Papel del óxido nítrico en la respuesta del IGF-I hepático a la inflamación

Role of nitric oxide in hepatic IGF-I response to inflammation

1 *Departamento de Fisiología*
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
2 *Departamento de Ciencias Morfológicas y Fisiología*
Universidad Europea de Madrid

Priego T. [1]
Ibáñez de Cáceres I. [1]
Martín A. I. [2]
López-Calderón A. [1]
Villanúa M. A. [1]

RESUMEN

Objetivos: **Estudiar la implicación del óxido nítrico (NO) en el efecto inhibidor de la inflamación, tanto aguda como crónica, sobre el factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I), ya que este gas es un mediador importante de la respuesta inflamatoria.**

Material y métodos: **Para ello se analizó el efecto del bloqueo de la óxido nítrico sintasa inducida por las citoquinas (iNOS), mediante la administración de aminoguanidina (AG) a ratas macho, sobre la inhibición del IGF-I sérico y hepático que se produce en respuesta a la inflamación. La inflamación aguda se indujo mediante la administración de lipopolisacárido de *E-coli* (LPS), y la crónica, mediante la administración de adyuvante de Freund, que produce en los animales una artritis crónica. Las concentraciones séricas y hepáticas de IGF-I se midieron mediante RIA.**

Resultados: **La administración de AG a ratas artríticas disminuyó el grado de inflamación ($p < 0,01$), pero no modificó el IGF-I sérico o hepático. En las ratas tratadas con LPS, la AG no alteró el IGF-I hepático, pero normalizó el IGF-I sérico.**

Conclusiones: **1) El NO no participa en el descenso del IGF-I hepático observado en la inflamación aguda o crónica. 2) El NO está implicado en los mecanismos responsables del descenso del IGF-I sérico en la inflamación aguda.**

Palabras clave: *NO, iNOS, artritis, LPS, IGF-I.*

Priego T, Ibáñez de Cáceres I, Martín A I, López-Calderón A, Villanúa M A
Papel del óxido nítrico en la respuesta del IGF-I hepático a la inflamación
Mapfre Medicina, 2004; 15: 20-27

ABSTRACT

Objective: **To study the role of nitric oxide (NO) in the inhibitory effect of the acute and chronic inflammation on the insulin-like growth factor-I (IGF-I), since this gas is a mediator of inflammation.**

Material and methods: **For this purpose, the inhibition of the enzyme NO synthase inducible by citoquines (iNOS), throughout aminoguanidine (AG) administration to male rats, and its effect on the decrease in serum and hepatic IGF-I observed during inflammation, was studied. Acute inflammation was induced by administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS), and chronic inflammation by administration of Freund adjuvant, that induces chronic arthritis. Serum and hepatic IGF-I concentrations was measured by RIA.**

Results: **AG administration to arthritic rats decreased the severity of inflammation ($p < 0.01$), but it did not modify serum or hepatic IGF-I. In LPS-treated rats, the AG did not change the hepatic IGF-I content, but it normalised serum IGF-I levels.**

Conclusions: **1) NO does not mediate the decrease in the hepatic IGF-I in acute and chronic inflammation. 2) NO is involved in the mechanisms responsible for the decrease in serum IGF-I levels in acute inflammation.**

Key words: *NO, iNOS, arthritis, LPS, IGF-I.*

Priego T, Ibáñez de Cáceres I, Martín A I, López-Calderón A, Villanúa M A
Role of nitric oxide in hepatic IGF-I response to inflammation
Mapfre Medicina, 2004; 15: 20-27

Correspondencia:
M.ª Ángeles Villanúa
Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
28040 Madrid
E-mail: anvi@med.ucm.es

Fecha de recepción: *14 de mayo de 2002*

El trabajo ha sido financiado por la Fundación Mapfre Medicina (2001) y por el FIS (00/0949)

INTRODUCCIÓN

El choque séptico y las enfermedades crónicas inflamatorias se acompañan de un balance de nitrógeno negativo y proteolisis (1). La pérdida de proteínas lleva aparejada disminución de músculo esquelético, aumento de la incidencia de infecciones y mala cicatrización de las heridas. Aunque la causa de estas alteraciones metabólicas es multifactorial (disminución del apetito y, por lo tanto, de la ingesta, inmovilización y la inflamación), las alteraciones del sistema endocrino desempeñan un papel importante, aunque todavía no bien conocido. La hormona de crecimiento (GH) que tiene importantes acciones anabólicas, actúa en los tejidos de dos modos, directamente y a través de la activación del factor de crecimiento similar a la insulina-I (IGF-I). En los niños con enfermedades inflamatorias y en los adultos con choque séptico se ha observado un descenso de los niveles séricos del IGF-I (2).

