



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

**Efecto de la inhibición crónica de NOS-2 sobre la activación de
COX-2 y TGF- β 1 en un modelo de nefrectomía 5/6 en la rata**

TESIS DE POSGRADO
Para obtener el grado de Doctor en Ciencias

PRESENTA:
PABLO BENITO BAUTISTA GARCIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

DEPARTAMENTO DE NEFROLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHÁVEZ"

TUTOR RESPONSABLE: **DR. JAIME HERRERA-ACOSTA †**

Comité tutorial

**DRA. MARTHA FRANCO GUEVARA
DR. JOSE PEDRAZA CHAVERRI**

México DF, Octubre 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Jaime Herrera Acosta†, por haberme dado la oportunidad, confianza y apoyo durante mi estancia en el Departamento de Nefrología.

A los Dres. Carmen Clapp Jiménez, José Pedraza Chaverrí, Martha Franco Guevara, Guillermo Mendoza Hernández, Raúl Mancilla Jiménez, Marina Macías Silva, Dante Amato Martínez y Julio César Carrero Sánchez, por sus valiosos comentarios, los cuales enriquecieron esta tesis.

Agradecimientos especiales:

A la Dras. Gabriela Sánchez-Lozada, Edilia Tapia Rodríguez, Carmen Ávila-Casado y Virgilia Soto Abraham, por haber enriquecido la tesis con sus valiosas aportaciones en el área de fisiología renal y patología respectivamente.

A la QFB Magdalena Cristóbal García por su invaluable colaboración, amistad y apoyo, que sin duda fueron de gran importancia para la realización de mi tesis doctoral.

Al personal del Departamento de Nefrología del Instituto Nacional de Cardiología: Rocío García, Silvia Salgado, Juan Alfredo Alvarado, y José Santamaría. Por su valiosa ayuda y amistad.

DEDICATORIAS

A mi madre por todo su amor y por ser un ejemplo excepcional de que el esfuerzo continuo, el compromiso con el trabajo, la fortaleza interior y la dignidad son herramientas indispensables para llegar al éxito.

A mi padre, por su cariño y por ser un ejemplo de honradez y compromiso con el trabajo.

A mi tía por su inmensa paciencia, amor y cariño, y por apoyarme siempre en todo lo que me propuse, mil gracias.

A mis hermanos por su apoyo, amor y comprensión.

A mi sobrinito Alejandro por su amor y cariño.

A la Dra. María Lozano por haberme enseñado a ser feliz.

INDICE

Abreviaturas.....	i
Relación de figuras.....	ii
Relación de tablas.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	xi
1. Antecedentes.....	1
1.1 Evolución de la insuficiencia renal crónica.....	1
1.2 Mecanismos involucrados en la progresión del daño renal.....	2
2. Estructura general de las sintasas de óxido nítrico.....	3
2.1 Localización, función y regulación de las NOS en el riñón normal.....	4
2.2 Organización estructural del promotor de la NOS-2.....	6
2.3 Participación de NOS-2 en modelos experimentales de daño renal.....	8
2.4 Activación de COX-2 por NO.....	11
3. Participación de las prostaglandinas en la función renal.....	11
3.1 Síntesis de prostaglandinas.....	12
3.2 Factores que modulan la activación del promotor de COX-2.....	12
3.3 Participación de NOS-2 y COX-2 en la progresión del daño renal.....	13
3.4 Participación de NOS-2 y TGF- β 1 en la evolución del daño renal.....	15
3.5 Biología del TGF- β 1.....	15
3.6 El TGF- β y la fibrosis renal.....	16
3.7 Interacción de NOS-2 y TGF- β 1 en la progresión del daño renal.....	17
4. Justificación.....	19
5. Hipótesis.....	21

6. Objetivos.....	22
6.1 Generales.....	22
6.2 Específicos.....	22
7. Material y Métodos.....	23
7.1 Cuantificación de la presión arterial sistólica (PAS).....	24
7.2 Proteinuria y depuración de creatinina.....	24
7.3 Obtención de RNA.....	25
7.4 Tratamiento con DNasa.....	25
7.5 Cuantificación relativa del RNAm para NOS-2, COX-2 y TGF- β 1.....	26
7.6 Cuantificación relativa del RNAm para NOS-2, COX-2 y TGF- β 1 por RT-PCR en tiempo real.....	29
7.7 Western blot.....	30
7.8 Cuantificación de la fracción activa del TGF- β 1.....	31
7.9 Histología Renal.....	32
7.10 Estudios por Inmunohistoquímica.....	33
7.11 Análisis estadístico.....	33
8. Resultados.....	34
8.1 Presión arterial sistólica y proteinuria.....	34
8.2 Cinéticas de amplificación de COX-2 y TGF- β 1 mediante RT-PCR semicuantitativa convencional.....	35
8.3 Niveles de expresión de NOS-2, COX-2 y TGF- β 1 en el tejido renal.....	37
8.3.1 Niveles de expresión de NOS-2.....	37
8.4 Expresión de COX-2.....	38
8.4.1 Niveles de expresión de TGF- β 1.....	39

8.5 Expresión de NOS-2, COX-2 y TGF- β 1 en el tejido renal por medio de la técnica de RT-PCR semicuantitativa en tiempo real.....	40
8.6 Niveles de RNAm de NOS-2.....	41
8.7 Niveles de RNAm de COX-2.....	42
8.8 Expresión de TGF- β 1.....	42
8.9 Análisis por Western-blot.....	43
8.10 Análisis por Western-blot de COX-2.....	44
8.10 Cuantificación de TGF- β 1 por ELISA.....	45
8.11 Estudios histológicos.....	46
8.13 Análisis por inmunohistoquímica.....	48
9. Discusión.....	50
9.1 Efecto de la administración de AG y L-NIL sobre la expresión de NOS-2..	51
9.2 Efecto de NOS-2 sobre la expresión de COX-2 y TGF- β 1.....	53
9.3 Vías de activación de COX-2 inducidas por NO.....	53
9.4 Inducción de NOS-2 durante la progresión del daño renal.....	55
9.5 Mecanismos de activación de TGF- β 1 inducidos por NO.....	57
9.6 Efecto de la administración de AG y L-NIL sobre las alteraciones vasculares en ratas con Nx 5/6.....	58
10. Conclusiones.....	60
11. Bibliografía.....	61

Relación de figuras

- Fig. 1 Reacciones de la sintasa de óxido nítrico. Oxidación de L-arginina dependiente de NADPH para formar L-citrulina y NO.....3
- Fig. 2 Estructura básica de las NOS. En este se muestran los dominios estructurales de las sintasas de óxido nítrico, se indican los sitios de unión para L-arginina, hemo, tetrahidrobiopterina (BH4) y calmodulina.....4
- Fig. 3 Localización renal de NOS-2. Segmentos de la nefrona donde se localiza NOS-2.....6
- Fig. 4 Organización estructural del promotor de la NOS-2. a) Estructura esquemática del extremo 5' del promotor de NOS-2 de origen humano, el cual muestra los sitios potenciales para la generación de diversas isoformas por splicing alternativo, b) estructura de la región distal del promotor de NOS-2, el cual parece ser un elemento de respuesta a citocinas.....7
- Fig. 5 Sobre-expresión de NOS-2 en biopsias renales de pacientes con nefropatía por IgA y nefritis lúpica, obsérvese la ausencia de NOS-2 en el riñón normal y en pacientes con enfermedad renal de cambios mínimos.....9
- Fig. 6 Representación esquemática del promotor de COX-2 en el ser humano, el cual muestra sitios consenso para distintos factores de transcripción.....14
- Fig. 7 Representación esquemática de las vías de señalización TGF- β /Smad's. Este sistema, involucra una familia de receptores membranales con actividad cinasa, los cuales fosforilan una serie de proteínas caracterizadas como Smad's, una vez activadas estas pueden formar complejos multiméricos, los cuales pueden actuar como factores de transcripción.....16

Fig. 8 Valores de presión arterial y proteinuria en ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....	35
Fig. 9 Cinéticas de amplificación de COX-2 y TGF- β 1 en corteza y médula renal de ratas normales por RT-PCR semicuantitativa.....	36
Fig. 10. Cuantificación de los niveles de RNAm de NOS-2 en corteza y médula renal de ratas normales, con Nx 5/6, y Nx 5/6+AG mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....	38
Fig. 11. Cuantificación de los niveles de RNAm de COX-2 en corteza y médula renal de ratas normales, con Nx 5/6 y con Nx 5/6+AG mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....	39
Fig. 12 Cuantificación de los niveles de RNAm de TGF- β 1 en corteza y médula renal de ratas normales, con Nx 5/6 y con Nx 5/6+AG mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....	40
Fig. 13. Cuantificación de los niveles de RNAm de NOS-2 en la corteza y médula renal de ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....	41
Fig. 14. Cuantificación de los niveles de RNAm de COX-2 en al corteza y médula renal de ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....	42

Fig. 15. Cuantificación de los niveles de RNAm de TGF- β 1 en la corteza y médula renal de ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL mediante la técnica de RT-PCR en tiempo-real. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....	43
Fig. 16. Cuantificación de los niveles de proteína de NOS-2 en homogenados totales de ratas normales, con Nx 5/6 y con Nx 5/6+AG mediante la técnica de Western-blot. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....	44
Fig. 17. Cuantificación de los niveles de proteína de COX-2 en preparados de microsomas de riñón total en ratas normales, con Nx 5/6 y con Nx 5/6+AG mediante la técnica de Western-blot. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....	44
Fig. 18. Cuantificación de los niveles de la fracción activa del TGF- β 1 mediante la técnica de ELISA, en plasma de ratas normales, nefrectomizadas y a las cuales se les administró AG. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....	45
Fig. 19. Cuantificación de la fibrosis túbulo-intersticial de ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL. Las flechas indican la formación de tejido fibroso. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....	46
Fig. 20. Cuantificación del daño arteriolar en ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL mediante la técnica de inmunohistoquímica. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....	47
Fig. 21. Cuantificación de los niveles de proteína de NOS-2 en riñones de ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL mediante la técnica	

de inmunohistoquímica. Las flechas indican la inmunotinción de NOS-2. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.....49

Relación de tablas

Tabla 1. Secuencia de iniciadores utilizados para amplificar NOS-2, COX-2, TGF- β 1 y GADPH por RT-PCR convencional.....27

Tabla 2. Iniciadores utilizados para amplificar NOS-2, COX-2, TGF- β 1 y β -actina por RT-PCR en tiempo-real.....30

Abreviaturas

AG	Aminoguanidina
AGE's	Productos avanzados de glicosilación
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BMP-2	Proteína morfogenética de hueso-2
COX-2	Ciclooxigenasa-2
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conjuntivo
GADPH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GFR	Índice de filtración glomerular
GMPc	Guanosin monofosfato cíclico
IRC	Insuficiencia renal crónica
LAP	Proteína asociada de latencia
L-NIL	L-N6-iminoetil-lisina
LTBP-β	Proteína de unión al TGF-β latente
NF-κB	Factor nuclear κB
NO	Oxido nítrico
NOS	Sintasas de óxido nítrico
Nx 5/6	Nefrectomía 5/6
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PAS	Presión arterial sistólica
PG	Prostaglandinas
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante-β1

Resumen

La insuficiencia renal crónica es consecuencia de diversos eventos fisiopatológicos en donde intervienen un número importante de factores. Diversos estudios han demostrado que el daño renal crónico se caracteriza por infiltrado inflamatorio, fibrosis túbulointersticial y lesión vascular. Sin embargo, el papel de la sintasa de óxido nítrico inducible (NOS-2) es aún controversial. Por una parte, diversos estudios han demostrado una asociación entre el daño tisular renal y el incremento en los niveles de expresión de NOS-2 en el túbulointersticio, y por otra se ha demostrado una disminución significativa de NOS-2 en modelos de daño renal progresivo en la rata. Recientemente se describió que el NO además de facilitar la generación de radicales libres en un medio oxidativo, participa importantemente en la activación de mediadores pro-inflamatorios y pro-fibróticos tales como la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β 1) los cuales están involucrados en la progresión del daño renal.

Por lo anterior, decidimos evaluar el efecto de la administración de dos inhibidores específicos de NOS-2 (aminoguanidina, AG y L-N6-iminoetil-lisina, L-NIL) sobre la expresión de COX-2, y TGF- β 1, así como su efecto sobre el desarrollo de las alteraciones morfológicas en el tejido renal como fibrosis túbulointersticial y arteriopatía en un modelo de ablación renal subtotal (Nx 5/6) en la rata, que consiste en la remoción del riñón derecho y la ligadura permanente de dos ramas de la arteria renal izquierda, lo cual genera la necrosis por isquemia de dos tercio del riñón izquierdo, dejando 1/6 de masa renal funcional, esta maniobra experimental reproduce las alteraciones morfo-funcionales características de la enfermedad renal progresiva.

La nefrectomía 5/6 produjo una marcada hipertensión arterial, proteinuria y un incremento en la expresión de NOS-2, COX-2 y TGF- β 1, la cual se asoció con el desarrollo de arteriopatía y fibrosis túbulo-intersticial.

La administración de AG y L-NIL disminuyó parcialmente la proteinuria, sin modificar la presión arterial, atenuó significativamente la expresión de NOS-2, COX-2 y TGF- β 1, así como el desarrollo de las alteraciones estructurales en el tejido renal, lo cual sugiere que las altas concentraciones de NO generadas a partir de NOS-2 podrían modular positivamente la actividad de mediadores pro-inflamatorios y pro-fibróticos involucrados en la generación de daño renal.

Abstract

Chronic renal failure is the consequence of an important number of physiopathological events. Several studies have demonstrated that chronic renal disease is characterized by inflammatory infiltration, tubulo-interstitial fibrosis and vascular damage. However, the role of inducible nitric oxide synthase (NOS-2) is still controversial. In this sense, several studies have demonstrated an association between renal damage and an important raise in the levels of NOS-2 in tubulo-interstitium. In contrast, others studies have shown a significant decrease of NOS-2 in a model of renal chronic disease. Recently, it has been described that reactive nitrogen species participate in the activation of pro-inflammatory and pro-fibrotic pathways such as cyclooxygenase-2 (COX-2) and transforming growth factor- β (TGF- β) respectively, both of them involved in the progression of renal disease.

Thereby, we decided to evaluate the effect of administration of two selective inhibitors of NOS-2 on the expression of COX-2 and TGF- β 1 as well as its effect on morphological alterations such as tubulo-interstitial fibrosis and arteriopathy in a model of subtotal renal ablation (5/6 Nx) in rats, which reproduces the morpho-functional alterations established in chronic renal disease.

Subtotal renal ablation induced marked hypertension, significant proteinuria as well as an important increase of NOS-2, COX-2 and TGF- β 1 levels associated with the development of arteriopathy and tubulo-interstitial fibrosis.

The administration of AG and L-NIL partially decreased proteinuria, without changes on systolic blood pressure, nevertheless they induced a

significant decrease on NOS-2, COX-2 and TGF- β 1 expression, as well as the development of structural alterations in renal tissue. This study demonstrates that administration of AG and L-NIL prevented the structural alterations induced by 5/6 nephrectomy despite persisting hypertension. Indeed this study suggests that high concentration of NO produced by NOS-2 may enhance the activation of pro-inflammatory and pro-fibrotic mediators involved on the progression of renal disease.

INTRODUCCIÓN

Los riñones están situados detrás del espacio peritoneal, éstos participan en la regulación del balance hidro-electrolítico (equilibrio osmolar del líquido intra y extracelular), en la regulación del equilibrio ácido-base (excreción de H^+ y reabsorción de HCO_3^-), en la excreción de desechos tóxicos resultados del metabolismo celular (urea, ácido úrico, creatinina y productos finales del metabolismo de distintas hormonas), además de estar involucrado en la producción de diversas hormonas como vitamina D y eritropoyetina indispensables para la absorción de Ca^{2+} y la producción de hemoglobina respectivamente.

Un par de riñones sanos filtra alrededor de 1, 700 litros de sangre diarios a través de sus unidades de filtración (nefronas). Cada riñón contiene aproximadamente un millón de estas unidades, las cuales están constituidas por una red de capilares localizados en el corpúsculo renal y una serie de túbulos renales, a través de los cuales se filtra la sangre para formar lo que posteriormente será la orina, este proceso puede dividirse en tres etapas:

1. Filtración Glomerular
2. Reabsorción tubular
3. Secreción tubular

Por el contrario, durante el curso de la enfermedad renal se desarrollan una serie de procesos fisiopatológicos que conducen a la pérdida de la función renal. Entre éstos destaca el proceso inflamatorio, el cual se asocia a la expresión de la sintasa de óxido nítrico-2 (NOS-2), así como la subsiguiente generación de estrés nitrosativo. Sin embargo, existen controversias acerca de la participación de la NOS-2 en la evolución del daño renal, en este sentido

existen diversas evidencias experimentales donde se ha demostrado una disminución significativa en la expresión de NOS-2 durante la progresión del daño renal y por el contrario, otros donde se ha demostrado un incremento en la expresión de NOS-2.

Un aspecto que hay que enfatizar, es la activación de mediadores proinflamatorios y profibróticos por el óxido nítrico (NO) y las especies reactivas de nitrógeno, entre los que destacan: COX-2 y TGF- β 1, por lo que a través de estos eventos el NO podría participar en la generación de daño renal.

1. Antecedentes

1.1 Evolución de la insuficiencia renal crónica

Durante el curso de la insuficiencia renal crónica (IRC), el proceso fisiopatológico inicial induce primeramente una disminución significativa de la filtración glomerular y eventualmente la pérdida de la función renal.

Brenner y colaboradores propusieron que la reducción crónica de la masa renal producida como resultado de la progresión de la nefropatía hipertensiva, induce una respuesta adaptativa en las nefronas remanentes. En estas nefronas, la vasodilatación preglomerular facilita la transmisión de la presión arterial periférica a los capilares glomerulares. La hiperfiltración resultante, sirve inicialmente para mantener la filtración glomerular y el balance de sodio a corto plazo, pero secundariamente conduce al daño glomerular progresivo como producto del incremento en la presión capilar glomerular y la pérdida de la función renal a largo plazo, lo cual se traduce en proteinuria ¹.

Una vez que se ha presentado la proteinuria, se acelera la progresión del daño renal, constituyendo uno de los principales factores predictivos de la evolución del daño renal ².

La evolución de la insuficiencia renal crónica puede dividirse en 4 fases: 1) disminución de la reserva renal, 2) insuficiencia renal incipiente, 3) insuficiencia renal sintomática y (4) enfermedad renal terminal. La disminución de la reserva renal implica una disminución del 25% del índice de filtración glomerular (FG), en esta etapa el balance hidro-electrolítico y ácido-base son mantenidos a través de modificaciones adaptativas de las nefronas remanentes, sin embargo un decremento del 75% de la FG, a pesar de cursar de manera asintomática, presenta un incremento en los niveles de

urea/creatinina además de anormalidades en los niveles séricos de diversas hormonas tales como: eritropoyetina, calcitriol y hormona paratiroidea.

Una vez que el FG presenta una disminución mayor del 75% la enfermedad se torna sintomática presentando anemia, acidosis, hipocalcemia, hiperfosfatemia e hipercalemia; esta etapa de la enfermedad progresa rápidamente siendo necesaria la terapia de reemplazo, lo cual marca el inicio de la insuficiencia renal terminal ³.

Numerosos modelos experimentales se han utilizado para evaluar los mecanismos que intervienen en la progresión del daño renal. El más utilizado es la Nx 5/6, la cual produce hipertensión arterial, proteinuria y fibrosis renal progresiva, reproduciendo los cambios morfo-funcionales producidos en las etapas finales de la enfermedad renal crónica posterior a una pérdida sustancial de la masa renal.

1.2 Mecanismos involucrados en la progresión del daño renal

Aunque los cambios hemodinámicos están involucrados de manera importante en el desarrollo de la enfermedad renal progresiva, existen diversos fenómenos de carácter inflamatorio y profibrótico que tienen lugar entre el proceso desencadenante inicial y la etapa final del daño renal, los cuales podrían mantener y/o exacerbar el daño tisular.

Diversos estudios han demostrado que el daño renal está asociado con un incremento en la síntesis de óxido nítrico (NO) producido a partir de la isoforma inducible de la familia de las sintasas de óxido nítrico (NOS), caracterizada como NOS-2 la cual se expresa tanto en el glomérulo como en el intersticio renal bajo condiciones patológicas ⁴⁻⁶.

El NO es una molécula lipofílica, altamente reactiva, con diversas funciones biológicas entre las que se encuentran: la regulación del tono vascular ⁷, los procesos de agregación plaquetaria ⁸, inflamación ⁹, aprendizaje y memoria ¹⁰, diferenciación celular ¹¹, migración celular ¹², y apoptosis ¹³.

El NO es generado a partir de L-arginina, oxígeno molecular, y NADPH por una familia de enzimas colectivamente llamadas sintasas de óxido nítrico (NOS), las cuales comparten una organización estructural básica.

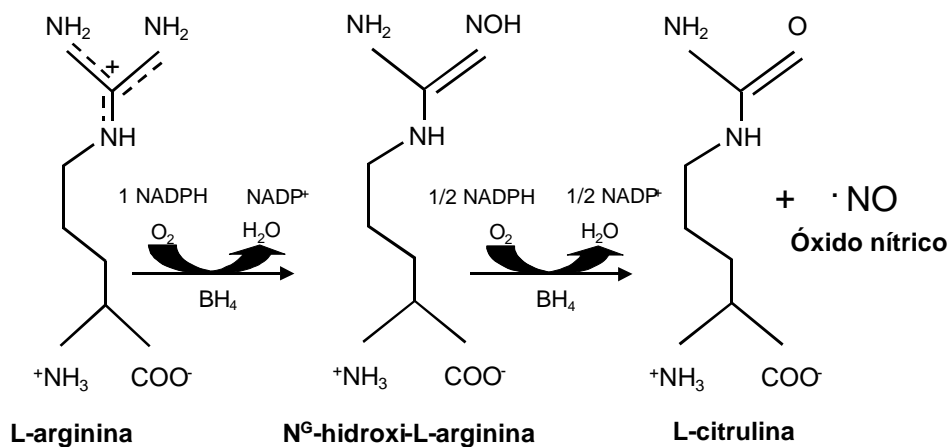


Fig. 1 Reacciones de la sintasa de óxido nítrico. Oxidación de L-arginina dependiente de NADPH para formar L-citrulina y NO.

2. Estructura general de las sintasas de óxido nítrico

Las NOS están constituidas por dos dominios estructurales, un dominio oxidativo localizado en el extremo amino y un dominio reductor localizado en su extremo carboxilo, ambos separados por un dominio de unión a calmodulina. El dominio oxidativo contiene el sitio activo hemo del tipo de la citocromo P-450 y un sitio de unión a tetrahydrobiopterina (BH₄), mientras el dominio reductor contiene un dominio de transferencia de electrones al cual se asocian mononucleótido de flavina (FMN) y flavín adenina dinucleótido (FAD) ¹⁴.

Estructura básica de las NOS

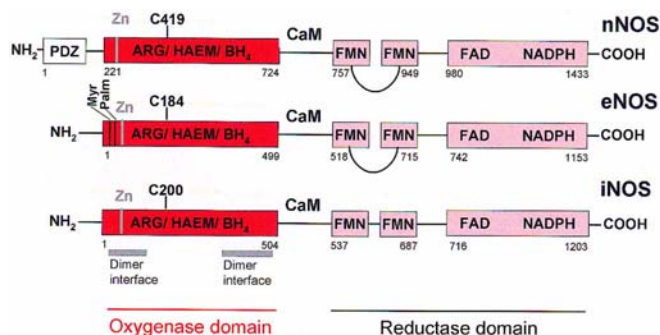


Fig. 2 Estructura básica de las NOS. En este se muestran los dominios estructurales de las sintasas de óxido nítrico, se indican los sitios de unión para L-arginina, hemo, tetrahydrobiopterina (BH₄) y calmodulina,

La actividad de las NOS requiere la asociación de BH₄ y calmodulina, esta asociación puede inducirse por el incremento transitorio en las concentraciones de Ca²⁺ intracelular, actuando como un modulador alostérico de las tres isoformas de la NOS.

