirculación glomerular: Kf y tráfico de macroléculas a través del mesangio
Citotoxicidad	Combinación del NO con radicales del oxígeno	Inflamación y daño tisular
Inhibición síntesis proteínas de matriz extracelular	Desconocido	Modulación de la MEC en enfermedades glomerulares

NO: óxido nítrico. RN reductasa: ribonucleótido reductasa. PDGF: factor de crecimiento derivado de las plaquetas. Kf: coeficiente de ultrafiltración. MEC: matriz extracelular.

Correspondencia: S. Lamas.  
Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).  
Velázquez, 144.  
28006 Madrid

La secuencia de cDNA de célula mesangial de rata (fig. 2) está accesible en la base de datos *Gene-Bank* con el siguiente código de acceso: U-48829.

factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y lipopolisacárido bacteriano (LPS).

2. Estudio de la inhibición de la síntesis de NO en células mesangiales de rata por antiinflamatorios y antioxidantes y sus mecanismos moleculares.

3. Caracterización de la región promotora del gen de la NOS1 de rata.

4. Estudios en células mesangiales humanas.

Por evidentes razones de espacio, y al haberse publicado o estar en vías de hacerlo la mayor parte de estos estudios, no podemos hacer una descripción exhaustiva de cada uno de estos apartados, limitándonos a destacar los aspectos más relevantes.

## ESTUDIOS EN CELULAS MESANGIALES DE RATA

Nuestros resultados iniciales mostraron que el TNF- $\alpha$  y el LPS tienen una actividad sinérgica en cuanto a su capacidad para sintetizar NO en las células mesangiales, detectándose un aumento de la síntesis significativo a las 4 horas de exposición, que es máximo tras ocho horas de tratamiento. Mediante estudios de RT-PCR (transcripción inversa seguidos de reacción en cadena de la polimerasa), partiendo del RNA total de células mesangiales estimuladas con LPS+TNF- $\alpha$ , purificamos y clonamos un fragmento de 700 pares de bases del cDNA de la NOS1 de células mesangiales, cuya secuencia de nucleótidos y aminoácidos es de elevada identidad con la NOS1 de las células musculares lisas de rata, sugiriendo que son el producto de la expresión del mismo gen (fig. 1). Posteriormente utilizamos este fragmento como sonda para realizar los experimentos de Northern blot.

El estudio de la síntesis de NO mediante la acumulación de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> en el medio de incubación de las células y de la expresión de RNA mensajero demostró que un glucocorticoide típico como la dexametasona inhibía la síntesis y la expresión de la NOS1, si bien para que esta última fuera significativa era necesario añadir la dexametasona antes de la combinación de estímulos inductora<sup>9</sup>. Asimismo pudimos demostrar que el efecto de la dexametasona dependía de la unión al receptor de glucocorticoides, ya que el efecto inhibitorio de la dexametasona era bloqueado por un antagonista del mismo, el RU-3486<sup>10</sup>. En experimentos encaminados a estudiar el posible efecto de la dexametasona sobre la estabilidad del mRNA de la NOS1 comprobamos que este agente antiinflamatorio prolongaba la vida media del transcrito en un 30 %, si bien este fenómeno no explica el efecto inhibitorio de la dexametasona (Saura y cols., manuscrito en preparación).