La artritis experimental inducida por la administración de adyuvante se utiliza como modelo animal para el estudio de la artritis reumatoide y del estrés inflamatorio crónico. En este modelo animal se produce una reducción drástica del peso corporal, a partir de los días 10-12 de la administración del adyuvante, días en los que comienzan a aparecer los síntomas inflamatorios y un desarrollo rápido de caquexia, junto con un descenso del IGF-I sérico y hepático (3). En los animales de experimentación, la administración del lipopolisacárido de *E. Coli* (LPS) o endotoxina inicia una serie de eventos similares a los causados por una infección por bacterias Gram positivas, desarrollándose toda la serie de reacciones en cascada de las citoquinas proinflamatorias que darán lugar a la inflamación (4). En la inflamación inducida por la administración de LPS están disminuidos los niveles circulantes de GH, así como las concentraciones séricas y hepáticas de IGF-I (5, 6).

El óxido nítrico (NO) interviene como mediador en múltiples eventos biológicos, de entre los que destaca su importancia en el desarrollo de procesos inflamatorios. El NO se genera mediante la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), enzima de la que existen tres formas. Dos de ellas, son formas constitutivas (cNOS) que se expresan normalmente en las células endoteliales y en las células nerviosas, y una de ellas, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), se induce en los tejidos en respuesta a los estímulos inflamatorios. La inducción de la iNOS en los tejidos puede conducir a la producción sostenida de altas concentraciones de NO, que puede ejercer efectos proinflamatorios como vasodilatación, edema y citotoxicidad, así como mediar en procesos dependientes de citoquinas (7). Se ha observado producción excesiva de NO en pacientes con sepsis, colitis ulcerosa, psoriasis, lupus eritematoso sistémico y artritis. Las fuentes potenciales de NO en estos procesos inflamatorios no están claras, pero parecen incluir el endotelio vascular, el músculo liso vascular, los hepatocitos, los macrófagos y los condrocitos, y la iNOS se ha detectado en cada uno de estos tipos celulares. El aumento en los niveles plasmáticos de NO que se produce en la inflamación es el resultado de la inducción de la iNOS, y no del incremento de las formas constitutivas de la NOS. Este hecho se ha demostrado al administrar LPS tras el bloqueo de la iNOS y observar que disminuyen los síntomas inflamatorios, mientras que, el bloqueo inespecífico de todas las formas de la NOS, aumenta el daño hepático y la mortalidad en el shock endotóxico (8).

Aunque en la inflamación existe un descenso de la secreción hipofisaria de GH, también puede producirse un efecto inhibidor a nivel de los tejidos (9, 10). En el hígado, durante la inflamación, la iNOS se produce fundamentalmente en las células de Kupffer y en las endoteliales (11). A nivel hepático se ha observado también que las células de Kupffer son responsables del daño hepático que se produce en respuesta al LPS o al interferón gamma, efecto que se bloquea al inhibir la producción de óxido nítrico (12). Además, los compuestos nitrogenados derivados del NO contribuyen a modificar la función celular y repercuten negativamente sobre el crecimiento a través de diversos mecanismos. Uno de los posibles mecanismos es la nitrosilación de proteínas hepáticas que regulan el IGF-I. Datos recientes obtenidos tras la administración de LPS sugieren que la disminución del IGF-I está asociada con el desarrollo de citotoxicidad hepática, localizada en las regiones en que se ha producido nitrosilación de proteínas (13).

En el presente trabajo se pretende analizar si la inhibición selectiva de la óxido nítrico sintasa inducible es capaz de prevenir o mejorar la respuesta del IGF-I a la inflamación, inducida por la administración de LPS (modelo para estudiar el shock endotóxico) o de adyuvante (modelo experimental para el estudio de una enfermedad inflamatoria crónica como es la artritis reumatoide).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y diseños experimentales

Utilizamos ratas macho de la raza Wistar, mantenidas en número de tres o cuatro animales por jaula, con acceso libre a la comida y bebida. Las condiciones de temperatura (20-22 °C) y luz (de 7,30 a 19,30 horas) fueron constantes y se siguió la normativa para el cuidado y manejo de animales de laboratorio recomendada por la Unión Europea.

Experimento n.° 1: «Efecto de la inhibición específica de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) sobre la respuesta del IGF-I sérico y hepático a la inflamación crónica (artritis experimental)»

Los animales macho controles y artríticos de 40 días de edad,fueron suministrados por la casa Charles River (Barcelona, España). La artritis se indujo mediante una inyección intradérmica de adyuvante incompleto de Freund's con una suspensión de 1 mg de *Mycobacterium butyricum,* inactivado por calor, en la superficie plantar de la pata trasera derecha. Los animales controles se inyectaron con vehículo (aceite de parafina). Veinte días tras la inyección del adyuvante, los animales controles y artríticos se dividieron en dos grupos, uno al que se le administró 200 mg/kg sc de aminoguanidina hemisulfato (AG) (Alexis Corporation, Switzerland) y otro, al que se le administró sc 250 µL de tampón fosfato (PBS). Ambos tratamientos (AG y PBS) se realizaron entre los días 20 y 28 tras la administración del adyuvante o del vehículo.

