



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Expresión renal de Gas1 en el desarrollo postnatal en ratas**

**T E S I S**

Que presenta

**Biol. Andrea Cetina Palma**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

Directores de la tesis:

**DR. JOSÉ LUIS REYES SÁNCHEZ**

**DR. JOSÉ VÍCTOR SEGOVIA VILA**

Ciudad de México

Diciembre, 2016

Este proyecto se realizó en el laboratorio 36 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, bajo la dirección del D.C. José Luis Reyes Sánchez y con el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## Resumen

Los riñones son los órganos reguladores de la homeostasis de los vertebrados y están formados por unidades llamadas nefronas, que están conformadas por el glomérulo, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle y la nefrona distal. Los mamíferos recién nacidos poseen riñones funcionalmente inmaduros cuando se comparan con el adulto. Aunque todos los segmentos de la nefrona están presentes al nacimiento y la filtración ocurre antes de nacer (12 semanas de edad gestacional en el humano), la maduración renal continúa en el periodo postnatal, en donde procesos biológicos como la proliferación y la diferenciación celular son indispensables para alcanzar la maduración. Las células se multiplican rápidamente durante el desarrollo y por lo tanto es posible que existan agentes que detengan esta proliferación en un determinado tiempo. La proteína Gas1 está relacionada con la diferenciación celular e inhibe la proliferación celular ya que detiene el ciclo celular en la transición de la fase G0 a la fase S. El papel de Gas1 durante el desarrollo postnatal renal es desconocido.

El objetivo de este trabajo fue conocer el patrón de expresión de la proteína Gas1 en el riñón durante el desarrollo postnatal en la rata e identificar en qué secciones de la nefrona se encuentra presente.

Se observó que Gas1 presenta un patrón de expresión diferencial a nivel renal. Se encuentra en el glomérulo y en la nefrona distal. En el glomérulo, identificado por medio de la proteína Nefrina la expresión de Gas1 es a nivel intraglomerular y en la cápsula de Bowman. La expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman es homogénea conforme madura el riñón, sugiriendo un posible papel de Gas1 como marcador de estado de diferenciación celular a nivel glomerular. Gas1 no se expresa en el túbulo proximal durante el desarrollo postnatal ni en el adulto. Gas1 se expresa desde el día postnatal (DPN) 1 en las células principales APQ2<sup>+</sup> del túbulo colector. No se expresa en todas las estructuras de la nefrona distal (delimitada por la proteína claudina4 o CL4) en los DPN 1, 3, 7, 10 y 14. A partir del DPN 21 su expresión es homogénea y se mantiene en todas las estructuras distales. La expresión de Gas1 en la nefrona distal aumenta conforme madura el riñón, sugiriendo un posible papel de Gas1 como marcador de estado de diferenciación celular en la nefrona distal. Se evaluó la expresión de marcadores de células progenitoras renales NCAM<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> en las diferentes secciones de la nefrona encontrando que disminuye conforme madura el riñón, sugiriendo una relación inversa entre la expresión de Gas1 y NCAM/CD24, y un posible papel regulador de Gas1 en las células progenitoras renales (CPR).

## Abstract

The kidneys are the regulatory organs of the homeostasis in vertebrates and they are constituted by units called nephrons, which are formed in turn by the glomerulus, proximal convoluted tubule, loop of Henle and distal nephron. Most species of newborn mammals have functionally immature kidneys compared with adults. Although all the segments of the nephron are present at birth and the filtration process occurs before birth (12 weeks gestational age), the renal maturation continues in the postnatal period, in which, biological processes like proliferation and cellular differentiation are essential in order to reach maturation. The cells multiply rapidly during development, therefore, it is possible the existence of agents that restrain this proliferation at a certain period of time. The Gas1 protein is related with cellular differentiation and inhibits the cell proliferation as it arrests the cell cycle in the transition of G0 phase to S phase. The role of Gas1 during postnatal renal development remains unknown. The main aim of this work was to study the expression pattern of Gas1 protein in the kidney of rats during postnatal development as well as the identification of the sections of the nephron in which it could be present. We have found that Gas1 has a differential expression pattern at renal level; it is located in the glomerulus and in the distal nephron. In the glomerulus, identified by the Nephtrin protein, the Gas1 expression is at intraglomerular level and in the Bowman's capsule. As long as the kidney matures the expression of Gas1 in the Bowman's capsule is homogeneous, suggesting a possible role of Gas1 like a marker in the state of cell differentiation at glomerular level.

Gas1 it is not expressed in the proximal tubule during postnatal development neither in the adult. Gas1 is expressed since the postnatal day 1 in the main cells AQP2<sup>+</sup> of collecting tubule. It is not expressed in all the structures of the distal nephron (delimited by the protein CL4) in the postnatal days 1, 3, 7, 10 and 14. Starting from the 21 postnatal day, the expression pattern of Gas1 is homogeneous and it is present in all the distal structures. The expression of Gas1 in the distal nephron increases as kidney matures, suggesting also a possible role of Gas1 like a marker in the state of cell differentiation in the distal nephron. We have evaluated the expression of renal progenitor cells markers NCAM<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> in the different sections of the nephron and found a decrease of these markers as the kidney matures, suggesting an inverse relationship between the expression of Gas1 and NCAM<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>, and therefore a possible regulator role of Gas1 in the renal progenitor cells.

## Abreviaturas

ADH	Hormona antidiurética
ADL	Adulto
AKT	Serine/threonine-protein kinase
AQP2	Acuaporina 2
CB	Cápsula de Bowman
CD24	Clúster de diferenciación 24
CPR	Células progenitoras renales
CTM	Células troncales mesenquimales
°C	Grados centígrados
DPN	Día postnatal
DppD	Dipeptidil peptidasa
E	Día embrionario
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
Fig	Figura
Gas1	Growth arrest specific 1
GDNF	Factor Neurotrópico Derivado de Células Gliales
h	Hora
hrs	Horas
IgG	Inmunoglobulina G
IMF	Inmunofluorescencias
µg	Microgramo
mg	Miligramo
min	Minutos
µl	Microlitro
ml	Mililitro
µm	Micrómetro

MM	Mesénquima metanéfrico
N	Normalidad
NCAM	Neural cell adhesion molecule
ND	Nefrona distal
nm	Nanómetro
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehido
seg	Segundos
SNC	Sistema nervioso central
ST	Solución estándar
WT-1	Wilms tumor protein
YU	Yema ureteral

## Índice

1. Introducción.....	14
1.1. Desarrollo renal embrionario.....	14
1.2. El riñón.....	16
1.3. Eventos postnatales renales.....	16
1.3.1. Maduración renal.....	16
1.3.2. Nefrogénesis renal.....	17
1.4. Gas1.....	18
2. Antecedentes.....	19
3. Justificación.....	20
4. Objetivos.....	21
5. Materiales y reactivos.....	22
5.1. Materiales.....	22
5.2. Reactivos.....	22
5.2.1. Crioconservación de tejido renal.....	22
5.2.2. Inmunofluorescencia.....	22
5.2.3. Anticuerpos primarios.....	23
5.2.4. Anticuerpos secundarios.....	23
5.2.5. Proteinuria.....	23
5.2.6. Creatinina.....	23
5.2.7. ELISA.....	24
6. Metodología.....	25
6.1. Modelo experimental.....	25
6.2. Crioconservación de tejido renal.....	25
6.3. Inmunofluorescencia.....	25
6.4. Cuantificación de píxeles.....	25
6.5. Inmunofluorescencia para la sección tubular de la nefrona.....	26
6.6. Inmunofluorescencia para la sección glomerular de la nefrona.....	26
6.7. Proteinuria.....	26
6.8. Creatinina por el método de Jaffé.....	27
6.9. Creatinina sérica.....	28

6.10.	Creatinina en orina.....	29
6.11.	Prueba de ELISA.....	29
6.12.	Análisis estadístico.....	30
7.	Resultados.....	31
7.1.	Función renal.....	31
7.1.1.	Creatinina sérica.....	31
7.1.2.	Relación U/P de creatinina.....	31
7.1.3.	Proteinuria.....	31
7.2.	IMF de la sección glomerular.....	33
7.2.1.	Gas1 y Nefrina.....	33
7.2.2.	Gas1 y WT1.....	36
7.2.3.	Gas1 y NCAM.....	38
7.3.	IMF de la sección distal.....	42
7.3.1.	Gas1 y Cl4.....	42
7.3.2.	Expresión diferencial de Gas1 en la ND.....	45
7.3.3.	Expresión de marcadores de CPR en la ND.....	46
7.3.3.1.	NCAM.....	46
7.3.3.2.	CD24.....	48
7.3.3.3.	Relación inversa entre Gas1 y CD24.....	49
7.3.4.	Gas1 y AQP2.....	51
7.4.	IMF de la sección proximal de la nefrona.....	53
7.4.1.	Gas1 y DppD.....	53
7.4.2.	Expresión de marcadores de CPR en el proximal.....	55
7.4.2.1.	NCAM.....	55
7.4.2.2.	CD24.....	57
7.5.	Patrón de expresión diferencial de las CPR a nivel tubular.....	59
7.6.	Detección de Gas1 por ELISA.....	60
8.	Discusión.....	61
9.	Conclusión.....	67
10.	Perspectivas.....	68
11.	Bibliografía.....	69

## Índice de figuras

Fig. 1. Comparación de la expresión de Gas1/Nefrina del DPN 1 y ADL en la sección glomerular.

Fig. 2. Patrón de expresión renal de Gas1 y Nefrina en el glomérulo durante el desarrollo postnatal en la rata.

Fig. 3. Comparación de la expresión de WT1/Nefrina del DPN 1 y ADL en la sección glomerular.

Fig. 4. Patrón de expresión renal de WT1 y Nefrina en el glomérulo durante el desarrollo postnatal en la rata.

Fig. 5. Comparación de la expresión de Gas1/NCAM del DPN 1 y ADL en la sección glomerular.

Fig. 6. Patrón de expresión renal de NCAM y Gas1 en el glomérulo durante el desarrollo postnatal en la rata.

Fig. 7. Comparación de la expresión de Gas1/CL4 del DPN 1 y ADL en la sección distal.

Fig. 8. Patrón de expresión renal de CL4 y Gas1 en la nefrona distal durante el desarrollo postnatal en la rata.

Fig. 9. Comparación de la expresión de Gas1/CL4 del DPN 10 y 14 en la sección distal.

Fig. 10. Expresión de Gas1/CL4 del DPN 21 en la sección distal.

Fig. 11. Comparación de la expresión de CL4/NCAM del DPN 1, 7 y 21 en la sección distal.

Fig. 12. Patrón de expresión renal de CL4 y NCAM en la nefrona distal durante el desarrollo postnatal en la rata.

Fig. 13. Comparación de la expresión de Gas1/CD24 del DPN 1 y ADL en la sección distal.

Fig. 14. Relación inversa en los niveles de expresión de Gas1/CD24 del DPN 1 y ADL en la sección distal.

Fig. 15. Patrón de expresión renal de Gas1 y CD24 en la nefrona distal durante el desarrollo postnatal en la rata.

Fig. 16. Comparación de la expresión de Gas1/AQP2 del DPN 1 y ADL en la sección distal.

Fig. 17. Patrón de expresión renal de Gas1 y AQP2 en la nefrona distal durante el desarrollo postnatal en la rata.

Fig. 18. Comparación de la expresión de Gas1/DppD del DPN 3, 21 y ADL en la sección proximal.

Fig. 19. Patrón de expresión renal de Gas1 y DppD en la nefrona proximal durante el desarrollo postnatal en la rata.

Fig. 20. Comparación de la expresión de DppD/NCAM del DPN 1, 3, 10 y 21 en la sección proximal.

Fig. 21. Patrón de expresión renal de DppD y NCAM en la nefrona proximal durante el desarrollo postnatal en la rata.

Fig. 22. Comparación de la expresión de DppD/CD24 del DPN 1, 3, 7 y 14 en la sección proximal.

Fig. 23. Patrón de expresión renal de DppD y CD24 en la nefrona proximal durante el desarrollo postnatal en la rata.

Fig. 24. Expresión diferencial de CD24 y NCAM a nivel tubular.

## Índice de gráficas

Gráfica 1. Creatinina sérica durante el desarrollo postnatal de la rata.

Gráfica 2. Relación entre la concentración de creatinina urinaria y la creatinina sérica durante el desarrollo postnatal de la rata.

Gráfica 3. Proteinuria durante el desarrollo postnatal de la rata.

Gráfica 4. Comparación de la cuantificación de pixeles de Nefrina del DPN1 y el ADL en la sección glomerular.

Gráfica 5. Comparación de la cuantificación de pixeles de Gas1 intraglomerular del DPN1 y el ADL.

Gráfica 6. Comparación de la cuantificación de pixeles de WT1 del DPN1 y el ADL en la sección glomerular.

Gráfica 7. Comparación de la cuantificación de pixeles de NCAM durante el desarrollo postnatal en la sección glomerular de la rata.

Gráfica 8. Comparación de la cuantificación de pixeles de NCAM del DPN1 y el ADL en la sección glomerular.

Gráfica 9. Comparación de la cuantificación de pixeles de Gas1 durante el desarrollo postnatal en la sección glomerular de la rata.

Gráfica 10. Comparación de la cuantificación de pixeles de NCAM y Gas1 durante el desarrollo postnatal en la sección glomerular de la rata.

Gráfica 11. Comparación de la cuantificación de pixeles de CL4 del DPN1 y el ADL en la nefrona distal.

Gráfica 12. Comparación de la cuantificación de pixeles de Gas1 del DPN1 y el ADL en la nefrona distal.

Gráfica 13. Comparación de la cuantificación de pixeles de NCAM del DPN1 y el ADL en la nefrona distal.

Gráfica 14. Comparación de la cuantificación de pixeles de CD24 del DPN1 y el ADL en la nefrona distal.

Gráfica 15. Comparación de la cuantificación de pixeles de AQP2 del DPN1 y el ADL en la nefrona distal.

Gráfica 16. Comparación de la cuantificación de pixeles de DppD del DPN1 y el ADL en la sección proximal.

Gráfica 17. Comparación de la cuantificación de pixeles de NCAM del DPN1 y el ADL en la sección proximal.

Gráfica 18. Comparación de la cuantificación de pixeles de CD24 del DPN1 y el ADL en la sección proximal.

Gráfica 19. Concentraciones de Gas1 presente en orina obtenidas por medio de ELISA durante el desarrollo postnatal.

Gráfica 20. Concentraciones de Gas1 presente en suero obtenidas por medio de ELISA durante el

desarrollo postnatal.

