

Regulación de la óxido nítrico sintetasa inducible glomerular

M. Saura y S. Lamas

Centro de Investigaciones Biológicas. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Introducción

En los últimos años, el óxido nítrico (NO) ha sido identificado como un importante mensajero intercelular que regula una gran variedad de funciones en diversos tejidos. Es un mediador inusual, ya que es un gas extremadamente lábil cuya vida media es del orden de segundos. Esta molécula actúa como radical libre gracias a su electrón desapareado que le confiere la capacidad de ser altamente reactivo con otras moléculas. Nadie esperaba que esta sustancia pudiera ser importante en la biología. Hasta hace relativamente pocos años era considerado un constituyente más de la contaminación atmosférica. Sin embargo, a finales de los años 80 se describió la síntesis de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, productos de la oxidación del NO, por los mamíferos^{1,2} y se identificó al NO como el factor relajante derivado del endotelio^{3,4}, abriéndose entonces un intenso campo de investigación en la comunicación entre células, ya que esta molécula, dada su naturaleza difusible, atraviesa libremente la membrana celular y actúa como mensajero inter e intracelular.

La gran variedad de tipos celulares donde ha sido identificado, así como el gran número de reacciones controladas por el NO, ha incrementado el interés en el estudio de esta sustancia y ha hecho que se alcance un rápido progreso en la investigación acerca de este mediador.

Síntesis y acciones del NO

La principal acción del NO es la relajación de la musculatura para reflejar su activación por agentes inflamatorios como citoquinas y LPS. NOS \bar{i} está ausente en la mayoría de las células en condiciones normales. Su expresión es inducida en varios tipos

celulares por señales procedentes del sistema inmune tales como citoquinas, produciendo grandes cantidades de NO durante períodos tan largos como cinco días.

Dada la participación del NO en la fisiología y fisiopatología de tantos y variados sistemas de órganos hay un profundo interés en la regulación de la biosíntesis de NO desde el punto de vista fisiológico y farmacológico. Una motivación para este interés, aunque no la única, es la evidencia de que la profunda hipotensión resultante de la administración de endotoxina bacteriana (LPS) o de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) podría depender de la inducción de NOS^{5,11}. Debido a que la NOS \bar{e} endotelial interviene en la regulación de la agregación plaquetaria y la regulación del tono vascular y la neuronal podría jugar también un importante papel fisiológico, muchos investigadores consideran que el mayor desafío es encontrar una manera de inhibir selectivamente NOS.

Regulación de la expresión de NOS \bar{i}

Existen tres razones fundamentales que obligan a pensar en un ingenioso mecanismo de regulación de la actividad de este enzima. Primero, la amplia distribución por todo el organismo de la isoforma inducible que ha sido demostrada hasta la fecha en macrófagos, neutrófilos, queratinocitos, astrocitos, hepatocitos, musculatura lisa, contribuyendo a la regulación del tono vascular. Sin embargo, el NO tiene otra serie de complejas funciones: actúa en la inhibición de la agregación plaquetaria, es un neurotransmisor en el sistema nervioso central y también interviene en reacciones de quimiotaxis y citotoxicidad⁵. Por otra parte, en el momento actual se cree que cantidades anormalmente elevadas de NO están involucradas en ciertas situaciones fisiopatológicas como la hipotensión que acompaña al shock séptico y la respuesta inflamatoria inducida por daño tisular.

El NO es el producto de la oxidación del grupo guanidinio de la L-arginina por un enzima denominado óxido nítrico sintetasa (NOS). Este enzima cataliza la oxidación de la L-arginina para convertirla en