Durante los ocho días de tratamiento se realizó un seguimiento diario del peso corporal y de la evolución de la enfermedad, para lo que se analizó el estado de cada una de las articulaciones, dando una puntuación a cada pata según el grado de inflamación: 0 = sin eritema ni inflamación, 1 = eritema cutáneo, 2 = inflamación moderada con eritema cutáneo, 3 = fuerte inflamación, 4 = inflamación muy severa con anquilosamiento. El índice de artritis es la suma de la puntuación de las cuatro patas, siendo el valor máximo 16. El día 28 tras la administración del adyuvante (día 8 de tratamiento), los animales se decapitaron 2,5 horas después de la última inyección de AG o PBS. Se recogió la sangre troncular en tubos de poliestireno, mantenidos en hielo, se dejó coagular durante cuatro horas a 4 °C, se centrifugó y a continuación se decantó el sobrenadante. El suero se mantuvo congelado a –20 °C hasta la valoración del IGF-I y de los niveles de nitritos y nitratos. Se recogió el hígado y se guardó una muestra de aproximadamente 100 mg a –20 °C para la determinación del contenido de IGF-I.

Experimento n.°2: «Efecto de la inhibición específica de la iNOS sobre la respuesta del IGF-I sérico y hepático a la inflamación aguda inducida por la inyección de LPS»

Los animales macho de 40 días de edad fueron suministrados por la casa Charles River (Barcelona, España). Se administró AG (100 mg/kg ip) o PBS, y LPS (100 µg/kg ip) o salino, a las 16,00 horas y a las 8,30 horas del día siguiente (cuatro horas antes del sacrificio de las ratas). Tras la decapitación se extrajo la sangre troncular en tubos de poliestireno, mantenidos en hielo, se dejó coagular durante cuatro horas a 4 °C, se centrifugó durante 15 minutos a una f de 1.500 g, y a continuación se decantó el sobrenadante. El suero se mantuvo congelado a –20 °C hasta la valoración del IGF-I y de los niveles de nitritos y nitratos. Se recogió el hígado y se guardó una muestra de aproximadamente 100 mg a –20 °C para la determinación del contenido del IGF-I.

Valoración de nitritos y nitratos

Previo a la valoración de los nitritos y nitratos, se redujo la turbidez del suero mediante la centrifugación de 300 µl del mismo, a través de unas membranas de ultrafiltración de Centrifree Micropartition Device (Amicon Division, Millipore Corporation, Bedford, EEUU) a 1.500 rpm y a 37 °C durante una hora. La concentración de nitritos y nitratos se midió por el método modificado de Griess (14), descrito por Miranda *et al.* (15). Se mezclaron 100 µl del suero filtrado con 100 µl de VCl_3 e inmediatamente se añadieron 100 µl del reactivo de Griess. La mezcla se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Las muestras se leyeron en un lector de ELISA a una absorbancia de 540 nm. La concentración de nitritos y nitratos se calculó utilizando una curva patrón de $NaNO_2$.

Determinación del IGF-I sérico y hepático mediante radioinmunoanálisis (RIA)

El IGF-I sérico se separó de sus proteínas transportadoras (IGFBPs) por un método de extracción

con etanol ácido, valorándose sus concentraciones mediante un RIA de doble anticuerpo (6). El IGF-I hepático se extrajo por el método descrito por Torres Alemán *et al.* (16). Aproximadamente 100 mg de hígado se homogeneizaron en ácido acético 1 N. Posteriormente el extracto se hirvió durante 20 minutos, se centrifugó durante 15 minutos a una f de 1.500 g, y se liofilizó el sobrenadante.

El anticuerpo anti-IGF-I utilizado (UB2-495) fue suministrado gratuitamente por el programa de distribución de hormonas del NIDDK. Se utilizó como hormona patrón y para yodación el IGF-I-I humano (A52-EPD186), amablemente cedido por Eli Lilly Co. (Madrid, España). La sensibilidad del RIA fue de 10 pg/tubo, con unos coeficientes de variación intra e interanálisis del 5% y del 7%, respectivamente.

El contenido proteico de las muestras de hígado se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, Rockford, Illinois, EEUU).

Análisis estadístico

El análisis estádistico se llevó a cabo utilizando el programa STATGRAPHICS plus para Windows. Los datos se expresaron como la media ± SEM (error estándar de la media). Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial. Cuando el ANOVA indicó la existencia de interacción entre las variables, se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Duncan para una comparación múltiple de las medias. La significación estadística se estableció a partir de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Al analizar la evolución de la enfermedad de las ratas artríticas a lo largo de los ocho días de tratamiento con AG (Figura 1) se observa que su administración mejora el grado de enfermedad desde el cuarto día de tratamiento, evidenciándose el mayor efecto en el día 8 ($p < 0,01$). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías.

En la Tabla I se muestra la evolución del peso corporal durante los ocho días de tratamiento, observándose que la administración de AG no la modificó ni en las ratas artríticas ni en las controles. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías.