### **Índice de esquemas**

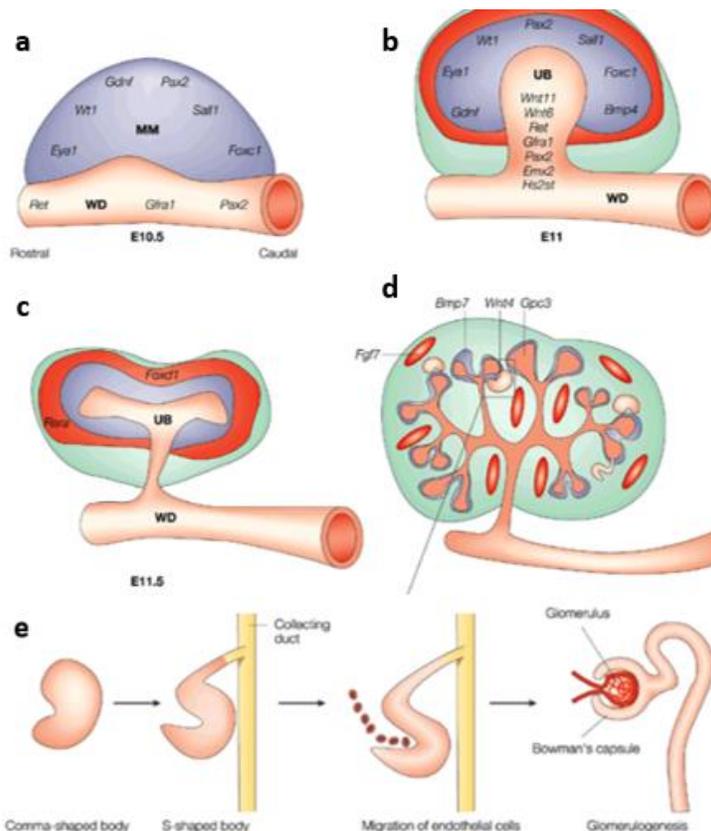
Esq. 1. Desarrollo embrionario de la nefrona.

Esq. 2. WT1 contribuye a la autorenovación y proliferación del mesénquima metanéfrico.

## Introducción

### Desarrollo renal embrionario

En los vertebrados, durante el desarrollo embrionario del riñón se da la diferenciación secuencial de tres estructuras: el pronefros, mesonefros y metanefros, siendo éste último el que dará origen al riñón funcional. La formación del riñón funcional comienza por la inducción de dos zonas embrionarias diferentes recíprocamente inducidas, el mesénquima metanéfrico (MM) y la yema ureteral (YU) derivada del conducto de Wolf.<sup>5, 6</sup>

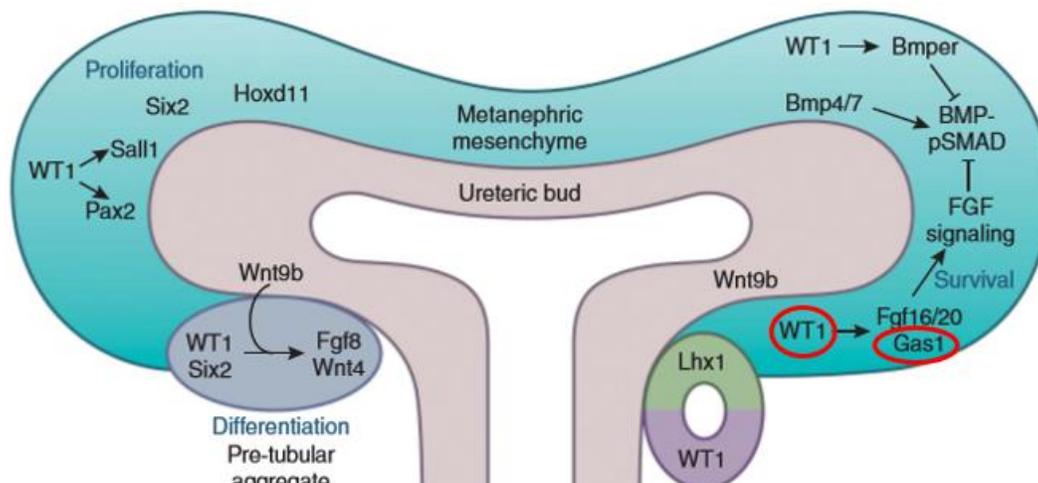


Esq. 1. Desarrollo embrionario de la nefrona. Se muestran los diferentes estados morfológicos renales en la embriogénesis renal del ratón. a) Se muestra al E10.5 las dos zonas embrionarias, el mesénquima metanéfrico (MM) y la yema ureteral (YU) derivada del conducto de Wolf (WD). b) E11, diferentes factores transcripcionales y agentes que regulan el balance entre proliferación, inhibición de la proliferación, apoptosis y diferenciación, necesarios en esta etapa de desarrollo. c y d) Después de las inducciones recíprocas entre el MM y la YU comienza la ramificación del árbol ureteral. e) formación de los agregados en coma y posteriormente en forma de S, finalmente células endoteliales migran y las estructuras glomerulares se forman<sup>11</sup>.

La YU comienza la morfogénesis en respuesta a señales provenientes del MM<sup>7</sup>, que provoca que la YU se ramifique e invada el MM, induciendo que las células adyacentes al MM se condensan alrededor de las puntas de la YU, formando la cap mesénquima; las células del MM restantes serán el mesénquima estromal, posteriormente los agregados pretubulares provenientes de la cap mesénquima comienzan la transición mesénquima-epitelial para dar lugar a las vesículas renales, que se fusionarán con el tallo ureteral generando los agregados en forma de coma (coma shape) que formaran a los agregados en forma de S (S shape) con hendiduras proximales y

distales conforme se van diferenciando. La hendidura más proximal será infiltrada por células endoteliales formando el penacho glomerular. Finalmente, interacciones recíprocas epitelio-mesénquima inducen a la YU a ramificarse repetidamente de una manera altamente reproducible, y nuevas nefronas se forman a partir del MM adyacente a cada punta de la YU. La YU que se ramifica forma el sistema de túbulos colectores que conectarán las nefronas con el uréter que drenará la orina en la vejiga<sup>8,9</sup> (Esq. 1).

El desarrollo renal embrionario está fuertemente regulado por agentes que inducen o inhiben la proliferación y diferenciación celular, por ejemplo, el crecimiento de la YU a partir del conducto de Wolff se da en respuesta a la secreción de GDNF (Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales) por parte del MM. Esta señal inductora se asocia al receptor c-Ret que se localiza en las membranas plasmáticas de las células epiteliales de la YU temprana. La síntesis de GDNF está regulada por el factor transcripcional WT1. Este factor transcripcional regula la expresión de varios genes mediante su unión a los promotores. Por ejemplo, después de que el MM responde a la señal del FGF, la proteína Gas1 que es dependiente de la expresión de WT1, promueve la proliferación del MM al activar la cascada de señalización FGF<sup>10,11,12</sup> (Esq. 2).



Esq. 2. WT1 contribuye a la auto-renovación y proliferación del mesénquima metanefrítico. En círculos rojos se observa que WT1 regula directamente la señalización del FGF al regular a Fgf20/Fgf16 y la expresión de Gas1 para antagonizar la cascada BMP-Psmad necesario para la supervivencia y autorenovación del MM<sup>12</sup>.

## **El riñón**

Los riñones son los órganos excretores en los vertebrados, cada individuo posee dos, uno a cada lado de la columna vertebral y están situados en la parte posterior del abdomen, en el retroperitoneo. Estos órganos filtran la sangre del aparato circulatorio y eliminan los desechos (diversos residuos metabólicos del organismo, como son la urea, el ácido úrico, la creatinina, el potasio y el fósforo) mediante la orina, a través de un complejo sistema excretorio que incluye mecanismos de filtración, reabsorción y secreción. El riñón se divide macroscópicamente en dos zonas, una zona externa denominada corteza y una zona interna denominada médula. A nivel microscópico, el riñón humano está formado aproximadamente por 2 millones de nefronas (mientras que en las ratas es aproximadamente entre 30-34,000 por órgano). La nefrona es la unidad estructural y funcional del riñón, responsable de la homeostasis de la sangre y del líquido extracelular. Su principal función es filtrar la sangre para regular el agua y las sustancias solubles, reabsorbiendo lo que es necesario y excretando el resto como orina.

La nefrona está constituida por el glomérulo, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle (delgada ascendente y descendente), el túbulo distal y los túbulos colectores. El funcionamiento de la nefrona está basado en un intercambio de iones que comienza cuando la sangre ingresa al glomérulo vía la arteriola aferente, el fluido filtrado pasa al tubo contorneado proximal donde el sodio, agua, aminoácidos y glucosa se reabsorben parcialmente, por mecanismos transcelulares y paracelulares<sup>8,9</sup>.

## **Eventos postnatales renales**

### **Maduración renal**

Un evento que ocurre en el periodo postnatal en algunos mamíferos entre ellos el humano y la rata es la maduración renal. Se sabe que, aunque todas las secciones de la nefrona están presentes al momento del nacimiento y que, aunque la filtración se realiza desde antes del nacimiento, los riñones son funcionalmente inmaduros al nacer.

Los riñones de los mamíferos recién nacidos tienen una limitada capacidad de concentrar orina y una tendencia a retener sodio, cuando se compara con el adulto. Características estructurales y funcionales del riñón son las responsables de estas diferencias, por ejemplo, al nacer el asa de Henle

es más corta, existe un bajo gradiente osmótico intersticial y un alto flujo sanguíneo medular, una alta permeabilidad del túbulo colector al sodio, una baja respuesta de las células del túbulo colector a la hormona antidiurética (ADH) relacionada a la escasez de sus receptores, mínima respuesta de la adenil ciclasa a ADH, disminución en el túbulo proximal de los transportadores de aniones orgánicos (SLC22a6 y SLC22a8), entre otras características morfológicas y estructurales<sup>13,14</sup>.

### **Nefrogénesis renal**

Otro evento que ocurre en el periodo postnatal es la nefrogénesis en algunos mamíferos entre ellos, el ratón y la rata. La zona nefrogénica en el riñón en desarrollo genera varios grupos de nefronas antes de desaparecer alrededor de los DPN 6-7 en el ratón. La inducción de nuevas nefronas se completa probablemente los DPNs 3-4. Parece que la ventana de inducción de la mayoría de las nefronas es entre el día E16.5 y el DPN 2. Esto es congruente con lo observado por *Cebrian et al*; que encontraron que solo 700 nefronas estaban presentes en el día E16.5, pero incrementaban a 8,000 nefronas al DPN 2. En ratones la nefrogénesis se detiene poco tiempo después del nacimiento, cuando las CPR están completamente agotadas, mientras que en los humanos la inducción de nuevas nefronas ocurre completamente en el feto (la nefrogénesis termina en la semana 36 de gestación). Hasta la fecha los mecanismos que controlan la proliferación y su detención en estas poblaciones es desconocido. Una fuente de células madre capaz de originar las unidades funcionales del riñón, las nefronas, no existe en el órgano adulto, ya que la población de CPR en el riñón humano se agota al nacimiento. Aunque la población equivalente en los ratones persiste en los primeros días de vida, también se termina, lo que resulta en la incapacidad de generar nuevas nefronas en respuesta a un daño postnatal<sup>15</sup>.

La investigación sobre la nefrogénesis y las CPR ha llevado a la identificación de agentes que controlan el balance entre la autorenovación y la diferenciación de las CPR, incluyendo a WT1. En ausencia de este factor transcripcional durante la embriogénesis el MM sufre apoptosis, resultando en agenesia renal. WT1 controla la expresión de varios genes requeridos para la proliferación y diferenciación de las CPR<sup>16</sup>.

## Gas1

Las diferentes etapas del desarrollo (embrional, postnatal, madurez y vejez) involucran una integración y control estricto de varios procesos biológicos, como son: la proliferación, diferenciación y muerte celular. Sin embargo, la proliferación celular no está regulada solamente por la presencia o ausencia de factores de crecimiento, sino por un balance entre factores que promueven el crecimiento y factores que lo inhiben. Uno de estos agentes que inhiben el crecimiento celular es la proteína Gas1. Aunque se conocen algunas de las funciones de Gas1 *in vitro* poco se sabe de sus funciones *in vivo*.

En los estados no proliferativos de diferentes tipos celulares la expresión de un grupo de 6 genes llamados: genes específicos del arresto del crecimiento o genes GAS se regula positivamente, se encontró también que en células que se encontraban en etapas no proliferativas la proteína Gas1 se encontraba regulada positivamente<sup>17</sup>. Gas1 es una proteína multifuncional, tiene funciones que van desde supresor de tumores, agente proapoptótico/antiapoptótico, regulador positivo del crecimiento del cerebelo durante el desarrollo embrional, entre otros<sup>18</sup>.

Gas1 (Growth arrest-specific protein 1) es una proteína extracelular de membrana y posee una región glicosilfosfatidilinositol. Está formada por 345 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 37 KDa. El homólogo de Gas1 en humanos ha sido identificado y posee una homología con el Gas1 murino de 76.6% a nivel de aminoácidos. Gas1 detiene el ciclo celular en la transición de la fase G0 a la fase S. En cultivos celulares, la sobre-expresión de esta proteína inhibe la síntesis de ADN y detiene la proliferación celular. En cultivos primarios se conoce su actividad como agente proapoptótico en neuronas del hipocampo, neuroblastomas y células gliales. Se encuentra expresada en cerebro, riñón, corazón, células endoteliales, pulmón, gónadas (próstata y glándulas mamarias) y músculo esquelético. Se propuso, que los efectos de Gas1 en el arresto celular e inducción de apoptosis a nivel del sistema nervioso son causados por su capacidad de inhibir la señalización intracelular inducida por GDNF, que se encuentra presente y juega un papel muy importante en la morfogénesis renal<sup>18, 19, 20</sup>.

## Antecedentes

Estudios previos demostraron que Gas1 se expresa en podocitos de ratas adultas sanas y que células mesangiales glomerulares eran capaces de secretar Gas1 en el sobrenadante *in vitro*. Y usando un modelo experimental de ratas con glomerulonefritis mesangioproliferativa encontraron que Gas1 podría actuar como un inhibidor endógeno de la proliferación celular<sup>21</sup>.

Otro grupo de investigación evaluó el miR-34a. Se sabe que este miR-34a está asociado con la proliferación celular y se encuentra regulado positivamente en la nefropatía diabética. Ellos encontraron que la regulación a la baja del miR-34a inhibe la proliferación celular mesangial glomerular *in vitro* y mejora la hipertrofia glomerular *in vivo*. Encontraron que Gas1 como blanco del miR-34a regula la proliferación de células glomerulares ya que, el miR-34a tiene un efecto inhibitorio en la expresión de Gas1 al reconocer su 3'UTR. Por lo tanto, una regulación a la baja del miR-34a mejora la proliferación mesangial y la hipertrofia glomerular en la nefropatía diabética temprana en el ratón al tener como blanco a Gas1<sup>22</sup>.