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

citrulina, siendo el NO el coproducto de esta reacción⁶. Hasta ahora han sido aisladas y caracterizadas tres NOS distintas que son producto de tres genes diferentes. Las tres isoformas varían en la localización celular, secuencia de aminoácidos, regulación y, por lo tanto, en sus papeles funcionales. Dos isoformas de NOS son dependientes de Ca^{2+} y de calmodulina exógena y se expresan de manera constitutiva. Una está localizada en el endotelio^{7,8} y la otra se expresa en neuronas periféricas y centrales mediando procesos como la vasodilatación y la neurotransmisión⁹. Estas dos enzimas se denominan genéricamente NO sintetasa constitutiva (NOSc) y permanecen en reposo hasta que una elevación en el nivel de Ca^{2+} intracelular activa su unión a la calmodulina y hace que se produzca NO durante varios minutos. La tercera forma es inducible y se denominó NOS inducible (NOS)¹⁰, células musculares lisas, endoteliales, epitelio, células mesangiales, fibroblastos, células tumorales y miocitos cardíacos⁵. Segundo, en todas estas células, la máxima inducción de NOS depende de la combinación sinérgica de estímulos cuya eficacia varía según el tipo celular. A menudo la sinergia se produce entre el interferón gamma y un compuesto de la pared bacteriana, el lipopolisacárido (LPS)¹² o con $\text{TNF-}\alpha$ ¹³, pero la lista de agentes que son capaces de inducir la NOS se ha incrementado en los últimos años y ahora incluye sustancias como el ácido picolínico¹⁴, ozono, agentes que aumentan el AMPc¹⁵, luz ultravioleta y agentes microbianos que han perdido el LPS. Finalmente, NOS está sujeta a supresión inmunológica, por ejemplo, por el factor transformante del crecimiento ($\text{TGF-}\beta$)¹⁶ o las interleuquinas 4 (IL-4)¹⁷, 10¹⁸ y 13^{19,20}. En la mayoría de los casos la producción de NO se relaciona con cambios similares en la abundancia del mRNA de NOS, indicando que en su mayor parte la regulación de la NOS se produce a nivel transcripcional, actuando bien directamente sobre la transcripción o sobre la estabilidad del mRNA.

Debido a que, en general, la inducción de la expresión de NOS refleja un incremento en la transcripción del gen se han intensificado los esfuerzos para clonar el gen e identificar los elementos del DNA involucrados en su regulación. Hasta el momento se han clonado los promotores del gen de la NOS humana²¹ y murina^{22,23}. La inducibilidad de NOS por diversos estímulos indica que la regulación de su promotor debe ser muy compleja. En la región promotora de este gen, tanto en humanos como en ratón, se han detectado numerosas secuencias de DNA reguladoras a las que posiblemente se pueden unir diferentes factores de transcripción. Mediante el análisis computarizado de las secuencias se han podido identificar sitios para la unión de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, AP-1, NF-

IL-6, elementos de respuesta a interferón y a $\text{TNF-}\alpha$. La capacidad de inducir la transcripción de la NOS murina por LPS parece ser debida a una única secuencia $\text{NF-}\kappa\text{B}$ situada entre los nucleótidos -85 y -76, en combinación con otras proteínas nucleares no identificadas hasta la fecha^{22,23}. Sin embargo, la funcionalidad de muchos de estos posibles elementos reguladores en la región reguladora del promotor de la NOS todavía no ha sido determinada.

Aspectos funcionales de la expresión de NOS

La expresión de NOS es el resultado de respuestas inflamatorias difusas o localizadas resultantes de la infección o daño tisular. Así, donde la respuesta inflamatoria es parte de una respuesta adaptativa, la expresión de NOS es beneficiosa; cuando la expresión de NOS es parte de una inflamación anormal, esta expresión puede ser perjudicial (ejemplo, enfermedades autoinmunes). Como aspectos beneficiosos puede destacarse que la expresión de NOS resulta en la inhibición del crecimiento de patógenos desde microorganismos hasta virus²⁴. Y también parece proteger a los tejidos del daño en respuestas agudas inflamatorias sistémicas como la sepsis²⁵. La vasodilatación resultante de la expresión de NOS mejora la perfusión durante la sepsis, pero si ésta es excesiva la hipotensión resultante puede llegar a ser refractaria y, por tanto, letal. En el contexto de los órganos sólidos, la expresión de NOS en endotoxemia podría ser citoprotectora, ya que previene la formación de microtrombos inhibiendo la agregación plaquetaria y la lesión mediada por radicales del oxígeno²⁶.