Como puede observarse en la Figura 2, tanto en las ratas artríticas (AA) (panel superior) como en las tratadas con LPS (parte inferior), los niveles séricos de nitritos y nitratos están elevados en re-

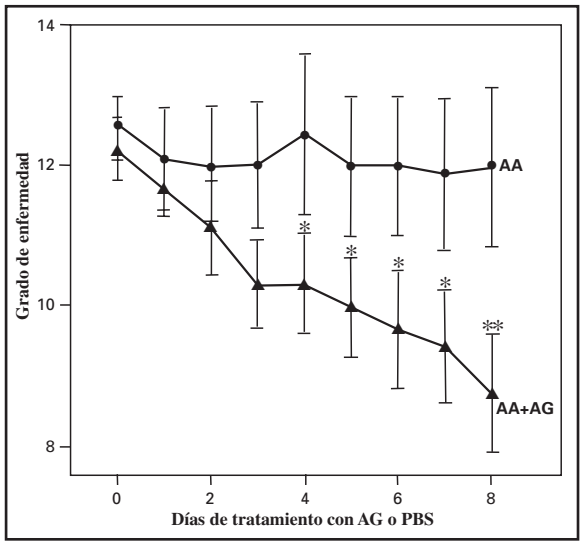


Figura 1. Evolución de la enfermedad en ratas artríticas tratadas con PBS (AA) o con aminoguanidina (AG) (200 mg/kg/sc) durante ocho días, desde el día 20 al 28 tras la administración del adyuvante. Los datos se expresan como la media ± sem de diez animales en cada grupo.
* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *vs* grupo AA.

TABLA I. Evolución del peso corporal (g)

	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
C	218 ± 2,5	222 ± 3,3	236 ± 3,3	251 ± 3,6	262 ± 4,0
C+AG	222 ± 5,4	226 ± 5,6	236 ± 5,5	246 ± 5,6	258 ± 6,7
AA	158 ± 3,8 **	161 ± 3,9 **	167 ± 4,2 **	169 ± 4,9 **	175 ± 5,1 **
AA+AG	155 ± 4,9	158 ± 5,1	164 ± 5,7	168 ± 6,5	173 ± 7,4

Efecto de la administración de aminoguanidina (AG) (200 mg/kg) durante ocho días a ratas controles (C) y artríticas (AA) sobre el peso corporal. Los datos están expresados como la media ± error estándar de la media de diez animales por grupo.
** $p < 0,01$ *versus* grupo control. ANOVA multifactorial.

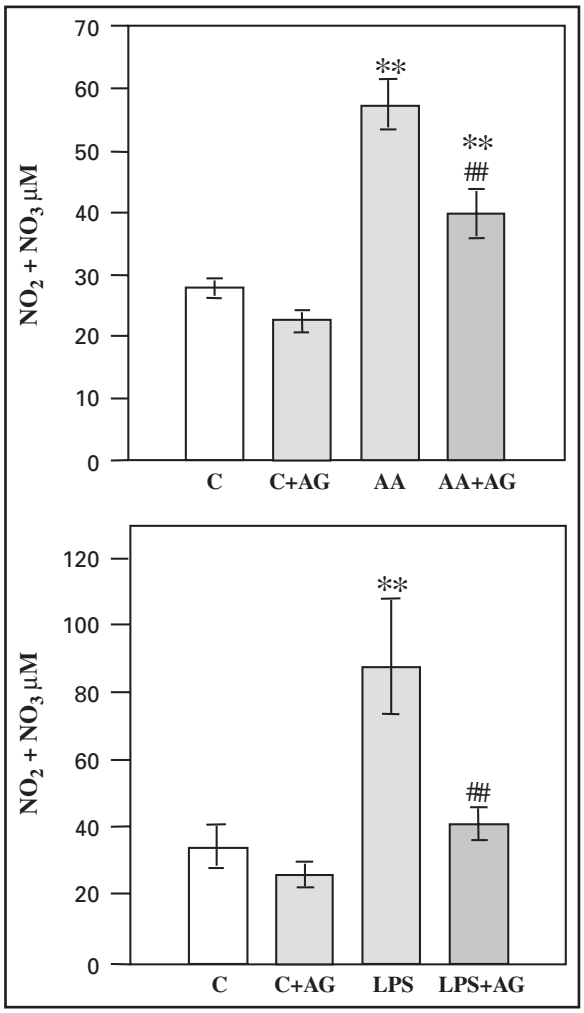


Figura 2. Niveles séricos de nitritos y nitratos (µM) en ratas artríticas (AA) o controles (C) tratadas con PBS o aminoguanidina (AG) (200 mg/kg/ sc) durante ocho días, desde el día 20 al 28, tras la administración del adyuvante. Los animales se sacrificaron 2,5 horas tras la última inyección de AG o PBS (figura superior). Figura inferior: ratas inyectadas con LPS (100 µg/kg/ip) (LPS) o salino (C) y aminoguanidina (AG) (100 mg/kg/ip) o PBS, a las 16 horas y a las 8,30 horas del día siguiente (cuatro horas antes del sacrificio). Los datos se expresan como la media ± sem de diez animales en cada grupo.
** $p < 0,01$ *vs* el grupo control (C), ## $p < 0,01$ *vs* grupo AA o LPS.