Como antecedente directo de nuestro laboratorio mediante un modelo de diabetes temprana en rata, se encontró que la expresión de Gas1 disminuye en la cápsula de Bowman y promueve el aumento de células progenitoras parietales, esto como un posible mecanismo de reparación renal en presencia de un daño por hiperglucemia<sup>23</sup>.

Hasta la fecha se desconoce el patrón de expresión de Gas1 en el riñón sano durante la maduración postnatal en rata. Recordando que, aunque todos los segmentos de la nefrona están presentes al nacimiento y la filtración ocurre antes de nacer, la maduración de los túbulos en el riñón continúa en el periodo postnatal. Durante este periodo de tiempo existen diversos cambios morfológicos y funcionales a nivel renal, en donde procesos biológicos como la proliferación y la diferenciación celular son indispensables para alcanzar la maduración. Las células se multiplican rápidamente durante el desarrollo y por lo tanto es posible que existan agentes que regulen esta proliferación en un determinado tiempo. La proteína Gas1 está relacionada con la diferenciación celular<sup>19</sup> y regula negativamente la proliferación celular ya que detiene el ciclo celular en la transición de la fase G0 a la fase S. El papel de Gas1 durante el desarrollo postnatal renal es desconocido.

## **Justificación**

Aunque se conocen algunas de las funciones de Gas1 *in vitro* poco se sabe de sus funciones *in vivo*. Se desconoce en qué secciones de la nefrona está presente Gas1 durante el desarrollo postnatal en ratas y, por lo tanto, el papel de Gas1 durante el desarrollo postnatal renal es completamente desconocido.

Es importante dilucidar si existe alguna correlación entre Gas1 y marcadores de células progenitoras renales (NCAM y CD24) importantes en la nefrogénesis postnatal, y su posible papel en la regulación de éstas en el desarrollo renal postnatal en rata.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Caracterización de la expresión renal de la proteína Gas1 durante el desarrollo postnatal en rata.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ⊙ Conocer el patrón de expresión de la proteína Gas1 en el riñón durante el desarrollo postnatal.
- ⊙ Conocer específicamente en qué secciones de la nefrona se expresa la proteína Gas1 durante el desarrollo postnatal.
- ⊙ Conocer si existe alguna correlación entre marcadores de células progenitoras renales (NCAM y CD24) y Gas1.

## **MATERIALES Y REACTIVOS**

### **MATERIALES**

- ⊙ Microcentrifuga eppendorf 5417R, Brinkman instruments Inc
- ⊙ Centrifuga GS-6R BECKMAN
- ⊙ Agitador Barnstead, Thermolyne Type 16700 Mixer
- ⊙ Criostato, LEICA CM 1100
- ⊙ Microscopio ZEISS West Germany 47 30 12- 9902
- ⊙ Porta objetos, #Catálogo 2947 25x75 mm, Corning
- ⊙ Cubre objetos, 24x50 mm, Corning
- ⊙ Microscopio confocal multifotónico Leica TCS SP8 AOBS (ACOUSTO-OPTICAL BEAM SPLITTER) DMI6000 (Leica Microsystems, Alemania).

### **REACTIVOS**

#### **CRIOCONSERVACIÓN DE TEJIDO RENAL**

- ⊙ 2-metil-butano
- ⊙ Nitrógeno líquido
- ⊙ Solución salina al 0.9%

#### **INMUNOFLUORESCENCIA**

- ⊙ PBS 1X
- ⊙ Triton X-100
- ⊙ Metanol absoluto
- ⊙ Buffer de citrato de sodio 10mM pH 6.0
- ⊙ DAPI, #Catálogo D1306, Invitrogen
- ⊙ PFA 4% + sacarosa al 30%

- ⊙ Albúmina 0.5% libre de IgG
- ⊙ Tween 20

### **ANTICUERPOS PRIMARIOS**

- ⊙ AQP2,  $\alpha$ -goat, #Catálogo sc-9882, Santa Cruz Biotechnology Inc
- ⊙ NCAM,  $\alpha$ -goat, #Catálogo sc-1507, Santa Cruz Biotechnology Inc
- ⊙ DppD,  $\alpha$ -mouse, #Catálogo MCA924, SEROTEC
- ⊙ CL4,  $\alpha$ -mouse, #Catálogo 32-9400, Invitrogen
- ⊙ Nefrina,  $\alpha$ -goat, #Catálogo sc-19000, Santa Cruz Biotechnology Inc
- ⊙ WT-1,  $\alpha$ -rabbit, #Catálogo sc-192, Santa Cruz Biotechnology Inc
- ⊙ CD24,  $\alpha$ -mouse, #Catálogo 551133, BD Pharmingen
- ⊙ Gas1,  $\alpha$ -rabbit #Catálogo DY2644, Proscience

### **ANTICUERPOS SECUNDARIOS**

- ⊙ Alexa Fluor 594 Chicken,  $\alpha$ -rabbit, Invitrogen
- ⊙ Alexa Fluor 488 Donkey,  $\alpha$ -goat, Invitrogen

### **PROTEINURIA**

- ⊙ Protein Assay Reagent A, #Catálogo 500-0113, BIO-RAD
- ⊙ Protein Assay Reagent S, #Catálogo 500-0115, BIO-RAD
- ⊙ Protein Assay Reagent B, #Catálogo 500-0114, BIO-RAD
- ⊙ Albúmina 1mg/ml
- ⊙ Agua desionizada

### **CREATININA**

- ⊙ Solución de Ac. Tricloroacético (TCA) al 35%
- ⊙ Solución estándar de creatinina 100 $\mu$ g/ml
- ⊙ Solución de Ac. Pírico al 0.04 M [40mM]

- ⊙ Solución de NaOH 0.75 N
- ⊙ Agua desionizada

## **ELISA**

- ⊙ Kit de Elisa (R&D Systems)

## **Metodología**

### **Modelo experimental**

Utilizamos como animales experimentales ratas hembras Wistar a diferentes días postnatales (DPN), a los DPN 1, 3, 7, 10, 14, 21 y adulto de 2 meses (ADL). Se mantuvieron con ciclos normales de 12/12 h luz/oscuridad a una temperatura promedio de  $22 \pm 1$  °C y  $50 \pm 5\%$  de humedad. Se sacrificaron las ratas por decapitación en cada DPN y se recolectaron muestras de sangre y tejido renal. Las muestras de orina se obtuvieron mediante una presión suave directamente en la vejiga previo al sacrificio. Protocolo aprobado por el Cinvestav y de acuerdo a la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999.

### **Crioconservación de tejido renal**

Ya obtenidos los riñones en cada DPN, se decapsularon y se sumergieron en solución salina al 0.9%. Para crioconservar el tejido renal, los riñones de los DPN 1, 3, 7, 10, 14 y 21 se sumergieron en 2-metil-butano (Aldrich; Milwaukee, WI) por 30 seg, seguido por 2.5 min en nitrógeno líquido y después a temperatura ambiente por 2.5 min más. Finalmente se almacenaron en papel aluminio debidamente etiquetado a -80 °C. Para crioconservar los riñones de los ADL se sumergieron en 2-metil-butano (Aldrich; Milwaukee, WI) por 1 min, seguido por 5 min en nitrógeno líquido y después a temperatura ambiente por 5 min más.

### **Inmunofluorescencia**

A partir de las muestras de riñón crioconservadas, se realizó la metodología estandarizada y previamente reportada<sup>1</sup> de inmunofluorescencia (IMF). Se realizaron cortes renales de 4-6  $\mu\text{m}$  de grosor en el criostato Leica CM150 de cada DPN y se colocaron en portaobjetos previamente gelatinizados (debidamente etiquetados) y se almacenaron a -80°C.

### **Cuantificación de pixeles**

Las imágenes de IMF capturadas con el microscopio confocal se analizaron con el software Leica LAS AF Lite. Los valores de la cuantificación de pixeles se obtuvieron al sacar la relación entre el valor de los pixeles totales en un área específica. Se analizaron varios (entre 3-4) campos por muestra, y varias muestras (2-3) por cada condición experimental.

### **Inmunofluorescencia para la sección tubular de la nefrona**

Los cortes se fijaron con metanol absoluto por 10 minutos a 4°C. Se permeabilizó con 1% de triton X-100 al 0.2% por 10 min a temperatura ambiente. Después se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS 1X y se bloqueó con albúmina 0.5% libre de IgG por 30 min a temperatura ambiente. Se incubó toda la noche con el anticuerpo primario (dilución 1:100) NCAM (Santa Cruz), CL4 (Invitrogen), DppD (SEROTEC), CD24 (BD Pharmingen), AQP2 (Santa Cruz) y Gas1. Posteriormente se usaron los anticuerpos secundarios (1:300) Alexa Fluor 594 Chicken anti-rabbit (rojo) y Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat (verde). La IMF se evaluó usando el microscopio confocal.

### **Inmunofluorescencia para la sección glomerular de la nefrona**

Los cortes se fijaron con PFA al 4% + sacarosa al 30% a 4°C durante toda la noche protegidos de la luz. Posteriormente se lavaron las laminillas con PBS 1X 3 veces durante 5 min. Se incubaron las laminillas con buffer de citrato de sodio (citrato de sodio 10 Mm, pH 6.0) a 80 °C durante 20 min y se dejaron enfriar con buffer de citrato de sodio a temperatura ambiente. Se permeabilizó con PBS Tween 20% 1X por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X y se bloqueó con albúmina 0.5% libre de IgG por 30 min a temperatura ambiente. Se incubó toda la noche con el anticuerpo primario (dilución 1:100) NCAM (Santa Cruz), Nefrina (Santa Cruz), WT1 (Santa Cruz), CD24 (BD Pharmingen) y Gas1. Se usaron anticuerpos secundarios (1:300) Alexa Fluor 594 Chicken anti-rabbit (rojo) y Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat (verde). La IMF se evaluó usando el microscopio confocal.

### **Proteinuria**

Mediante la cuantificación de proteínas por el método de Lowry modificado de Bio Rad se evaluó la presencia de proteínas en la orina (proteinuria) como marcador de daño renal<sup>2</sup>.

Para preparar la curva estándar de proteínas (Tabla 1) se utilizó una solución estándar de albúmina a una concentración de 1mg/ml.

<b>Muestra de la curva estándar</b>	<b>Sol. Estándar Albúmina (μl)</b>	<b>Agua desionizada (μl)</b>	<b>Concentración (μg/ μl)</b>
#1	5	495	0.01
#2	12.5	487.5	0.025
#3	25	475	0.05
#4	50	450	0.1
#5	100	400	0.2
#6	200	300	0.4
#7	400	100	0.8
#8	500	0	1.0
Blanco	0	500	0

*Tabla 1. Concentración de albúmina de cada muestra de la curva estándar de proteínas*

Se obtuvieron muestras de orina (n=20) de cada DPN (1, 3, 7, 10, 14, 21 y ADL) de las ratas Wistar antes de sus sacrificios. Posteriormente en una placa de 96 pozos se agregó 10 μl de cada muestra (curva estándar y muestras problema) y se les adicionó 25 μl del reactivo (A + S) y 200 μl del reactivo B. Finalmente para el desarrollo de color, las muestras se incubaron a temperatura ambiente y al resguardo de la luz por 15 min. La absorbancia se leyó a 650-750 nm utilizando el equipo Infinite M200 pro (Tecan System).

### **Creatinina por el método de Jaffé**

Para evaluar la función renal medimos la concentración de la creatinina en suero y orina de cada DPN. La Creatinina en presencia de picrato alcalino produce un color anaranjado<sup>3</sup> (reacción de Jaffé) permitiendo su análisis por medio de una reacción colorimétrica.

## Creatinina sérica

A partir de las muestras de sangre obtenidas en cada DPN (n=20) se evaluó la concentración de creatinina presente en suero mediante el método de Jaffé. Para preparar la curva estándar de creatinina (Tabla 2) se utilizó una solución estándar de creatinina a una concentración de 100 µg/ml y ácido Tricloroacético (TCA) al 35% como precipitante de proteínas.

Solución estándar (ST I) (µl)	Agua desionizada (µl)	TCA (35%)	[Creatinina] [µg/ml]
60	500	40	10
30	530	40	5
12	548	40	2
6	554	40	1
ST II (4 µl de ST I)	743	53	0.5
120 µl ST II	440	40	0.1
12 µl ST II	548	40	0.01
Blanco	560	40	0

*Tabla 2. Concentración de creatinina de cada muestra de la curva estándar de creatinina para sueros*

Las muestras problema se prepararon a una dilución 1:15, se resuspendieron todas las muestras (sueros problema y curva estándar), se centrifugaron y se obtuvo el sobrenadante de cada una. Posteriormente en una placa de 96 pozos se agregó 125 µl de cada muestra y se les adicionó 50 µl de ácido pícrico [40 Mm], se resuspendieron y se les adicionó 50 µl de NaOH 0.75 N. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente y al resguardo de la luz por 20 min. La absorbancia se leyó a 520 nm utilizando el equipo Infinite M200 pro (Tecan System).

### Creatinina en orina

De las muestras de orina obtenidas en cada DPN se evaluó la concentración de creatinina presente en orina también por el método de Jaffé. Para preparar la curva estándar de creatinina (Tabla 3) se utilizó una solución estándar de creatinina a una concentración de 100 µg/ml.

Solución estándar (ST I) (µl)	Agua desionizada (µl)	[Creatinina] [µg/ml]
120	480	20
60	540	10
30	570	5
12	588	2
6	594	1
ST II (8 µl de ST I)	1592	0.5
120 µl ST II	480	0.1
12 µl ST II	588	0.01
Blanco	600	0

Tabla 3. Concentración de creatinina de cada muestra de la curva estándar de creatinina para orinas

Las muestras problema se prepararon a una dilución 1:100. Se agregó 125 µl de cada muestra en una placa de 96 pozos y se les adicionó 50 µl de ácido pícrico [40 Mm], se resuspendieron y se les adiciono 50 µl de NaOH 0.75 N. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente y al resguardo de la luz por 20 min. La absorbancia se leyó a 520 nm utilizando el equipo Infinite M200 pro (Tecan System).

### Prueba de ELISA

Realizamos la prueba de ELISA (R&D Systems) según las indicaciones del fabricante, para la detección y cuantificación de la proteína Gas1 en las muestras de suero y orina de cada DPN.

### **Análisis estadístico**

Todos los resultados se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar. Para la comparación de dos grupos (DPN 1 y ADL) se utilizó la prueba *t* de Student y para la comparación de grupos múltiples (todos los DPN) se empleó el análisis de varianza (ANOVA). Se consideró estadísticamente significativa una  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Función renal

Evaluamos la función renal con la finalidad de validar nuestro modelo experimental de ratas sanas y en desarrollo postnatal.