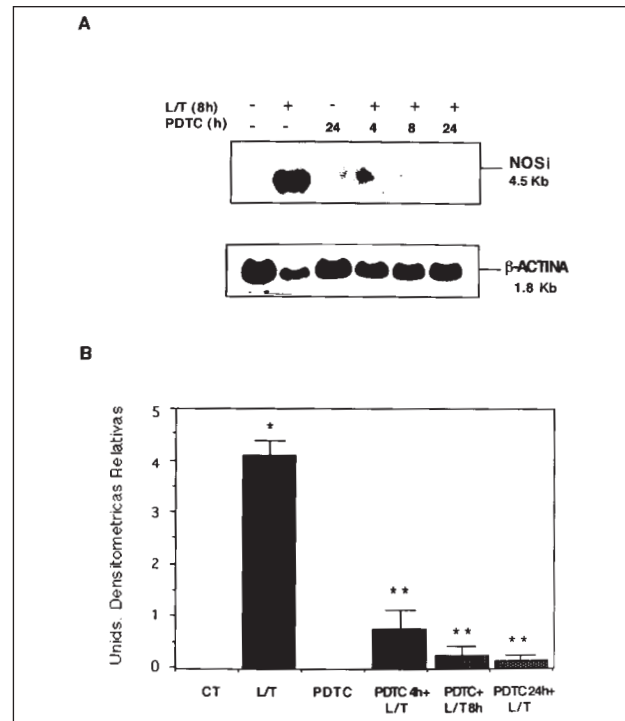


Fig. 1.—Efectos del tiempo de incubación con pirrolidinditiocarbamato (PDTC) sobre la expresión del mRNA de NOS1 en CMR estimuladas con LPS+ TNF- $\alpha$ . Las CMR fueron incubadas con vehículo (CT, 24 h), LPS (10  $\mu$ g/ml, 8 h) + rHuTNF- $\alpha$  (100 ng/ml, 8 h) (L/T), PDTC (100  $\mu$ M, 24 h) y PDTC (100  $\mu$ M) a diferentes tiempos (24, 8 y 4 h) + L/T (8 h). A) Autorradiografía de un experimento representativo mostrando la expresión del mRNA de la NOS1 y de la  $\beta$ -actina. B) Los análisis densitométricos que muestran expresión de NOS1 corregidos por la expresión de  $\beta$ -actina están representados debajo. Los resultados muestran la media  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes. \*  $p < 0,05$  vs CT; \*\*  $p < 0,05$  vs L/T.

La utilización de un antioxidante, el pirrolidín ditiocarbamato (PDTC), con capacidad relativamente selectiva de inhibir la activación de un factor de transcripción, llave de muchas respuestas inflamatorias, el NF- $\kappa$ B, demostró la implicación de este factor en la expresión de la NOS1, algo que ya había sido sugerido para la NOS1 presente en macrófagos murinos<sup>9</sup>. La activación de este factor de transcripción conlleva la disociación de la subunidad inhibitoria I $\kappa$ B y el transporte del factor de transcripción al núcleo donde será capaz de unirse al DNA y activar la transcripción génica. El PDTC es capaz de bloquear la liberación de I $\kappa$ B gracias a su actividad antioxidante y quelante de metales pesados. Además, en contraste con la dexametasona, este agente era capaz de inhibir la síntesis de NO y la expresión del RNA mensajero de NOS1 con un patrón temporal distinto, ya que el tratamiento con

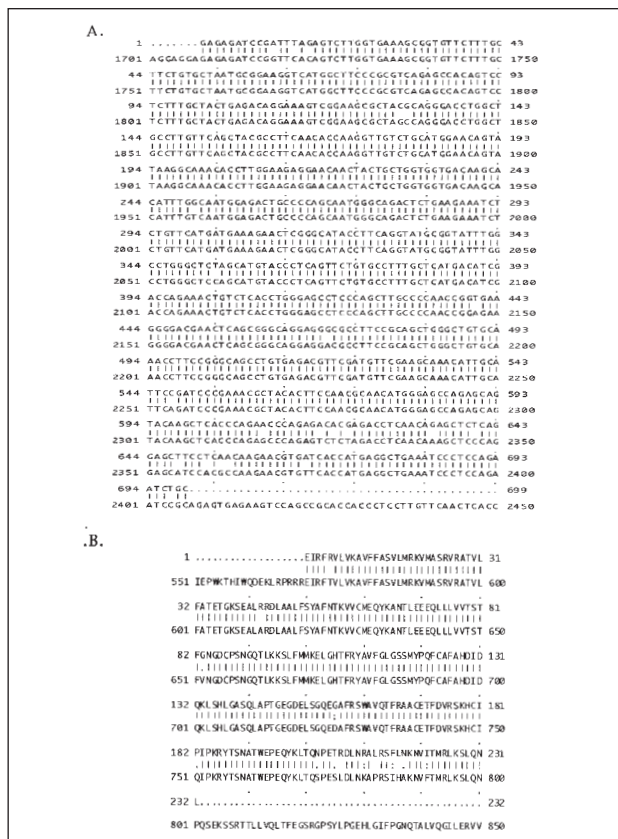


Fig. 2.—Comparación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos entre la NOS inducible de célula muscular lisa de rata y célula mesangial de rata. En el renglón superior se encuentra la secuencia de células mesangiales de rata; el renglón inferior corresponde a la secuencia de las células musculares lisas de rata. A) Alineamiento entre los cDNAs de célula mesangial y célula muscular lisa de rata. Porcentaje de identidad: 97 %. B) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los cDNAs del gen NO-sintetasa de célula muscular lisa y célula mesangial de rata. Porcentaje de identidad: 95 %

PDTC cuatro horas después de añadir TNF- $\alpha$  y LPS seguía produciendo una inhibición significativa (fig. 2).