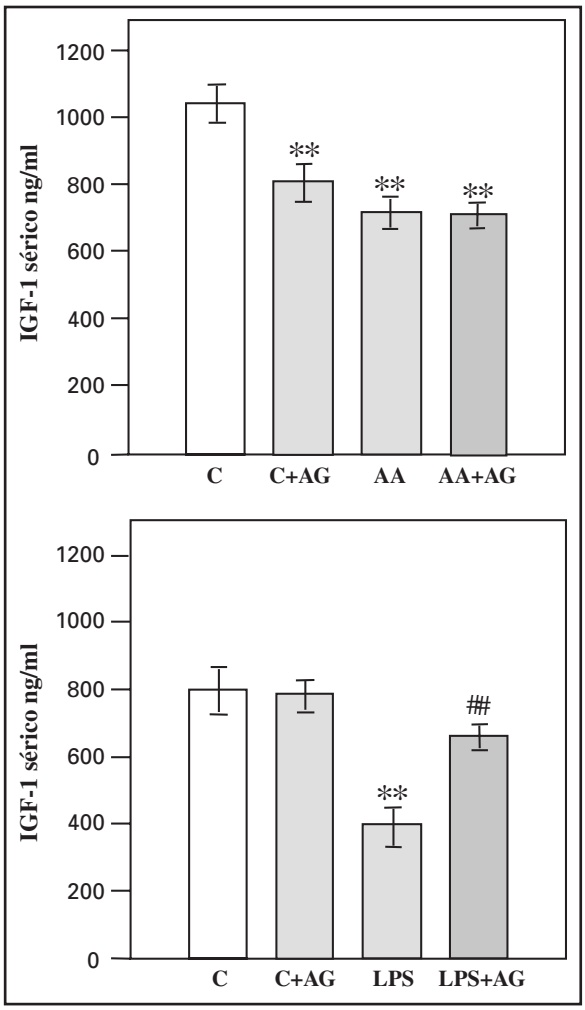


Figura 3. Niveles séricos de IGF-I (ng/ml) en, figura superior: ratas artríticas (AA) o controles (C) tratadas con PBS o aminoguanidina (AG) (200 mg/kg/sc) durante ocho días, desde el día 20 al 28, tras la administración del adyuvante. Los animales se sacrificaron 2,5 horas tras la última inyección de AG o PBS. Figura inferior: ratas inyectadas con LPS (100 µg/kg/ip) (LPS) o salino (C) y aminoguanidina (AG) (100 mg/kg/ip) o PBS, a las 16 horas y a las 8,30 horas del día siguiente (cuatro horas antes del sacrificio). Los datos se expresan como la media ± sem de diez animales en cada grupo.
** $p < 0,01$ *vs* el grupo control (C), ## $p < 0,01$ *vs* grupo LPS.

lación con los que presentan las ratas controles (C). El tratamiento con el inhibidor de la iNOS, la AG, disminuyó significativamente los niveles séricos de nitratos y nitritos tanto en las ratas con inflamación crónica (AA + AG *vs* AA) (parte superior) como en las ratas con inflamación aguda (LPS + AG *vs* LPS) (panel inferior) ($p < 0,01$ en ambos casos). Sin embargo, en las ratas tratadas con LPS la AG restableció los niveles de nitritos hasta alcanzar el valor de los animales control, mientras que en las ratas artríticas el efecto fue parcial (Figura 2). El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, seguido del test de Duncan.

Tanto los animales artríticos (Figura 3, parte superior), como los animales tratados con LPS (Figura 3, parte inferior) muestran una marcada disminución en los niveles séricos de IGF-I respecto a los animales controles ($p < 0,01$ en ambos casos), descenso que no se modificó tras el trata-

miento con AG en las ratas artríticas (figura superior). Sin embargo, en las ratas tratadas con LPS, la administración de AG restableció los niveles séricos de IGF-I. En las ratas control (C), la administración aguda de AG no modificó los niveles séricos de IGF-I (figura inferior), pero la administración crónica los disminuyó significativamente *(p* < 0,01, Figura 3, parte superior). ANOVA de dos vías, seguido del test de Duncan.

Cuando se midió el contenido hepático del IGF-I (Figura 4) se observó un descenso del mismo, tanto en los animales artríticos *(p* < 0,05) como en los tratados con LPS *(p* < 0,01) en relación al contenido que presentan los animales controles (paneles superior e inferior, respectivamente). Este descenso no se modificó tras la administración crónica o aguda de la AG. Sin embargo, en los animales controles la administración de este fármaco produjo un descenso en los niveles hepáticos de IGF-I (Figura 4). ANOVA de dos vías, seguido del test de Duncan.