#### Creatinina sérica

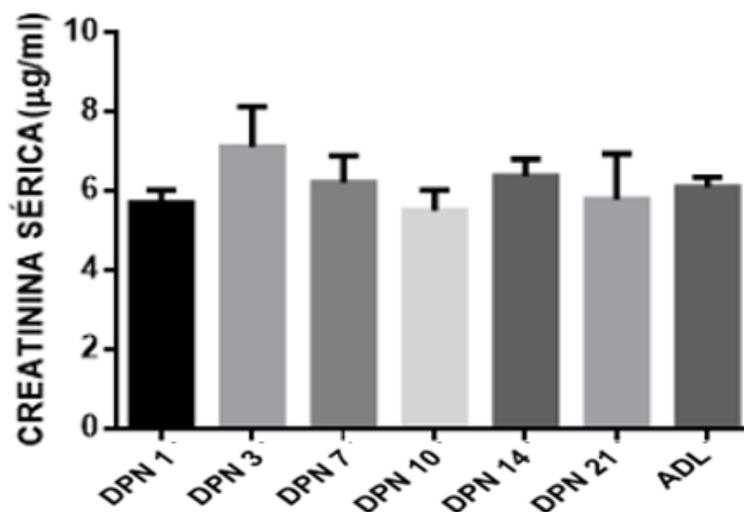
Como podemos ver en la gráfica 1, los valores de creatinina sérica no varían significativamente durante el desarrollo postnatal, reflejando la capacidad del riñón de mantener la homeostasis desde el primer día de nacidas las ratas.

#### Relación U/P de creatinina

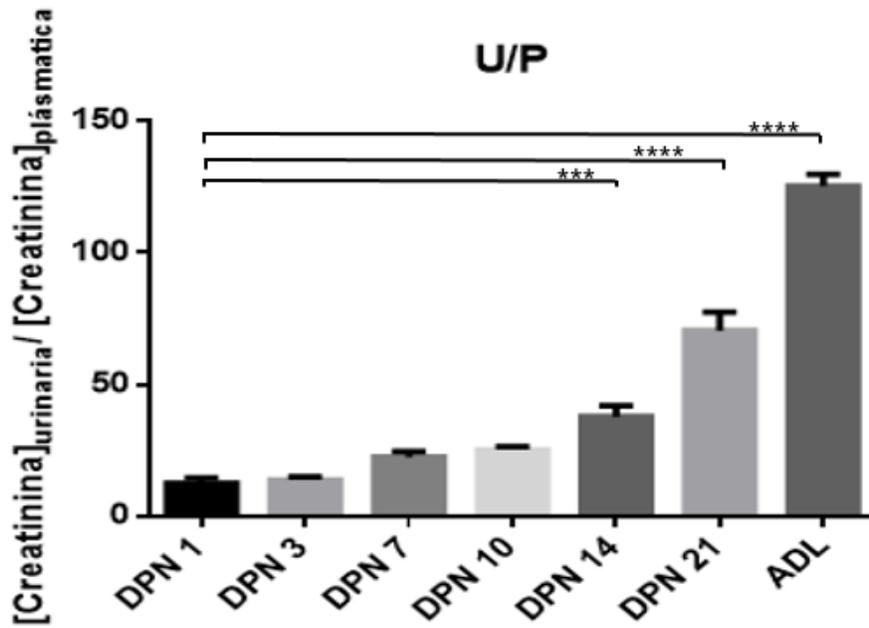
Evaluamos la relación entre la concentración de creatinina en orina y la concentración de creatinina sérica, es decir, la relación U/P para estimar la filtración glomerular. Podemos ver en la gráfica 2 que hay un incremento significativo sí comparamos el DPN 1 con el ADL de la filtración glomerular, reflejando que la función renal aumenta conforme avanzan los días, es decir, confirmando la maduración renal postnatal.

#### Proteinuria

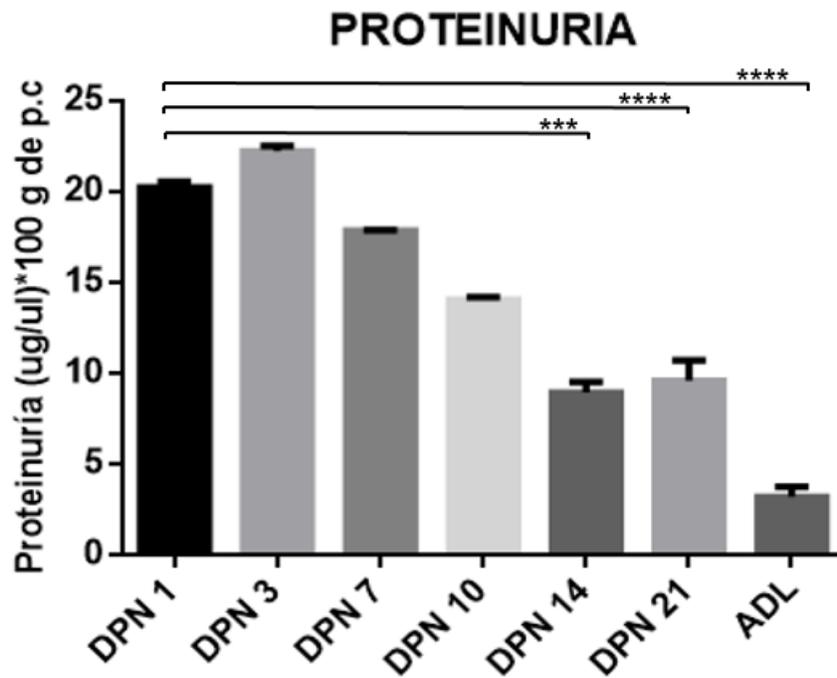
En la gráfica 3 se muestran los datos obtenidos para el análisis de proteinuria en cada DPN, podemos ver que al DPN 1 hay una proteinuria alta que disminuye conforme el riñón madura, disminuyendo significativamente desde del DPN 14 hasta el ADL.



Gráfica. 1. Creatinina sérica durante el desarrollo postnatal de la rata.  $p < 0.05$ .



Gráfica. 2. Relación entre la concentración de creatinina urinaria y la creatinina sérica durante el desarrollo postnatal de la rata.  $p < 0.05$ .



Gráfica. 3. Proteinuria durante el desarrollo postnatal de la rata.  $p < 0.05$ .

## IMF de la sección glomerular

### Gas1 y Nefrina

Por medio de IMF evaluamos el patrón de expresión de la proteína Gas1 durante el desarrollo postnatal en la rata en tres secciones de la nefrona: glomérulo, la nefrona distal y el túbulo proximal.

Para delimitar la sección glomerular utilizamos la proteína nefrina como marcador específico del glomérulo. En la Fig. 2 podemos observar el patrón de expresión de Gas1 en los diferentes DPN. Se puede observar que Gas1 se encuentra presente desde el DPN 1 y que su expresión es intraglomerular, esta expresión disminuye conforme el riñón madura y se localiza específicamente en la cápsula de Bowman (CB) (Fig.1. d, flechas blancas) de forma homogénea en el riñón adulto.

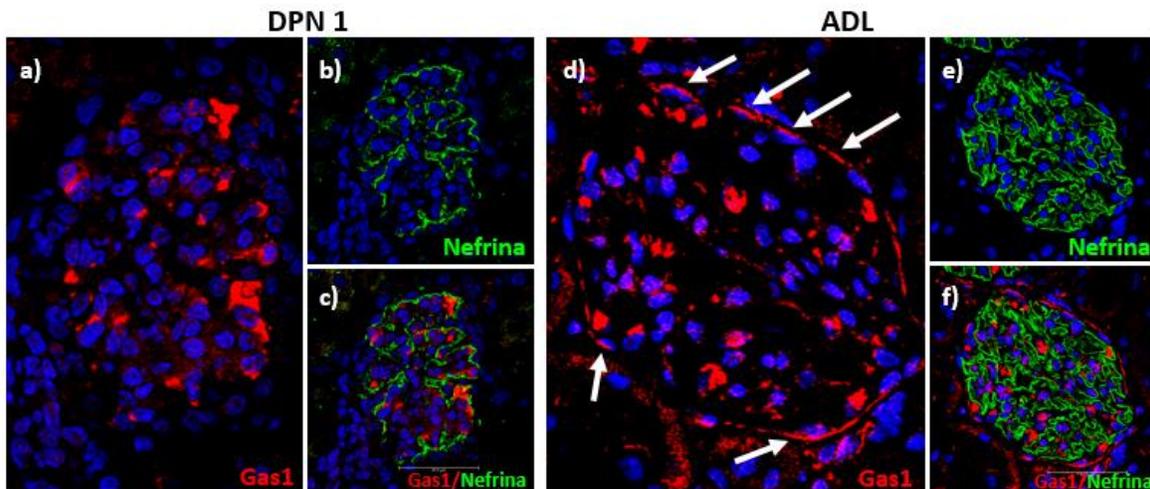
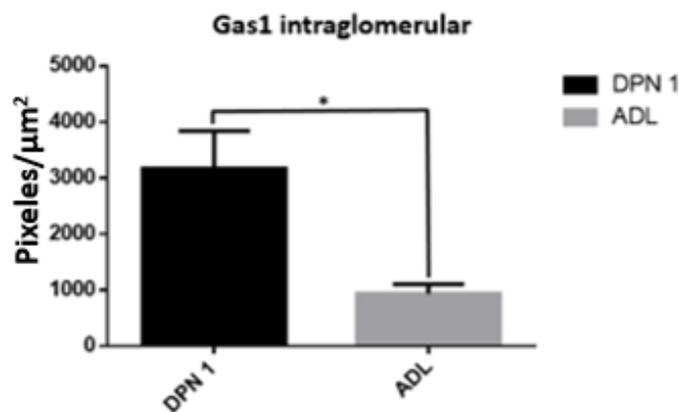
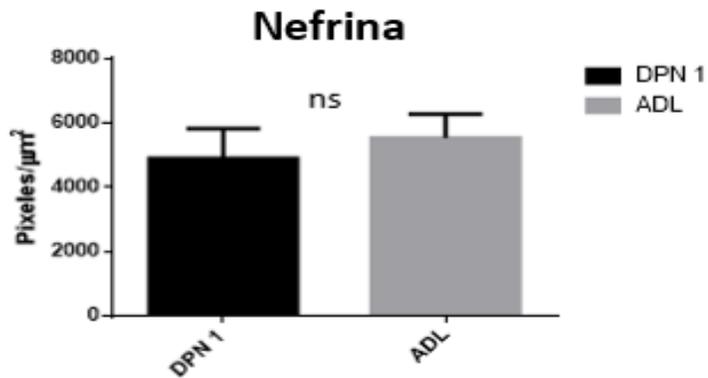


Fig. 1. Comparación de la expresión de Gas1/Nefrina del DPN 1 y ADL en la sección glomerular. Señal intraglomerular de Gas1 (rojo) en ambas condiciones (a y d). En la etapa ADL se observa Gas1 de forma homogénea en la CB (d, flechas blancas). Se observa la expresión de nefrina que delimita al glomérulo (b y e, verde). Merge de Gas1 + Nefrina (c y f). En azul los núcleos marcados con DAPI.



Gráfica. 4. Comparación de la cuantificación de pixeles de Gas1 intraglomerular del DPN1 y el ADL.  $P < 0.05$ .



Gráfica.5. Comparación de la cuantificación de píxeles de Nefrina del DPN1 y el ADL en la sección glomerular.

P<0.05.

Se observó en las IMF una expresión baja de Nefrina al DPN 1, esto se puede ver mejor si se compara con el ADL (Fig.1, b y e). Al cuantificar los píxeles encontramos que no era significativo el cambio en el nivel de expresión observado en la IMF (Gráfica 5). Sin embargo, confirmamos lo observado con el patrón de expresión intraglomerular de Gas1, el mayor nivel de expresión es en los primeros DPN y disminuye cuando el riñón madura (Gráfica 4).

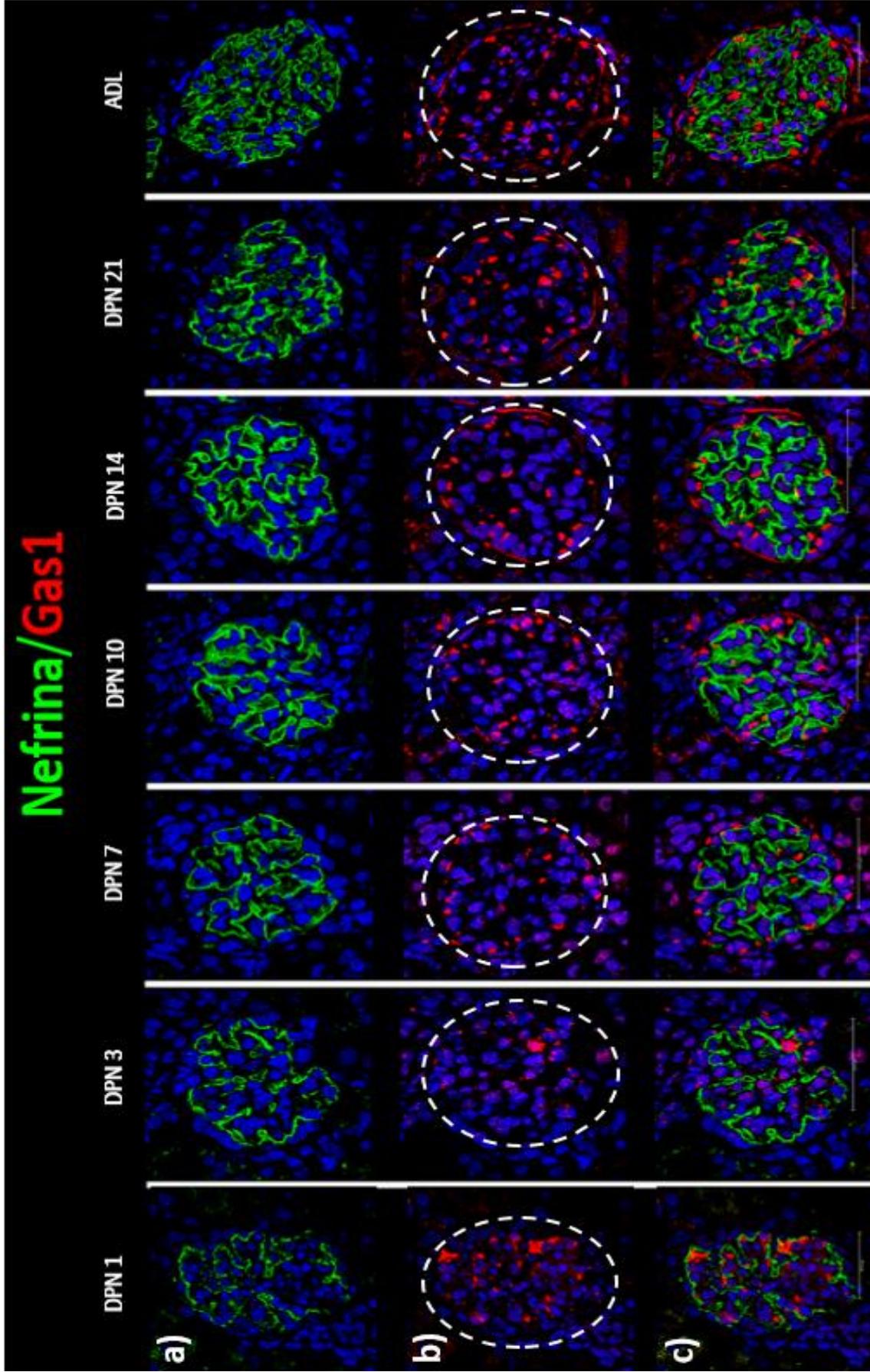


Fig. 2. Patrón de expresión renal de Gas1 y Nefrina en el glomérulo durante el desarrollo postnatal en la rata. a) Nefrina en verde, b) Gas1 en rojo, señal intraglomerular desde el DPN1 que disminuye en el ADL. Se observa que a partir del DPN 10 Gas1 se expresa de forma homogénea a nivel de la CB y se mantiene hasta la etapa madura (ADL), c) Merge de Gas1 + Nefrina. Los núcleos se marcaron con DAPI en azul.