Como resultado de su potente reactividad química y su alta capacidad de difusión, la actividad de las NOS están sujetas a una variedad de modificaciones post-transcripcionales, las cuales incluyen: eventos de fosforilación, interacción proteína-proteína y modificación de grupos funcionales, las cuales modulan la distribución espacial, la síntesis de NO, así como su efecto espacio-temporal ¹⁵.

2.1 Localización, función y regulación de las NOS en el riñón normal

Una variedad de métodos se han utilizado para identificar la expresión de las NOS en el tejido renal. Los estudios realizados mediante inmunohistoquímica han demostrado que las tres isoformas de la NOS se expresan en el tejido renal. La NOS-1 o neuronal, caracterizada por primera vez en el tejido nervioso, se expresa predominantemente en la mácula densa,

donde regula el mecanismo de retroalimentación túbuloglomerular, la secreción de renina además de participar en la absorción de HCO_3^- . Aunque, la expresión de la NOS-1 parece estar regulada en el riñón durante condiciones de salud y enfermedad, virtualmente no se conocen con detalle los mecanismos que intervienen en su regulación ¹⁶. Su gen se expande 200 kilobases (KB) localizándose dentro del cromosoma 12, su principal transcrito está constituido por 29 exones, los cuales traducen una proteína de 160 kD ¹⁷.

La isoforma endotelial NOSe o NOS-3 se caracterizó a partir de las células del endotelio vascular, en el tejido renal se expresa predominantemente en el endotelio vascular glomerular, donde participa en la regulación de la resistencia vascular renal tanto de la arteriola aferente como eferente manteniendo el flujo plasmático renal, además de intervenir en el control de la excreción de sodio en la médula renal ante variaciones en la dieta ayudando a mantener la presión arterial sistémica, entre los factores que regulan su expresión se encuentran la tensión sobre la pared vascular, hipoxia, $\text{TNF-}\alpha$, lipoproteínas oxidadas de baja densidad, factores de crecimiento fibroblástico y del endotelio vascular, así como diversas modificaciones post-transcripcionales como la N-miristoilación y palmitoilación del extremo amino indispensables para su correcta ubicación en las caveolas de la membrana celular endotelial ¹⁸. Su gen se localiza dentro del cromosoma 7, constituyéndose de 26 exones, los cuales codifican para una proteína de 135 kD ¹⁹.

Por último, la NOSi ó NOS-2 fue caracterizada en macrófagos, y a diferencia de las isoformas constitutivas (NOS-1 y NOS-3), esta se activa transcripcionalmente después de un estímulo pro-inflamatorio, en el cual la secreción de ciertas citocinas como $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ y lipopolisacáridos facilitan la

unión del factor nuclear- κ B (NF- κ B) a sus elementos de respuesta dentro del promotor de NOS-2 induciendo su expresión, lo cual genera altas concentraciones de NO²⁰. La NOS-2 se identificó en células mesangiales, en la arteriola aferente, y en el epitelio del túbulo colector medular donde probablemente en condiciones normales participa en la excreción de sodio, agua y bicarbonato de sodio¹⁸.

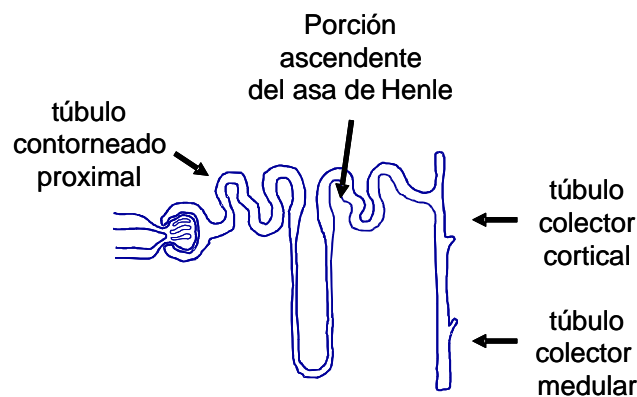


Fig. 3 Localización renal de NOS-2. Segmentos de la nefrona donde se localiza NOS-2

2.2 Organización estructural del promotor de la NOS-2

Se han caracterizado dos regiones dentro del promotor de NOS-2 en el ratón: la Región I, la cual constituye un módulo central, mientras que la segunda región más distal contiene elementos de respuesta a lipopolisacáridos y citocinas²¹. Además se han identificado elementos de respuesta para NF- κ B²², hipoxia²³, cajas C/EBP²⁴, factor regulador del interferón gama tipo-1 (IRF-1)²⁵⁻²⁶, así como dos elementos de respuesta secuenciales activados por IFN- γ dentro de la región II²⁷.

Sin embargo, aunque se ha descrito la organización estructural del promotor para el gen de NOS-2 en el ratón, la regulación transcripcional de este gen en el ser humano difiere notablemente.

En contraste al promotor de NOS-2 en el ratón, las primeras 4.7 kb en el extremo 5' del promotor en el ser humano no contiene elementos de respuesta para citocinas, ya que tales sitios se localizan en secuencias corriente arriba del promotor (- 5.8 kb), además de que se han descrito tres elementos de respuesta para NF- κ B los cuales muestran un efecto sinérgico ²⁸ así como, elementos de respuesta a AP-1, que también le confieren inducibilidad a citocinas ²⁹.

Organización estructural del promotor de la NOS-2 en el ser humano

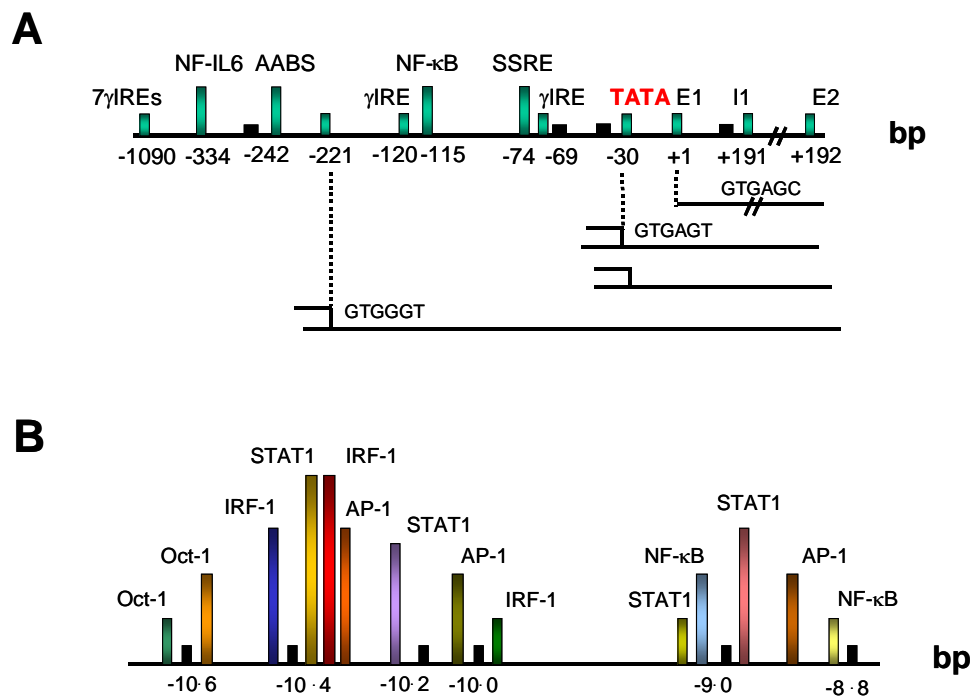


Fig. 4 Organización estructural del promotor de la NOS-2. a) Estructura esquemática del extremo 5' del promotor de NOS-2 de origen humano, el cual muestra los sitios potenciales para la generación de diversas isoformas por splicing alternativo, b) estructura de la región distal del promotor de NOS-2, el cual parece ser un elemento de respuesta a citocinas.

2.3 Participación de NOS-2 en modelos experimentales de daño renal

Se ha mostrado que las altas concentraciones de NO producidas a partir de NOS-2 tiene efectos deletéreos sobre la función celular como la inhibición irreversible del complejo I, II y ATPasa de la cadena respiratoria, la inhibición de la acotinasa y superóxido dismutasa dependiente de Mn (MnSOD) mitocondrial, modificaciones por S-nitrosilación en factores de transcripción bloqueando sus propiedades de unión al DNA, alteraciones en la actividad de proteínas por nitrosilación de grupos funcionales (p21^{ras})³⁰, e inducción de apoptosis, por lo su participación en la progresión del daño renal ha sido evaluada en diversos modelos experimentales.

En este sentido, se han llevado a cabo estudios para evaluar la expresión de NOS-2 mediante análisis de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* en glomérulos aislados de rata con glomerulonefritis por complejos inmunes, los cuales observaron un incremento en los niveles de RNAm de NOS-2 en células mononucleares intraglomerulares y en células del infiltrado inflamatorio intersticial, lo cual sugirió una relación entre la sobreexpresión de NOS-2 y la aparición de alteraciones estructurales en el tejido renal³¹. Por otra parte, Furusu y colaboradores³² demostraron un incremento significativo en la expresión de NOS-2 en biopsias renales de pacientes con nefropatía por IgA, nefritis lúpica, nefropatía membranosa y enfermedad renal de cambios mínimos. Tales evidencias experimentales sugieren la participación de NOS-2 en la generación de daño renal en procesos patológicos que cursan con un proceso inflamatorio crónico.

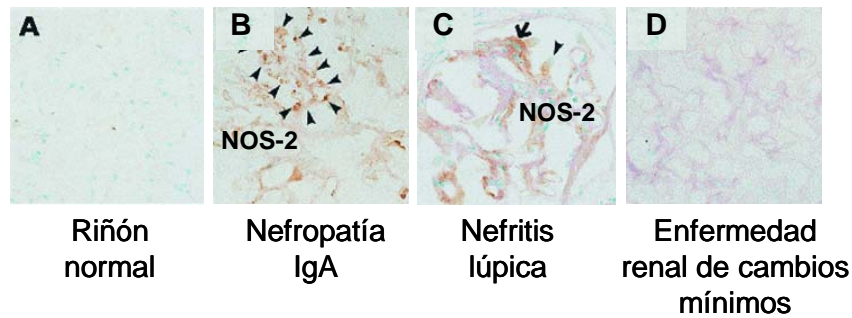


Fig. 5 Sobre-expresión de NOS-2 en biopsias renales de pacientes con nefropatía por IgA y nefritis lúpica, obsérvese la ausencia de NOS-2 en el riñón normal y en pacientes con enfermedad renal de cambios mínimos.

Por otra parte Ketteler y colaboradores ³³, evaluaron la participación de la NOS-2 en un modelo experimental de glomerulonefritis por anticuerpos anti Thy-1, observando un incremento en la expresión de NOS-2, así como un incremento en el número de macrófagos infiltrantes, estos eventos se asociaron con un mayor daño tisular, además de prolongar la respuesta quimiotáctica dando como resultado una mayor respuesta inflamatoria en el tejido renal.

Recientemente, Peters y colaboradores ³⁴, observaron que la administración de L-arginina a ratas con nefritis lúpica experimental indujo una mayor fibrosis renal, la cual se asoció con un incremento en la expresión de factores profibróticos como TGF- β , fibronectina y del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), así como una caída acelerada de la función renal. Además, se han observado efectos deletéreos sobre la estructura y función renal asociados con la administración de L-arginina y la subsiguiente activación de la isoforma inducible en varios modelos experimentales como vasculitis dérmica asociada a inmuno-complejos, daño pulmonar asociado a hipoxia, colitis tóxica y reperfusión cerebral ³⁵⁻³⁷.

Aunque, los estudios mencionados anteriormente han sugerido que la activación de NOS-2 participa de manera importante en el desarrollo del daño renal, otros autores han encontrado resultados contradictorios. Vaziri y colaboradores ³⁸ encontraron una disminución en la expresión de NOS-2 en ratas con Nx 5/6, así como en un modelo de síndrome nefrótico, sugiriendo que la pérdida de la masa renal podría disminuir la expresión de la NOS-2. Además un estudio en pacientes ³⁹, mostró una disminución en la producción total de NO en pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC), sugiriendo que su disminución podría contribuir a la aparición de hipertensión arterial y al desarrollo de la progresión del daño renal.

En relación con las evidencias que sugieren la participación activa de NOS-2 en la evolución del daño renal, Fujihara y colaboradores ⁴⁰ demostraron la expresión diferencial de dos fracciones distintas de NOS-2 en el tejido renal en ratas con nefrectomía 5/6, las cuales fueron caracterizadas como una fracción constitutiva, la cual muestra bajos niveles de expresión en condiciones normales y una fracción intersticial, la cual se induce de manera importante en zonas con un proceso inflamatorio, sugiriendo su participación en la inducción del daño renal.

Actualmente se han desarrollado distintas estrategias para disminuir el proceso inflamatorio en diversos modelos de daño renal crónico como la administración de anti-inflamatorios no esteroideos (nitroflurbiprofen) ⁴¹, la administración de inmunosupresores (micofenolato de mofetil) ⁴²⁻⁴³, así como la utilización de anticoagulantes del tipo de la pentoxifilina ⁴⁴, los cuales mostraron efectos benéficos al disminuir de manera importante el infiltrado inflamatorio, la proteinuria y los cambios estructurales sin modificar la presión arterial,

sugiriendo por una parte, que el proceso inflamatorio que tiene lugar en fases intermedias del daño renal participa de manera importante en la patogénesis y desarrollo de la enfermedad renal progresiva y por otro, que la generación de daño renal depende sólo parcialmente de los cambios sobre la presión arterial sistémica.

Más específicamente, se han realizado estudios donde se ha demostrado el efecto benéfico de la inhibición selectiva de NOS-2 sobre el daño renal. En este sentido, Brooks ⁴⁵ y Fujihara ³⁹ observaron que la administración de un inhibidor selectivo de la NOS-2 (AG) en ratas con nefrectomía subtotal disminuyó la proteinuria y los cambios estructurales asociados con este modelo, sin cambios aparentes sobre la presión arterial sistémica, por lo que los autores sugirieron que su efecto protector podría estar asociado a un efecto anti-inflamatorio como resultado de la inhibición selectiva de NOS-2.

2.4 Activación de COX-2 por NO

Aunque se han descrito diversos mecanismos por los que el NO podría inducir procesos de daño tisular como la generación de radicales libres, actualmente se ha demostrado que el NO podría funcionar como un modulador alostérico de diversas enzimas tales como la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la cual esta involucrada en la generación de prostaglandinas proinflamatorias como PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, prostaciclina; PGI₂, tromboxano A₂ y leucotrienos ⁴⁶.

3. Participación de las prostaglandinas en la función renal

Las PGs son importantes mediadoras de la función renal sus efectos incluyen: regulación de la hemodinámica glomerular, transporte de electrolitos y agua, así como en la producción y secreción de renina ⁴⁷⁻⁴⁸. Los prostanoides

derivados de la actividad de COX-2 también están involucrados en la generación de procesos deletéreos observados durante el desarrollo del daño renal como incremento en la excreción de proteínas urinarias, alteraciones del tono vascular de la arteriola aferente y el desarrollo de fibrosis renal.

3.1 Síntesis de prostaglandinas

Las prostaglandinas (PGs) se generan a partir del metabolismo enzimático del ácido araquidónico por una familia de enzimas identificadas como ciclooxigenasas. Actualmente se han descrito dos isoformas de la ciclooxigenasa caracterizadas como ciclooxigenasa-1 y 2. La COX-1 se expresa ampliamente en diversos órganos (hígado, glándula mamaria, útero, pulmón y riñones) en condiciones basales, sin variaciones sustanciales a lo largo del ciclo celular, mientras que COX-2 se comporta como una proteína inducible en diversos tejidos y tipos celulares, aunque su expresión puede ser constitutiva en diferentes órganos como placenta, cerebro y riñón ⁴⁹.

Entre los estímulos capaces de inducir la expresión de COX-2 se encuentran citocinas pro-inflamatorias, lipopolisacáridos y diversos factores de crecimiento ⁵⁰.

3.2 Factores que modulan la activación del promotor de COX-2

Mediante el análisis de la secuencia del promotor de COX-2 se han identificado un gran número de sitios consenso, al cual se unen diversos factores de transcripción ⁵¹.

Entre los factores de transcripción involucrados en la activación del promotor para COX-2 se destacan: NF- κ B ⁵², el factor nuclear de células T activadas (NF-AT) ⁵³, la proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc (CREB) ⁵⁴, la proteínas de asociación a facilitadores con secuencias CAAT

(C/EBP)⁵⁵, sitios de unión a AP-1 y AP-2⁵⁶⁻⁵⁷, factor nuclear del IL-6 (NF-IL6)⁵⁸, sitios de unión a la proteína específica-1 (SP-1)⁵⁹, así como sitios de unión para receptores de activación para la proliferación de peroxisomas (PPARs)⁶⁰.

3.3 Participación de NOS-2 y COX-2 en la progresión del daño renal

Con respecto a la contribución de COX-2 en la progresión del daño renal, existen diversas evidencias experimentales que demuestran su participación en la generación de daño renal. Wang y colaboradores demostraron la sobre-expresión de COX-2 en riñones de ratas con Nx 5/6, lo cual se asoció importantemente a la aparición de alteraciones estructurales en el tejido renal⁶¹. Posteriormente, el mismo grupo, demostró que la administración de un inhibidor selectivo de COX-2 disminuyó significativamente la proteinuria, así como el desarrollo del daño renal progresivo⁶², lo cual sugirió que el aumento en los niveles de expresión de COX-2 en condiciones patológicas, puede iniciar y/o acelerar el daño renal.

Por otra parte, en un modelo de glomerulonefritis aguda mediada por complejos inmunes se demostró que la inhibición selectiva de COX-2 produjo una disminución en la actividad y expresión de la NOS-2, mientras que la inhibición de NOS-2 indujo un efecto negativo sobre la actividad de COX-2 *in vivo*, sugiriendo que la existencia de vías de intercomunicación entre NO y prostanooides podrían contribuir al daño renal⁶³.

Por su parte, Vane y colaboradores demostraron la expresión simultánea de NOS-2 y COX-2 en un modelo experimental de inflamación granulomatosa en la rata, por lo que los autores sugirieron que la producción concurrente de eicosanoides como PGE₂, así como la producción de NO contribuyen de manera importante en el proceso inflamatorio al incrementar la producción de

sus moléculas efectoras AMPc y GMPc, respectivamente ⁶⁴ y por otra la generación de vías de retroalimentación positiva que amplifican y perpetúan el proceso inflamatorio ⁶⁵.

Aunque recientemente se ha dado mayor importancia a las vías de intercomunicación que se establecen entre NOS-2 y COX-2, se han descrito procesos de activación de COX-2 a través del NO sintetizado a partir de NOS-1 ⁶⁶ o la modulación de NOS-3 por eicosanoides producidos a partir de COX-2 ⁶⁷ durante el periodo perinatal y durante el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) en distintas especies, por lo que resulta importante considerar que los productos de ambas enzimas pueden establecer vías de retroalimentación tanto positivas como negativas.

Organización estructural del promotor de la COX-2:

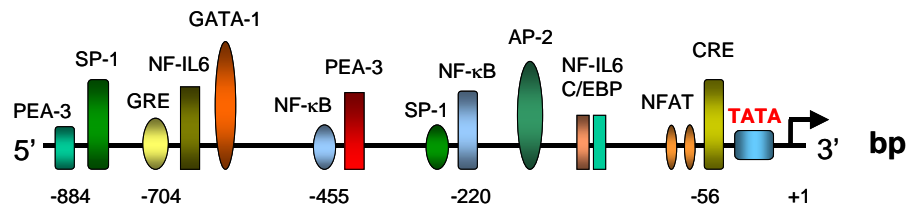


Fig. 6 Representación esquemática del promotor de COX-2 en el ser humano, el cual muestra sitios consenso para distintos factores de transcripción.

Bajo diversas circunstancias los efectos del NO sobre la expresión de COX-2 son de carácter inhibitorio, por lo que los efectos del NO sobre la expresión de COX-2 podrían estar relacionados con las concentraciones de NO, el tipo celular y el estado de activación celular ⁶⁸⁻⁶⁹.

3.4 Participación de NOS-2 y TGF- β 1 en la evolución del daño renal

Resulta importante señalar, que además de establecer mecanismos de intercomunicación entre vías proinflamatorias, los productos derivados de NOS-2 (NO y peroxinitratos) podrían incrementar la biodisponibilidad de factores profibróticos tales como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β).

3.5 Biología del TGF- β 1

El TGF- β es una citocina que pertenece a una gran familia de proteínas estrechamente relacionadas, las cuales incluyen además de la familia del TGF- β a las activinas y a las proteínas morfogenéticas del hueso o (BMPs) ⁷⁰.

De esta familia de proteínas, la más ampliamente estudiada es el TGF- β 1, el cual es secretado como un homodímero inactivo de 25 kDa unido con una proteína asociada de latencia o LAP. En algunos casos, este complejo puede estar asociado a una proteína de 125-160 kDa, caracterizada como proteína de unión al TGF- β latente ó LTBP- β . La proteína asociada de latencia inhibe la unión del TGF- β a su receptor ⁷¹.

La familia del TGF- β se une a su familia de receptores, la cual comprende 7 receptores de tipo I y 5 receptores del tipo II ⁷². Los receptores tipo I y tipo II pueden formar una variedad de heterodímeros los cuales han sido descritos en el tejido renal ⁷³.

Los receptores para el TGF- β 1 fueron caracterizados como TbRI y TbRII los cuales funcionan como cinasas de serina/treonina cinasa asociados a membrana, los cuales posterior a la unión del ligando fosforilan una serie de proteínas, caracterizadas como R-Smad's (Smad 2-3 para TGF- β 1 y activinas: Smad 1, 5 y 8 para BMP's), las cuales una vez activadas establecen hetero-

trímeros con un segundo tipo de Smad común a todas las vías caracterizadas como Co-Smad's (Smad-4). La tercera categoría de Smads, las Smads inhibitorias (Smad-6 y 7), funcionan como elementos inhibitorios de la vía del TGF- β 1 y su expresión ha sido identificada en el riñón ⁷⁴⁻⁷⁷.

Mecanismos de acción del TGF- β

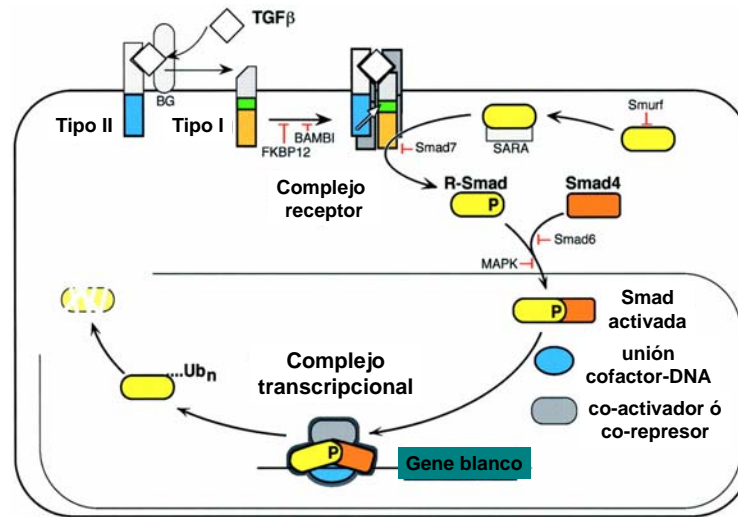


Fig. 7 Representación esquemática de las vías de señalización TGF- β /Smad's. Este sistema, involucra una familia de receptores membranales con actividad cinasa, los cuales fosforilan una serie de proteínas caracterizadas como Smad's, una vez activadas estas pueden formar complejos multiméricos, los cuales pueden actuar como factores de transcripción.