Las señales intracelulares que controlan la expresión del mRNA de la NOSi no son bien conocidas. El estudio de la región promotora de otros genes relacionados con respuesta inflamatoria, y posteriormente el aislamiento y caracterización de la región promotora del gen de NOSi murino y humano, aportaron pruebas de que determinados factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B y quizás AP-1, participan en la activación de este gen. Algunos experimentos preliminares de retardo en gel utilizando extractos nucleares de células mesangiales de rata

y oligonucleótidos marcados conteniendo la secuencia de unión tanto del factor de transcripción NF- $\kappa$ B como de AP-1 demostraron que ambos se activaban por los mismos estímulos que eran necesarios para la inducción de la NOSi, si bien el patrón temporal era distinto entre sí. Cuando se incluía PDTC 2 horas antes del estímulo se observaba una inhibición casi completa de la activación de NF- $\kappa$ B, un fenómeno que no era tan claro en el caso del pretratamiento con dexametasona. En el caso de AP-1, el PDTC no era capaz de modificar su activación, encontrando un grado variable de inhibición con la dexametasona. En el momento actual nos encontramos pendientes de confirmar estos resultados.

Un aspecto importante para poder profundizar en el estudio de la regulación transcripcional de la NOSi de rata se relaciona con el conocimiento detallado de la estructura del promotor del gen en la rata. En este sentido hemos clonado y secuenciado 380 pares de bases de la región 5 reguladora del gen de rata utilizando una estrategia de PCR a partir de DNA genómico. El análisis de la misma ha permitido establecer la existencia de diversas regiones consenso de unión a factores reguladores (Saura y cols., manuscrito en preparación). En su mayor parte estas regiones se encontraban presentes en el promotor del gen de la NOSi murina<sup>11, 12</sup> y las regiones consenso de unión al factor NF- $\kappa$ B, así como la caja TATA, se encontraban totalmente conservadas. En esta región limitada no hemos encontrado una zona de posible unión a AP-1, y estamos ampliando la secuencia de estudio en sentido 5' para poder encontrar estos hipotéticos elementos.

### ESTUDIOS EN CELULAS MESANGIALES HUMANAS

Utilizando células mesangiales humanas en cultivo observamos que para obtener una inducción significativa en cuanto a la síntesis de NO y expresión de la NOSi es necesaria la combinación de 2 o más citoquinas y lipopolisacárido. Este hecho se correlaciona con algunas observaciones publicadas en la literatura, donde parece que la regulación transcripcional de la NOSi humana es significativamente diferente de la murina y probablemente de la de rata. Es posible que a lo largo de la evolución la especie humana haya desarrollado mecanismos de respuesta diferenciales ante citoquinas proinflamatorias o productos de la pared microbiana. En estos mismos estudios