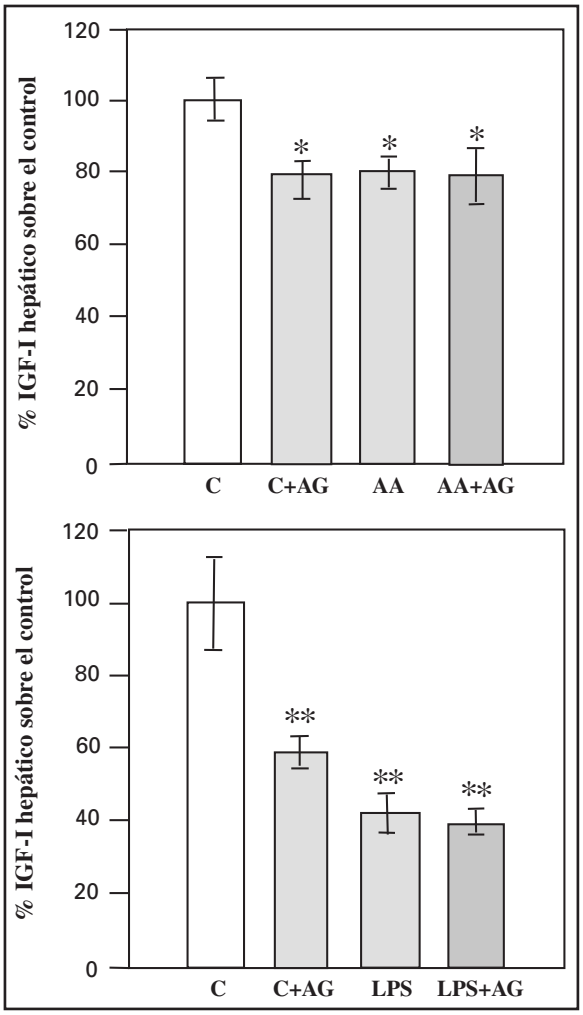


Figura 4. Efecto del tratamiento con aminoguanidina (AG) (200 mg/kg/sc) o PBS durante ocho días a ratas artríticas (AA) (figura superior), o con AG (100 mg/kg/ip) a las 16 horas y a las 8,30 horas del día siguiente, en ratas inyectadas a las mismas horas con LPS (100 µg/kg/ip) o salino (figura inferior), sobre el contenido hepático de IGF-I (mg/proteína) expresado como porcentaje sobre el valor de las ratas control. Los datos se expresan como la media ± sem de diez animales en cada grupo.
* *p* < 0,05, ** *p* < 0,01 *vs* el grupo control (C).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio sugieren que el óxido nítrico no participa en el descenso del IGF-I hepático que se produce en la artritis experimental y en la sepsis. Sin embargo, el óxido nítrico si parece estar implicado en el descenso en los niveles séricos de IGF-I que se observa en la inflamación aguda.

Los niveles séricos de nitritos y nitratos que se encuentran elevados tanto en la situación de inflamación crónica (artritis inducida por la administración de adyuvante) como aguda (administración de LPS) mejoran tras la administración de la AG, mientras que en los animales controles no produce ningún efecto. Estos datos están de acuerdo con los descritos por diversos autores, al utilizar tanto la AG (17-19) como otros inhibidores de la iNOS, por ejemplo, el L-NIL (N-iminoetil-L-lisina) (18, 20, 21) para inhibir la producción de NO en ratas artríticas y en ratas tratadas con LPS.

La implicación del NO en los procesos inflamatorios se corrobora en este estudio, ya que el tratamiento con la AG disminuyó de forma significativa el grado de enfermedad en las ratas artríticas a partir del cuarto día de su administración. Esta observación ya había sido realizada también por otros autores al describir una reducción en el volumen de las patas de ratas artríticas tras el tratamiento con el inhibidor L-NIL (18) o con la AG (17, 18). En el presente estudio la disminución en los niveles plasmáticos de nitritos y nitratos encontrado en las ratas artríticas tras ocho días de tratamiento con AG (desde el día 20 tras la administración del adyuvante hasta el día 28), se correlaciona con una disminución importante en el grado de enfermedad, como se ha observado previamente tras la administración de AG (17, 18) o de L-NIL (18). Sin embargo, no todos los autores encuentran una correlación entre los niveles de nitritos y nitratos y el grado de enfermedad, tras la administración tanto del L-NIL (20) como de la AG (22).

Del presente estudio se desprende que la administración terapéutica del inhibidor de la iNOS es efectiva mejorando los síntomas inflamatorios cuando la enfermedad ya está instaurada. Sin embargo, los datos de la literatura son contradictorios a este respecto. Hay estudios que sugieren que al aumento de la síntesis de NO, vía la inducción de la iNOS, puede estar parcialmente implicada en la patogénesis de la artritis inducida por la administración de adyuvante y, por lo tanto, la inhibición selectiva de la iNOS puede ser beneficioso para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias. En este sentido, Tanaka *et al.* (17) encuentran una reducción del 50% en la inflamación de las patas de las ratas artríticas tras el tratamiento con AG durante 18 días, a la misma dosis (200 mg/kg) y vía de administración (sc) empleadas en este estudio, comenzando desde el día en que se administra el adyuvante. Sin embargo, otros autores (23) no encuentran mejoría en el grado de inflamación de las patas, ni al administrar AG desde el momento de la administración del adyuvante, ni al administrarla a partir del día 12. Las diferencias entre estos resultados y los descritos por Tanaka *et al.* y los del presente trabajo, pueden deberse a que el tratamiento con AG se realizó sólo durante cuatro días, tanto al administrarlo profiláctica como terapeúticamente, y a la dosis de 100 mg/kg por vía ip. Además, otros autores (22) encuentran que el tratamiento con AG a ratas artríticas, a la dosis de 500 mg/kg dos veces al día y por vía oral, entre los días 21 y 28 tras la administración del adyuvante, disminuye la excreción urinaria de nitritos y nitratos sin mejorar el grado de enfermedad. Las diferencias con nuestros resultados pueden deberse a la dosis utilizada y a la vía de administración.