3.6 El TGF- β y la fibrosis renal

Existen diversos estudios que involucran al TGF- β 1 en la acumulación de matriz extracelular (MEC) en el glomérulo y en el desarrollo de la fibrosis renal. Esta citocina se expresa en el tejido renal del ser humano y se ha asociado con un incremento en la síntesis de elementos de la matriz extracelular en diversas enfermedades del riñón ⁷⁸⁻⁷⁹.

Además, se ha demostrado una clara relación entre el desarrollo de fibrosis túbulointersticial y la sobreexpresión del TGF- β 1 en ratones transgénicos ⁸⁰, lo cual sugieren que el TGF- β podría inducir la acumulación de

matriz extracelular en el riñón favoreciendo el desarrollo de fibrosis túbulo intersticial.

El empleo de maniobras experimentales utilizadas para disminuir el daño renal secundario a la expresión y actividad del TGF- β 1, como la infusión intrarrenal de un oligonucleótido antisentido dirigidos contra el RNAm del TGF- β en un modelo de obstrucción ureteral unilateral, disminuyó el desarrollo de fibrosis túbulo intersticial, sugiriendo la participación del TGF- β 1 en el desarrollo del daño tisular renal ⁸¹.

Por el contrario, no todos los estudios han detectado niveles elevados de TGF- β 1 en enfermedades renales en humanos o en modelos experimentales de glomeruloesclerosis, lo cual puede estar en relación con el tipo de enfermedad renal o bien al curso temporal de la misma, dentro del cual el TGF- β 1 podría cambiar su patrón de expresión dando lugar a la activación de otros factores profibróticos como el factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF) ⁸².

3.7 Interacción de NOS-2 y TGF- β 1 en la progresión del daño renal

Existen evidencias experimentales que demuestran vías de interacción funcional entre NOS-2 y TGF- β 1, las cuales podrían establecer asas de retroalimentación positiva para este último, que podrían incrementar la biodisponibilidad del TGF- β 1 activo al inducir cambios conformacionales en el péptido asociado de latencia (LAP), dependientes de la generación de estrés oxidativo derivadas de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, lo cual permitiría la unión del TGF- β 1 a su receptor activando las vías de señalización mencionadas anteriormente ⁸³⁻⁸⁴.

Los datos anteriores sugieren que el NO sintetizado a partir de NOS-2 podría establecer mecanismos de intercomunicación, los cuales activarían factores pro-inflamatorios y pro-fibróticos facilitando la aparición de alteraciones morfo-funcionales como proteinuria, pérdida progresiva de la función renal, fibrosis renal así como, el desarrollo de arteriopatía, acelerando la caída de la función renal y la evolución a la enfermedad renal terminal.

1. Justificación

La insuficiencia renal crónica representa un importante problema de salud, la cual se presenta generalmente como un evento secundario a diversas patologías pre-existentes como hipertensión arterial, diabetes mellitus, aterosclerosis, etc. En México la insuficiencia renal es una de las principales causas de atención hospitalaria ocupando el 4º lugar en hombres y el 10º lugar en mujeres.

Asimismo este padecimiento ocupa el 10º lugar de mortalidad en la población masculina con 1972 casos y el 8º lugar en la población femenina con 1743 casos.

Aunque los cambios hemodinámicos están involucrados de manera importante en el desarrollo de la enfermedad renal progresiva, recientemente se ha dado importancia a los procesos patológicos que tienen lugar entre el proceso inicial y las etapas tardías del daño renal, entre éstos destaca el proceso inflamatorio renal, el cual se asocia con la expresión de NOS-2 en diversos modelos experimentales de enfermedad renal ³⁰⁻³². Sin embargo, aunque existen controversias con respecto a la expresión de NOS-2 durante la evolución del daño renal ³⁷, datos recientes sugieren que las altas concentraciones de NO producidas como resultado de la sobre-expresión de NOS-2 podría activar y/o inducir la expresión de moléculas pro-inflamatorias y pro-fibróticas como COX-2 ⁶⁷⁻⁶⁸ y TGF- β 1 ⁸³⁻⁸⁴, las cuales podrían establecer asas de retroalimentación positiva que a su vez facilitarían la evolución del daño renal. Por lo que el estudio del patrón de expresión de NOS-2 durante la progresión del daño renal, su efecto sobre la expresión de COX-2 y TGF- β 1, y su asociación con la aparición de alteraciones estructurales en el riñón,

permitirá por una parte aclarar las controversias existentes con respecto a la expresión de NOS-2 durante la evolución del daño renal y por otra establecerá por primera vez en el riñón, si existe una asociación entre la sobre-expresión de NOS-2 y la inducción de moléculas pro-inflamatorias y pro-fibróticas, durante la progresión de la enfermedad renal.

5. Hipótesis

1. La ablación renal subtotal incrementará los niveles de expresión de NOS-2 en el tejido renal, lo cual se asociará con la sobreexpresión de COX-2 y TGF- β 1, facilitando la aparición de lesiones estructurales en el tejido renal como el engrosamiento de la capa media de la arteriola aferente (arteriopatía) y el incremento en el depósito de matriz extracelular en el túbulo-intersticio (fibrosis túbulo-intersticial).
2. La inhibición selectiva de NOS-2 con AG y L-NIL reducirá los niveles de expresión de COX-2 y TGF- β 1 en el tejido renal, así como el desarrollo de arteriopatía y la fibrosis túbulo-intersticial.

6. Objetivos

6.1 Generales

1. Evaluar la expresión de NOS-2 en la progresión del daño renal en un modelo de Nx 5/6 en la rata.

6.2 Específicos

- a) Evaluar el efecto de NOS-2 sobre la expresión de RNAm y proteína de COX-2 y TGF- β 1 en un modelo de Nx 5/6 en la rata.
- b) Evaluar el efecto de la inhibición crónica de NOS-2 sobre la arteriopatía y fibrosis túbulo-intersticial en el tejido renal de ratas con Nx 5/6.
- c) Analizar el efecto de la inhibición crónica de la NOS-2 con la administración de dos inhibidores selectivos de NOS-2 (AG y L-NIL) sobre la expresión del RNAm y proteína de COX-2 y TGF- β 1, así como sobre el desarrollo de arteriopatía y fibrosis tubulointersticial.

7. Material y Métodos

Se utilizaron 72 ratas machos de la cepa Sprague-Dawley con un peso de 300 g, las cuales se obtuvieron de Harlan, México. Cuarenta y cuatro ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg/kg de peso por vía intraperitoneal, después de lo cual se efectuó la nefrectomía 5/6 (Nx 5/6), la cual se realizó al escindir el riñón derecho y ligar de dos a tres ramas de la arteria renal izquierdas riñones, con lo cual se logra infartar 5/6 partes del tejido renal, tomando en cuenta que cada riñón se divide en 3/3 para fines quirúrgicos. Después de recuperarse de la anestesia, los animales fueron colocados en sus jaulas originales teniendo libre acceso al agua y alimento (0.5 % Na⁺, 22% de proteínas), los animales fueron mantenidos a 20 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

Las ratas se asignaron a 3 grupos: Grupo Control: constituido por 24 ratas las cuales sólo fueron manipuladas sin someterse a ninguna maniobra experimental, Grupo con Nefrectomía 5/6 (Nx 5/6): integrado por 24 ratas las cuales se sometieron a Nx 5/6, y el grupo con Nx 5/6 constituido por 24 ratas a las cuales se les administró 24 h después de la cirugía, dos inhibidores selectivos de NOS-2 (AG al 0.1 % en el agua de beber, durante 21 días, con recambio del inhibidor c/24 h). Sin embargo, debido a la disminución en la producción de los productos avanzados de glicosilación AGE's (caracterizados como agentes etiopatológicos importantes en la progresión del daño renal) inducido por AG, se agregó un grupo adicional de ratas, al cual se le administró el segundo inhibidor selectivo de NOS-2, (L-NIL 15mg/L en el agua de beber, durante 21 días, con recambio del inhibidor c/24 h), el cual no presenta algún

efecto sobre la producción de los AGE's. Todos los grupos fueron evaluados durante 21 días.

7.1 Cuantificación de la presión arterial sistólica (PAS)

La presión arterial sistólica se midió en la cola de ratas conscientes por medio del método de pletismografía (Narco Biosystem, Austin, TX, USA). Las ratas se entrenaron antes de medir la presión arterial realizándose dos mediciones una al inicio y otra al final del protocolo experimental.

7.2 Proteinuria y depuración de creatinina

Se realizaron recolecciones de orina de 24 horas en cajas metabólicas de todos los grupos experimentales, se determinó la excreción renal de proteínas por medio de un método turbidimétrico con ácido tricloroacético (TCA). Se preparó una solución estándar de albúmina sérica bovina en solución salina al 0.9% a una concentración de 1,000 $\mu\text{g/ml}$. A partir de esta solución se prepararon estándares de 100, 200, 400 y 800 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente se centrifugaron 3 ml de orina de cada grupo experimental a 1000 x g durante 10 min y se tomó 1 ml del sobrenadante de cada muestra, a los cuales se les agregó 250 μl de TCA al 12.5 % al igual que a los estándares de albúmina. Cada orina problema se comparó con un blanco (1 ml de solución salina + 250 μl de TCA). La absorbencia se ajustó a 0 con el blanco mencionado anteriormente. Tanto las muestras problemas como sus respectivos blancos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. al final se cuantificó la concentración de proteínas a una λ de 420 nm. Las determinaciones de creatinina se realizaron con un método colorimétrico (Creatinina test, Spinreact, Girona, España), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

7.3 Obtención de RNA

Después de un período de 21 días las ratas se sacrificaron, para lo cual se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso i.p.) se obtuvo su riñón izquierdo, el cual se dividió macroscópicamente en corteza y médula renal, ambas secciones renales se congelaron en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su utilización.

El RNA total se aisló a partir de cortezas y médulas renales de ratas individuales por el método de cloruro de cesio-tiocianato de guanidina. Se utilizaron aproximadamente 250 mg de tejido, el cual se homogenizó en 8 ml de una solución de lisis (4 M de tiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sodio, 0.5 % de lauril sarcosil (w/v) y 0.1 M de β -mercaptoetanol) y luego se centrifugó a $1800 \times g$ durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a tubos de polialómero a los cuales se agregó 4 ml de cloruro de cesio (CsCl 5.68 M, acetato de sodio 3M pH 5.2). Las muestras se centrifugaron a $150,000 \times g$ durante 18 h a 20°C en un rotor Sorvall modelo TH-641. El precipitado de cada muestra se resuspendió en $300 \mu\text{l}$ de H_2O grado biología molecular (BM) para las cortezas y en $150 \mu\text{l}$ para las médulas renales. Posteriormente se precipitaron con 0.1 vol de acetato de sodio 3M pH 5.2 durante 24 h., la concentración de RNA total se determinó a una λ de 260-280 nm (Beckman DU640; Beckman Brea, CA, USA). La integridad del RNA se evaluó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se visualizó en un transiluminador de UV (Stratagene mod. 2020E).

7.4 Tratamiento con DNasa

Para evitar la contaminación de las muestras de RNA total con DNA genómico, estas se trataron con DNasa I. Tanto las cortezas como las

médulas renales precipitadas con 24 horas de anticipación se centrifugaron a 1500 x g a 4 °C durante 30 min., posteriormente se extrajo el sobrenadante por decantación y se agregaron 500 µl de etanol grado BM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) al 70% y se centrifugaron nuevamente a 1500 x g a 4°C durante 5 minutos extrayendo completamente el sobrenadante después de lo cual, se repitió nuevamente otro ciclo de centrifugación bajo las mismas condiciones durante 1 minuto.

Cada muestra se colocó en el desecador durante 2 minutos para remover cualquier remanente del sobrenadante y tanto las muestras de corteza como de médula renal se resuspendieron en 50 µl de agua grado BM. Posteriormente, se agregó 1 UI de DNAasa I-libre de RNAasa (Roche, Mannheim, Germany) por cada 100 µl de muestra, se incubaron a 37°C durante 15 min en presencia de volúmenes iguales de una mezcla de fenol-cloroformo-isoamílico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), y se agitaron y centrifugaron a 1500 x g durante 5 min. Se obtuvo el sobrenadante de cada muestra teniendo cuidado de no mezclar ambas fases, el cual se precipitó con 0.1 V de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 3 V de etanol grado BM al 100%. La precipitación se realizó durante dos horas a -80°C, los ciclos de centrifugación se repitieron y al final las muestras se resuspendieron en 50 µl de agua BM y la concentración de RNA total se cuantificó a una λ de 260- 280 nm.

7.5 Cuantificación relativa del RNAm para NOS-2, COX-2 y TGF- β

La expresión relativa de NOS-2, COX-2 y TGF- β 1 se cuantificó tanto en la corteza como en la médula renal por medio del método de reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la transcriptasa reversa (RT-PCR) utilizando los

iniciadores obtenidos de (Invitrogen life technologies, CA, USA) mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de iniciadores utilizados para amplificar NOS-2, COX-2, TGF- β 1 por RT-PCR convencional

Iniciador	Secuencia	Referencia
NOS-2	Sentido 5' GTC TTC CAC CAG GAG ATG TTG 3' Antisentido 5' CTC CTG CCC ACT GAG TTC GTC 3'	Morrissey et al ⁸⁵ 570 bp
COX-2	Sentido 5' GCT GCT GAG AAG GGA GTT 3' Antisentido 5' GGT GGT ACT GTC GTT CCA 3'	Castrop et al ⁸⁶ 356 bp
TGF- β 1	Sentido 5' CAC CAT CCA TGA CAT GAA CC 3' Antisentido 5' TCA TGT TGG ACA ACT GCT CC 3'	Morath et al ⁸⁷ 403 bp
GADPH	Sentido 5' ATTGCATCCTGCACCACCAA 3' Antisentido 5' GTAGCCATATTCATTGTCATA 3'	Rocco et al ⁸⁸ 515 bp

Para evaluar los efectos no específicos de las maniobras experimentales y los niveles de expresión de NOS-2, COX-2 y TGF- β 1, amplificamos un fragmento del gen correspondiente a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) utilizando un iniciador previamente descrito ⁸⁸, el cual amplificó un producto de 515 pb. La contaminación por DNA genómico se descartó al amplificar las muestras sin agregar la transcriptasa reversa.

La reacción de transcripción reversa (RT) se realizó utilizando 5 μ g del RNA total obtenido a partir de la corteza y médula renal de cada rata. Previamente a cada reacción de RT, el RNA se sometió a 65°C durante 10 min. La RT se realizó a 37°C durante 60 min en un volumen total de 20 μ l, utilizando 200 U de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia del ratón (MMLV,

Invitrogen Life Technologies, CA, USA), y 100 pmol de hexámeros, 0.5 mM de cada dNTP (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) y 1 X del buffer de reacción para la RT (75 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8.3). Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min. para inactivar la transcriptasa reversa y posteriormente se diluyeron en 40 µl de agua grado BM. Se utilizó un décimo de la reacción de RT de cada muestra de los diferentes grupos para realizar la amplificación por PCR de los productos correspondientes a NOS-2, COX-2, TGF-β1 y GADPH en una mezcla de reacción con un volumen total de 20 µl el cual contenía 1X de buffer de PCR (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3), 0.1 mM de dNTP, 10 µM de cada iniciador, y 1 unidad de la Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA). Las muestras se cubrieron con 30 µl de aceite mineral grado biología molecular, y los ciclos de la reacción se llevaron a cabo en un termociclador (M.J. Research, Watertown, MA, USA) con el siguiente perfil: desnaturalización 1 min 94 °C, alineamiento 1 min 55°C para NOS-2, 60°C para COX-2, y 55°C para TGF-β1 y GADPH y 1 min de extensión a 72°C. El último ciclo fue seguido por un paso final de 5 min a 72°C. El gen control fue co-amplificado simultáneamente en cada reacción.

Se realizaron estudios preliminares para determinar el número óptimo de ciclos de amplificación. Para analizar los productos de PCR, cada reacción se evaluó por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 5%. Las bandas se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV, y posteriormente se analizaron con un software digital (Kodak 1D Image Analysis Software, Scientific Imaging System, Eastman Kodak Company, NY, USA) para determinar su densidad óptica relativa. A partir de la cinética de amplificación,

se determinó el número óptimo para cada par de iniciadores obteniendo los siguientes resultados: 30 ciclos para NOS-2, 27 ciclos para COX-2, 28 ciclos para TGF- β 1 y 20 ciclos para GAPDH tanto en la corteza como en la médula renal. Para determinar semicuantitativamente la expresión de los genes antes mencionados, todas las reacciones se evaluaron de manera individual a partir del RNA total de cada corteza y médula renal de todos los grupos involucrados.

7.6 Cuantificación relativa del RNAm para NOS-2, COX-2 y TGF- β 1 por RT-PCR en tiempo real

Se cuantificaron los niveles de RNAm para NOS-2, COX-2, TGF- β 1 y β -actina por medio de la técnica de RT-PCR en tiempo real, en ratas a las cuales se les administró L-NIL utilizando un sistema LightCycler 2.0 (Roche Applied System, Mannheim, Germany) empleando el siguiente reactivo: Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies, CA, USA), el cual se utilizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de cada gen se amplificaron bajo las siguientes condiciones: Preincubación a 95°C durante 10 min, desnaturalización a 95°C durante 10 s, alineamiento a 60°C durante 10 s y extensión a 72°C durante 12 s, durante 40 ciclos. La secuencia de los iniciadores se enlista en la tabla 2, el iniciador de β -actina se reportó previamente⁹⁰.

Los resultados se cuantificaron como el valor de Ct, donde Ct se define como el número de ciclos de la PCR a la cual se detecta por primera vez el amplicon y se expresa como la siguiente relación (gen blanco/gen control)⁹¹.

Tabla 2. Iniciadores utilizados para amplificar NOS-2, COX-2, TGF- β 1 y b-actina por RT-PCR en tiempo-real.

Iniciador	Secuencia	Referencia
NOS-2	Sentido 5' TGC ATG GAC CAGTAT AAG GCA AAC 3' Antisentido 5' GTT TCT GGT CGA TGT CAT GAG CAA 3'	Egido et al ⁸⁹
COX-2	Sentido 5'-GAA ATG GCT GCA GAG TTG-3' Antisentido 5' TCA TCT AGT CTG GAG TGG 3'	Castrop et al ⁸⁵
TGF- β 1	Sentido 5' CAC CAT CCA TGA CAT GAA CC 3' Antisentido 5' TCA TGT TGG ACA ACT GCT CC 3'	Morath et al ⁸⁶
β -actina	Sentido 5' CGGGATCCCCGCCCTAGGCACCAGGGT 3' Antisentido 5'GGAATTCGGCTGGGGTGTGGAAGGTCTCAA 3'	Vitzthum ⁹⁰

7.7 Western blot

Se obtuvieron los riñones de ratas de los grupos involucrados, los cuales se congelaron en nitrógeno líquido y se colocaron a -80°C hasta su utilización. Para los estudios de inmunotransferencia, los riñones totales se homogenizaron en una solución de lisis la cual contenía (30 mM Tris-HCl, 10 % glicerol, 5 mM EDTA, y una mezcla de inhibidores de proteasas (Amersham, Biosciences, NJ, USA) a una dilución de 1:100, pH 8.0). Después de 10 min. de centrifugación a 10, 000 g, el sobrenadante se dividió en dos partes, una se utilizó para la determinación de NOS-2 y β -actina en el homogenado total y la otra se centrifugó a 200,000 g para obtener microsomas para la determinación de COX-2. La concentración de proteínas se determinó con un kit (Bio-Rad Hercules, CA, USA). Los microsomas y homogenados totales se resuspendieron en el amortiguador de muestra con dodecil sulfato de sodio (SDS), calentados a 100°C durante 5 min., y las proteínas se separaron en un gel desnaturizante conteniendo SDS-poliacrilamida al 10% a un voltaje

constante de 100 V por aproximadamente 1 h. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF, Hybond-P (Amersham Biosciences, NJ, USA).

Para determinar la eficacia de la transferencia de proteínas a la membrana, esta se tiñó con el reactivo de Ponceau S (Sigma-Aldrich Inc., CA, USA).

Las membranas se incubaron con los anticuerpos monoclonales primarios para NOS-2 (dilución 1:500) (BD Transduction Laboratorios, Mississauga, ON Canada), la β -actina (1:500, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) y COX-2 (dilución 1:500, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), durante 60 min. Posteriormente, fueron incubadas con el anticuerpo secundario a una dilución de 1:6,000 (ECL Plus Western Blotting Reagent Pack, Amersham Biotechnology, NJ, USA), y las proteínas de interés se visualizaron utilizando un reactivo quimioluminiscente (ECL Detection System, Amersham Biotechnology, NJ, USA). Los niveles de proteína de NOS-2, COX-2 y β -actina se cuantificaron por medio de un análisis densitométrico de las membranas expuestas a placas autoradiográficas, las cuales se analizaron con un sistema digital de imágenes (Kodak 1D Image Analysis Software, Scientific Imaging System, Eastman Kodak Company, NY, USA) para determinar su densidad óptica relativa.

7.8 Cuantificación de la fracción activa del TGF- β 1

La cuantificación de los niveles plasmáticos de la fracción activa del TGF- β 1 se realizó en todos los grupos involucrados utilizando un reactivo comercial mediante la técnica de ELISA (Quantikine, R and D System, Minneapolis, MN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.9 Histología Renal

Los riñones remanentes se perfundieron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4%. El riñón se sumergió en parafina y se obtuvieron secciones de tejido de 4 μm , que luego se tiñeron con ácido peryodico de Schiff (PAS). La morfología arteriolar se valoró por medio de inmunotinción indirecta con peroxidasa con un antígeno dirigido contra la α -actina del músculo liso (DAKO Corp. Carpinteria, CA, USA).

Cuantificación morfológica: se realizó por un patólogo, al cual no se le informó sobre las maniobras experimentales de cada muestra (examen ciego). Las arteriolas aferentes se identificaron por su localización adyacente al polo vascular del glomérulo, la presencia de su lámina elástica interna y por contar con una capa de células endoteliales más delgada que la que posee la arteriola eferente ⁹².

Decidimos excluir del análisis todos los vasos que mostraban más de una capa de células endoteliales de acuerdo a Clapp y colaboradores ⁹³.

Para cada arteriola, el diámetro externo y su diámetro interno (excluyendo el endotelio) se generó por medio de un análisis computacional para calcular el área media total (diámetro externo (DE) – diámetro interno (DI)), en 10 arteriolas por muestra. El índice media lumen se calculó por la relación DE/DI.

La evaluación de la fibrosis túbulo-intersticial se realizó por un patólogo, en forma ciega. Las muestras se tiñeron con el agente tricrómico de Masson. Se analizaron 10 campos de corteza por biopsia (640 X 477 mm a 10X) las cuales se analizaron por medio de microscopía de luz en un microscopio Olympus BX51 (Olympus American, Melville, NY, USA) y capturadas en una

cámara de video digital (CoolSnap Pro, Media Cybernetics Silver Spring, MD). Las fotografías se procesaron en una computadora y posteriormente fueron analizadas utilizando el programa Image-Pro-Plus 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) y el Adobe Photoshop 7 (Adobe Systems, San Jose, CA). Tomando ventaja de las capacidades de reconocimiento del color que posee el software, las áreas en color azul se seleccionaron y cuantificaron en pixeles, excluyendo previamente del campo los glomérulos y vasos. Por cada campo examinado, el número de áreas positivas se expresó como una fracción del área túbulo-intersticial (áreas azules positivas divididas entre el área total). Finalmente, para cada biopsia, la cantidad fraccional media de áreas azules positivas se obtuvo al promediar los valores de 10 campos examinados.