## Gas1 y WT1

Evaluamos la expresión del factor transcripcional WT1, que además de ser otro marcador específico del glomérulo, se ha descrito que regula directamente a Gas1 en riñones *in vivo*<sup>4</sup>.

Se puede observar que WT1 se expresa desde el primer DPN de las ratas y durante todo el desarrollo, además de ser específicamente nuclear ya que colocaliza con los núcleos (Fig. 4). También observamos por medio de las IMF, que la señal de WT1 es mayor en los primeros DPN y disminuye conforme madura el riñón (Fig. 3, a y d); esto lo confirmamos por medio de la cuantificación de pixeles representada en la gráfica 6.

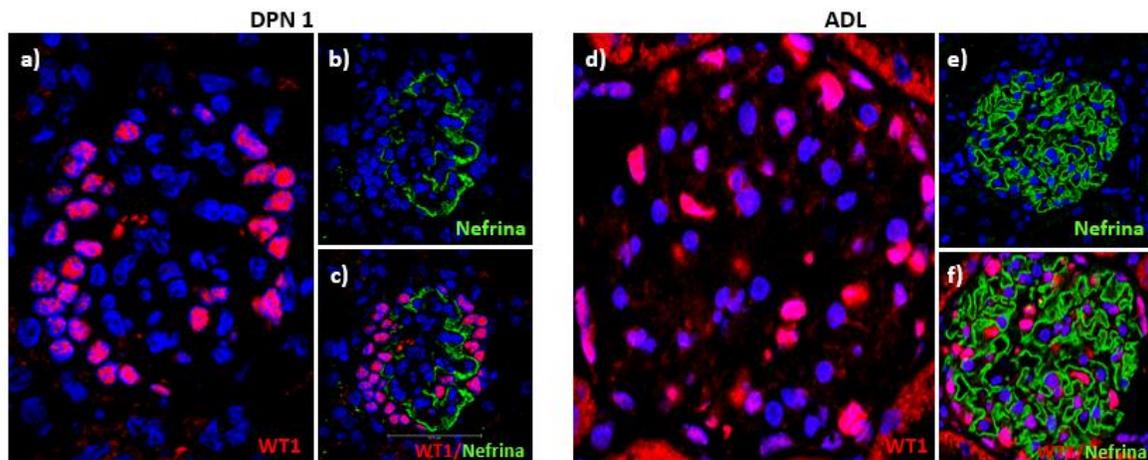
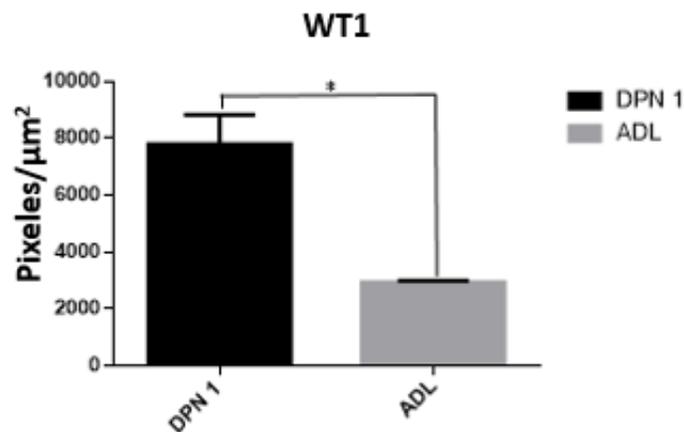


Fig. 3. Comparación de la expresión de WT1/Nephrina del DPN 1 y ADL en la sección glomerular. Señal intraglomerular de WT1 (rojo) específicamente nuclear ya que colocaliza con los núcleos dando una señal rosa en ambas condiciones (a y d). Se observa la expresión de Nephrina que delimita al glomérulo (b y e, verde). Merge de WT1 + Nephrina (c y f). En azul los núcleos marcados con DAPI.



Gráfica. 6. Comparación de la cuantificación de pixeles de WT1 del DPN1 y el ADL en la sección glomerular. P<0.05.

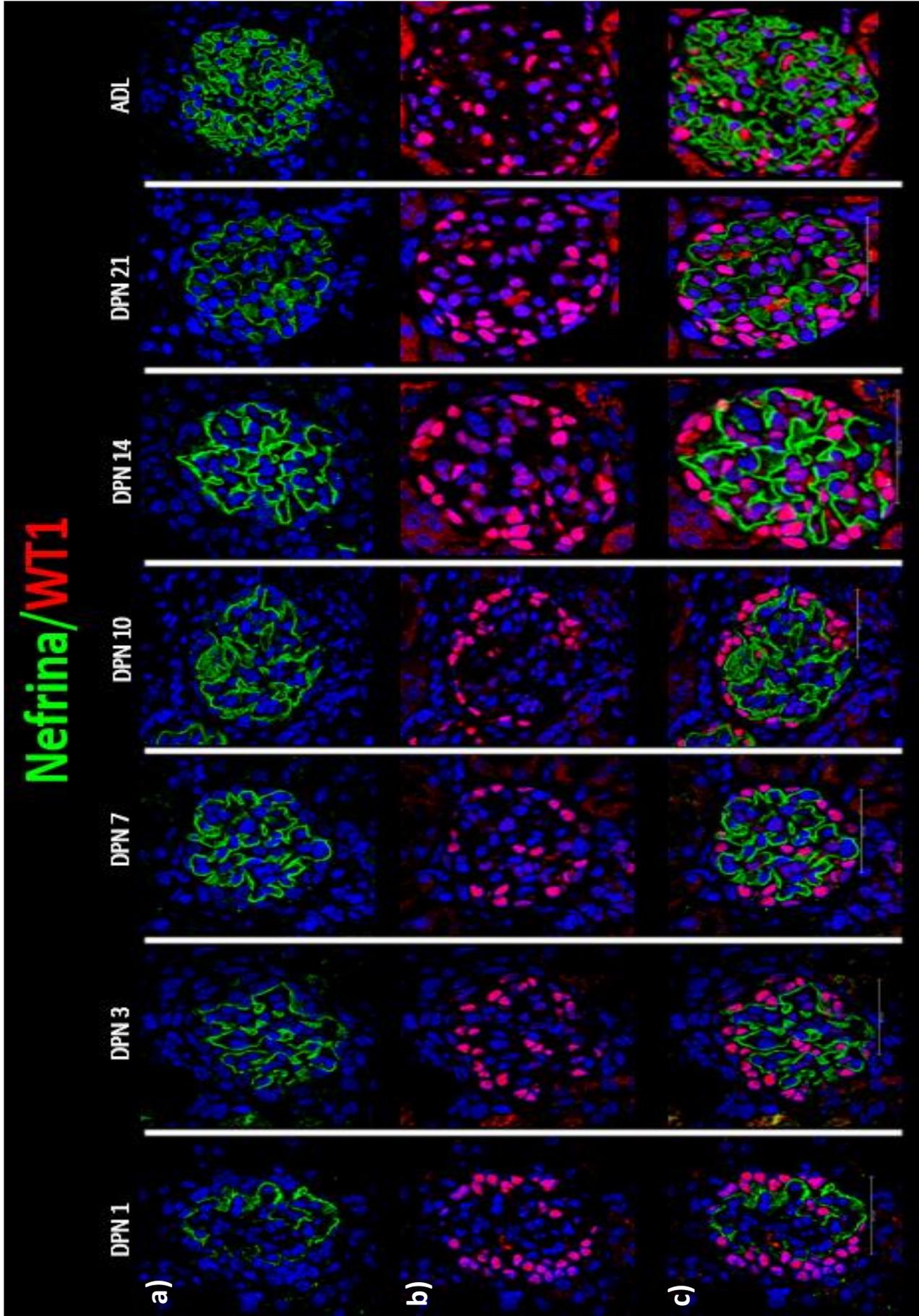


Fig. 4. Patrón de expresión renal de WT1 y Nefrina en el glomérulo durante el desarrollo postnatal en la rata. a) Nefrina en verde, b) WT1 en rojo, que colocaliza con los núcleos dando una señal rosa), c) Merge de WT1 + Nefrina. Los núcleos se marcaron con DAPI en azul.

## Gas1 y NCAM

En la Fig. 6 podemos observar el patrón de expresión de NCAM, un marcador de células progenitoras renales (CPR)<sup>31</sup>. Su expresión varía durante el desarrollo postnatal en rata ya que el mayor nivel de expresión lo encontramos en el DPN1 siendo principalmente intraglomerular, disminuyendo en los DPN 3 y 7; aumentando nuevamente al DPN 10 y disminuyendo gradualmente su expresión intraglomerular desde el DPN 14 y comenzando a localizarse en la CB (Fig. 5, d, flechas blancas). Se observa el mismo patrón de expresión intraglomerular descrito anteriormente de Gas1 y como en el ADL se expresa homogéneamente en la CB (Fig. 5, b y e).

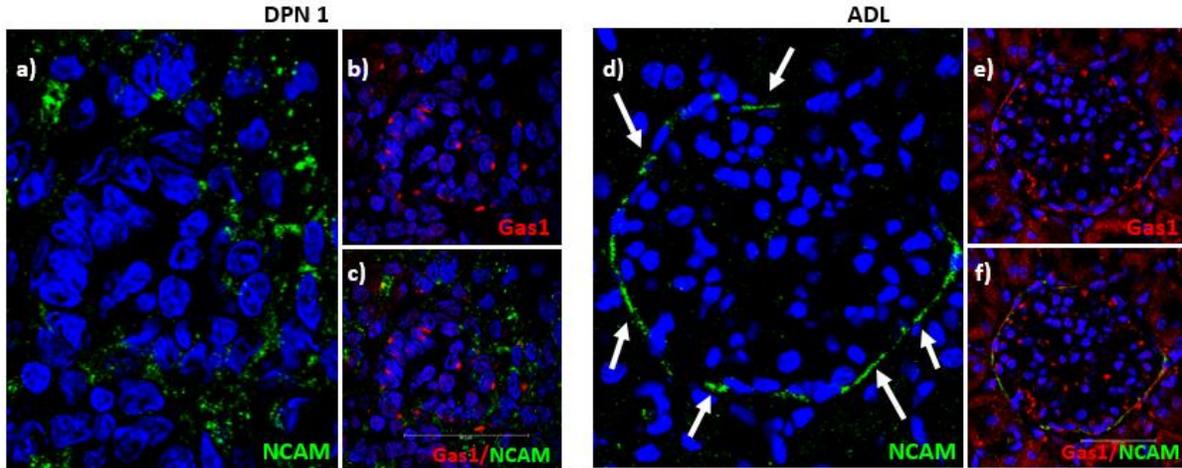
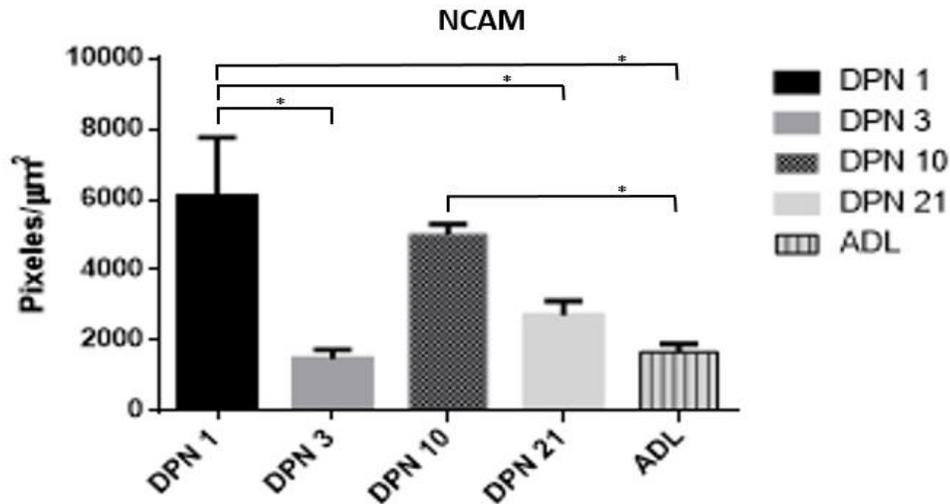


Fig. 5. Comparación de la expresión de Gas1/NCAM del DPN 1 y ADL en la sección glomerular. Mayor nivel de expresión de NCAM al DPN 1 (a, expresión principalmente intraglomerular, verde). En la etapa ADL se observa NCAM de forma homogénea en la CB (d, flechas blancas) y la disminución de su expresión intraglomerular. b y e) expresión de Gas1 en rojo. No se encontró merge de Gas1 + NCAM (c y f). En azul los núcleos marcados con DAPI.

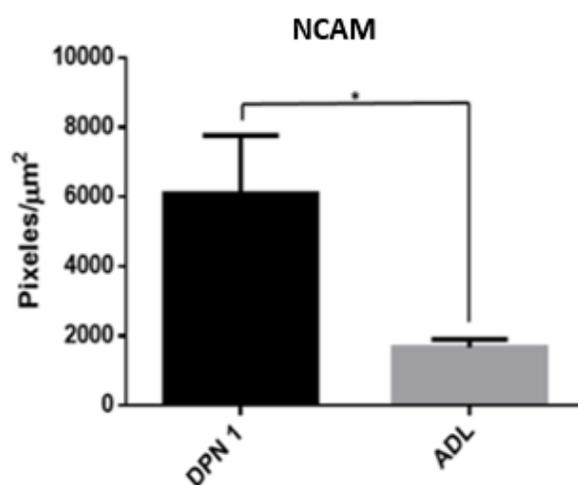


Gráfica. 7. Comparación de la cuantificación de píxeles de NCAM durante el desarrollo postnatal en rata en la sección glomerular. P<0.05.