NOS y riñón

Varios autores han comenzado a localizar la NOS en el riñón²⁷. Existen datos publicados recientemente que indican que el NO tiene potentes efectos en la función renal, incluyendo modulación de las hemodinámicas renal y glomerular, secreción de renina, feed-back túbulo-glomerular y excreción de sodio (revisada en ref. 28). Este NO es importante manteniendo la tasa de filtración glomerular en condiciones basales y también en estados patológicos en los que está incrementada la producción de angiotensina II²⁹. Además el NO puede inhibir la proliferación mesangial y así modular los efectos de las citoquinas y factores de crecimiento en la glomerulonefritis³⁰. A pesar de la creciente importancia que se asigna al NO en la función renal se conoce relativamente poco acerca de la expresión de NOS a lo largo de la

nefrona. Wilcox y colaboradores han demostrado la presencia de NOS en las células de la mácula densa³¹. Se ha identificado NOSi en cultivos primarios de células del túbulo proximal y de túbulos colectores de la capa medular interna en rata³². Morrissey y cols. demostraron recientemente la representación de NOSi en distintos tejidos del riñón, encontrándola en la capa medular externa y en glomérulos³³.

Se ha demostrado que algunas citoquinas inflamatorias, como el TNF- α ³⁴, la IL-1 β ³⁵ o productos de la pared microbiana como el LPS³⁶ son capaces de inducir la expresión de un tipo de NOS similar a la del macrófago en células mesangiales y que éstas son capaces de responder al NO por ellas liberado, incrementando los niveles de GMPc intracelular. Las células mesangiales glomerulares son un tipo especializado de células musculares lisas con propiedades comunes a los macrófagos, incluyendo la capacidad de sintetizar prostaglandinas, radicales libres del oxígeno, citoquinas y factores de crecimiento. Debido a su naturaleza contráctil son capaces de regular la tasa de filtración glomerular y el tráfico de macromoléculas a través del glomérulo. Estas células responden al NO derivado del endotelio con la formación de GMPc y la subsiguiente relajación³⁷.

Nuestro grupo ha llevado a cabo estudios utilizando LPS y TNF- α y hemos comprobado que ambas sustancias se comportan de forma sinérgica para inducir la NOS¹³. Cuando analizamos el comportamiento de este enzima se observó que la inducibilidad que presenta ante estos dos estímulos es dependiente del proceso de transcripción y de síntesis proteica. Es un hecho conocido que las células mesangiales son capaces de producir NO ante estímulos de tipo inmunológico, pero recientemente se ha descrito la inducción de la transcripción de la NOSi en estas células por sustancias no relacionadas, como la forskolina que actúa de forma sinérgica con la IL-1 β ³⁸, o agentes capaces de aumentar los niveles de AMPc³⁹. El mecanismo por el que se produce la inducción es desconocido hasta el momento. La expresión de este enzima puede resultar autotóxica en determinadas situaciones. El exceso de formación de NO y de GMPc en células mesangiales no sólo bloquea la contractilidad de estas células³⁵, sino que puede contribuir al daño tisular observado en la patogénesis de ciertas formas de glomerulonefritis⁴⁰.

Debido a la implicación del NO en la fisiopatología renal hay un creciente interés en conocer la regulación de la NOSi mesangial. En 1989, Pfeischtter y cols. describieron que la actividad de este enzima se podía inhibir con glucocorticoides⁴¹, hecho que ya se había comprobado en macrófagos y, al igual que ocurre en éstos, también por el TGF- β ¹⁶. Sin embargo, en estos trabajos no explican el mecanismo empleado por estas sustancias para inducir este efecto.

Nuestro grupo ha demostrado recientemente que un glucocorticoide, la dexametasona, es capaz de inhibir la transcripción de NOSi en células mesangiales de rata inducida por LPS+TNF- α ¹³. Este fenómeno se produjo de forma dependiente de concentración y tiempo. La dexametasona es capaz de prevenir el efecto producido por la combinación del LPS+TNF- α ; sin embargo, el tratamiento con dexametasona no es capaz de revertir el efecto producido por la estimulación de la NOSi, lo cual podría ayudar a explicar el fracaso terapéutico de los glucocorticoides en el shock séptico admitiendo, naturalmente, que el NO es un importante mediador implicado en las alteraciones hemodinámicas que en éste se producen⁴². El mecanismo molecular que subyace en este proceso no ha sido aún establecido; los glucocorticoides podrían disminuir la estabilidad del RNA, disminuir la tasa de transcripción o interactuar con otros factores de transcripción activadores inhibiendo su efecto. En células musculares lisas se ha descrito que la dexametasona es capaz de aumentar la estabilidad del mRNA y al mismo tiempo disminuir en un 30% la tasa de transcripción de NOSi⁴³, pero no existe hasta el momento ningún trabajo que señale un fenómeno semejante en células mesangiales. No se ha clonado el promotor de la NOSi de rata, de forma que no se conoce si existe un elemento de respuesta a glucocorticoides. En el promotor murino no se ha detectado ningún elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE)^{22, 23}, que constituye el mecanismo general de actuación sobre la expresión génica de estas drogas⁴⁴. Sin embargo, es posible que existan pequeñas pero significativas diferencias en el gen de rata que ayuden a explicar este fenómeno.