7.10 Estudios por Inmunohistoquímica

La inmunolocalización de la NOS-2 se evaluó por medio de la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa indirecta utilizando un anticuerpo anti-NOS-2 (BD Transduction Laboratories). La cuantificación se realizó de manera ciega y se analizaron 10 campos glomerulares por biopsia en un microscopio Olympus BX51 (Olympus America Inc., Melville, NY, USA). La expresión de NOS-2 en el tejido renal se evaluó con un analizador de imagen digital (Image-Pro-Plus). Los resultados se expresaron como la relación entre el número de células positivas/número de núcleos en células glomerulares.

7.11 Análisis estadístico

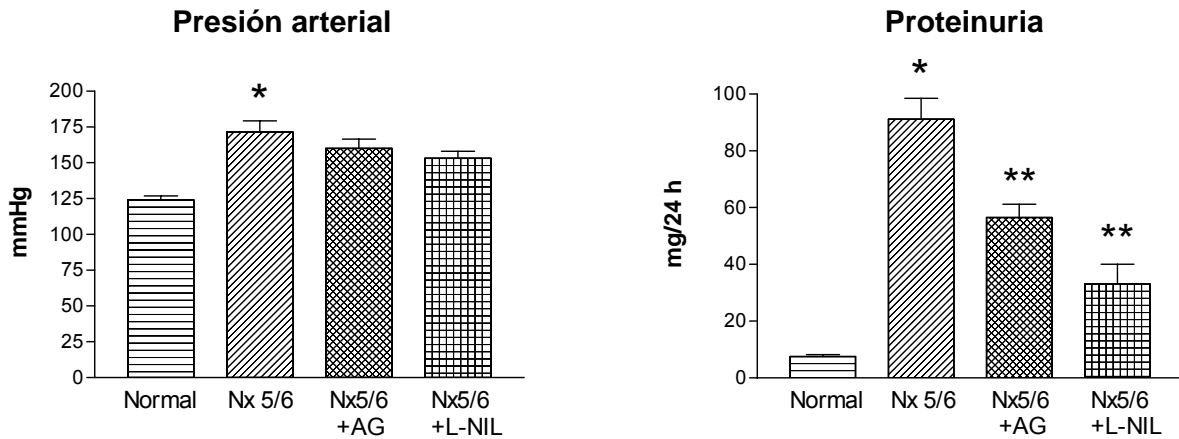
Los datos se analizaron utilizando el programa GraphPad Prism 3.0. Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Bonferroni. Se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

8. Resultados

8.1 Presión arterial sistólica y proteinuria

Los valores de presión arterial sistólica en ratas normales fueron de 125.0 ± 2.9 mmHg, por el contrario los animales experimentales sujetos a nefrectomía renal subtotal (Nx 5/6) desarrollaron un incremento significativo en los valores de presión arterial al finalizar el protocolo experimental (170.0 ± 7.7 vs 125.0 ± 2.9 mmHg). La administración de AG ó L-NIL en ratas con Nx 5/6 no modificó los valores de presión arterial, siendo similares a las ratas nefrectomizadas.

Con respecto a la proteinuria, las ratas a las cuales se les realizó la Nx 5/6 presentaron un incremento significativo en la excreción de proteínas urinarias (91.1 ± 7.4), comparadas con las ratas normales, las cuales presentaron valores de 7.5 ± 0.7 mg/24 h. La administración de AG y L-NIL indujeron una disminución significativa de la proteinuria con respecto a las ratas con Nx 5/6, las cuales sin embargo, no alcanzaron los valores basales (56.5 ± 4.7 y 33 ± 7 mg/24 h respectivamente).



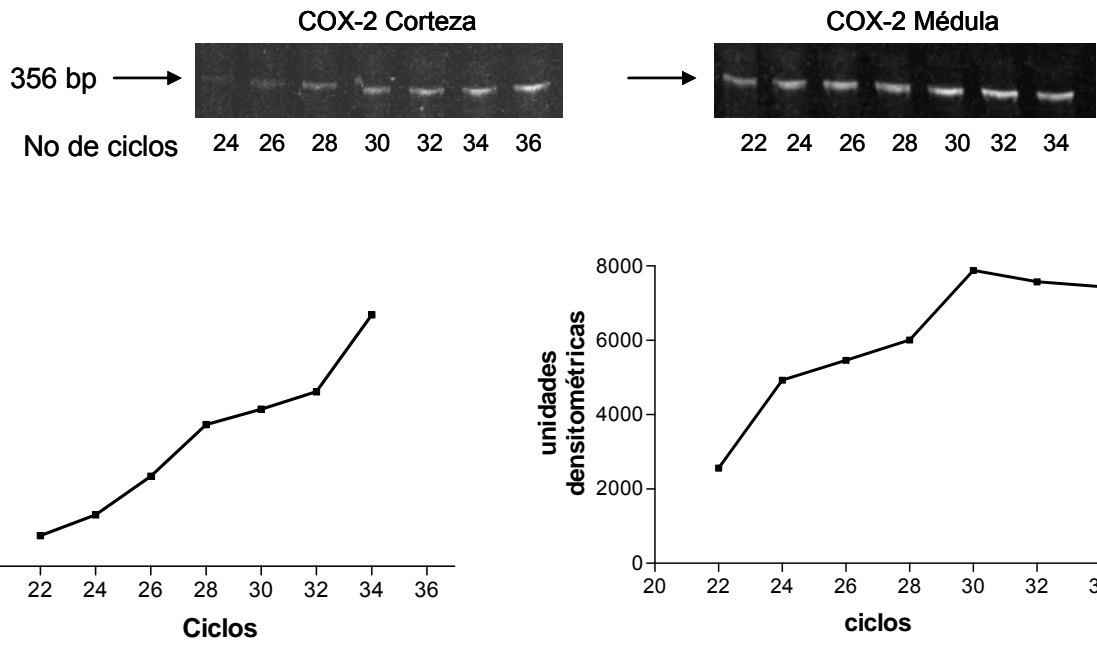
*p<0.05 vs. Normal; **p<0.05 vs. Nx 5/6.

Fig. 1 Valores de presión arterial y proteinuria en ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.

8.2 Cinéticas de amplificación de COX-2 y TGF- β 1 mediante RT-PCR semicuantitativa convencional

Se realizaron las cinéticas de amplificación de NOS-2, COX-2 y TGF- β 1 en la corteza y médula renal de ratas normales para determinar el número óptimo de ciclos de amplificación, para lo cual se utilizaron 2.5 μ g/ μ l de RNA total para cada reacción, estableciendo los siguientes perfiles de amplificación: NOS-2: 30 ciclos, COX-2: 27 ciclos y TGF- β 1 28 ciclos tanto en la corteza como en la médula renal. Los ciclos óptimos de amplificación de GADPH y NOS-2 se describieron previamente^{85, 88}.

Cinéticas de amplificación COX-2



Cinéticas de amplificación TGF- β 1

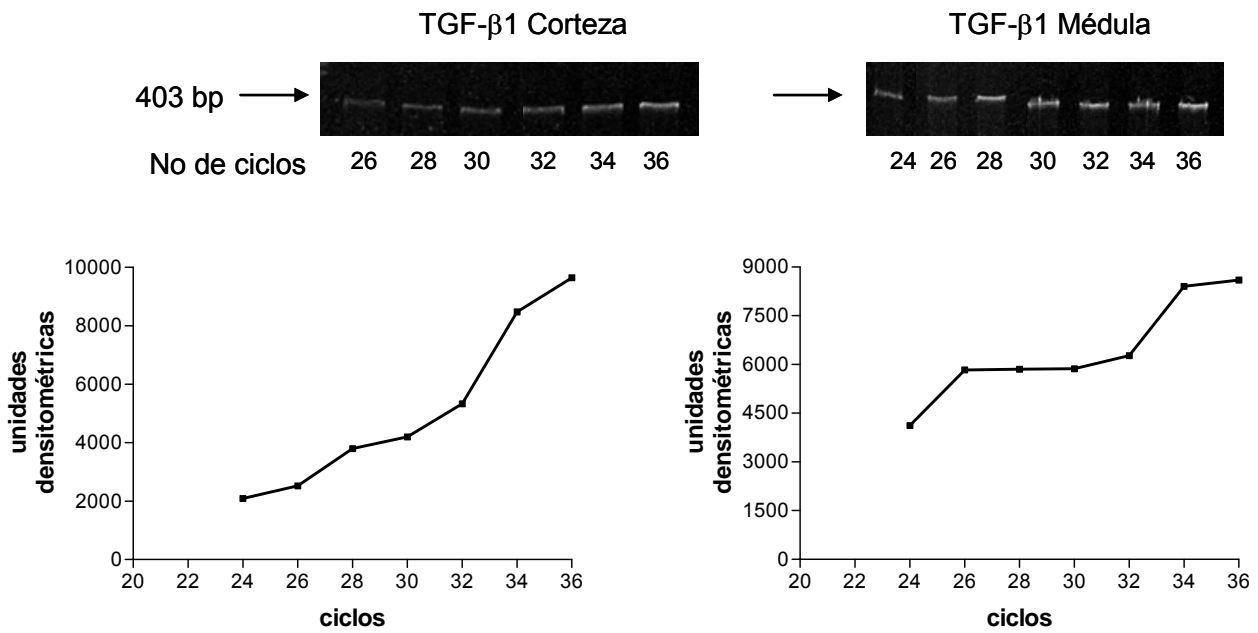


Fig. 2 Cinéticas de amplificación de COX-2 y TGF- β 1 en corteza y médula renal de ratas normales por RT-PCR semicuantitativa.

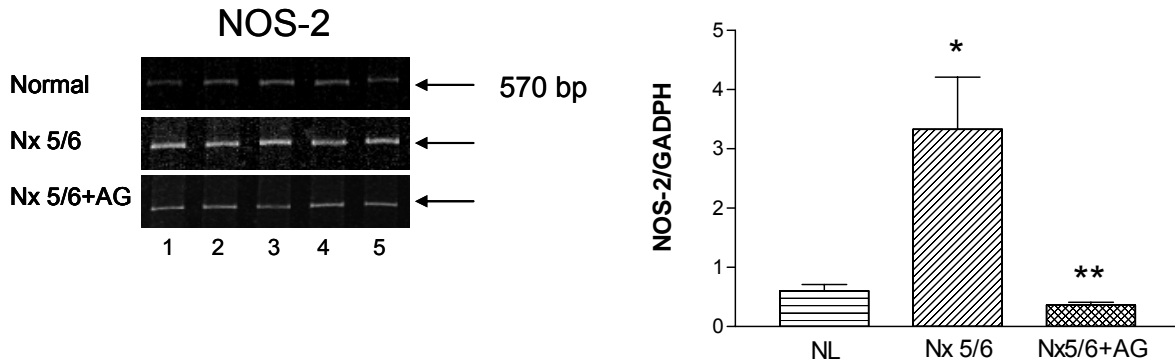
8.3 Niveles de expresión de NOS-2, COX-2 y TGF- β en el tejido renal

Los niveles de expresión de NOS-2, COX-2 y TGF- β 1 se determinaron individualmente mediante un análisis por RT-PCR convencional y por tiempo-real, a partir del RNA total obtenido de la corteza y médula renal de ratas controles, nefrectomizadas y a las cuales se les administró AG y L-NIL.

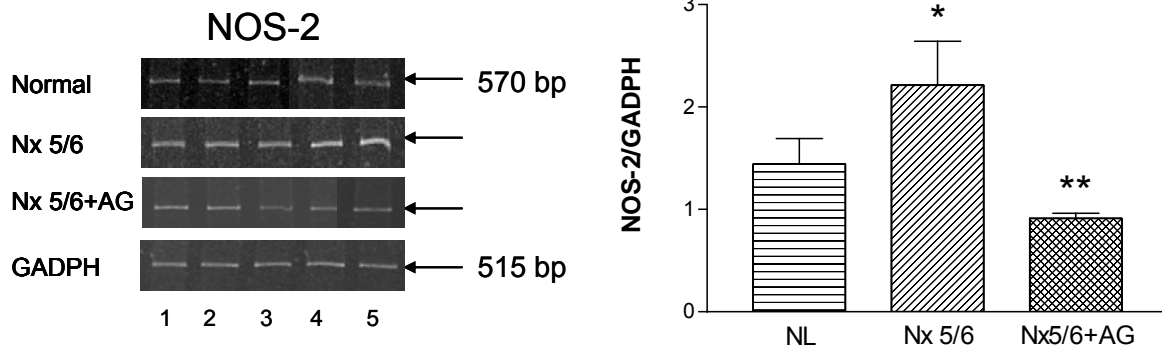
8.3.1 Niveles de expresión de NOS-2

Se observó que en condiciones normales los niveles de RNAm de NOS-2, son más abundantes en la médula que en la corteza renal. Por el contrario, las ratas que experimentaron Nx 5/6 mostraron un incremento significativo en la expresión de NOS-2, tanto en la corteza como en la médula renal, comparado con las ratas normales, el cual se previno con la administración de AG.

CORTEZA RENAL



MEDULA RENAL

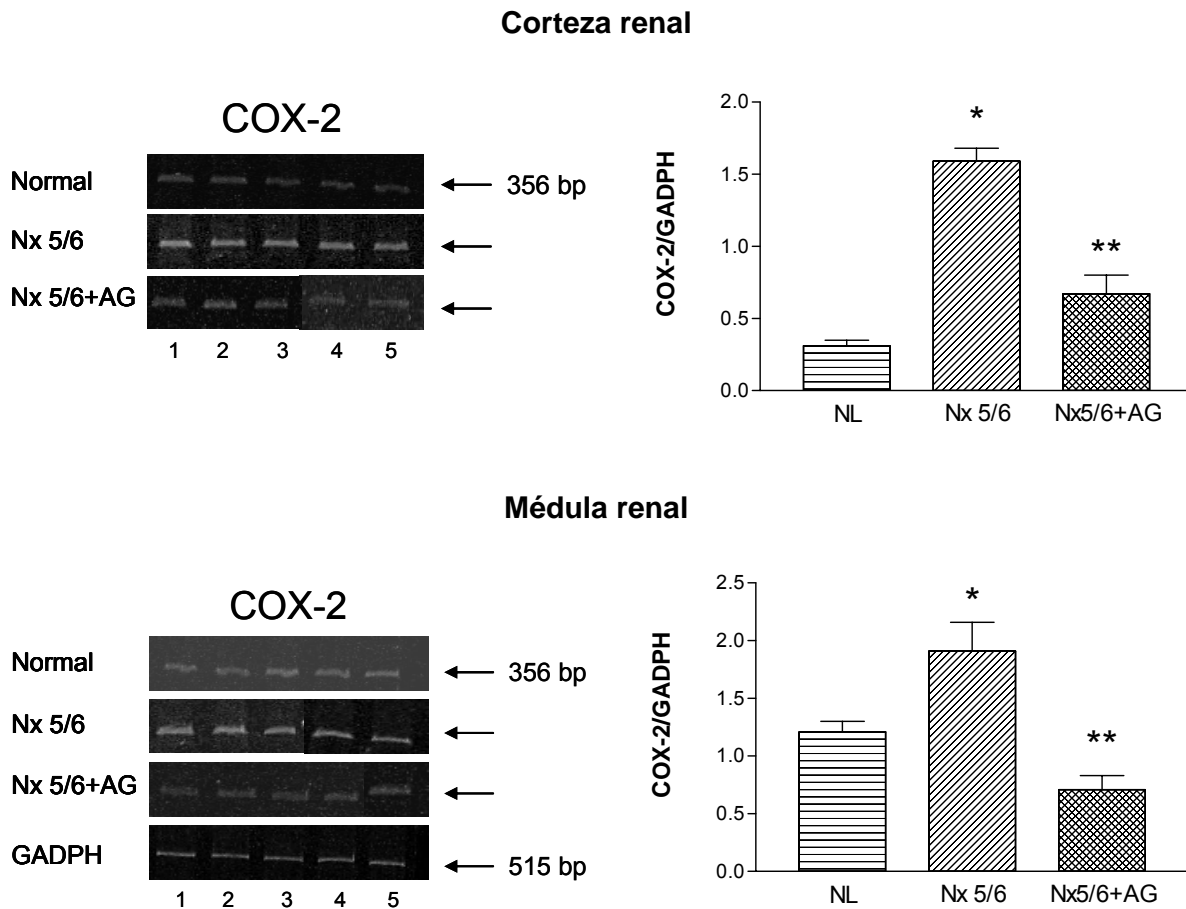


*p<0.05 vs. Normal; **p<0.05 vs. Nx 5/6.

Fig. 3. Cuantificación de los niveles de RNAm de NOS-2 en corteza y médula renal de ratas normales, con Nx 5/6, y Nx 5/6+AG mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.

8.4 Expresión de COX-2

Se observó que en condiciones normales, los niveles de RNAm de COX-2 son mayores en la médula que en la corteza renal. Por el contrario, la NX 5/6 indujo un incremento significativo en los niveles de RNAm comparado con ratas normales, el cual se previno con la administración de AG.



*p<0.05 vs. Normal; **p<0.05 vs. Nx 5/6.

Fig. 4. Cuantificación de los niveles de RNAm de COX-2 en corteza y médula renal de ratas normales, con Nx 5/6 y con Nx 5/6+AG mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Los resultados representan el promedio ± ES; n=5 de cada grupo.

8.4.1 Niveles de expresión de TGF-β1

Por otra parte, aunque se observó que en condiciones normales la expresión de TGF-β1 es mayor en la médula que en la corteza renal, este no fue significativo. Por el contrario, la Nx 5/6 indujo un incremento significativo en los niveles de expresión de TGF-β1 tanto en la corteza como en la médula renal, el cual se previno con la administración de AG.

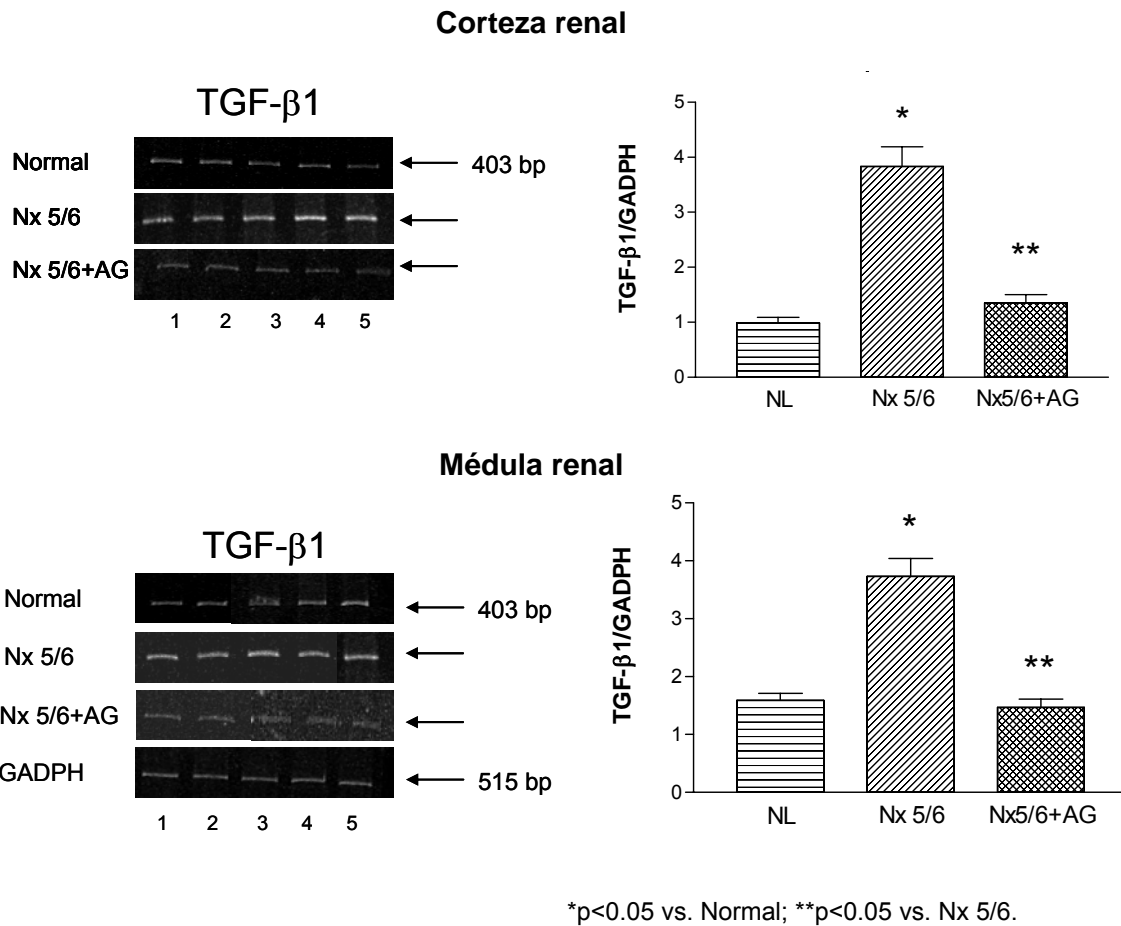


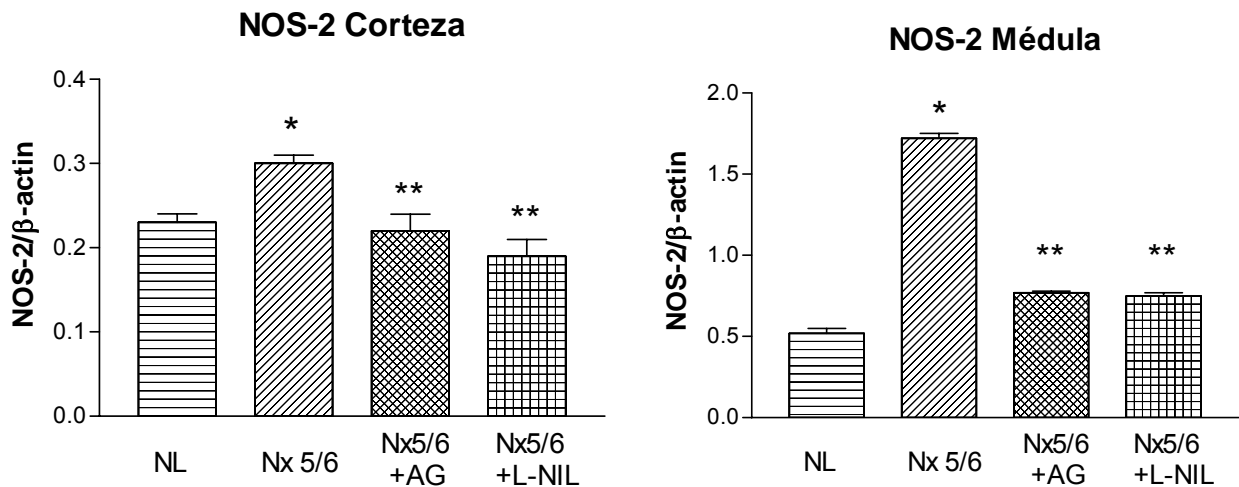
Fig. 5 Cuantificación de los niveles de RNAm de TGF- β 1 en corteza y médula renal de ratas normales, con Nx 5/6 y con Nx 5/6+AG mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.

8.5 Expresión de NOS-2, COX-2 y TGF- β 1 en el tejido renal por medio de la técnica de RT-PCR semicuantitativa en tiempo real

Debido a la disminución en la producción de AGE's exhibida por AG, se agregó un grupo adicional de ratas, al cual se le administró otro inhibidor selectivo de NOS-2 (L-NIL), el cual carece de los efectos adicionales de AG sobre los AGE's. Para tal efecto, se realizó la cuantificación relativa de los niveles de RNAm de NOS-2, COX-2 y TGF- β 1 en la corteza y en la médula renal a ratas a las cuales se les administró AG ó L-NIL.