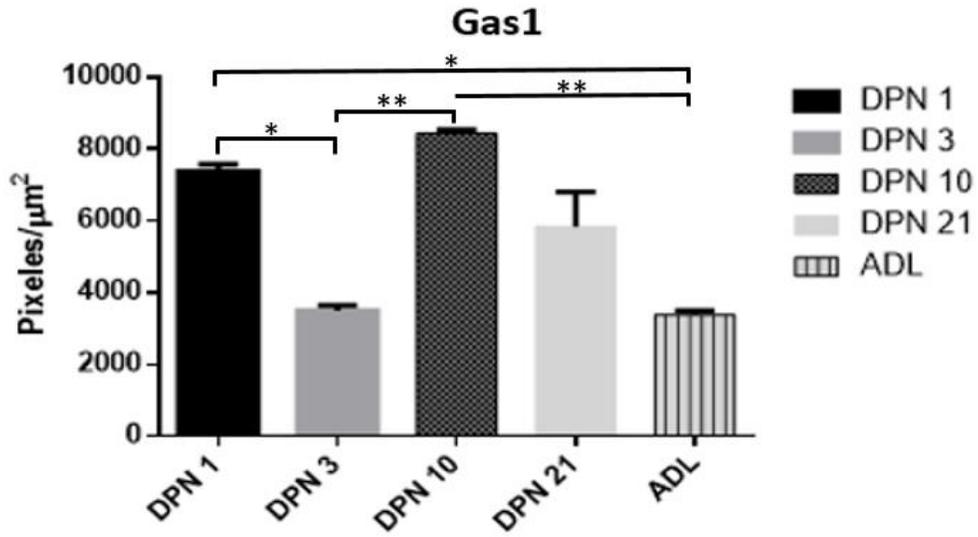
Al cuantificar los pixeles confirmamos los cambios observados en el patrón de expresión de NCAM (Gráfica 7), el mayor nivel de expresión durante el desarrollo postnatal es al día 1 y 10, ya que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos, su expresión comienza a disminuir gradualmente después del DPN 10, esta disminución es más evidente en la comparación del DPN1 y el ADL (Gráfica 8).

En la gráfica 9 se muestran los cambios en el patrón de expresión de Gas1 durante el desarrollo postnatal. Se observa que el mayor nivel de expresión también es a los DPN 1 y 10, y su expresión comienza a disminuir gradualmente después del DPN 10.

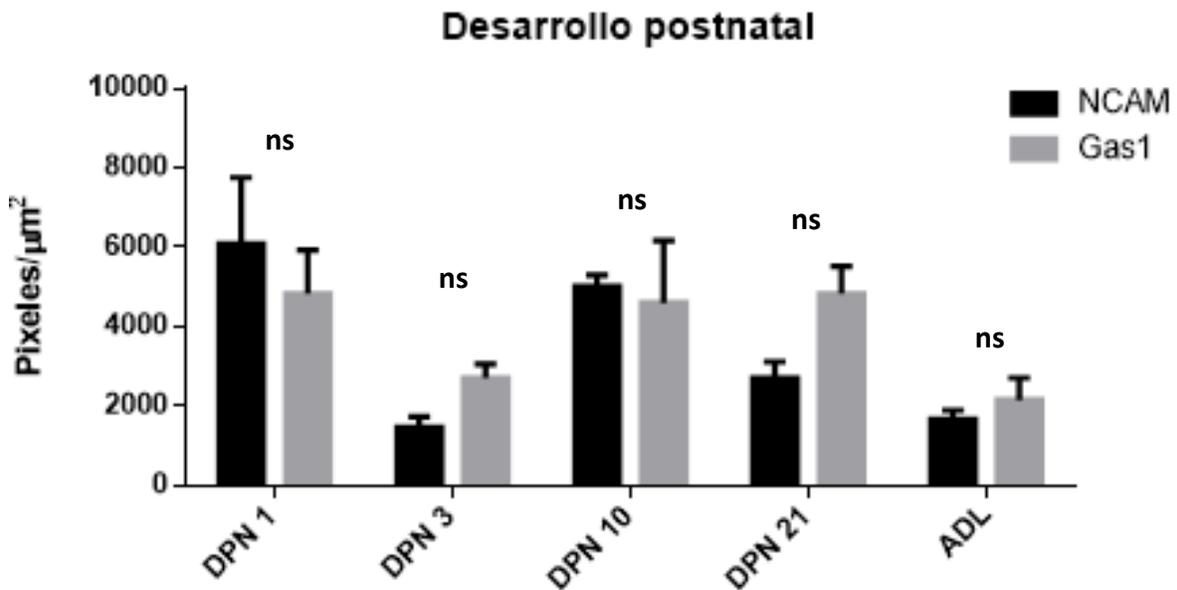
En la gráfica 10 se muestran los datos obtenidos para Gas1 y NCAM durante el desarrollo, se puede observar que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambas proteínas en ningún DPN. Se observa la misma tendencia en ambos patrones (Gas1 y NCAM) de expresión durante la maduración renal.



Gráfica. 8. Comparación de la cuantificación de pixeles de NCAM del DPN1 y el ADL en la sección glomerular.  $P < 0.05$ .



Gráf. 9. Comparación de la cuantificación de pixeles de Gas1 durante el desarrollo postnatal en la sección glomerular de la rata.  $P < 0.05$ .



Gráf. 10. Comparación de la cuantificación de pixeles de NCAM (barras negras) y Gas1 (barras grises) durante el desarrollo postnatal en la sección glomerular de la rata.  $P < 0.05$ .

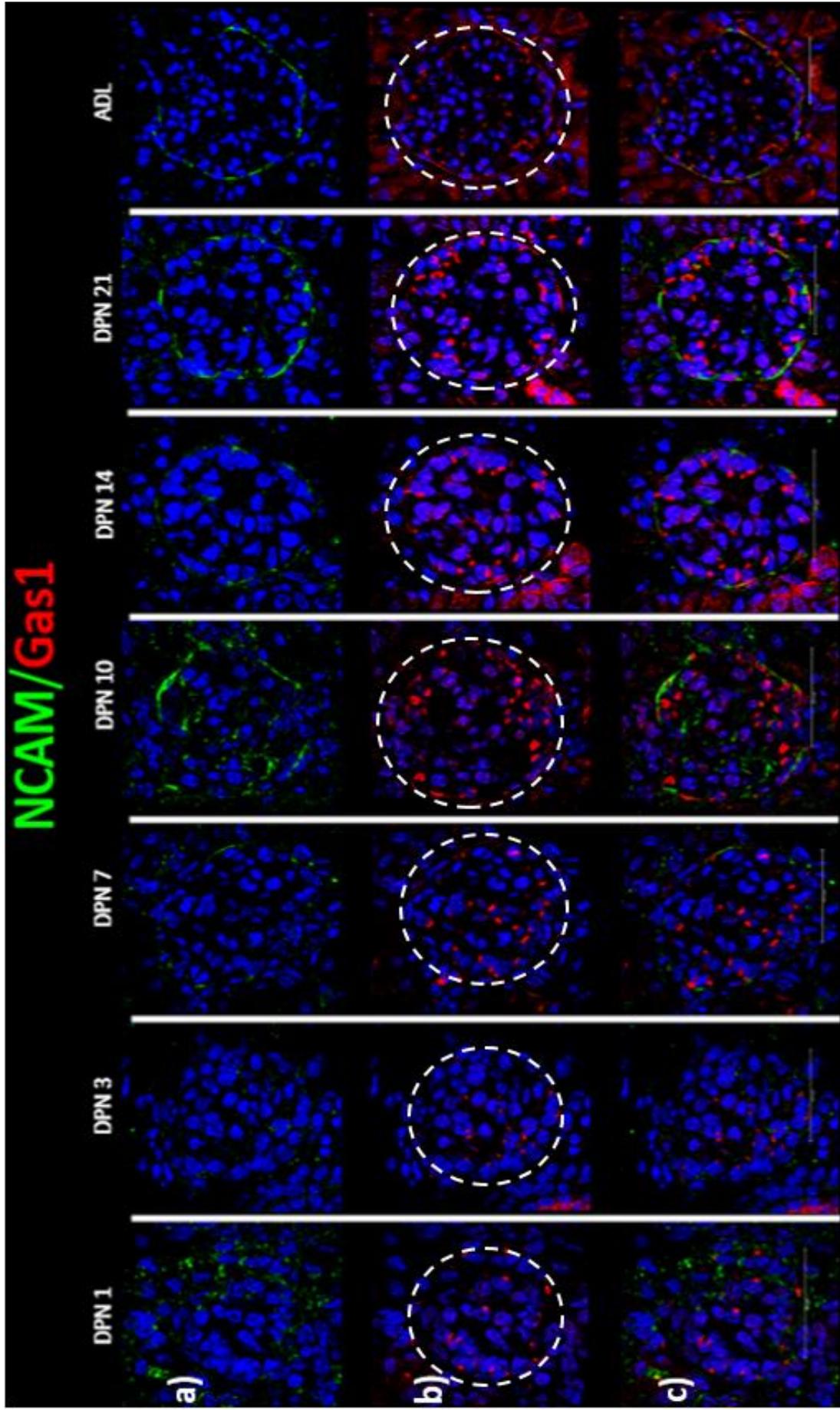


Fig. 6. Patrón de expresión renal de NCAM y Gas1 en el glomérulo durante el desarrollo postnatal en la rata. a) NCAM en verde, su expresión es intraglomerular y está presente desde el DPN1, baja a los DPN 3 y 7, aumenta de nuevo al DPN 10, baja su expresión hacia el DPN 14 pero se localiza homogéneamente en la cápsula de Bowman conforme madura el riñón. b) Gas1 en rojo, señal intraglomerular desde el DPN1 que disminuye en el ADL. Se observa que a partir del DPN 10 Gas1 se expresa de forma homogénea a nivel de la cápsula de Bowman y se mantiene hasta la etapa madura (ADL), c) Merge de NCAM + Gas1. Los núcleos se marcaron con DAPI en azul.

## IMF de la sección distal

### Gas1 y CL4

Quisimos saber si Gas1 se encontraba presente en la nefrona distal (ND) durante la maduración renal, utilizamos la CL4 para delimitarla y por medio de IMF encontramos que Gas1 colocaliza con CL4 durante el desarrollo postnatal renal de la rata (Fig. 7, c y e).

También observamos en las IMF que la expresión de CL4 era menor y dispersa en los primeros DPN en comparación con el ADL en donde su expresión es mayor y homogénea; esto se puede apreciar mejor en la comparación del DPN 1 y el ADL (Fig. 7, b y f). De igual manera, encontramos que el patrón de expresión de Gas1 en esta sección de la nefrona es incrementar conforme el riñón madura (Fig. 7, a y d). Esto lo confirmamos por medio de la cuantificación de pixeles representado en las gráficas 11 y 12. En la figura 8 se puede observar el patrón de expresión de Gas1 durante la maduración renal.

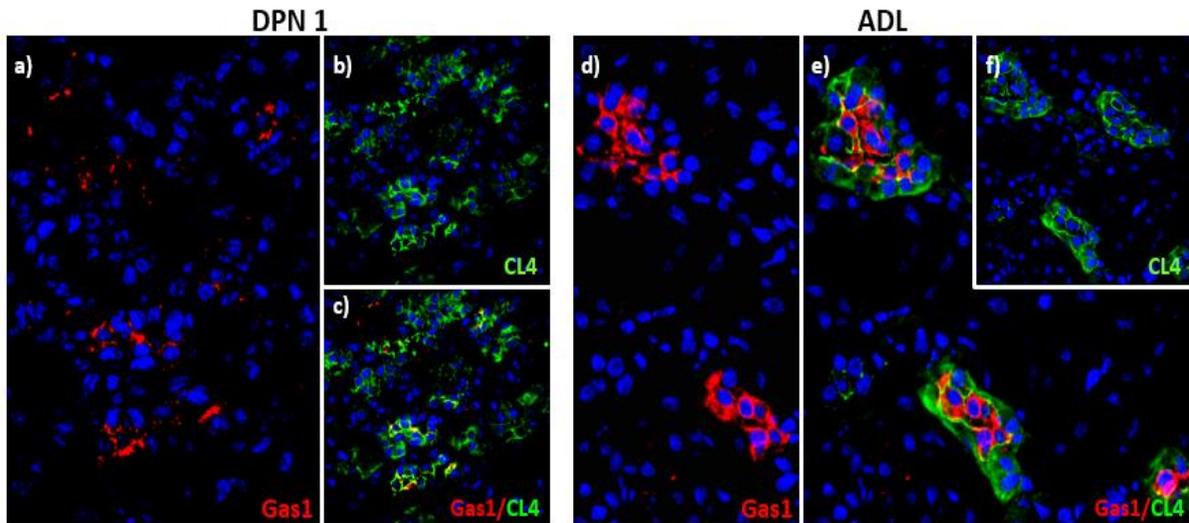
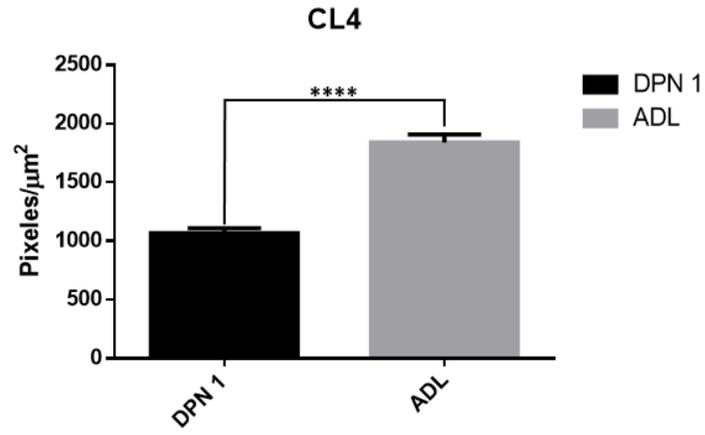
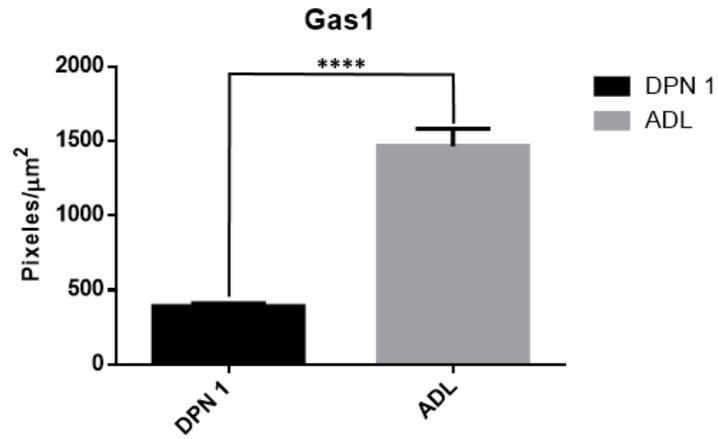


Fig. 7. Comparación de la expresión de Gas1/CL4 del DPN 1 y ADL en la sección distal. Señal de Gas1 (rojo) en ambas condiciones (a y d). En la etapa ADL se observa una mayor expresión de Gas1 en la ND (d). Se observa la expresión de CL4 que delimita a la ND (b y f, verde). Merge de Gas1 + CL4 (c y e). En azul los núcleos marcados con DAPI.