El control de la transcripción de este enzima en respuesta a citoquinas inflamatorias está siendo intensamente estudiado, y parece claro que están involucrados una serie de factores de transcripción comunes a muchos sistemas celulares, el más llamativo de los cuales es el NF- κ B. Se trata de un factor de transcripción multiproteico formado por dos subunidades, la p50 y la p65, que se encuentra de forma inactiva en el citoplasmaacomplejado con una subunidad inhibitoria, el I κ B. Este factor es activado en respuesta a LPS, IL-1 β , TNF- α y otros estímulos y juega un papel clave en el desarrollo de respuestas inmunes e inflamatorias⁴⁵. Otros grupos además del nuestro, han descrito la participación de este factor en la activación de la transcripción de NOSi en células mesangiales de rata^{13, 39}. Para ello se utilizó un inhibidor de su activación, el pirrolidin ditiocarbamato (PDTC). La activación del NF- κ B conlleva la disociación de la subunidad inhibitoria I κ B y la subsiguiente translocación al núcleo del factor donde se une al DNA; el PDTC es capaz de bloquear la liberación de I κ B con un mecanismo de acción relacionado probablemente

con su capacidad quelante de metales pesados y su actividad antioxidante⁴⁶. Esta sustancia produjo una inhibición dependiente de tiempo y dosis sobre la inducción de la NOS i observada en CMR estimuladas con LPS+TNF- α . El PDTC añadido cuatro horas después de inducir el enzima es todavía capaz de inhibir su expresión. También se ha demostrado que el PDTC es capaz de inhibir la expresión de NOS i inducida por IL-1 β de forma dependiente de la dosis, pero no la inducida por AMPc³⁹. Esto indica que la activación vía AMPc implica la actuación de otros factores de transcripción que bien, solos o en combinación con el NF- κ B, son capaces de activar la NOS inducible de la célula mesangial. Observaciones recientes concluyen que el NF- κ B es capaz de interaccionar de forma directa con el receptor de los glucocorticoides activado^{47, 48}. La significación biológica de este hecho todavía no ha sido bien estudiada, pero es posible que pueda ayudar a explicar el efecto inhibitorio de los glucocorticoides en la NOS i mesangial.

Parece cada vez más claro que el NO liberado por las células mesangiales podría estar implicado en determinadas enfermedades renales^{40, 49, 50}. En ratas con glomerulonefritis de Heyman, los glomérulos aislados producen cantidades importantes de NO $_2$ basalmente y después de la estimulación con LPS cuando se compara con glomérulos de animales control⁴⁹. Los autores de estos estudios atribuyen estos efectos a los macrófagos infiltrados, pero es posible, en virtud de lo antes expuesto, que las células mesangiales estén realizando una contribución sustancial a este fenómeno, sin descartar la participación de las otras estirpes celulares componentes del glomérulo, como son las células endoteliales⁵¹ y las epiteliales³². Así, nosotros hemos observado, utilizando glomérulos aislados que la combinación de LPS+IFN- γ y LPS+TNF- α es capaz de inducir la expresión de la NOS i , y también demostramos el efecto inhibitorio de la dexametasona y del PDTC en esta estructura, donde los resultados son más fácilmente extrapolables a lo que podría suceder *in vivo*¹³. Esto sugiere una potencial vía de actuación en la disfunción renal que ocurre en la sepsis. En trabajos recientes se ha investigado el papel del NO producido en la enfermedad glomerular inducida por endotoxina. De estos estudios se desprende que el LPS puede estimular endógenamente la producción de NO *in vivo* de forma sistémica y dentro del glomérulo y que ejerce un papel protector en la trombosis glomerular ayudando a mantener la perfusión del órgano en situaciones en las cuales ésta se ve comprometida²⁶.