8.6 Niveles de RNAm de NOS-2

Se observó que en condiciones normales, los niveles de RNAm de NOS-2 son mayores en la médula que en la corteza renal, datos similares a los reportados con la RT-PCR convencional. De igual manera, la Nx 5/6 indujo un incremento significativo en la expresión de NOS-2 tanto en la corteza como en la médula renal, comparado con ratas normales. Tal incremento, se previno con la administración tanto de AG como L-NIL. Lo cual esta en relación a los datos obtenidos por la RT-PCR convencional.



*p<0.05 vs. Normal; **p<0.05 vs. Nx 5/6.

Fig. 6. Cuantificación de los niveles de RNAm de NOS-2 en la corteza y médula renal de ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.

8.7 Niveles de RNAm de COX-2.

En cuanto a COX-2 se observó una mayor abundancia del RNAm en la médula comparada con la corteza renal en ratas normales, por el contrario la Nx 5/6 indujo un incremento significativo del mensajero de COX-2 tanto en la corteza como en la médula renal, el cual se previno con la administración de ambos inhibidores de NOS-2, lo cual concuerda con los resultados obtenidos con la RT-PCR convencional.

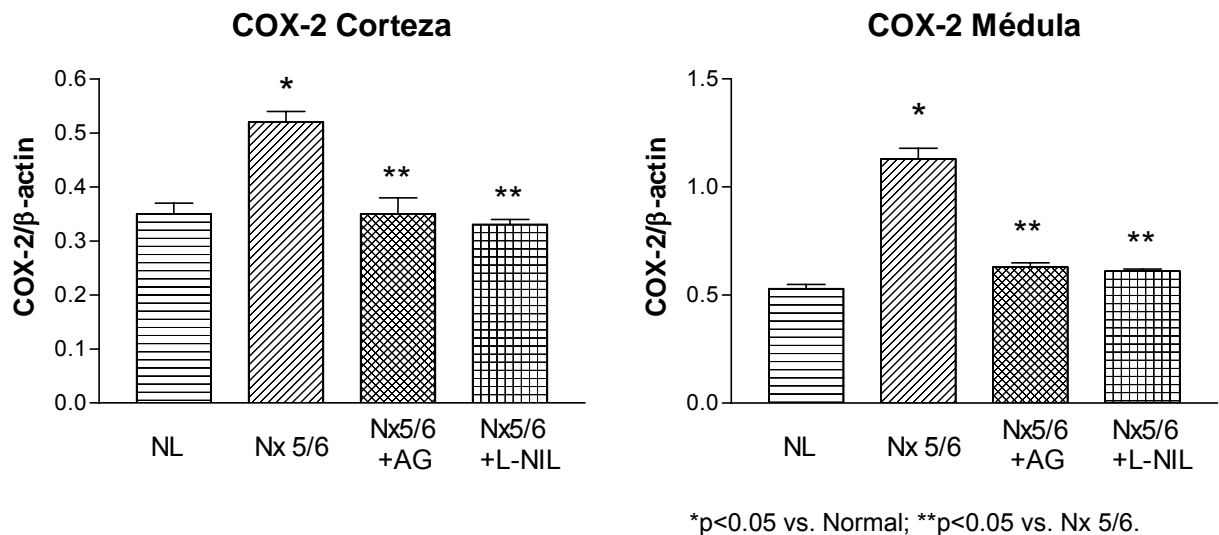
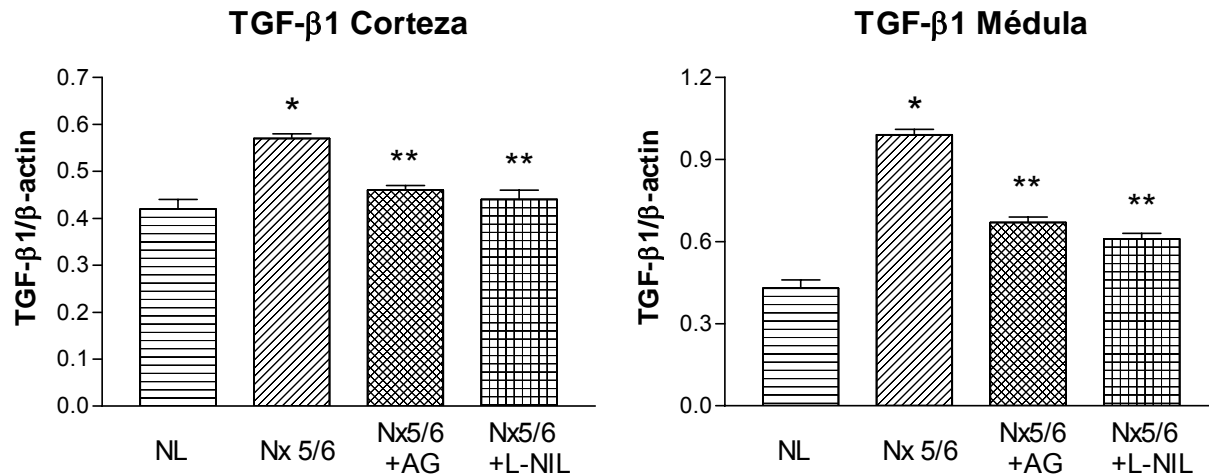


Fig. 7. Cuantificación de los niveles de RNAm de COX-2 en la corteza y médula renal de ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.

8.8 Expresión de TGF- β 1

De igual manera, se observó que bajo condiciones normales los niveles de RNAm de TGF- β 1 son similares tanto en la corteza como en la médula renal. Por el contrario, la Nx 5/6 indujo un incremento significativo del mensajero de TGF- β 1 tanto en la corteza como en la médula renal, el cual se

previno con la administración tanto de AG como de L-NIL, lo cual es similar a los datos obtenidos por RT-PCR convencional.



*p<0.05 vs. Normal; **p<0.05 vs. Nx 5/6.

Fig. 8. Cuantificación de los niveles de RNAm de TGF-β1 en la corteza y médula renal de ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL mediante la técnica de RT-PCR en tiempo-real. Los resultados representan el promedio ± ES; n=5 de cada grupo.

8.9 Análisis por Western-blot

La abundancia de los niveles de proteína de NOS-2 se evaluó por medio de Western blot con un anticuerpo dirigido contra la fracción intersticial de NOS-2, la cual es inducida bajo condiciones patológicas.

Se encontraron niveles bajos de la proteína de NOS-2 bajo condiciones normales, en el homogenado total de riñón. Por el contrario, la Nx 5/6 indujo un incremento significativo en los niveles de NOS-2, el cual se previno con la administración de AG.

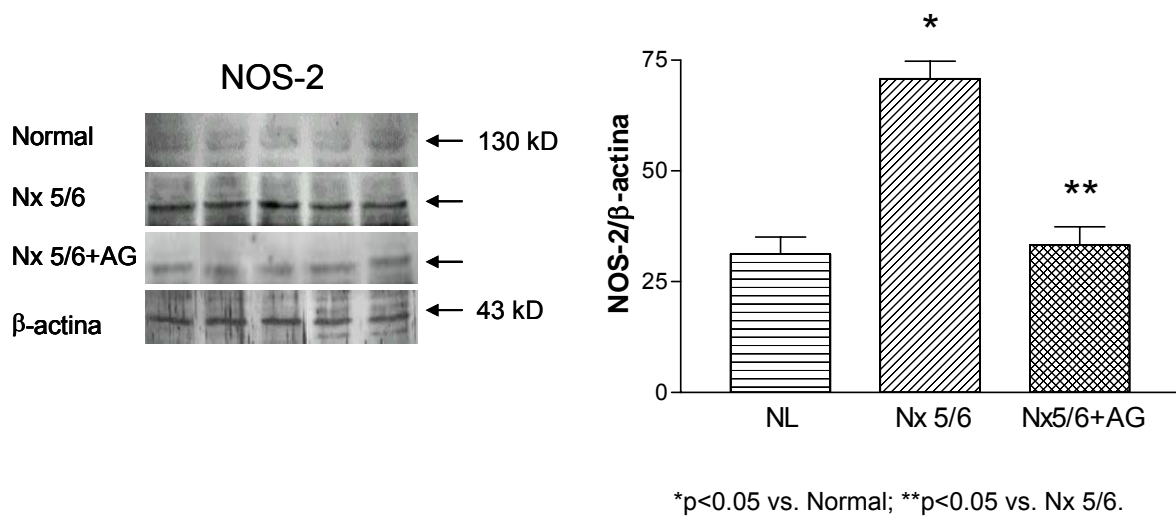


Fig. 9. Cuantificación de los niveles de proteína de NOS-2 en homogenados totales de ratas normales, con Nx 5/6 y con Nx 5/6+AG mediante la técnica de Western-blot. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.

8.10 Análisis por Western-blot de COX-2

El análisis por Western blot reveló la expresión basal de COX-2 en microsomas de riñón total de ratas normales, la Nx 5/6 indujo un incremento significativo en los niveles de proteína de COX-2, el cual se previno con la administración de AG.

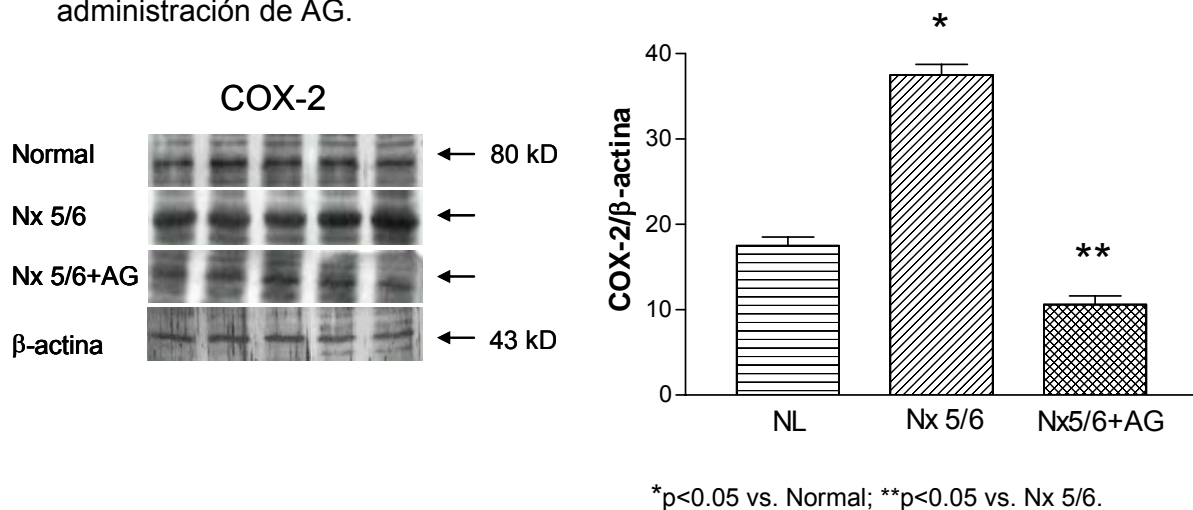


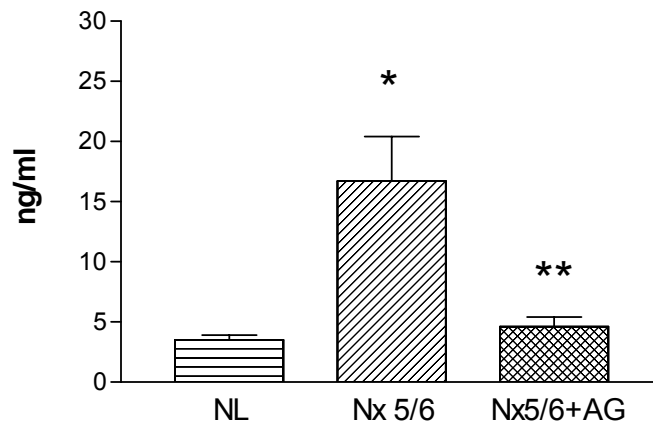
Fig. 10. Cuantificación de los niveles de proteína de COX-2 en preparados de microsomas de riñón total en ratas normales, con Nx 5/6 y con Nx 5/6+AG mediante la técnica de Western-blot. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.

8.10 Cuantificación de TGF-β1 por ELISA

Debido al hecho de que la fracción activa del TGF-β1 es la directamente involucrada en la activación del receptor, decidimos cuantificar los niveles de dicha fracción por medio de la técnica de ELISA.

En el grupo control se observaron niveles basales de la fracción activa del TGF-β1 en plasma (44.98 ± 9.57 pg/ml). Por el contrario, la ablación renal indujo un marcado incremento en las concentraciones de la fracción activa del TGF-β1 comparado con el grupo control, el cual se previno con la administración de AG ($214.18 \pm 47.05^*$ vs 59.22 ± 12.43 pg/ml).

Niveles plasmáticos de la fracción activa del TGF-β1

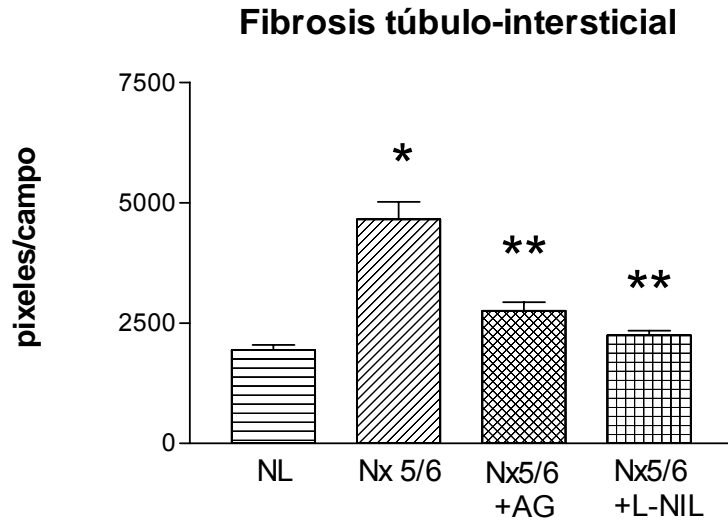


*p<0.05 vs. Normal; **p<0.05 vs. Nx 5/6.

Fig. 11. Cuantificación de los niveles de la fracción activa del TGF-β1 mediante la técnica de ELISA, en plasma de ratas normales, nefrectomizadas y a las cuales se les administró AG. Los resultados representan el promedio \pm ES; n=5 de cada grupo.

8.11 Estudios histológicos

La ablación renal subtotal indujo el desarrollo de fibrosis túbulo-intersticial, atrofia tubular y dilatación de la luz tubular, comparada con el grupo control. Sin embargo, tales alteraciones morfo-funcionales se previnieron con la administración de AG y L-NIL.



* $p < 0.05$ vs. Normal; ** $p < 0.05$ vs. Nx 5/6.

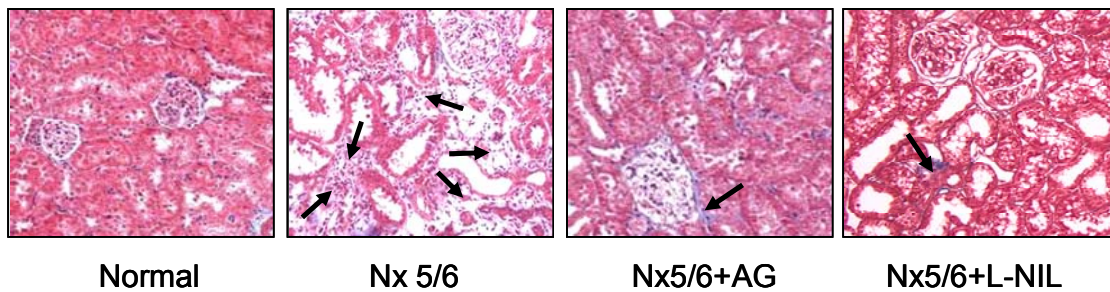


Fig. 12. Cuantificación de la fibrosis túbulo-intersticial de ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL. Las flechas indican la formación de tejido fibroso. Los resultados representan el promedio \pm ES; $n=5$ de cada grupo.

Como hemos descrito previamente ⁴³, la nefrectomía 5/6 Nx indujo el desarrollo de alteraciones microvasculares descritas como engrosamiento de la pared vascular y reducción de la luz vascular (6.37 ± 0.59 vs 3.55 ± 0.20 , $P < 0.01$), evaluada por la siguiente fórmula: $\text{área media total (diámetro externo (DE) - diámetro interno (DI))}$, las cuales estuvieron ausentes en el grupo control. Por el contrario, la administración de AG y L-NIL previnieron las alteraciones vasculares inducidas por la nefrectomía 5/6 (3.47 ± 0.18 , $P < 0.01$).

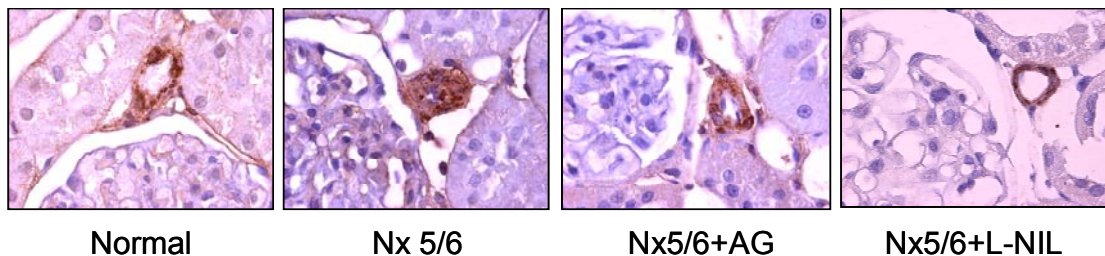
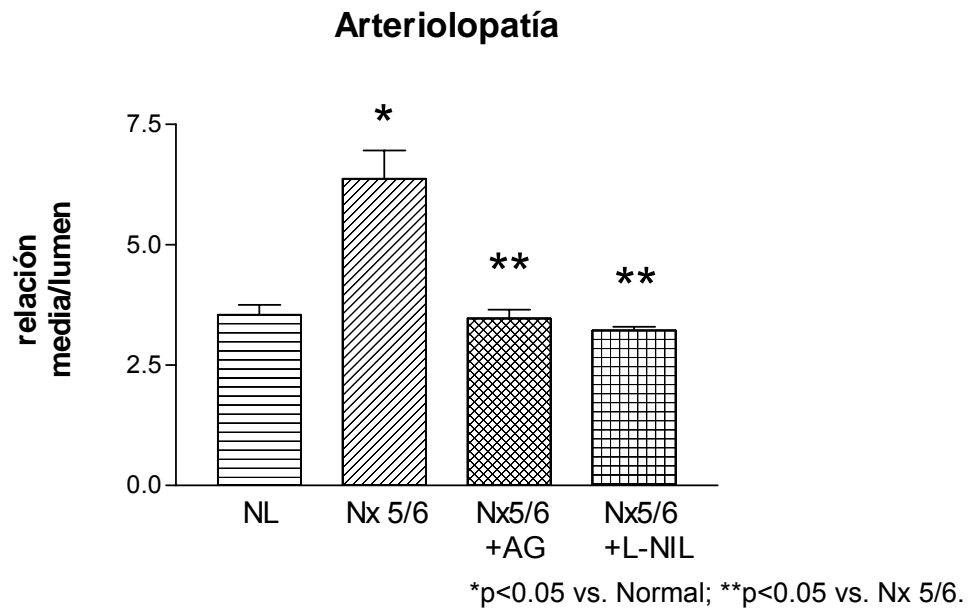
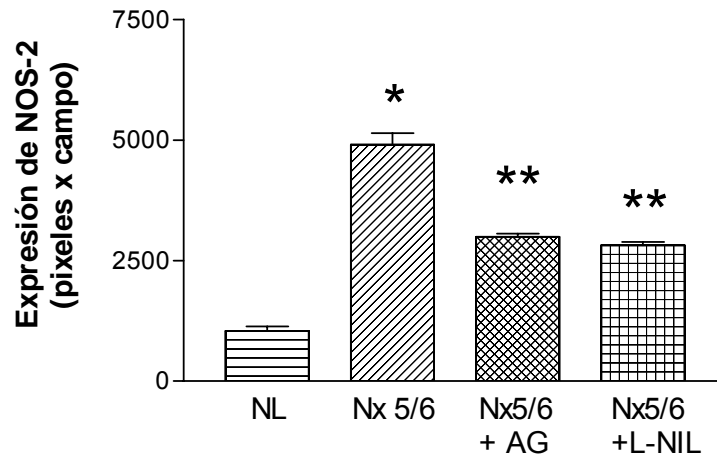


Fig. 13. Cuantificación del daño arteriolar en ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL mediante la técnica de inmunohistoquímica. Los resultados representan el promedio \pm ES; $n=5$ de cada grupo.

8.13 Análisis por inmunohistoquímica

Por medio del análisis por inmunohistoquímica, en el cual se utilizó el mismo anticuerpo para el ensayo de Western blot, se encontraron niveles bajos de la proteína de NOS-2, los cuales se observaron principalmente en el túbulo-intersticio. La reducción de masa renal indujo un incremento significativo en la inmunodetección de NOS-2 en el túbulo-intersticio comparadas con el grupo control, el cual se previno tanto con la administración de AG (controles: $1,357 \pm 48$ pixeles/400X por campo; Nx 5/6: $6,370 \pm 407$ pixeles/400X por campo vs controles $p < 0.001$; AG $3,296 \pm 18$ pixeles/400X campo, $p < 0.001$ vs Nx 5/6) como con la administración de L-NIL ($2,818 \pm 64$ pixeles/400 por campo, $p < 0.001$ vs Nx 5/6).

Inmunohistoquímica



* $p < 0.05$ vs. Normal; ** $p < 0.05$ vs. Nx 5/6.

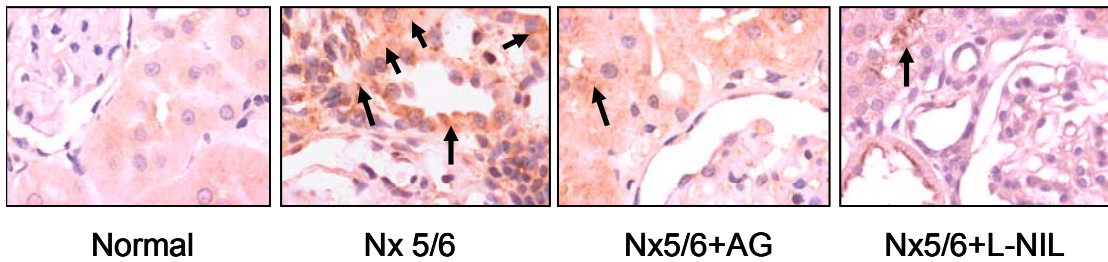


Fig. 14. Cuantificación de los niveles de proteína de NOS-2 en riñones de ratas normales, con Nx 5/6, con Nx 5/6+AG y con Nx 5/6+L-NIL mediante la técnica de inmunohistoquímica. Las flechas indican la inmunotinción de NOS-2. Los resultados representan el promedio \pm ES; $n=5$ de cada grupo.

9. Discusión

Diversos estudios han demostrado que durante la evolución del daño renal, la inhibición del proceso inflamatorio previene o retarda las alteraciones morfo-funcionales tales como la infiltración de células inflamatorias, la acumulación de matriz extracelular, el desarrollo de lesiones vasculares, así como la aparición de proteinuria ²⁻⁴. En este sentido, la participación de NOS-2 podría tener un papel relevante, debido a que esta isoforma se induce al inicio de un proceso inflamatorio y su activación prolongada podría tener efectos deletéreos sobre el tejido renal. Sin embargo, existen datos controversiales con respecto a su participación durante la evolución del daño renal. En este sentido, varios autores han demostrado una disminución en los niveles de expresión de NOS-2 en diversos modelos de daño renal progresivo ³⁸⁻³⁹. Aunque tales resultados son contradictorios con nuestros hallazgos, la disminución en los niveles de expresión de NOS-2 observada en estos estudios, podría ser consecuencia de variaciones en los periodos de evolución y en el modelo experimental utilizado, los cuales podrían afectar los niveles de expresión de NOS-2, al disminuir importantemente la masa renal funcional o bien al bloquear la generación de vías de retroalimentación positiva, disminuyendo de esta manera los procesos de auto-inducción.