Gráfica. 11. Comparación de la cuantificación de pixeles de CL4 del DPN1 y el ADL en la nefrona distal.  
 $P < 0.05$ .



Gráfica. 12. Comparación de la cuantificación de pixeles de Gas1 del DPN1 y el ADL en la nefrona distal.  
 $P < 0.05$ .



### Expresión diferencial de Gas1 en la ND

Algo interesante que encontramos en el patrón de expresión de Gas1 fue que no se expresa en todas las estructuras de la ND. Es decir, Gas1 no está presente en todos los túbulos distales (Fig. 9, a y c, círculos punteados), esto se puede observar desde el DPN 1 hasta el 14, siendo hasta el DPN 21 en donde se observa a Gas1 de forma homogénea en la ND (Fig. 10).

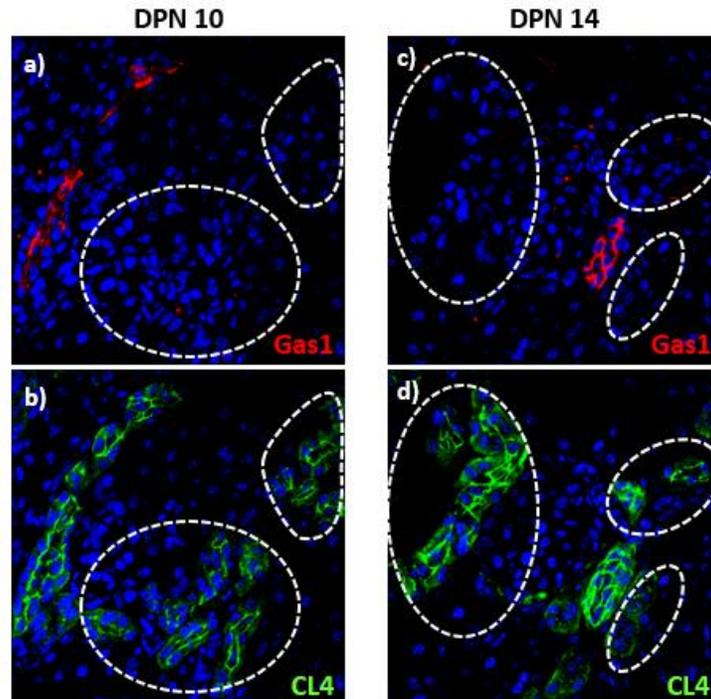


Fig. 9. Comparación de la expresión de Gas1/CL4 del DPN 10 y 14 en la sección distal. Señal de Gas1 (rojo) en ambas condiciones (a y c). Se observa la ausencia de la expresión de Gas1 (círculos punteados) en túbulos marcados con CL4 (verde, b y d) que delimita a la ND. En azul los núcleos marcados con DAPI.

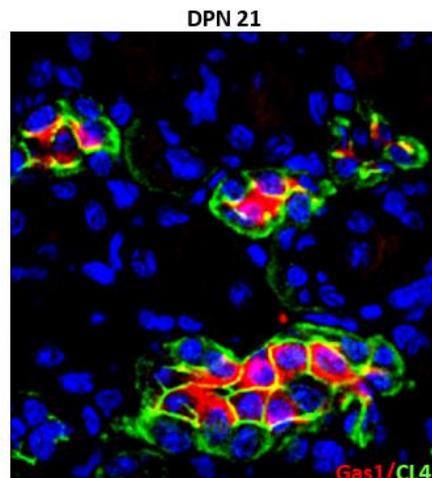


Fig. 10. Expresión de Gas1/CL4 del DPN 21 en la sección distal. Se observa a Gas1 (rojo) en todas las estructuras de la ND marcadas con CL4 (verde). En azul los núcleos marcados con DAPI.

## Expresión de marcadores de Células progenitoras renales en la ND

### NCAM

Debido a que una de las funciones de Gas1 es detener la proliferación celular, quisimos conocer el patrón de expresión durante el desarrollo postnatal de la rata de las células progenitoras renales (CPR) que proliferan y se diferencian para dar lugar a las nefronas maduras durante la nefrogénesis.

En la Fig. 12 se muestra el patrón de expresión de uno de los marcadores de las CPR, NCAM (verde) en la ND (delimitada con CL4 en rojo). Observamos que a lo largo del desarrollo postnatal se expresa NCAM de una manera similar desde el DPN 1 hasta el DPN 21 donde comienza a disminuir significativamente (Gráfica 13).

Algo interesante que encontramos fue que NCAM no se encuentra presente en todos los túbulos de la ND durante el desarrollo postnatal, es decir, no se expresa en todas las estructuras de la ND (Fig. 11, círculos punteados).

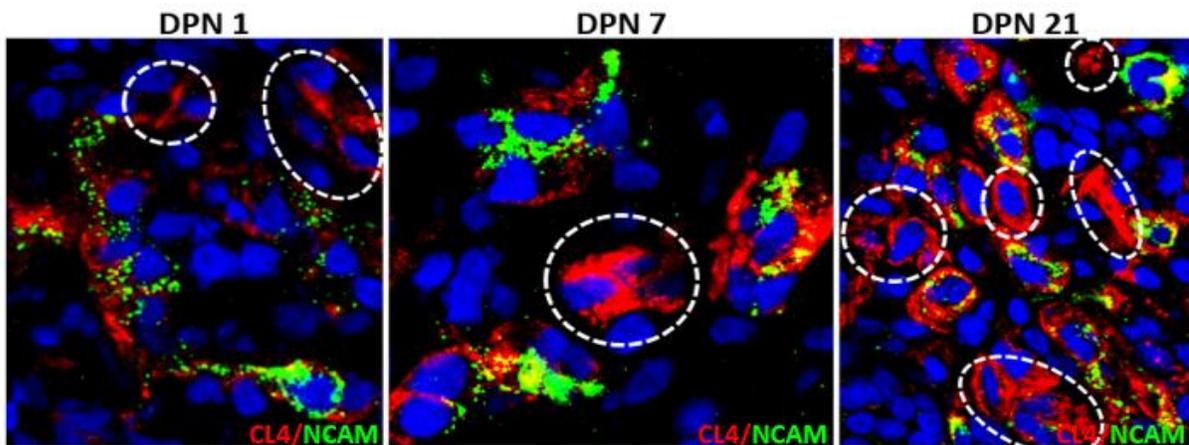
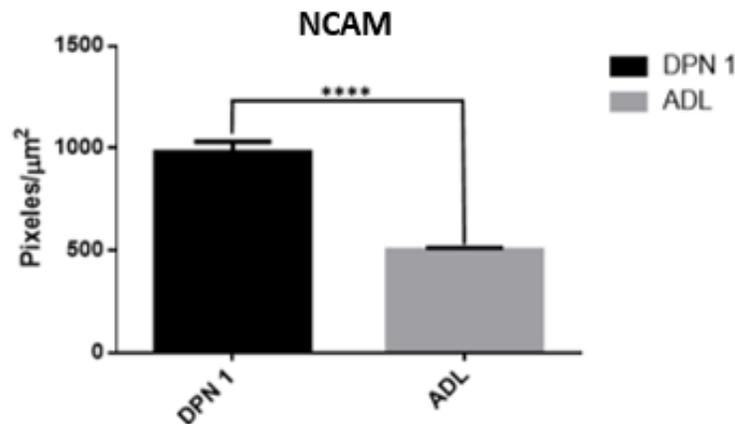


Fig. 11. Comparación de la expresión de CL4/NCAM del DPN 1, 7 y 21 en la sección distal. Se observa la expresión de CL4 (rojo) y NCAM (verde) desde el DPN 1. NCAM no se encuentra presente en todos los túbulos de la ND durante la maduración renal (círculos punteados). En azul los núcleos marcados con DAPI.



Gráfica. 13. Comparación de la cuantificación de pixeles de NCAM del DPN1 y el ADL en la nefrona distal.  $P < 0.05$ .

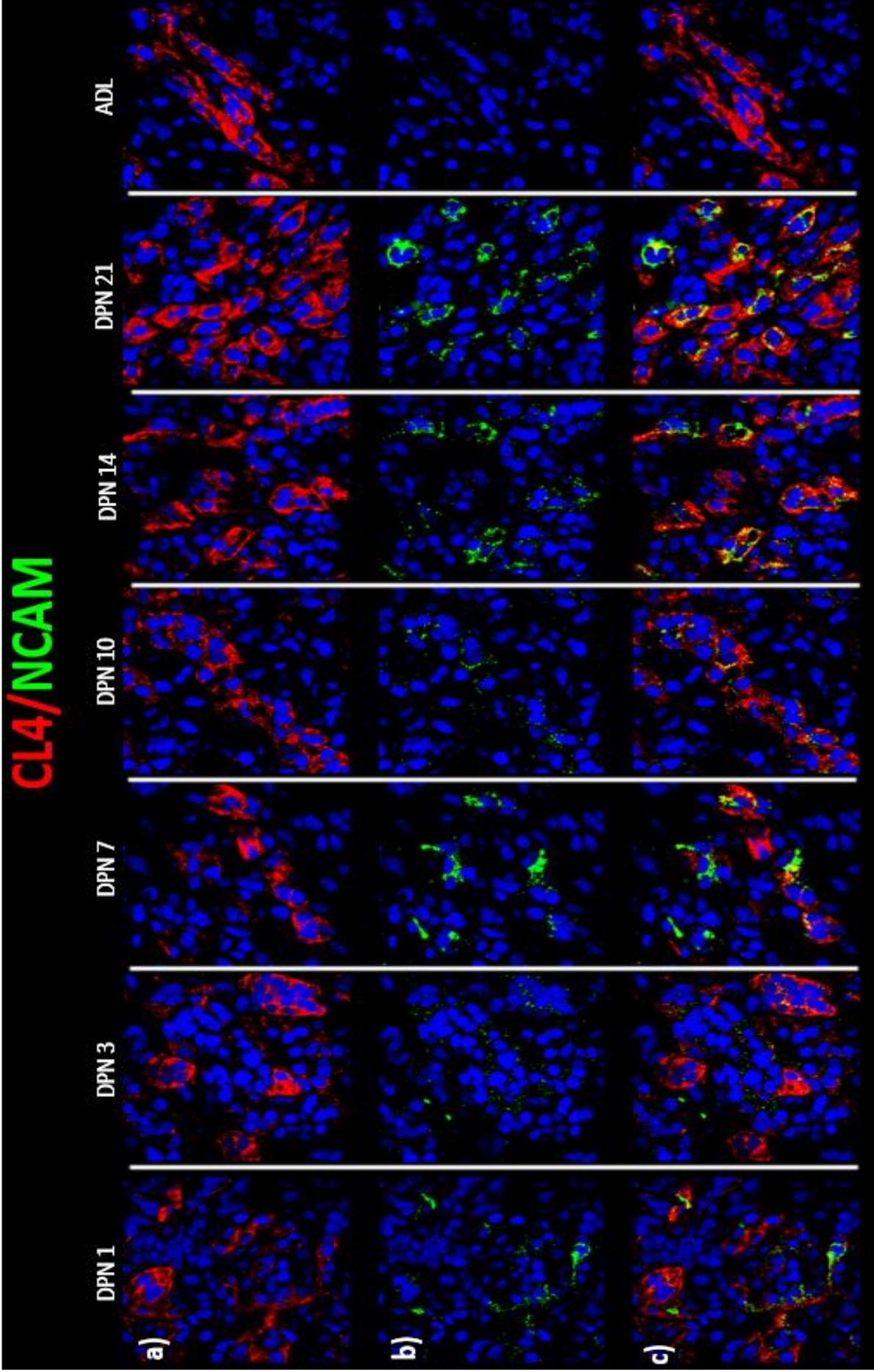


Fig. 12. Patrón de expresión renal de CL4 y NCAM en la nefrona distal durante el desarrollo postnatal en la rata. a) CL4 (rojo), se observa que su expresión incrementa conforme madura el riñón. b) NCAM (verde), se expresa desde el DPN 1 hasta el 21, disminuyendo drásticamente en el ADL. c) Merge de CL4 +NCAM, ambas proteínas colocalizan confirmando su presencia en la ND. Los núcleos se marcaron con DAPI en azul.

## CD24

Otro marcador que utilizamos para identificar las CPR fue la proteína CD24. En la Fig. 15 podemos observar el patrón de expresión de Gas1 descrito anteriormente (a, rojo) y CD24 (b, verde). CD24 se expresa desde el DPN 1 pero su expresión disminuye drásticamente a partir del DPN 3 hasta casi desaparecer en el ADL (Fig. 13, d). Esto lo confirmamos mediante la cuantificación de pixeles en donde se aprecia que CD24 disminuye significativamente en la ND del ADL (Gráfica 14).