Los resultados contradictorios en relación a la inhibición de la iNOS y la disminución en el grado de enfermedad se han observado no sólo tras la administración de AG, sino también con otros inhibidores. Hay autores (20) que no encuentran una mejoría en la inflamación de las patas de las ratas artríticas al administrar L-NIL terapéuticamente, pero sí fue efectivo al administrarlo de modo profiláctico. Sin embargo, muy recientemente (21) se ha observado que el L-NIL no disminuye la respuesta inflamatoria aguda y además empeora la crónica.

El hecho de que la administración de AG disminuya los niveles séricos de nitritos en las ratas artríticas y que los restablezca en las ratas tratadas con LPS sugiere que en la inflamación crónica el aumento en la producción de NO se debe no sólo a un aumento de la iNOS sino también al aumento de las NOS constitutivas. Pozza *et al.* (24) administrando un inhibidor selectivo de la NOS neuronal a ratas artríticas encuentran una disminución en el grado de inflamación, y concluyen que la NO neuronal está implicada en el desarrollo y mantenimiento de la artritis.

El contenido hepático de IGF-I no se modifica tras la administración de AG, ni en las ratas tratadas con LPS ni en las artríticas. Sin embargo, tras la inhibición de la iNOS, en las ratas artríticas tampoco se modifican los niveles circulantes de IGF-I, pero se restablecen en las ratas tratadas con LPS. Las diferencias encontradas tras el tratamiento con AG en el contenido hepático y en los niveles séricos de IGF-I en la inflamación aguda puede deberse a una alteración en los niveles séricos de las proteínas que transportan el IGF-I, las IGFBPs. De ellas, la predominante y, por lo tanto, la que condiciona en mayor medida las acciones biológicas del IGF-I, es la IGFBP-3 que se produce en las células de Kupffer hepáticas. Se sabe, que a nivel hepático y durante la inflamación, la iNOS se produce fundamentalmente en este tipo celular (11) más que en los hepatocitos, que es el lugar de síntesis del IGF-I. Los derivados del NO producirían un efecto inhibidor sobre los macrófagos hepáticos, por lo que al inhibir la producción de NO mediante la administración de AG, la síntesis y los niveles circulantes de IGFBP-3 incrementarían. El aumento en los niveles circulantes de la IGFBP-3 serían responsables del aumento de los niveles séricos del IGF-I en la inflamación aguda tras el tratamiento con la AG.

En la inflamación crónica, los niveles circulantes de la IGFBP-3 también estarían aumentados tras la inhibición de la iNOS; sin embargo, al estar inhibida de forma crónica la producción de IGF-I hepático como se refleja en la disminución de su contenido, el aumento de la IGFBP-3 no se acompañaría de un aumento en los niveles circulantes de IGF-I.

El hecho de que en las ratas control, el tratamiento tanto agudo como crónico con la AG disminuya el contenido hepático de IGF-I indica que, en condiciones normales, la iNOS contribuye a la producción basal de NO, y que este gas interviene en la regulación de la función de los hepatocitos. Las concentraciones séricas de IGF-I se encuentran disminuidas, al igual que sus concentraciones hepáticas, en las ratas control tratadas crónicamente con AG. Sin embargo, en las ratas control, el tratamiento agudo con AG no produjo modificaciones en los niveles circulantes del IGF-I, posiblemente debido al aumento en la producción hepática de la IGFBP-3.

Ya que la alteración del sistema IGF-I está implicado en las alteraciones orgánicas que se pro-

ducen en la inflamación, estos resultados sugieren que el aumento de las concentraciones séricas del IGF-I puede contribuir a los efectos beneficiosos del tratamiento con inhibidores de la iNOS en la sepsis.

Agradecimientos

Los autores agradecen a A. Carmona su ayuda técnica. Este trabajo ha sido posible gracias a las ayudas de la Fundación MAPFRE Medicina (2001) y del FIS (00/0949), así como a la beca concedida a I. Ibáñez de Cáceres (BEFI, 99/9020)