Diversos autores han demostrado en modelos experimentales de daño renal tanto en animales como en humanos, un incremento significativo en los niveles de expresión de NOS-2, la cual participaría importantemente en la generación del daño renal. En este sentido, existen reportes que han demostrado un efecto citoprotector en el tejido renal con la administración de

inhibidores específicos de NOS-2 en modelos de daño renal crónico, lo cual sugiere su participación en la evolución de la enfermedad renal crónica^{37, 40}.

Por lo que en el presente trabajo decidimos evaluar la participación de la isoforma inducible de NOS durante la progresión del daño renal en ratas con Nx 5/6 (modelo experimental que reproduce las alteraciones morfo-funcionales de la enfermedad renal crónica en humanos: glomeruloesclerosis, fibrosis túbulo-intersticial, arteriopatía, e insuficiencia renal progresiva), su efecto sobre la expresión de COX-2 y TGF- β 1, así como su participación en la aparición de las alteraciones estructurales inducidas por la ablación renal subtotal, para lo cual utilizamos 4 diferentes técnicas experimentales: RT-PCR convencional, RT-PCR en tiempo-real, western-blot e inmunohistoquímica.

9.1 Efecto de la administración de AG y L-NIL sobre la expresión de NOS-2

Con el propósito de bloquear selectivamente a la NOS-2, administramos dos inhibidores selectivos (AG y L-NIL): Inicialmente administramos AG al 0.1 % en el agua de beber durante 21 días, previamente se ha reportado que a esta dosis se consigue una inhibición eficiente sin afectar de manera significativa la actividad de la isoforma endotelial y/o la formación de AGE's, los cuales están involucrados en la generación del daño renal⁹⁴⁻⁹⁵. Sin embargo, para excluir cualquier efecto secundario de la AG, decidimos utilizar un inhibidor más selectivo de NOS-2 (L-NIL), el cual no presenta los efectos adicionales de AG⁹⁶.

En nuestro estudio encontramos que ambos inhibidores previnieron la sobre-expresión de NOS-2, COX-2 y TGF- β 1 en ratas con Nx 5/6, lo cual sugiere que su efecto podría deberse a la inhibición selectiva de la NOS-2. Además, un hallazgo interesante fue el hecho de que ambos compuestos no

solo bloquearon la actividad de NOS-2, al actuar como un sustrato competitivo en el sitio activo de la enzima ⁹⁶ sino además presentaron un efecto negativo sobre los niveles de RNAm y proteína de NOS-2. Con respecto a este punto, es importante destacar que aunque existen reportes que demuestran que AG y L-NIL ejercen su efecto a nivel post-traducciona, nuestros resultados demostraron adicionalmente que ambos inhibidores poseen un efecto negativo sobre los niveles de RNAm y proteína de NOS-2. Sin embargo, aunque nuestro trabajo no exploró las vías implicadas en tal efecto, podemos sugerir que podría ser el resultado en la disminución de la síntesis de NO y/o sus especies reactivas de nitrógeno (peroxinitrito) inducida por ambos inhibidores, lo cual podría prevenir la activación de potentes inductores endógenos de NOS-2 tales como: interferon- γ , y/o el factor de necrosis tumoral- α , los cuales se sintetizan durante la evolución de un proceso inflamatorio, por lo que al bloquear la activación de estas citocinas se evitaría la inducción de factores de transcripción, tales como el factor nuclear κ B, para el cual se han identificado elementos de respuesta dentro del promotor de NOS-2, bloqueando de esta manera su activación transcripcional ⁹⁷. De igual manera, nuestro estudio demostró que la administración de AG y/o L-NIL inducen una disminución en los niveles de proteína de NOS-2, la cual se demostró tanto en el análisis por western blot, como en el ensayo por inmunohistoquímica. Al este respecto, se ha descrito previamente que tal efecto podría ser resultado de la capacidad del L-NIL para generar monómeros disfuncionales de NOS-2, facilitando su degradación por el aparato proteosoma ⁹⁶, o bien como un efecto indirecto de la AG al disminuir la transcripción de la NOS-2 y en consecuencia sobre la traducción de su mensajero.

9.2 Efecto de NOS-2 sobre la expresión de COX-2 y TGF- β 1

Por otra parte, debido a la capacidad del NO o la de sus especies reactivas de modular la actividad de COX-2 y TGF- β 1, decidimos evaluar el efecto de la NOS-2 sobre la expresión y/o activación de COX-2 y TGF- β 1, así como su participación en el desarrollo de fibrosis túbulo-intersticial y arteriopatía, en ratas con Nx 5/6.

Nuestros resultados demostraron que el incremento en la expresión de NOS-2 en ratas nefrectomizadas se asocia con un aumento en los niveles de RNAm y proteína de COX-2 y TGF- β 1, el cual se previno con la administración de AG ó L-NIL, éstos resultados sugieren que el incremento en la expresión de NOS-2 podría actuar como un modulador positivo de COX-2 y TGF- β 1 durante la progresión del daño renal crónico.

9.3 Vías de activación de COX-2 inducidas por NO

Aunque, los mecanismos involucrados en la regulación y/o activación de NOS-2 sobre COX-2 y TGF- β 1 no se evaluaron en el presente trabajo, existen evidencias experimentales donde se ha demostrado que el NO y/o sus especies reactivas pueden incrementar la actividad de COX-2, tanto por mecanismo transcripcionales como post-transcripcionales.

En este sentido, se ha observado que el NO participa como un potenciador positivo en la inducción de COX-2 en células mesangiales de ratas estimuladas con interleucina-1⁹⁸, adicionalmente se ha demostrado que el NO podría generar una respuesta dependiente de tiempo en cultivo de macrófagos, participando marginalmente en la inducción temprana de NOS-2 y por el contrario, participar activamente en el mantenimiento de su expresión por períodos prolongados⁹⁹. Además, también se ha observado un efecto opuesto

en células mesangiales en el humano, en donde el NO participa importantemente en la inducción temprana de COX-2 y en etapas tardías contribuye como limitante de la inducción de COX-2, por un mecanismo que involucra al factor nuclear κ B¹⁰⁰. En este sentido, es probable que la activación ó inhibición de COX-2 inducida por NO dependiente de tiempo, pueda estar en relación a la producción de modificaciones post-traduccionales inducidas por el NO y/o sus especies reactivas en diversos efectores, como resultado de su exposición prolongada. A este respecto, se ha demostrado que la exposición prolongada al NO con diversos análogos del GMPc regula negativamente la actividad y expresión de la guanilato ciclasa¹⁰¹ y proteínas cinasa dependientes de GMPc (PKG)¹⁰², las cuales están involucradas en la activación de COX-2 en células mesangiales⁹⁸.

Por otra parte, aunque los eventos intracelulares involucrados en la inducción de COX-2 no se conocen completamente, se han identificado diversas cascadas de señalización que sugieren la participación de la proteína cinasa C (PKC), cascadas de fosforilación moduladas por MAPK y eventos de fosforilación mediados por tirosina cinasas en la inducción de la COX-2¹⁰³⁻¹⁰⁵, los cuales pueden ser modulados por NO, por lo que estas vías de señalización podrían representar mecanismos potenciales de inducción activados por NO en diversos tejidos. A este respecto, se ha observado en cultivo celulares de macrófagos, la participación de MAPK p38 y/o p42/44 en la inducción de COX-2. En tales estudios se ha demostrado que, la activación de COX-2 inducida por LPS requiere la activación de MAPK p38, la cual posteriormente activaría AP-1 y NF- κ B¹⁰⁶, también se ha demostrado la participación de p38 en la inducción de COX-2 en células mesangiales, cabe mencionar que la activación

de AP1 y NF- κ B podrían desencadenar la activación transcripcional de COX-2, como resultado de la existencia de elementos de respuesta para ambos elementos dentro del promotor de COX-2. Por lo que nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de NOS-2 y la subsiguiente generación de NO y/o las especies reactivas podrían inducir, tanto la activación transcripcional, como la actividad de COX-2, esta última posiblemente a través de mecanismos que involucran cambios conformacionales en el sitio activo de COX-2 al establecerse interacciones químicas transitorias entre el NO y el grupo hemo de la enzima facilitando de esta manera, la unión con el sustrato ^{67, 69}. Es importante destacar que tanto la NOS-2 como la COX-2 se inducen dentro del contexto de un proceso inflamatorio, por lo que la actividad de ambas enzimas podrían establecer asas de retroalimentación positiva, promoviendo por una parte su mutua inducción y activación y por otra mantener la activación prolongada de cada una, perpetuando así el proceso inflamatorio, tal como lo sugiere nuestro estudio en el cual, la sobreexpresión de NOS-2 indujo un incremento tanto en los niveles de RNAm y proteína de COX-2, asociados a la aparición de lesiones estructurales en el tejido renal, tales como: fibrosis túbulo-intersticial y arteriopatía, los cuales se previnieron con la administración de dos inhibidores selectivos de NOS-2 (AG y L-NIL), lo cual sugiere la participación de NOS-2 en la génesis y progresión del daño renal.

9.4 Inducción de NOS-2 durante la progresión del daño renal

Por otra parte, Fujihara y colaboradores demostraron recientemente, por medio de estudios de inmunohistoquímica, la existencia de lo que parecen ser dos fracciones distintas de la NOS-2 en ratas con nefrectomía subtotal, una de las cuales se expresa constitutivamente en células del túbulo renal, y la otra

inducida bajo condiciones patológicas en células del intersticio renal. Tales estudios además de apoyar nuestros hallazgos, sugieren la participación activa de distintas fracciones de NOS-2 en la progresión del daño renal, durante las fases en donde los procesos inflamatorios son predominantes ⁴⁰. En apoyo a estos estudios, previamente Mohaupt y colaboradores, demostraron la existencia de dos distintas isoformas de la NOS-2 en el parénquima renal, las cuales se expresan de manera heterogénea a lo largo de la nefrona y responden diferencialmente a estímulos comunes ¹⁰⁷. Por lo que nuestros resultados sugieren que durante la progresión del daño renal, podrían facilitarse la expresión de distintas fracciones de NOS-2 en el parénquima renal, como resultado de la activación de diversos mecanismos de control transcripcional dentro del promotor de NOS-2, inducidos por distintos estímulos deletéreos tales como; proteinuria, liberación de citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo, activación de células inflamatorias, que se presentan durante fases tempranas del proceso inflamatorio crónico, el cual se presenta durante la progresión del daño renal en ratas con Nx 5/6.

Es importante mencionar que los hallazgos que demuestran una disminución significativa en los niveles de NOS-2 durante la evolución del daño renal, podrían estar en relación con el modelo experimental utilizado, el período de tiempo en el cual se realicen las observaciones, la pérdida excesiva de masa renal observada durante periodos de tiempo prolongados (60 días) lo cual podría tener un efecto negativo sobre las asas de retroalimentación positiva inducidas por el propio NO ³⁹ ó bien debido a la que los anticuerpos e iniciadores empleados para la identificación de la proteína y el RNAm son incapaces de detectar las diversas variantes de la NOS-2 expresadas durante

el desarrollo del daño renal progresivo, estableciendo importantes discrepancias entre los estudios realizados anteriormente.

9.5 Mecanismos de activación de TGF- β 1 inducidos por NO

Por otra parte, además de la probable activación/inducción de COX-2 por NOS-2 mostrada en nuestro estudio, el aumento en la generación de NO y/o sus especies reactivas de nitrógeno, podría inducir vías profibróticas como resultado de la activación de factores de crecimiento, tales como: TGF- β 1, el cual está implicado en múltiples patologías donde predomina la formación de tejido fibroso ⁷⁷⁻⁸⁰.

Previamente se ha demostrado que tanto el NO como sus especies reactivas pueden activar la fracción latente del TGF- β 1, por un mecanismo que involucra un cambio conformacional en el péptido de latencia exponiendo el dominio de unión con su receptor ⁸³⁻⁸⁴. En este sentido nuestros resultados demostraron que la inhibición selectiva de NOS-2, produjo una disminución significativa en la expresión y actividad del TGF- β 1, y aunque nuestro estudio no evaluó las vías involucradas en tal efecto, es probable que la disminución en la expresión del TGF- β 1 inducida por AG y L-NIL podría ser el resultado del efecto citoprotector indirecto producido por la inactivación de NOS-2, tales como: la disminución en la filtración masiva de proteínas a través del glomérulo, prevención del estrés mecánico, así como el decremento en el estrés oxidativo mediado por el incremento en los niveles de angiotensina II ¹⁰⁸. Sin embargo, la disminución en la activación de la fracción latente del TGF- β 1 inducido por ambos inhibidores de NOS-2 mostrado en nuestro estudio, podría ser el resultado directo de la disminución en la generación de NO o sus intermediarios reactivos de nitrógeno (RNOI), lo cual prevendría la generación

de cambios conformacionales en la fracción latente del TGF- β 1, inhibiendo de esta manera, la unión a su receptor bloqueando así los mecanismo de señalización mediados por TGF- β 1, disminuyendo de esta manera la síntesis incrementada de matriz extracelular lo cual prevendría la aparición de fibrosis renal característica de la enfermedad renal crónica. Por lo que, nuestros resultados sugieren una asociación funcional entre la sobreexpresión de NOS-2 inducida durante la evolución del daño renal, la activación de TGF- β 1 y la generación de fibrosis túbulo-intersticial.

9.6 Efecto de la administración de AG y L-NIL sobre las alteraciones vasculares en ratas con Nx 5/6

Un hallazgo importante de nuestro estudio fue el hecho de que tanto la administración de AG como de L-NIL previnieron las lesiones vasculares inducidas por la nefrectomía 5/6, independientemente de sus efectos sobre la presión arterial. Previamente se ha demostrado que la preservación de la estructura microvascular renal previene la hiperfiltración glomerular en ratas con Nx 5/6, a pesar de persistir la hipertensión arterial ¹⁰⁹. Por lo que podemos especular que la preservación de la estructura vascular en el glomérulo de ratas con Nx 5/6 podría ser un efecto protector adicional de la administración de AG y L-NIL, nuevamente aunque nuestro trabajo no exploró la o las vías involucradas en tal efecto es probable que la inactivación del TGF- β 1 en el tejido renal inducido por la administración de AG y L-NIL pueda prevenir modificaciones en la relación estructura-función de las células musculares de la capa media vascular, esto como resultado de procesos de transdiferenciación celular inducidos por TGF- β 1 ¹¹⁰, por lo que la activación del TGF- β 1 asociado a la activación de mediadores prooxidativos inducidos durante la evolución del

daño renal, podría inducir un incremento en la producción de matriz extracelular, así como cambios en la estructura-función de varios tipos celulares del riñón, acelerando la progresión del daño renal.

En conclusión, nuestro trabajo demostró por 4 técnicas diferentes la sobre-expresión de NOS-2 en un modelo de daño renal progresivo por ablación renal subtotal misma que se asoció con un incremento en la expresión de COX-2 y TGF- β , así como con el desarrollo de lesiones estructurales del tejido renal, tales como: fibrosis túbulointersticial y arteriopatía, las cuales se previnieron con la administración de dos inhibidores específicos de NOS-2. Nuestro estudio sugiere además que la inducción de NOS-2 en el riñón durante las fases tempranas del daño renal podría actuar como un modulador positivo tanto de vías proinflamatorias como profibróticas, las cuales están involucradas en la progresión del daño renal.

Por otra parte, nuestro estudio sugiere que aunque la aparición de la hipertensión arterial es un fenómeno primario en la evolución de las enfermedades crónicas del tejido renal, esta podría tener un efecto marginal sobre el daño renal, comparado con la participación de procesos proinflamatorios, ya que la prevención del daño renal inducido por la administración de AG y L-NIL fueron independientes de modificaciones sobre la presión arterial, proponiendo que los eventos inflamatorios producidos durante las fases tempranas del daño renal podrían iniciar y/o perpetuar las alteraciones morfo-funcionales en el riñón, por un mecanismo que podría involucrar la activación de asas de retroalimentación positiva entre factores proinflamatorios y profibróticos inducidos por altas concentraciones de NO y/o sus productos oxidantes intermedios.

10. Conclusiones

1. Nuestros resultados sugieren la participación activa de la NOS-2, durante la progresión del daño renal, probablemente tanto por su potencial oxidante, como por su posible participación como modulador alostérico de vías pro-inflamatorias y pro-fibróticas.
2. Por otra parte, nuestro estudio demostró la sobre-expresión de NOS-2 durante la progresión del daño renal, lo cual contrasta con estudios previos donde se muestra una disminución significativa de NOS-2, en diversos modelos de daño renal crónico. Lo anterior sugiere que la expresión dependiente de tiempo de NOS-2 podría generar diferencias en la expresión del RNAm y proteína de la NOS-2 dependiendo de la fase experimental en la cual se realicen las estrategias experimentales.
3. Finalmente, nuestro estudio demostró que la administración de dos inhibidores selectivos de NOS-2, indujo una disminución significativa en la expresión de NOS-2, COX-2 y TGF- β , además de prevenir de lesiones estructurales en el tejido renal, lo cual sugiere la participación activa del NO generado a partir de NOS-2 en la evolución del daño renal.

11. Bibliografía

1. Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med* 307; 652-659, 1982.
2. Rossing P, Hommel E, Smidt UM, Parkin H. Impact of arterial blood pressure and albuminuria on the progression of diabetic nephropathy in IDDM patients. *Diabetes*; 42: 715-719, 1993.
3. Greenberg, Primer on kidney diseases. 4th Edition, published by National Kidney Foundation, pp 640. 2005.
4. Bremer V, Tojo A, Kimura K, Hirata Y, Goto A, Nagamatsu T, Suzuki Y, Omata M. Role of nitric oxide in rat nephrotoxic nephritis: comparison between inducible and constitutive nitric oxide synthase. *J Am Soc Nephrol*; 8: 1712-1721, 1997
5. Heeringa P, van Goor H, Moshage H, Klok PA, Hiutema MG, de Jager A, Schep AJ, Kallenberg CG. Expression of iNOS, eNOS and peroxynitrite-modified proteins in experimental anti-myeloperoxidase associated crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int*; 53: 382-393, 1998
6. Peters H, Border WA, Rückert M, Krämer S, Neumayer HH, Noble NA. L-Arginine supplementation accelerates renal fibrosis and shortens life span in experimental lupus nephritis. *Kidney Int*; 63: 1382-1392, 2003
7. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.

8. Azuma H, Ishikawa M, Sekisaki S. Endothelium dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 88: 411-415, 1986.
9. Tiao G, Rafferty J, Ogle C. Detrimental effect of nitric oxide synthase inhibition during endotoxemia may be caused by high levels of tumor necrosis factor and interleukin-6. *Surgery* 116: 332-338, 1994.
10. Prickaerts J, Steinbusch HW, Smits JF. Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: effects of 7-nitroindazole and zaprinast. *Eur J Pharmacol* 337: 125-136, 1997.
11. Peunova N, Enikolopov G. Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cell. *Nature* 375; 68-73, 1995.
12. Noiri E, Peresleni T, Srivastava N. Nitric oxide is necessary for a switch from stationary to locomoting phenotype in epithelial cells. *Am J Physiol* 270: C794-802, 1996.
13. Sarih M, Souvannavong V, Adam A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 191; 503-508; 1993.
14. Abu Soud HM, Loftus M, and Stuehr DJ. Subunit dissociation and unfolding of macrophages NO synthase: relationship between enzyme structure, prosthetic group binding and catalytic function. *Biochemistry* 34: 11167-11175, 1995.
15. Kone B, Kunczewicz T, Zhang W, Yu, ZY. Protein interaction with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol* 285: F178-F190, 2003.
16. Ichihara A, Inscho EW, Iming JD. Neuronal nitric oxide synthase modulates rat renal microvascular function. *Am J Physiol* 274: F516-F524, 1998.

17. Hall AV, Antonious H, Wang Y. Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS-1). *J Biol Chem* 269: 33082-33090, 1994.
18. Kone BC. Localization and regulation of nitric oxide synthase isoforms in the kidney. *Semin Nephrol*; 19: 230-241, 1999
19. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 268: 17478-17488, 1993.
20. MacMicking J, QW Xie, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323-350, 1997.
21. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P. Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream region mediate inductibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9730-9734, 1993.
22. Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-kB/rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 4705-4708, 1994.
23. Melillo G, Musso T, Sica A. A hypoxia responsive element mediates a novel pathway of activation of inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* 182: 1683-1693, 1995.
24. Gupta AK, Kone BC. CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP β) regulates nitric oxide synthase (iNOS) gene expression in mTAL cells. *J Am Soc Nephrol* 7: F599-605, 1996.
25. Martin E, Nathan C, Xie QW. Role of interferon regulatory factor-1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 180: 977-984, 1994.

26. Kamijo R, Harada H, Matsumaya T. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 263: 1612-1615, 1994.
27. Spink J, Evans T. Binding of the transcription factor interferon regulatory factor-1 to the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Biol Chem* 272: 24417-24425, 1997.
28. Taylor BS, de Vera ME, Ganster RW. Multiple NF-kb enhancer element regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 273: 15148-15156, 1998.
29. Chu SC, Marks-Konczalik J, Wu HP. Analysis of cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: Characterization of differences between human and mouse iNOS promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 871-878, 1998.
30. Janse A, Cook T, Taylor GM. Induction of nitric oxide synthase in rat immune complex glomerulonephritis. *Kidney Int* 45: 1215-1219, 1994.
31. Kröncke KD, Suschek CV, Bachofen VK. Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. *Antiox. Redox Signal* 2: 585-605, 2000.
32. Furusu A, Miyazaki M, Abe K. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 53: 1760-1768, 1998.
33. Ketteler M, Westenfeld R, Gawlik A, Bachmann S, Frey A. Nitric oxide synthase isoform expression in acute versus chronic anti-Thy 1 nephritis. *Kidney Int* 61: 826-833, 2002.

34. Peters H, Border WA, Rückert M, Krämer S, Nuemayer HH, Noble NA. L-Arginine supplementation accelerates renal fibrosis and shortens life span in experimental lupus nephritis. *Kidney Int* 63: 1382-1392, 2003.
35. Peters H, Border WA, Noble NA. From rats to man: A perspective on dietary L-arginine supplementation in human renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 14: 1640-1650, 1999.
36. Mullingan MS, Hevel JM, Marletta MA, Ward PA. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6338-6342, 1991.
37. Zhang F, Casey RM, Ross ME, Iadecola C. Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 27: 317-323, 1996.
38. Ni Z, Vaziri ND. Downregulation of nitric oxide synthase in nephrotic syndrome: role of proteinuria. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1638: 129-137.
39. Rebecca J, Baylis C. Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 58: 1261-1266, 2000.
40. Fujihara CK, Mattar AL, Vieira JM, Malheiros DM, Noronha IL, Goncalves AR, Nucci G, Zatz R. Evidence for the existence of two distinct functions for the inducible NO synthase in the rat kidney: Effect of aminoguanidine in rats with 5/6 ablation. *J Am Soc Nephrol*; 13: 2278-2287, 2002
41. Fujihara CK, Malheiros DM, Donato JL, Poli A, de Nucci G, Zatz R. Nitroflurbiprofen, a new nonsteroidal anti-inflammatory, ameliorates structural injury in remnant kidney. *Am J Physiol*; 274: F573-F579, 1998

42. Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, Noronha ID. Mycophenolate mofetil attenuate renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int*; 54: 1510-1519, 1998
43. Romero F, Rodriguez-Iturbe B, Parra G, González L, Herrera-Acosta J, Tapia E. Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. *Kidney Int*; 55: 945-955, 1999
44. Lin SL, Chen YM, Chien CT, Chiang WC, Tsai CC, Tsai TJ. Pentoxifilin attenuated the renal disease progression in rat with remnant kidney. *J Am Soc Nephrol*; 13: 2916-2929, 2002
45. Brooks DP, Contino L. Involvement of nitric oxide synthase in proteinuria associated with chronic renal disease in rats. *Pharmacology* 56: 257-261, 1998.
46. Goodwin. Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J* 13: 1121-1136, 1999.
47. Francisco LJ, Osborn JL, DiBona GF. Prostaglandins in renal release during sodium deprivation. *Am J Physiol* 243: 261-268, 1982.
48. Linas SL. Role of prostaglandins in renin secretion in the isolated kidney. *Am J Physiol* 246: F811-F818, 1984.
49. O'Neill, Ford-Hutchinson. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissue. *FEBS Lett* 330: 156-160, 1993.
50. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene* 18: 7708-7916, 1999.
51. Appleby SB, Ristimaki A, Neilson K, Narko K, Hla T. Structure of human cyclooxygenase gene. *Biochem J* 302: 723-727, 1994.