Conclusión

En resumen, las células mesangiales pueden producir NO en respuesta a variados estímulos. Las cé-

lulas endoteliales glomerulares y los macrófagos infiltrados, y posiblemente las células epiteliales, podrían ser una fuente adicional de NO en el glomérulo. Además, la endotoxina o citoquinas circulantes podrían actuar directamente en la célula mesangial para estimular la producción de NO.

Así, el NO producido por las células mesangiales glomerulares podría tener un número importante de acciones dentro del glomérulo, y por ende, regular asimismo la función tubular. Se necesitarán estudios adicionales para determinar si el NO está implicado en otras patologías glomerulares y para explorar la posibilidad de manipulación terapéutica de la NOS glomerular. Esto sólo se conseguirá cuando se conozca y comprenda la compleja regulación a la que el gen que codifica la NOS está sometido.

Bibliografía

1. Stuehr DJ y Marletta MA: Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7738-7742, 1985.
2. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD y Wishnok JS: Macrophage oxidation of L-Arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *The American Chemical Society* 27:8706-8711, 1988.
3. Ignarro LJ, Buga GM, Wood RS, Byrns RE y Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9265-9269, 1987.
4. Palmer RMJ, Ferrige AG y Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526, 1987.
5. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051-3064, 1992.
6. Marletta MA: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *JBiol Chem* 268:12231-12234, 1993.
7. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S y Michel T: Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS letters* 307:287-293, 1992.
8. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P y Michel T: Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci* 89:6348-6352, 1992.
9. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR y Snyder SH: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351:714-718, 1991.
10. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T y Nathan C: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256:225-228, 1992.
11. Moncada S y Higgs A: Mechanism of disease. The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012, 1993.
12. Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH y Russell SW: Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. *JBiol Chem* 268:1908-1913, 1993.
13. Saura M, López S, Rodríguez Puyol M, Rodríguez Puyol D y Lamas S: Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in rat mesangial cells and isolated glomeruli. *Kidney Int* 47, 1995. (En prensa.)
14. Melillo G, Cox GW, Biragyn A, Sheffler LA y Varesio L: Regulation of nitric oxide synthase mRNA expression by interferon- γ and picolinic acid. *JBiol Chem* 269:8128-8133, 1994.
15. Imai T, Hirata Y, Kanno K, y Marumo F: Induction of nitric oxide synthase by cyclic AMP in rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 93:543-549, 1994.
16. Pfeilschifter J y Vosbeck K: Transforming growth factor β_2 inhibits interleukin 1b-and tumour necrosis factor α -induction of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 175:372-379, 1991.
17. Bogdan C, Vodovotz Y, Paik J, Xie QW y Nathan C: Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J Leukoc Biol* 55:227-233, 1994.
18. Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL y Sher A: IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. *J Immunol* 148:1788-1792, 1992.
19. Doherty TM, Kastelein R, Menon S, Andrade S y Coffman RL: Modulation of murine macrophage function by IL-13. *J Immunol* 151:7151-7160, 1993.
20. Lamas S, Saura M, Martínez-Dalmau R, Rodríguez-Puyol M y Rodríguez-Puyol D: Human recombinant interleukin-13 (rHuIL-13) inhibits the expression and activity of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human mesangial cells (HMC). *J Am Soc Nephrol* 5:585, 1994.
21. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP, Billiar TR, Hutchinson NI y Mudgett JS: Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *JBiol Chem* 269:6765-6772, 1994.
22. Xie QW, Whisnant R y Nathan C: Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 177:1779-1784, 1993.
23. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW y Murphy WJ: Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate the induction by interferon γ and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9730-9734, 1993.
24. Karupiah G, Xie Q, Buller RML, Nathan C, Duarte C y MacMicking J: Inhibition of viral replication by interferon- γ -induced nitric oxide synthase. *Science* 261:1445-1448, 1993.
25. Thiemeermann C: The role of the L-arginine: nitric oxide pathway in circulatory shock. *Advances in Pharmacology* 28:45-79, 1994.
26. Shultz PJ y Raj L: Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin-induced glomerular thrombosis. *J Clin Invest* 90:1718-1725, 1992.
27. Ujie K, Yuen J, Hogarth L, Danzigier R y Star RA: Location and regulation of endothelial NO synthase mRNA expression in rat kidney. *Am J Physiol* 267:F296-F302, 1994.
28. Romero JC, Lahera V, Salom MG y Biondi ML: Role of endothelium-derived relaxing factor nitric oxide on renal function. *J Am Soc Nephrol* 2:1371-1378, 1992.
29. De Nicola L, Blantz RC y Gabbai FB: Nitric oxide and angiotensin II. *Am J Kid Dis* 17:1248-1256, 1992.
30. Shultz PJ, Schorer AE y Raj L: Effects of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide on rat mesangial cells. *Am J Physiol* 258 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol* 27), F162-F167, 1990.
31. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R y Schmidt HW: Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 11993-11997, 1992.
32. Markewitz BA, Michael JR y Kohan DE: Cytokine-induced expression of a nitric oxide synthase in rat renal tubule cells. *The American Society for Clinical Investigation* 91:2138-2143, 1993.