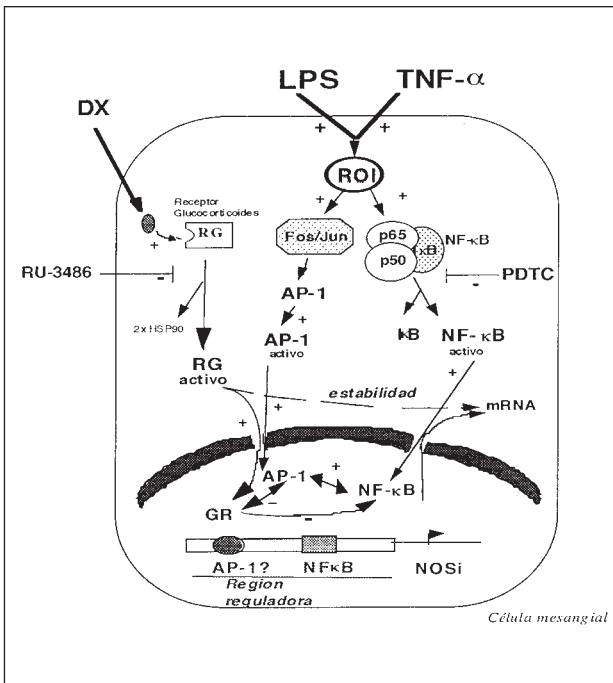


Fig. 3.—Modelo hipotético del mecanismo propuesto para la regulación de la NOSi en CMR. Tanto LPS como TNF-α serían capaces en nuestro sistema celular de activar NF-κB induciendo su translocación al núcleo y también de inducir la actividad del factor AP-1. Estos dos efectos pueden estar mediados por los radicales intermediarios del oxígeno (ROI). Una vez en el núcleo, el NF-κB se uniría a su secuencia consenso de la región reguladora de la NOSi, que es idéntica a la presente en el promotor de ratón, y AP-1 podría interaccionar en este mismo sitio o en posibles sitios de unión AP-1 que no han sido encontrados en el fragmento de la región 5' clonado. A su vez, la dexametasona, a través de la unión a su receptor, puede interferir en los procesos de activación de la NOSi mediante la interacción del RG activado con estos dos factores de transcripción y, afectando al mismo tiempo a la estabilidad del mRNA de la NOSi.

podimos comprobar que una linfoquina antiinflamatoria, la interleuquina-13, inhibe la expresión de la NOSi y la síntesis de NO de manera dependiente del tiempo y concentración<sup>13</sup>. La importancia de estos resultados se encuentra en el hecho de que esta linfoquina es un mediador endógeno que es expresado en el organismo durante enfermedades mediadas por anticuerpos y ha sido aislada en un modelo animal de glomerulonefritis.

Finalmente, estamos estudiando en estas mismas células el posible efecto de donadores exógenos de NO y de tetrahidrobiopterina, un cofactor crítico para activar las NOS 14, sobre la síntesis de NO y

sobre la propia expresión de la NOSi (Saura y Pérez-Sala, en preparación).

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En definitiva, nuestros estudios contribuyen a profundizar en algunos aspectos de la regulación de la expresión de la NOSi en células mesangiales de rata, pudiendo establecer un modelo de trabajo de la misma (fig. 3). Nuestros próximos pasos están encaminados a comprobar parte de estas hipótesis mediante la transfección de células mesangiales con diferentes construcciones del promotor de la NOSi de rata, una caracterización molecular más amplia de éste y la disección más precisa de la participación de NF-κB y AP-1 en los mecanismos inhibitorios de la dexametasona y el pirrolidín ditiocarbamato.

## Agradecimientos y observaciones

Marta Saura y Carlos Zaragoza son becarios de la Fundación Renal Iñigo Alvarez de Toledo. Este trabajo ha sido financiado con cargo al proyecto de la DGICYT PB 93-0044.

## Bibliografía

1. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051-3064, 1992.
2. Pfeilschifter J, Mulsch RPA, Fandrey J, Vosbeck K y Busse R: Interleukin 1β 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.
3. Shultz PJ, Archer SL y Rosenberg ME: Inducible nitric oxide synthase mRNA and activity in glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 46:683-689, 1994.
4. Raij L y Baylis C: Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney Int* 48:20-32, 1995.
5. Shultz PJ y Raij L: Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. *J Clin Invest* 90:1718-1725, 1992.
6. Pfeilschifter J, Kunz D y Mülh H: Nitric oxide: an inflammatory mediator of glomerular mesangial cells. *Nephron* 64:518-525, 1993.
7. Thiemeermann C: The role of the L-arginine: nitric oxide pathway in circulatory shock. *Adv Pharmacol* 28:45-79, 1994.
8. Cattell V y Cook HT: Nitric oxide: role in the physiology and pathology of the glomerulus. *Exp Nephrol* 1:265-280, 1993.
9. 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.
10. Saura M, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D y Lamas S: Papel de los glucocorticoides en la regulación de la actividad y la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible en células mesangiales de rata. *Neurología XV*:456-463, 1995.

## AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA SINTESIS DE NO EN LA CELULA MESANGIAL

11. 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 and lipopolysaccharide. *Proc. Natl Acad Sci USA* 90:9730-9734, 1993.
12. 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. *JExp Med* 177:1779-1784, 1993.
13. Saura M, Martínez-Dalmau R, Pérez-Sala D y Lamas S: Interleukin-13 inhibits nitric oxide synthase in human mesangial cells. *Biochem J* 313:641-646, 1995.
14. Marletta MA: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *JBiol Chem* 268:12231-12234, 1993.