52. Schmedtje JF, Ji YS, Liu WL, DuBois RN, Runge MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- κ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 272: 601-608, 1997.
53. Iñiguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M. An essential role of the nuclear factor of activated cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 275: 23627-23635, 2000.
54. Inoue H, Yokoyama C, Hara S, Tone Y, Tanabe T. Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 270: 24965-24971, 1995.
55. Kim Y, Fisher SM. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in mouse skin carcinoma cells. Regulatory role of CCAAT/enhancer-binding proteins in the differential expression of cyclooxygenase-2 in normal and neoplastic tissues. *J Biol Chem* 273: 27686-27694, 1998.
56. Allport VC, Slater DM, Newton R, Bennett PR. NF- κ B and AP-1 are required for cyclooxygenase-2 gene expression in amnion epithelial cell line (WISH). *Mol Hum Reprod* 6: 723-727, 2000.
57. Kirtikara K, Raghov R, Lalederrkind SJ, Goorha S, Kanekura T, Ballou LR. Transcriptional regulation of cyclooxygenase-2 in the human microvascular endothelial cell line, HMEC-1: control by the combinatorial actions of AP-2, NF-IL-6 and CRE elements. *Mol Cell Biochem* 203: 41-51, 2000.
58. Yamamoto K, Arakawa T, Ueda N, Yamamoto S. Transcriptional roles of nuclear factor κ B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor

- a-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* 270: 31315-31320, 1995.
59. Xu Q, Ji YS, Scmedtje JF. Sp1 increases expression of cyclooxygenase-2 in hypoxic vascular endothelium. Implications for the mechanisms of aortic aneurysm and heart failure. *J Biol Chem* 275: 24583-24589, 2000.
60. Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 274: 8328-8334, 1999.
61. Wang JL, Cheng HF, Zhang MZ, Macana J, Harris RC. Selective increase of cyclooxygenase-2 expression in a model of renal ablation. *Am J Physiol* 275; F613-F622, 1998.
62. Wang JL, Cheng HF, Shappell S, Harris RC. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases proteinuria and retard progressive renal injury in rats. *Kidney Int* 57: 2334-2342, 2000.
63. Lianos EA, Guglielmi K, Sharma M. Regulatory interactions between inducible nitric oxide synthase and eicosanoids in glomerular immune injury. *Kidney Int* 53: 645-653, 1998.
64. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci* 91: 2046-2050, 1994.
65. Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulatory of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 15: 351-369, 1997.
66. Dumont I, Peri KG, Hardy P, Hou X, Martinez-Bermudez AK, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. PGE₂, via EP₃ receptors, regulates brain nitric

- oxide synthase in the perinatal period. *Am J Physiol* 275: R1812-1821, 1998.
67. Dumont I, Hardy P, Peri KG, Hou X, Molotchnikoff S, Varma DR, Chemtob S. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by PGD(2) in the developing choroid. *Am J Physiol* 278: H60-H66, 2000.
68. Swierkosz TA, Mitchell JA, Tomlinson A, Botting RW, Warner TD, Vane JR. Relationship between different isoforms of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in various cell types. *Pol J Pharmacol* 46: 587-592, 1994.
69. Patel R, Attur MG, Dave M, Abramson SB, Amin AR. Regulation of cytosolic COX-2 and prostaglandin E2 production by nitric oxide in activated murine macrophages. *J Immunol* 162: 4191-4197, 1999.
70. Massague J. TGF- β signaling: receptors, transducers and Mad proteins. *Cell* 85: 947-950, 1996.
71. Munger. Latent transforming growth factor- β : structural features and mechanism of activation. *Kidney Int* 51: 1376-1382, 1997.
72. Attisano. Signal trasduction by the TGF- β superfamily. *Science* 296: 1646-1647, 2002.
73. Liu. T. TGF- β type II receptor in rat renal vascular development: localization to yustaglomerular cells. *Kidney Int* 53: 716-725, 1998.
74. Piek. Specificity, diversity and regulation in TGF- β superfamily signaling. *FASEB J* 13: 2105-2114, 1999.
75. Imamura. Smad-6 inhibits signaling by the TGF- β superfamily. *Nature* 389: 622-626, 1997.

76. Hayashi. The MAD-related protein smad-7 associates with the TGF- β receptor and functions as an antagonist of TGF- β signaling. *Cell* 89: 1165-1173, 1997.
77. Uchida. Localization of smad6 and smad7 in the rat kidney and their regulated expression in the anti-Thy nephritis. *Mol Cell Res Commun* 4: 98-105, 2000.
78. Yoshioka. Transforming growth factor- β protein and mRNA in glomeruli in normal and diseased human kidneys. *Lab Invest* 68: 154-163, 1993.
79. Yamamoto. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular disease. *Kidney Int* 49: 461-469, 1996.
80. Mozes. Renal expression of fibrotic matrix proteins and of transforming growth factor- β (TGF- β) isoforms in TGF- β transgenic mice. *J Am Soc Nephrol* 10: 271-280, 1999.
81. Isaka Y, Tsujie M, Ando Y, Nakamura H, Kaneda Y, Imai E, Hori M. Transforming growth factor- β 1 antisense oligodeoxynucleotides block interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* 58: 1885-1892, 2000.
82. Schnaper. TGF- β signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F243-F252, 2003.
83. Barcellos. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor- β 1. *Molecular Endocrinology* 10: 1077-1083, 1996.
84. Vodovotz. Regulation of transforming growth factor β 1 by nitric oxide. *Cancer Research* 59: 2142-2149, 1999.

85. Morrisey JJ, McCracken R, Kaneto H, Vehaskari M, Montani D, Klahr S. Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney Int*; 45: 998-1005, 1994
86. Castrop H, Schweda F, Schumacher K, Wolf K, Kurtz A. Role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion. *J Am Soc Nephrol*; 12: 867-874, 2001
87. Morath C, Dechow C, Lehrke I, Haxsen V, Waldherr R, Floege J, Ritz E, Warner J. Effect of retinoids on the TGF- β system and extracellular matrix in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*; 12: 2300-2309, 2001
88. Rocco MV, Neilson EG, Hoyer JR, Ziyadeh. Attenuated expression of epithelial cell adhesion molecules in murine polycystic kidney disease et al. *Am J Physiol*; 262: F679-F686, 1992.
89. Gómez-Guerrero C, López-Franco O, Suzuki Y, Sanjuán G, Várgas-Hernández P, Blanco J, Egido J. Nitric oxide production in renal cells by immune complexes: Role of kinases and nuclear factor- κ B. *Kidney Int* 62, pp. 2022-2034, 2002
90. Vitzthum H, Weiss B, Bachleitner W, Krämer BK, Kurtz A. Gene expression of adenosine receptors along the nephron. *Kidney Int* 65; 1180-1190, 2004.
91. Ferrario CM, Jessup J, Gallagher PE, Averill DB, Brosnihan KB, Tallant EA, Smith RD, Chappell MC. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int* 68: 2189-2196, 2005
92. Skov K, Mulvany MJ, Korsgaard N. Morphology of renal afferent arterioles in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 20:821-7, 1992.

93. Clapp, W. L., B. P. Croker. Adult kidney: Histology for Pathologists (2nd ed.), edited for Sternberg SS Philadelphia, PA Lippincott-Raven, pp. 799-834. 1997
94. Thomas MC, Forbes JM, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic nephropathy. *Am J Ther*: 12(6): 562-572, 2005
95. Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*: 289(4): F645-659, 2005
96. Wolff DJ, Bryk R. Mechanism of inducible nitric oxide synthase inactivation by aminoguanidine and L-N⁶-(l-Iminoethyl) lysine. *Biochemistry* 1998, 37: 4844-4852.
97. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences* 75; 639-653, 2004
98. Tetsuka T, Daphna-Iken D, Millar BW, Guan Z, Baier LD, Morrison AR. Nitric oxide amplifies interleucine-1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 97: 2051-2056, 1996.
99. Perkins DJ, Kniss DA. Blockade of nitric oxide formation down-regulates cyclooxygenase-2 and decreases PGE₂ biosynthesis in macrophages. *J Leukoc Biol* 65: 792-799, 1999.
100. Díaz-Cazorla M, Pérez-Sala D, Lamas S. Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 10: 943-952, 1999.
101. Filippov G, Bloch DB, Bloch KD. Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells *J Clin Invest* 100: 942-948, 1997.

102. Soff GA, Cornwell TL, Cundiff DL, Gately S, Lincoln TM. Smooth muscle cells expression of type I cyclic GMP-dependent protein kinase is suppressed of continuous exposure to nitrovasodilators, theophylline, cyclic GMP and cyclic AMP. *J Clin Invest* 100: 2580-2587, 1997.
103. Akarasereenont P, Mitchell JA, Appleton I, Thiernemann C, Vane VJ. Involvement of tyrosine kinase in the induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by endotoxin in cultured cells. *Br J Pharmacol* 113: 15220-1528, 1994.
104. Corbett JA, Kwon G, Marino MH, Rodi CP, Sullivan PM, Turk J, McDaniel ML. Tyrosine kinase inhibitors prevent cytokine-induced expression of iNOS and COX-2 by human islets. *Am J Physiol* 270: C1581-1587, 1996.
105. Rzymkiewicz DM, DuMaine J, Morrison AR. IL-1b regulates rat mesangial cyclooxygenase-2 gene expression by tyrosine phosphorylation. *Kidney Int* 47: 1354-1363, 1995.
106. Chen C, Chen YH, Lin WW. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression in J774 macrophages. *Immunology* 97: 124-129, 1999.
107. Mohaupt M, Elzie JL, Ahn KY, Clapp WL, Wilcox C, Kone B. Differential expression and induction of mRNAs encoding two inducible nitric oxide synthase in rat kidney. *Kidney Int* 46: 653-665, 1994.
108. Abbate M, Zoja C, Morigi M, Rottoli D, Angioletti S, Tomasoni S, Zanchi C, Longaretti L, Donadelli R, Remuzzi G. Transforming growth factor-b1 is upregulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins. A central pathway in progressive glomerulosclerosis. *Am J Pathol*, 161: 2179-2193, 2002

109. Tapia E, Franco M, Sánchez-Lozada LG., Soto V, Avila-Casado C, Santamaría J, Quiroz Y, Rodríguez-Iturbe B, Herrera-Acosta J: Mycophenolate mofetil prevents arteriopathy and renal injury in subtotal ablation despite persistent hypertension. *Kidney Int* 63:994-1002, 2003.
110. Stahl PJ, Felsen D. Transforming growth factor- β , basement membrana, and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Am J Pathol* 159: 1187-1192, 2001.

Original Article

Chronic inhibition of NOS-2 ameliorates renal injury, as well as COX-2 and TGF- β 1 overexpression in 5/6 nephrectomized rats

Pablo Bautista-García¹, Laura Gabriela Sánchez-Lozada¹, Magdalena Cristóbal-García¹, Edilia Tapia¹, Virgilia Soto², Ma. Carmen Ávila-Casado², Ricardo Márquez-Velasco³, Rafael Bojalil³, Martha Franco¹ and Jaime Herrera-Acosta^{1,*}

¹Department of Nephrology, ²Department of Pathology and ³Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

Abstract

Background. Chronic renal damage is associated with inflammatory infiltration, fibrosis and vascular lesion, coupled with increased expression of cyclo-oxygenase 2 (COX-2) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). However, the role of inducible nitric oxide synthase (NOS-2) is still controversial. Thus, we studied the contribution of NOS-2 to the expression levels of COX-2 and TGF- β 1, as well as the structural renal injury in rats with subtotal renal ablation (5/6 Nx).

Methods. Four groups of rats were studied: sham, 5/6 Nx, 5/6 Nx + aminoguanidine (AG) and 5/6 Nx + L-NIL (L-N6-iminoethyl-lysine). Systolic blood pressure (SBP), proteinuria and creatinine (Cr) clearance were measured. NOS-2, COX-2 and TGF- β 1 gene expression was determined by real-time reverse transcription-polymerase-chain reaction. Protein expression was evaluated by western blot and ELISA (TGF- β 1). Immunohistochemistry and morphometry were performed for NOS-2, microvascular thickening and fibrosis.

Results. Systemic hypertension and marked proteinuria, increased expression of NOS-2, COX-2 and TGF- β 1, thickening of arteriolar wall and tubulointerstitial fibrosis were produced in 5/6 Nx rats. Chronic inhibition of NOS-2 did not prevent arterial hypertension or the fall in Cr clearance, but partially reduced proteinuria. Nevertheless, AG and L-NIL preserved arteriolar morphology and the administration of both selective inhibitors of inducible NOS (AG and L-NIL) prevented NOS-2 overexpression.

Conclusion. This study shows that NOS-2 was markedly enhanced in renal tissue of 5/6 Nx rats.

Moreover, treatment with AG and L-NIL prevented the morpho-functional changes induced by subtotal renal ablation, despite persistence of systemic hypertension, suggesting that high concentrations of nitric oxide produced by NOS-2 could act as a positive modulator of the proinflammatory and profibrotic pathways involved in the progression of renal disease.

Keywords: aminoguanidine and L-NIL; COX-2; 5/6 nephrectomy; NOS-2; TGF- β 1

Introduction

In the course of chronic renal diseases, the initial insult leads to progressive decline in glomerular filtration rate and eventual loss of the kidney function. Brenner *et al.* [1] postulated that compensatory adaptations induced by nephron loss produce glomerular hypertension, which results in glomerular lesion, proteinuria, inflammatory infiltration, and, finally, renal scarring. The inflammatory process that takes place between the initial insult and the final process of renal scarring seems to play an important role in the onset of renal disease. In fact, different approaches used to ameliorate inflammation in rats with subtotal renal ablation (5/6 Nx) reduced proteinuria and structural renal injury without lowering systemic hypertension [2,3]. In addition, we demonstrated that suppression of inflammation in 5/6 Nx rats with mycophenolate mofetil prevented arteriopathy despite persistence of systemic hypertension, suggesting that vascular injury contributes to the progression of renal disease [4].

On the other hand, some studies have shown that renal damage is associated with increased expression of inducible nitric oxide synthase (NOS-2) in glomeruli and renal interstitium, which could enhance the generation of oxidative damage by the reactive nitrogen intermediates [5,6]. However, there is controversy about the participation of NOS-2 in renal

Correspondence and offprint requests to: Laura G. Sánchez-Lozada PhD, Department of Nephrology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano 1, 14080-Mexico City, Mexico. Email: lgsanchezlozada@hotmail.com
*Deceased

disease progression. In this regard, Vaziri *et al.* [7] found a significant decrement of NOS-2 renal expression in rats with subtotal renal ablation. On the other hand, Fujihara *et al.* [8], using antibodies targeted against two different epitopes, found the presence of what appeared to be two distinct NOS-2 fractions: a 'tubular' fraction, present in sham rats and less intensely in 5/6Nx; and an 'interstitial' fraction, observed only in swollen areas of the 5/6Nx group. Although the cell type that expressed this fraction was not reported, the authors suggested that it was probably synthesized by interstitial inflammatory cells. In fact, treatment with the NOS-2 specific inhibitor, aminoguanidine (AG) greatly attenuated renal injury in 5/6Nx rats by a direct anti-inflammatory effect, probably related to NOS-2 inhibition [9,10].

Large quantities of nitric oxide (NO) produced by NOS-2 have been related to the generation of peroxynitrite, activation of proinflammatory proteins such as cyclo-oxygenase (COX-2) through interaction with the heme moiety of the protein [11], and activation of profibrotic molecules such as transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), by the suppression of TGF- β 1 latency associated-peptide (LAP) activity [12]. Thus, through these effects, NO may participate in the accumulation of the extracellular matrix during chronic renal damage.

Thus, functional, vascular and structural renal damage may be partially mediated through increased expression of COX-2 and TGF- β 1, stimulated by NO produced by NOS-2. In the present study, we evaluated in 5/6Nx rats if the renoprotective effect exerted by chronic inhibition of NOS-2 with two different selective inhibitors of NOS-2 (L-NIL and AG) is associated with prevention of the expression and/or activation of COX-2 and TGF- β 1.

Methods

Adult male Sprague-Dawley rats (300–350 g) were obtained from Harlan, Mexico. Thirty rats underwent 5/6Nx by the removal of the right kidney and selective infarction of approximately two-thirds of the left kidney by ligation of two or three branches of the renal artery [4]. Fifteen sham-operated rats served as control. Experimental procedures were conducted according to our institutional guidelines.

Experimental groups

Rats were randomly assigned to four groups: S ($n=15$), sham-operated rats, 5/6 nephrectomy (Nx, $n=15$), Nx rats plus AG ($n=15$, AG, Sigma-Aldrich, Mexico, 0.1% in drinking water). To determine whether the beneficial effects of AG on NOS-2, COX-2 and TGF- β 1 mRNA levels were actually due to selective inhibition of NOS-2 or due to side effects of the compounds, we performed real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in an additional group of rats in which the specific inhibitor of NOS-2 (L-N6-iminoethyl-lysine: L-NIL 30 mg/l in

drinking water) was given. All groups of rat were studied after 21 days of follow-up.

Systolic blood pressure and proteinuria

Both parameters were measured in the basal period and at the end of the study. Systolic blood pressure (SBP), in conscious restrained rats, was measured by tail cuff sphyngomanometer using an automated system (Narco Biosystems, Houston, TX, USA). All animals were preconditioned for blood pressure measurements 1 week before each experiment. Twenty-four hour urine was collected for determination of proteinuria by a turbidimetric method [4]. In five rats of each group, serum and urine Cr concentration were measured with an autoanalyser (Creatinine Analyzer 2, Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA, USA), and renal Cr clearance was calculated by the standard formula $C=U*V/P$, where U is the concentration in urine, V is urine flow rate, and P is the plasma concentration.

Relative quantification of NOS-2, COX-2 and TGF- β 1 genes

Total mRNA was isolated from individual cortexes and medullas ($n=5$ rats each group) as previously described [13].

The purified RNA (5 μ g) was reverse-transcribed using oligo-dT (0.5 μ g) and 200 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies) for 1 h at 37°C.

Relative mRNA levels of NOS-2, COX-2 and TGF- β 1 were assessed in sham, 5/6Nx, 5/6Nx+AG and 5/6Nx+L-NIL groups by real-time RT-PCR with a LightCycler 2.0 System (Roche Applied System) using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG kit (Invitrogen Life Technologies) which was used according to the manufacturer's protocol. Samples were then amplified for NOS-2, COX-2, TGF- β 1 and β -actin under the following conditions: Pre-incubation for 10 min at 95°C, denaturation for 10 s at 95°C, annealing for 10 s at 60°C and extension step for 12 s at 72°C, 40 cycles. Sequences of primers were as follows (Invitrogen Life Technologies): NOS-2 [14]: 5' TGC ATG GAC CAGTAT AAG GCA AAC 3' (forward), 5' GTT TCT GGT CGA TGT CAT GAG CAA (reverse), for COX-2 [15]: 5'-GAA ATG GCT GCA GAG TTG-3' (forward), 5' TCA TCT AGT CTG GAG TGG 5' (reverse) for TGF- β 1 [16]: 5' CAC CAT CCA TGA CAT GAA CC 3' (forward), 5' TCA TGT TGG ACA ACT GCT CC 3' (reverse), and β -actin, as reported previously [17].

The results were quantified as Ct values, where Ct is defined as the threshold cycle of PCR at which the amplified product is first detected, and expressed as relative gene expression (the ratio of target/ β -actin) [18].

Western blotting

Western blot analysis was performed with whole kidney tissue homogenates. For analysis of COX-2, microsomes were isolated as previously described [19], and for NOS-2 analysis, a supernatant was used ($n=5$ each group). Blots were probed with NOS-2 (1:200 dilution) (BD Transduction Laboratories), COX-2 (1:100 dilution), and β -actin (1:300 dilution) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), the secondary antibodies (1:7000) (ECL Plus Western Blotting

Reagent Pack, Amersham Biotechnology) were detected using an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Biotechnology). Bands were quantified using ID image-analysis system (Kodak).

Measurement of TGF- β 1

TGF- β 1 was measured in plasma samples of rats used for western blot ($n = 5$ each group) with a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kit (Quantikine, R&D System, Minneapolis, MN, USA) following the manufacturer's instructions.

Renal histology

In five rats of each group, remnant kidneys were washed by perfusion with phosphate buffered saline (PBS), fixed with 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and 4 μ m sections were stained with periodic acid Schiff (PAS) reagent. Afferent arteriole morphology, evaluated as the media-to-lumen ratio, was assessed by indirect peroxidase immunostaining for α -smooth muscle actin (α -SMA, Dako Corp, Carpinteria, CA, USA) as described elsewhere [20]. Tubulointerstitial fibrosis was detected by Masson staining. NOS-2 expression was evaluated by the indirect streptavidin-biotin-peroxidase method, counterstained with haematoxylin, using the same antibody as in western blot. Ten non-crossed fields of cortex (10X) per biopsy were analysed using Image-Pro-Plus 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) and Adobe Photoshop 7 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). Positive brown-colour areas were selected and quantified in pixel units and the number of positive areas were expressed as a fraction of the total area (positive brown areas divided by overall field area). The mean fractional amount of positive brown areas was obtained by averaging the values from 10 examined fields.

Statistical analysis

Values were expressed as mean \pm SE. Differences between groups were evaluated by analysis of variance (ANOVA) with appropriate correction for multiple comparisons (Bonferroni). The relation between variables was assessed by correlation analysis.

Results

Systolic blood pressure and proteinuria

Body weight, SBP and proteinuria of each group of rats chosen to study RT-PCR, western blot and immunohistochemistry are depicted in Table 1. At 21 days of follow-up, groups with renal ablation had a marked elevation of SBP and proteinuria compared with sham rats. Treatment with AG did not prevent the rise in arterial pressure but partially prevented proteinuria. L-NIL treatment in 5/6Nx rats had a comparable behaviour to AG since it also significantly reducing proteinuria (33 ± 7 mg/day, $P < 0.001$ vs 5/6Nx) while SBP remained elevated (153 ± 5 mmHg, $P = ns$).

Renal ablation induced a significant fall of Cr clearance in treated and untreated 5/6Nx rats (Sham: 1.33 ± 0.17 ml/min; 5/6Nx: 0.57 ± 0.10 ml/min; 5/6Nx + AG: 0.64 ± 0.06 ml/min. $P < 0.01$ vs sham).

Expression of NOS-2

As shown in Figure 1, 5/6Nx induced a significant overexpression of NOS-2 mRNA in renal cortex and medulla (1.3- and 3.3-fold, respectively compared with 5/6Nx rats), which was prevented by both AG and L-NIL treatments. Likewise, expression of NOS-2 protein in total renal tissue evaluated by western blot was significantly increased in 5/6Nx rat; which was prevented by AG treatment (Figure 1C–D). Using the same antibody, immunohistochemistry revealed that overexpression of the NOS-2 protein was mainly located in the tubulointerstitial areas, and by morphometry we found a significant increase in 5/6Nx groups (Sham: 1357 ± 48 ; 5/6Nx: 6370 ± 407 pixels/400 \times field, $P < 0.001$ vs sham, Figure 1E–F). Up-regulation of NOS-2 was prevented in the 5/6Nx+AG group as well as in L-NIL treated rats (3296 ± 18 and 2818 ± 64 pixels/400 \times field respectively, $P < 0.001$ vs 5/6Nx) (Figure 1G–H).