33. Morrissey JJ, McCracken R, Kaneto H, Vehaskari M, Montani D y Klahr S: Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney. *Kidney Int* 45:998-1005, 1994.
34. Marsden PA y Ballermann BJ: Tumor necrosis factor activates soluble guanylate cyclase in bovine glomerular mesangial cells via an L-arginine-dependent mechanism. *J Exp Med* 172:1843-1852, 1990.
35. Pfeilschifter JPR, Mülsch A, Fandrey J, Vosbeck K y Busse R: Interleukin 1 β and tumour necrosis factor α induce a macrophage-type of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Eur J Biochem* 203:251-255, 1992.
36. Shultz PJ, Archer SL y Rosenberg ME: Inducible nitric oxide synthase mRNA and activity in glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 46:683-689, 1994.
37. Mené P, Simonson MS y Dunn MJ: Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev* 69:1347-1425, 1989.
38. Kunz D, Mühl H, Walker G y Pfeilschifter J: Two distinct signalling pathways trigger the expression of inducible nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:5387-5391, 1994.
39. Eberhardt W, Kunz D y Pfeilschifter J: Pyrrolidine dithiocarbamate differentially affects interleukin-1 β and cAMP-induced nitric oxide synthase expression in rat renal mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 200:163-170, 1994.
40. Cattell V, Lianos E, Largen P y Cook T: Glomerular NO synthase activity in mesangial cell immune injury. *Exp Nephrol* 1, 36-40, 1993.
41. Pfeilschifter J: Anti-inflammatory steroids inhibit cytokine induction of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Eur J Pharmacol* 195:179-180, 1991.
42. Bone RC, Fisher J, C.J. Clemmer TP, Sotman GJ, Metz CA, Balk RA y Group MSSS: A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 317:653, 1987.
43. Perrella MA, Yoshizumi M, Fen Z, Tsai J, Hsieh C, Kourembanas S y Lee M: Transforming growth factor- β 1, but not dexamethasone, down-regulates nitric-oxide synthase mRNA after its induction by interleukin-1 β in rat smooth muscle cells. *J Biol Chem* 269:14595-14600, 1994.
44. Barnes PJ y Adcock I: Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *TIPS Reviews* 14:436-441, 1993.
45. Baeuerle PA: The inducible transcription activator NF- κ B: regulation by distinct protein subunits. *Biochimica et Biophysica Acta* 1072:63-80, 1991.
46. Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W y Baeuerle PA: Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor- κ B activation in intact cells. *J Exp Med* 175:1181-1194, 1992.
47. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y, Rice N, Okamoto S, Kasahara T y Matsushima K: Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. *J Biol Chem* 269:16289-16295, 1994.
48. Ray A y Prefontaine KE: Physical association and functional antagonism between the P65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:752-756, 1994.
49. Cattell V, Largen P, De Heer E y Cook T: Glomeruli synthesize nitrite in active Heymann nephritis; the source is infiltrating macrophages. *Kidney Int* 40:847-851, 1991.
50. Cattell V, Cook T y Moncada S: Glomeruli synthesize nitrite in experimental nephrotoxic nephritis. *Kidney Int* 38:1056-1060, 1990.
51. Lamas S, Michel T, Brenner B y Marsden P: Nitric oxide synthesis in endothelial cells: evidence for a pathway inducible by tumor necrosis factor- α . *Am J Physiol: Cell Physiol* 261:C634-641, 1991.