BIBLIOGRAFÍA

1. VOERMAN H J, VAN SCHIJNDEL R J, GROENEVELD A B, DE BOER H, NAUTA J P, VAN DER VEEN E A, THIJS L G. Effects of recombinant human growth hormone in patients with severe sepsis. *Ann Surgery.* 1992; 216: 648-655.
2. DAVIES U M, JONES J, REEVE J, CAMACHO-HUBNER C, CHARLETT A, ANSELL B M, PREECE M A,WOO P M M. Juvenile rheumatoid arthritis. Effects of disease activity and recombinant human growth hormone on insulin-like growth factor 1, insulin-like growth factor binding proteins 1 and 3, and osteocalcin. Involvement of nitric oxide in the interferon-gamma-induced inhibition of growth hormone and prolactin secretion in anterior pituitary cell cultures. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 332-340.
3. LÓPEZ-CALDERÓN A, SOTO L, MARTÍN, A I. Chronic inflammation inhibits GH secretion and alters the serum insulin-like growth factor system in rats. *Life Sci.* 1999; 65:2049-2060.
4. KARIMA R, MATSUMOTO S, HIGASHI H, MATSUSHIMA K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Molecular Medicine Today.* 1999; 5: 123-132.
5. PRIEGO T. *Efecto de la administración del LPS sobre el eje GH-IGF-I: papel de los glucocorticoides.* Tesis de Licenciatura. Madrid: Universidad Complutense, 2000.
6. SOTO L, MARTÍN A I, MILLAN S, VARA E, LÓPEZ-CALDERÓN A. Effects of endotoxin lipopolysaccharide administration on the somatotropic axis. *J Endocrinol.* 1998; 159: 239-246.
7. GLANCY R, ABRAMSON S. Nitric oxide: a novel mediator of inflammations. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995; 216: 93-101.
8. LIAUDET L, ROSSELET A, SCALLER M D, MARKET M, PERRET C, FEIHL F. Nonselective versus selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental endotoxic shock. *J Infect Dis.* 1998; 177: 127-132.
9. LÓPEZ-CALDERÓN A, IBÁÑEZ DE CÁCERES I, SOTO L, PRIEGO T, MARTÍN A I, VILLANUA M A. The decrease in hepatic IGF-I gene expresión in arthritic rats is not associated with modifications in hepatic GH receptor mRNA. *Eur J Endocrinol.* 2001; 144: 1-6.
10. WOLF M, BÖHM S, BRAND M, KREYMANN G. Proinflammatory cytokines interleukin 1ß and tumor necrosis factor α inhibit growth hormone stimulation of insulin-like growth factor I synthesis and growth hormone stimulation of insulin-like growth hormone receptor mRNA levels in cultured rat liver cells. *Eur J Endocrinol.* 1996; 135: 729-737.
11. AONO K, ISOBE K, KIUCHI K, FAN Z H, ITO M, TAKEUCHI A, MIYACHI M, NAKASHIMA I, NIMURA Y. In vitro and in vivo expression of inducible nitric oxide synthase during experimental endotoxemia: involvement of other cytokines. *J Cell Biochem.* 1997; 65: 349-358.
12. GRIFFON B, CILLARD J, CHEVANNE M, MOREL I, CILLARD P, SERGENT O. Macrophage-induced inhibition of nitric oxide production in primary rat hepatocyte cultures via prostaglandin E2 release. *Hepatology.* 1998; 28: 1300-1308.
13. ELSASSER T H, KAHL S, RUMSEY T S, BLUM J W. Modulation of growth performance in disease: reactive nitrogen compounds and their impact on cell proteins. *Dom Anim Endocrinol.* 2000; 19: 75-84.
14. GREEN L C, WAGNER D A, GLOGOWSKI J, SKIPPER P L, WISHNOK J S, TANNENBAUM S R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126: 131-138.
15. MIRANDA K M, ESPEY M G, WINK D A. A rapid, simple spectrophotometric meted for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 2001; 5: 62-71.
16. TORRES-ALEMAN I, PONS S, SANTOS-BENITO F F. Survival of purkinje cells in cerebellar cultures is increased by insulin-growth factor I. *Eur J Neuros.* 1992; 4: 864-869.
17. TANAKA S, MATSUI T, MURAKAMI T, ISHIZUKA T, SUGIURA M, KAWASHIMA K, *et al.* Immunological abnormality associated with the augmented nitric oxide synthesis in adjuvant-induced arthritis. *Int J Immunopharmacol.* 1998; 20: 71-84.
18. CONNOR J R, MANNING P T, SETTLE S L, MOORE W M, JEROME G M, WEBBER R K, *et al.* Suppression of adjuvant-induced arhritis by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol.* 1995; 273: 15-24.
19. RUETTEN H, THIEMERMANN C. Prevention of the expression of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine or aminoethyl-isothiourea in macrophages and in the rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 225: 525-530.
20. FLETCHER D S, WIDMER W R, LUELL S, CHRISTEN A, OREVILLO C, SHAH S, *et al.* Therapeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase does not ameliorate the chronic inflammation and tissue damage associated with adjuvant-induced arthritis in rats. *J Pharmacol Exp Therap.* 1998; 28: 4714-4721.
21. MCCARTNEY-FRANCIS N L, SONG X, MIZEL D E, WAHL S M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. *J Immunol.* 2001; 166: 2734-2740.
22. STEFANOVIC-RACIC M, MEYERS K, MESCHTER C, COFFEY J W, HOFFMAN R A, EVANS C H. Comparison of the nitric oxide synthase inhibitors methylarginine and aminoguanidine as prophylactic and therapeutic agents in rat adjuvant arthritis. *J Rheumatol.* 1995; 22:1922-1928.
23. GAD M Z, KHATTAB M. Modulation of nitric oxide synthe-sis in inflammation. Relationship to oxygen-derived free radicals and prostaglandin synthesis. *Arzneim-Forsch Drug Res.* 2000; 50: 449-455.
24. POZZA M, BETTELLI C, MAGNANI F, MASCIA M T, MANZINI E, CALZÀ L. Is neuronal nitric oxide involved in adjuvant-induced joint inflammation? *Eur J Pharmacol.* 1998; 359: 87-93.