Expression of COX-2 and TGF- β 1

Subtotal renal ablation also induced an increase of COX-2 mRNA in renal cortex and medulla (1.6- and 2.0-fold, respectively compared with 5/6Nx group), which was prevented by both AG and L-NIL treatments (Figure 2A–B). In addition, immunoblot showed a significant increase of COX-2 protein in the 5/6Nx group, which was prevented by the AG treatment (Figure 2C–D). Similarly, 5/6Nx increased TGF- β 1 mRNA in cortex and medulla (1.3- and 1.8-fold compared with 5/6Nx rats); this increment was also prevented by AG and L-NIL treatments (Figure 3A–B).

Table 1. Body weight, systolic blood pressure (SBP) and proteinuria (Uprot) of rats chosen to study gene expression (real-time RT-PCR) and protein expression (western blot, WB; ELISA and immunohistochemistry, IMHC)

Method	Parameter	Sham	5/6Nx	5/6Nx + AG
RT-PCR $n = 5$ each group	Body weight	306 \pm 2	304 \pm 9	291 \pm 11
	SBP	124 \pm 3	164 \pm 9*	164 \pm 4**
	Uprot	7 \pm 1	114 \pm 6 [†]	57 \pm 13***
WB and ELISA $n = 5$ each group	Body weight	306 \pm 3	305 \pm 12	290 \pm 13
	SBP	108 \pm 3	163 \pm 8 [†]	156 \pm 6 [†]
	Uprot	6 \pm 0.3	73 \pm 3 [†]	47 \pm 3 ^{†,§}
IMHC $n = 5$ each group	Body weight	304 \pm 4	311 \pm 6	294 \pm 11
	SBP	109 \pm 3	175 \pm 14 [†]	153 \pm 5*
	Uprot	10 \pm 2	96 \pm 11 [†]	67 \pm 5 ^{†,§}

* $P < 0.01$ vs 5/6Nx; ** $P < 0.01$ vs sham; [†] $P < 0.001$ vs sham; [§] $P < 0.001$ vs 5/6Nx; [§] $P < 0.05$ vs 5/6Nx.

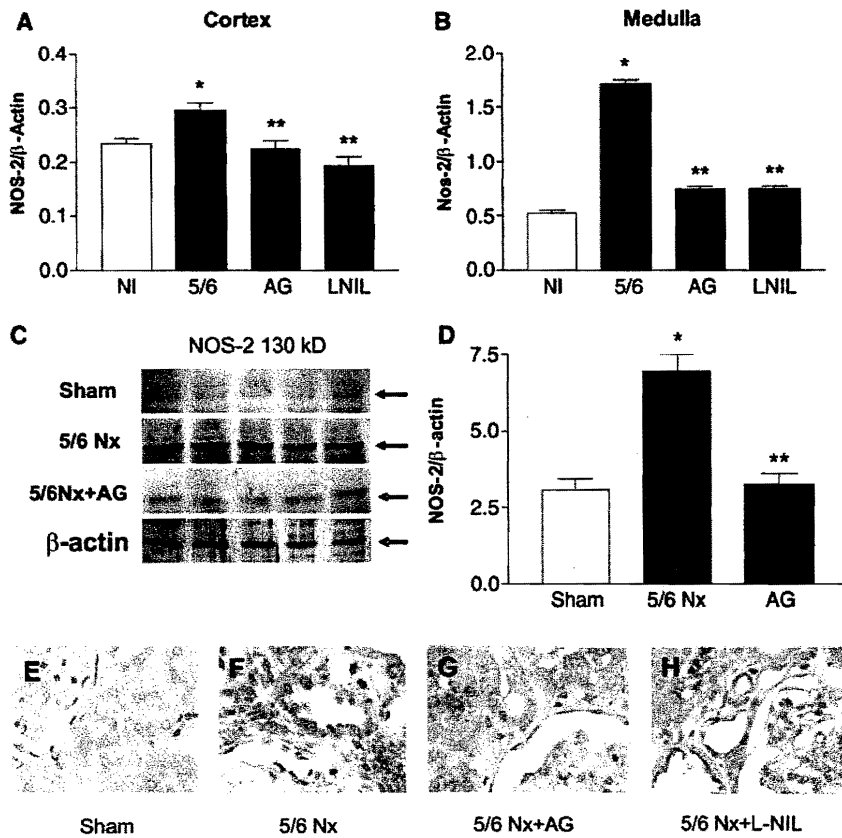


Fig. 1. NOS-2 renal expression. Cortical (A) and medullary (B) gene expression evaluated by real-time-RT-PCR. Representative western blot in renal homogenates (C, D). NOS-2 immunohistochemistry (400 \times ; E-H). A significant increase of NOS-2 renal expression in 5/6 Nx rats was observed in tubular epithelial cells, which was prevented in AG and L-NIL treated groups. * $P < 0.05$ vs sham; ** $P < 0.05$ vs 5/6 Nx.

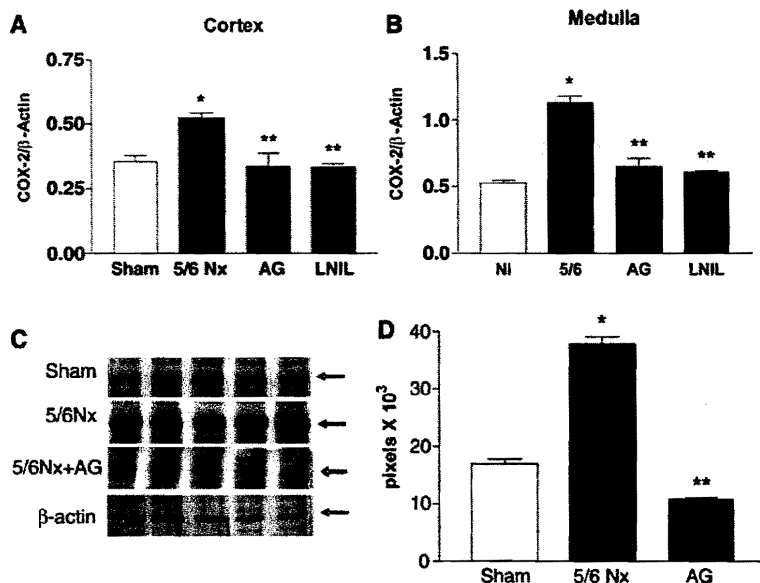


Fig. 2. COX-2 renal expression. Gene expression evaluated by real-time RT-PCR in cortex (A) and medulla (B). Protein expression was evaluated by western blot in renal microsomes (C, D). C is a representative western blot of COX-2. * $P < 0.05$ vs sham; ** $P < 0.05$ vs 5/6 Nx.

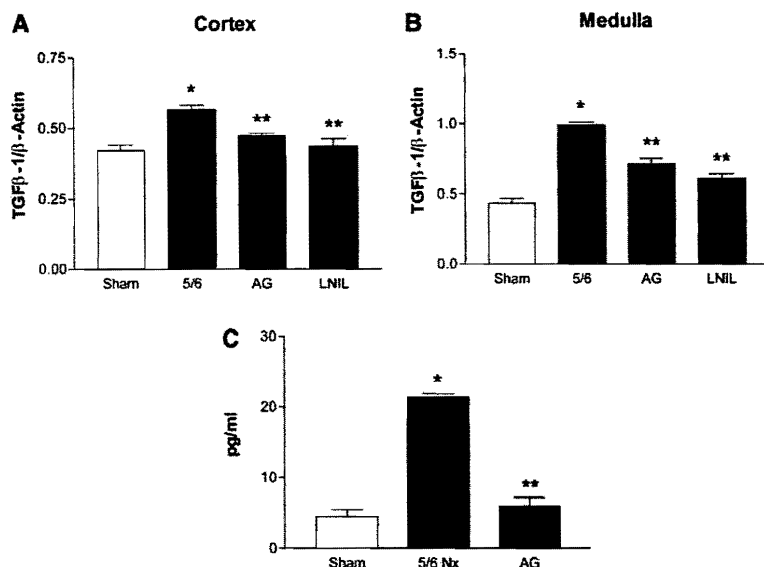


Fig. 3. TGF- β 1 expression. Gene expression was evaluated by real-time RT-PCR in renal cortex (A) and medulla (B). Protein active fraction of TGF- β 1 was evaluated by ELISA in plasma (C). * $P < 0.05$ vs sham; ** $P < 0.05$ vs 5/6 Nx.

The active fraction of the TGF- β 1 protein was evaluated by ELISA. Renal ablation induced a marked increase of the active fraction of TGF- β 1 compared with sham rats (16.71 ± 3.67 ng/ml vs 3.51 ± 0.75 , $P < 0.05$), which was prevented in the 5/6Nx + AG group (4.62 ± 0.82 ng/ml, $P < 0.05$ vs 5/6 Nx) (Figure 3C).

Histological studies

Quantification of tubulointerstitial fibrosis by morphometry showed increased fibrosis in subtotal renal ablated rats compared with the sham group (4653 ± 362 vs 1940 ± 107 pixels/area, $P < 0.05$). This morphological change was prevented by the administration of AG and L-NIL (2751 ± 181 and 2245 ± 98 pixels/area, respectively, $P < 0.05$ vs 5/6 Nx) (Figure 4A, C, E and G).

We previously showed that 5/6Nx induces a renal vascular lesion characterized by arteriolar wall thickening and narrowing of the vascular lumen [6]. In the present study, we found a similar microvascular lesion as disclosed by a significant increment in the media-to-lumen ratio compared with sham rats ($M/L = 6.37 \pm 0.59$ vs 3.55 ± 0.20 , $P < 0.01$). The arteriopathy was prevented by the administration of AG and L-NIL ($M/L = 3.47 \pm 0.18$ and 3.22 ± 0.08 , respectively, $P < 0.01$ vs 5/6Nx) (Figure 4B, D, F and H).

Correlations

We analysed the results of NOS-2 expression obtained by different approaches and examined its correlations among the studied parameters. These results are shown in Table 2. Cortical NOS-2 gene expression positively correlated with proteinuria, COX-2, and TGF- β 1.

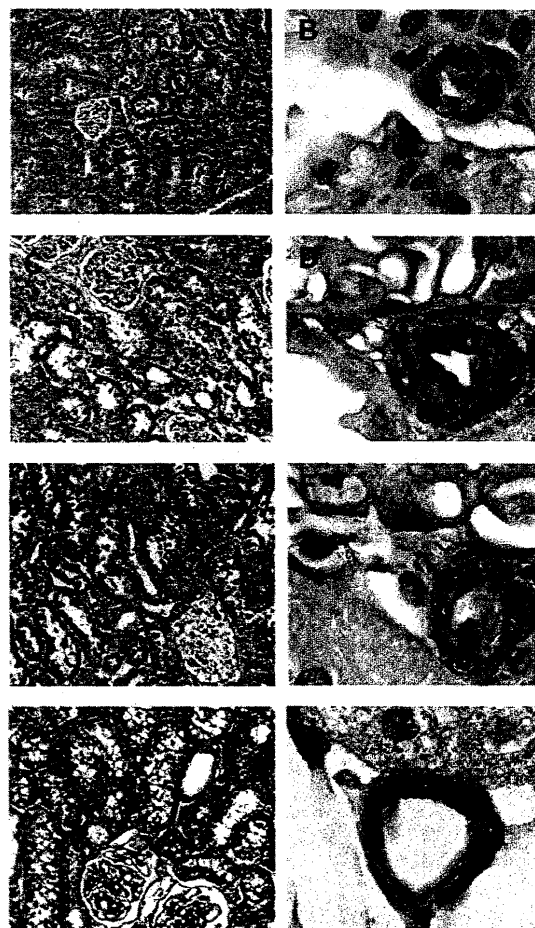


Fig. 4. Micrographs showing tubulointerstitial fibrosis (Masson, 400 \times) (A, C, E) and microvascular damage (PAS and α -SMA immunostaining, 1000 \times) (B, D, F) in sham (A, B), 5/6 Nx (C, D) and 5/6 Nx + AG (E, F) and L-NIL (G, H) rats.

Table 2. Correlations of NOS-2 expression obtained by different methods

Correlation	R-value	P-value
Gene analysis (RT-PCR)		
—NOS-2 (cortex) vs Uprot	0.77	0.001
—NOS-2 (cortex) vs COX2 (cortex)	0.77	0.001
—NOS-2 Cx vs TGF (cortex)	0.85	0.0001
Protein analysis (western blot and E)		
—NOS-2 Cx+Mx vs Uprot	0.79	0.0005
—NOS-2 Cx+Mx vs COX-2 _{Cx+Mx}	0.84	<0.0001
—NOS-2 _{Cx+Mx} vs TGF _{ELISA}	0.87	<0.0001
Immunohistochemical analysis		
—NOS-2 vs Uprot	0.64	0.01
—NOS-2 vs M/L ratio	0.91	<0.0001
—NOS-2 vs Fibrosis	0.88	<0.0001

By western blot, NOS-2 correlated with proteinuria and COX-2, and also with the active fraction of TGF- β 1 measured by ELISA. Morphometric analysis in groups used for immunohistochemistry revealed positive correlations among NOS-2 vs proteinuria, media-to-lumen ratio and fibrosis.

Discussion

Several studies have shown that during chronic renal injury, inhibition of inflammatory infiltration prevents or retards haemodynamic and structural alterations [2–4]. In this context, participation of NOS-2 may be relevant, since this isoform is induced in infiltrating inflammatory cells, and its high and continuous activity may have deleterious effects on renal tissue. However, the contribution of NOS-2 to the progression of renal damage is still controversial. In this regard, Aiello *et al.* [21] were the first to report decreased expression of NOS-2 in kidney sections of 5/6 Nx rats, and later on Vaziri *et al.* [7] confirmed this result in whole kidney homogenates. On the other hand, Brooks *et al.* [9] found in the same experimental model that administration of AG, a generally accepted specific inhibitor of NOS-2 [22], attenuated proteinuria. More recently, Fujihara *et al.* [8], suggested the existence of two functionally distinct NOS-2 renal fractions in 5/6 Nx rats: a constitutive tubular fraction and an interstitial fraction, associated with interstitial inflammation.

In the present study, we evaluated the participation of NOS-2 during chronic renal damage using three different approaches. In order to inhibit NOS-2, 0.1% of AG or 30 mg/l of L-NIL were added to drinking water. It had been previously shown that 0.1% of AG successfully blocks NOS-2, not inhibiting endothelial NOS or the formation of glycation end products (AGEs) [23]. Although the inhibition of NOS-2 by AG is considered to be specific, it can also reduce advanced AGEs formation, however presence of AGEs in 5/6 Nx rats was reported only after 12 weeks post-Nx [24]. Thus, it is unlikely that inhibition of AGEs production

by AG had contributed to the beneficial effects exerted by AG in the present study performed after 3 weeks of subtotal renal ablation. Nevertheless, in order to corroborate if the beneficial effect of AG treatment is actually due to selective inhibition of NOS-2, we used a more selective inhibitor of NOS-2, L-NIL. We found that both NOS-2 inhibitors prevented the overexpression of NOS-2, COX-2 and TGF- β 1 mRNA suggesting that both AG and L-NIL exerted their therapeutic effects through the inhibition of inducible NOS. In this regard, it was shown that AG and L-NIL blockaded the action of NOS-2 as an analogue substrate, indicating post-translational, rather than transcriptional inhibition [22]. However, the observation that AG and L-NIL also limit the expression of mRNA levels of NOS-2, suggests that both inhibitors may have effects on its transcriptional activation. Although, we can rule out a direct effect of AG and L-NIL on mRNA NOS-2 expression levels, it is likely that the decrement of NO and its oxidative radicals mediated by AG and L-NIL may prevent the activation of potent endogenous inducers such as cytokines, interferon- γ or tumour necrosis factor- α , produced during an inflammatory process, which could enhance the translocation of free NF- κ B from the cytosol to the nucleus and the induction of NOS-2 expression [25]. In support of a negative effect of AG and L-NIL on transcriptional activation of NOS-2, we found that protein expression measured as western blot was prevented in AG treated rats compared with 5/6 Nx rats and protein expression levels measured as immunohistochemistry were also decreased in AG and L-NIL treated rats compared with 5/6 Nx group.

Since progression of renal damage is partially mediated by proteinuria, proinflammatory and profibrotic molecules as well as structural damage, we studied if NOS-2 overexpression is related to these alterations, by analysis of expression of COX-2 and TGF- β 1, proteinuria, tubulointerstitial fibrosis and arteriolar thickening. Our results suggest that increased NOS-2 expression induced overexpression of COX-2 and TGF- β 1 at gene and protein levels. This is supported by the fact that NOS-2 inhibition with AG and L-NIL prevented the increased expression of both mRNAs. In fact, we found a positive correlation between expression of NOS-2 and COX-2 by real-time RT-PCR and western blot, and NOS-2 and TGF- β 1 by real-time RT-PCR and protein expression (NOS-2, western blot and TGF- β 1, ELISA). It has been postulated that tubulointerstitial fibrosis and vascular damage may result from the enhanced expression of COX-2 [26] and TGF- β 1 [27]. In our study, both alterations correlated positively with NOS-2 expression by immunohistochemistry. Finally, the most common marker of renal damage, proteinuria correlated with NOS-2 expression, evaluated by three different methods.

The mechanisms involved in the regulation of COX-2 and TGF- β 1 by NOS-2 are beyond the scope of the present study, nonetheless, several studies with different experimental models have shown that NO is

able to activate COX-2 [11] and TGF- β 1 [12]. The increased expression of NOS-2, observed in this study, could be associated with an enhanced generation of NO or of a secondary cytotoxic product such as peroxynitrite, which has been shown to activate the latent fraction of TGF- β 1 by inducing structural changes in its latency active peptide [12]. Thus, the active fraction of TGF- β 1 may increase the deposition of extracellular matrix in renal interstitium, enhancing the fibrotic process.

An important finding of this study is that two selective inhibitors of NOS-2 such as AG and L-NIL showed a protective effect on microvascular lesions, although it was unable to prevent the rise of arterial pressure. We previously reported [4] that preservation of the microvascular structure prevents the glomerular hyperfiltration and hypertension that result from 5/6Nx, despite persistence of arterial hypertension. Hence, we could speculate that conservation of the glomerular haemodynamic function, as a result of preservation of vascular structure, may be an additional protective effect exerted by AG and L-NIL.

In conclusion, the present studies show that the protective effect of two different selective inhibitors of NOS-2 (L-NIL and AG), inhibiting NOS-2 is associated with a decreased expression of NOS-2, COX-2 and the active fraction of TGF- β 1, as well as lower proteinuria and tubulointerstitial fibrosis, and the prevention of microvascular damage. These findings suggest that high concentrations of NO produced by NOS-2 can act as a positive modulator of proinflammatory and profibrotic pathways involved in the progression of renal disease.

Acknowledgements. We thank Dr José Pedraza-Chaverri for his suggestions and helpful discussions, and to Benito Chávez-Rentería for his technical assistance in the histological processing. Part of this work was presented in the XV Scientific Meeting of the Inter-American Society of Hypertension. April 27–30, 2003, San Antonio, TX, USA. Supported in part by grant CONACyT-Salud-2003-C01-25.

Conflict of interest statement. None declared.

References

- Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med* 1982; 307: 652–659
- Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R, Noronha ID. Mycophenolate mofetil attenuate renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int* 1998; 54: 1510–1519
- Romero F, Rodríguez-Iturbe B, Parra G, González L, Herrera-Acosta J, Tapia E. Mycophenolate mofetil prevents the progressive renal failure induced by 5/6 renal ablation in rats. *Kidney Int* 1999; 55: 945–955
- Tapia E, Franco M, Sánchez-Lozada LG *et al.* Mycophenolate mofetil prevents arteriopathy and renal injury in subtotal ablation despite persistent hypertension. *Kidney Int* 2003; 63: 994–1002
- Bremer V, Tojo A, Kimura K *et al.* Role of nitric oxide in rat nephrotoxic nephritis: comparison between inducible and constitutive nitric oxide synthase. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1712–1721
- Heeringa P, van Goor H *et al.* Expression of iNOS, eNOS and peroxynitrite-modified proteins in experimental anti-myeloperoxidase associated crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1998; 53: 382–393
- Vaziri ND, Ni Z, Wang XQ, Oveisi F, Zhou XJ. Downregulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: role of excess PTH. *Am J Physiol* 1998; 274: F642–F649
- Fujihara CK, Mattar AL, Vieira JM *et al.* Evidence for the existence of two distinct functions for the inducible NO synthase in the rat kidney: Effect of aminoguanidine in rats with 5/6 ablation. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2278–2287
- Brooks DP, Contino LC. Involvement of nitric oxide synthase in proteinuria associated with chronic renal disease in rat. *Pharmacology* 1998; 56: 257–261
- Yang CW, Yu CC, Ko YC, Huang CC. Aminoguanidine reduces glomerular inducible nitric oxide synthase (iNOS) and transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) mRNA expression and diminishes glomerulosclerosis in NZB/W F1 mice. *Clin Exp Immunol* 1998; 113: 258–264
- Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Curie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7240–7244
- Vodovotz Y, Chester L, Chong H *et al.* Regulation of transforming growth factor β 1 by nitric oxide. *Cancer Res* 1999; 59: 2142–2149
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; 7–7.8
- Gómez-Guerrero C, López-Franco O, Suzuki Y *et al.* Nitric oxide production in renal cells by immune complexes: Role of kinases and nuclear factor- κ B. *Kidney Int* 2002; 62: 2022–2034
- Castrop H, Schweda F, Schumacher K, Wolf K, Kurtz A. Role of renocortical cyclooxygenase-2 for renal vascular resistance and macula densa control of renin secretion. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 867–874
- Morath C, Dechow C, Lehrke I *et al.* Effect of retinoids on the TGF- β system and extracellular matrix in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2300–2309
- Vitzthum H, Weiss B, Bachleitner W, Krämer BK, Kurtz A. Gene expression of adenosine receptors along the nephron. *Kidney Int* 2004; 65: 1180–1190
- Ferrario CM, Jessup J, Gallagher PE *et al.* Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors. *Kidney Int* 2005; 68: 2189–2196
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994; 94: 2504–2510
- Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Santamaría J *et al.* Mild hyperuricemia induces vasoconstriction and maintains glomerular hypertension in normal and remnant kidney rats. *Kidney Int* 2005; 67: 237–247
- Aiello S, Noris M, Todeschini M. Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. *Kidney Int* 1997; 52: 171–181
- Wolff DJ, Bryk R. Mechanism of inducible nitric oxide synthase inactivation by aminoguanidine and L-N^G-(I-Iminoethyl) lysine. *Biochemistry* 1998; 37: 4844–4852
- Reckelhoff JF, Hennington BS, Kanji V *et al.* Chronic aminoguanidine attenuates renal dysfunction and injury in aging rats. *Am J Hypertens* 1999; 12: 492–498

24. Sebekova K, Schinzel R, Münch G, Krivosíková Z, Dzúrik R, Heidland A. Advanced glycation end-products levels in subtotaly nephrectomized rats: Beneficial effects of Angiotensin II receptor 1 antagonist losartan. *Miner Electrolyte Metab* 1999; 380–383
25. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences* 2004; 75: 639–653
26. Kang DH, Nakagawa T, Feng L *et al.* A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2888–2897
27. Yu L, Border WA, Huang Y, Noble NA. TGF-beta isoforms in renal fibrogenesis. *Kidney Int* 2003; 64: 844–856

Received for publication: 7.6.06
Accepted in revised form: 27.6.06