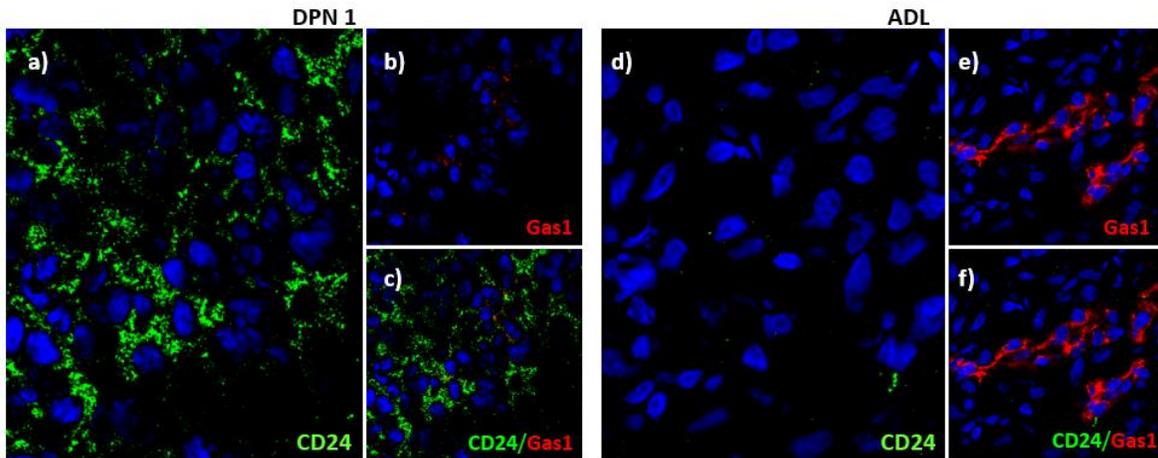
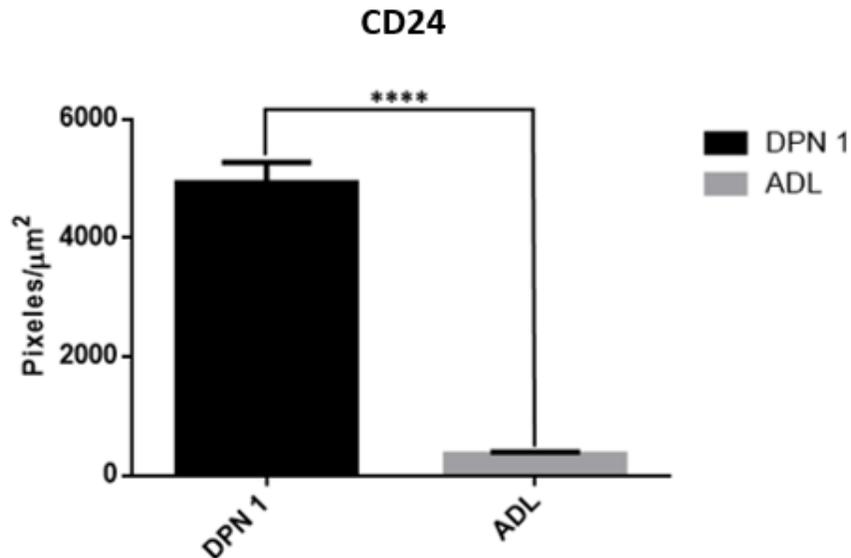


Fig. 13. Comparación de la expresión de Gas1/CD24 del DPN 1 y ADL en la sección distal. Señal de Gas1 (rojo) en ambas condiciones, se observa el mismo patrón de expresión de Gas1 descrito anteriormente (b y e). Se observa mayor expresión de CD24 (verde) al DPN 1 (a) que disminuye drásticamente en el ADL (d). Merge de Gas1 + CD24 (c y f). En azul los núcleos marcados con DAPI.



Gráfica. 14. Comparación de la cuantificación de pixeles de CD24 del DPN1 y el ADL en la nefrona distal.  $P < 0.05$ .

## Relación inversa entre Gas1 y CD24 en la ND

Algo interesante que encontramos en el patrón de expresión de Gas1 y CD24 es que son inversos (Fig. 14) es decir, al DPN 1 encontramos el mayor nivel de expresión de CD24, pero el menor nivel de expresión de Gas1, mientras que en el ADL CD24 prácticamente desaparece y encontramos el mayor nivel de expresión de Gas1.

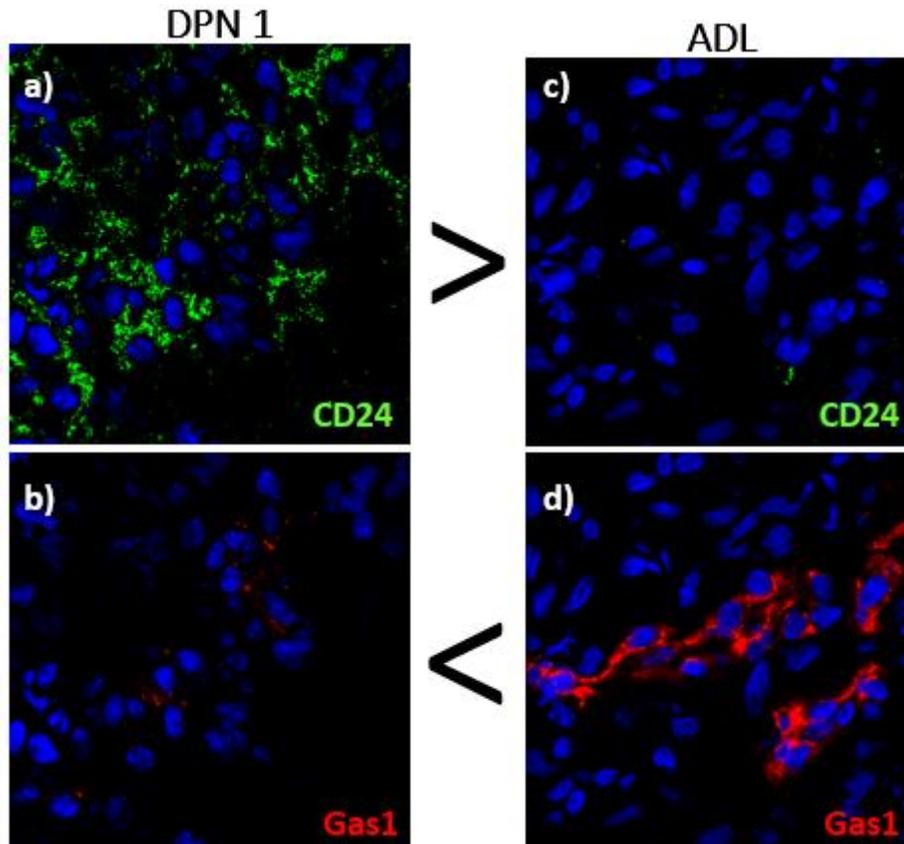


Fig. 14. Relación inversa en los niveles de expresión de Gas1/CD24 del DPN 1 y ADL en la sección distal. a y c) CD24 en verde, DPN 1 y ADL respectivamente, se observa que su patrón de expresión es disminuir conforme madura el riñón. b y d) Gas1 en rojo, DPN 1 y ADL respectivamente, se observa que su patrón de expresión es incrementar conforme madura el riñón. En azul los núcleos marcados con DAPI.

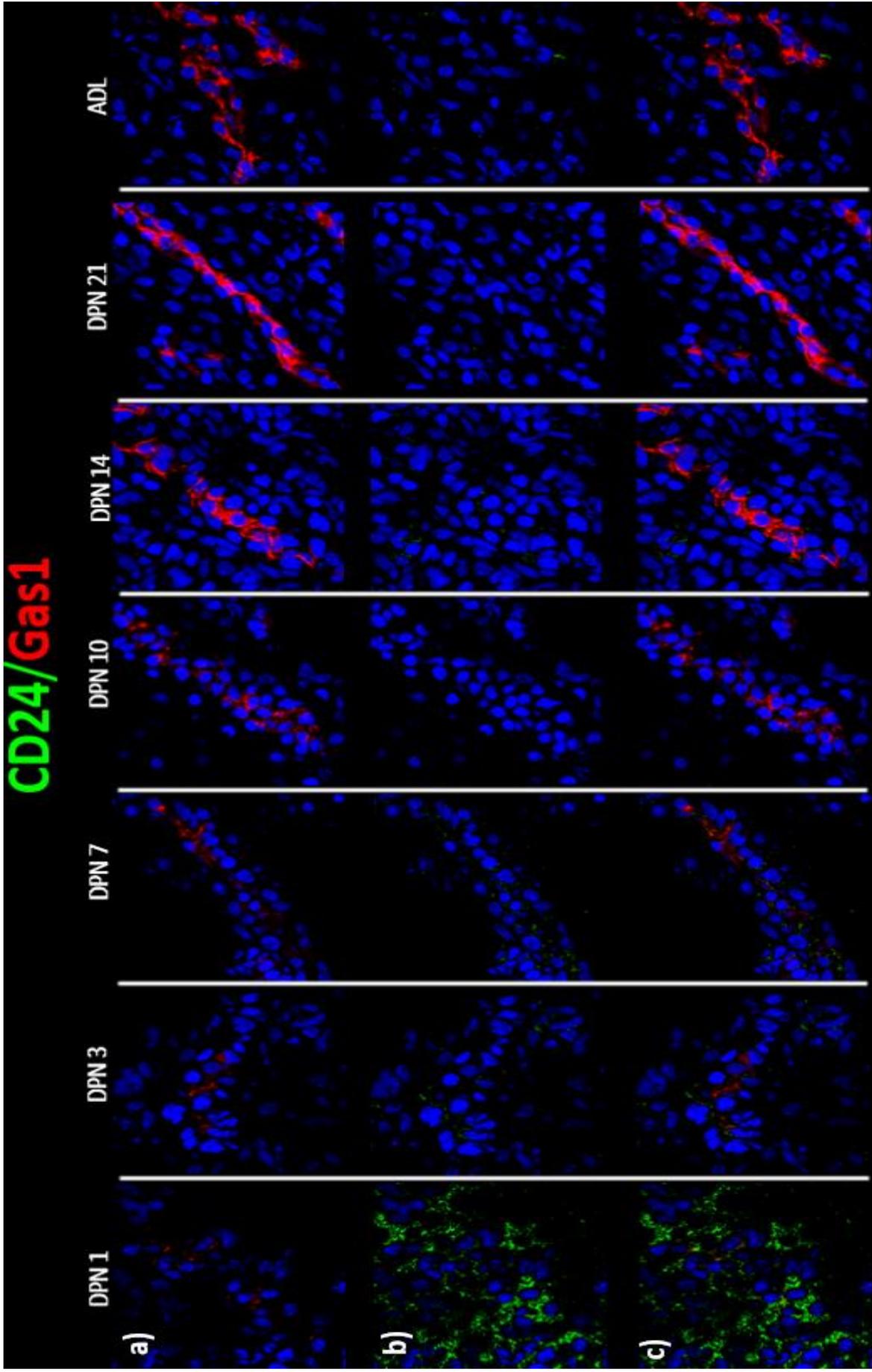


Fig. 15. Patrón de expresión renal de Gas1 y CD24 en la nefrona distal durante el desarrollo postnatal en la rata. a) Gas1 (rojo), se observa el mismo patrón de expresión descrito anteriormente en la ND, su expresión incrementa conforme madura el riñón. b) CD24 (verde), se expresa desde el DPN 1, disminuyendo drásticamente desde el DPN 3 y perdiéndose casi por completo en el ADL. c) Merge de Gas1 + CD24. Los núcleos se marcaron con DAPI en azul.

## Gas1 y AQP2

Utilizamos otro marcador específico de la ND, la proteína AQP2. La AQP2 identifica a una población específica de la ND, las células principales localizadas en el túbulo colector. Podemos observar en la Fig. 17 que la AQP2 se expresa desde el DPN 1 y durante todo el desarrollo postnatal y, que colocaliza claramente con Gas1 (c, Fig. 17).

Por medio de las IMF (Fig. 16) no observamos algún cambio en el patrón de expresión de AQP2 durante la maduración renal, pero al realizar la cuantificación de píxeles encontramos que el mayor nivel de expresión de AQP2 es al primer día postnatal y disminuye conforme madura el riñón (Gráfica 15).

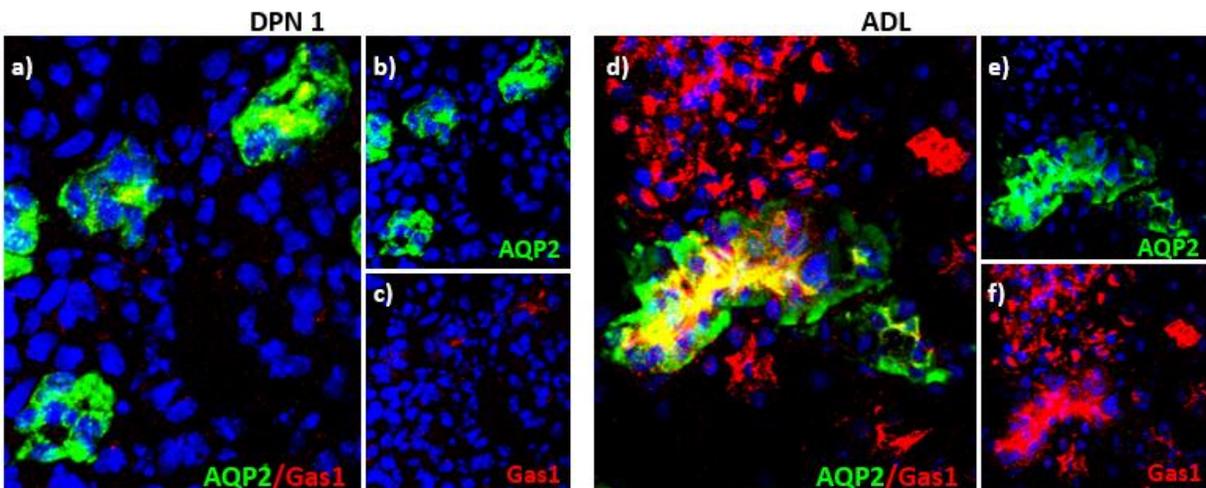
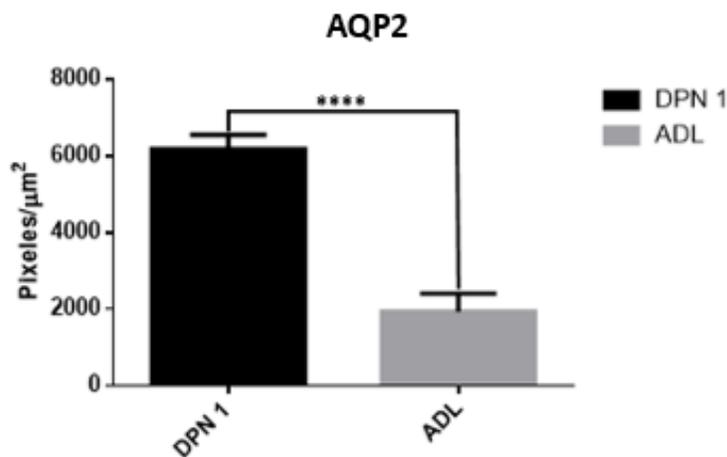


Fig. 16. Comparación de la expresión de Gas1/AQP2 del DPN 1 y ADL en la sección distal. Señal de Gas1 (rojo) en ambas condiciones, se observa el mismo patrón de expresión de Gas1 descrito anteriormente (c y f). Se observa mayor expresión de AQP2 (verde) al DPN 1 (b) que disminuye significativamente en el ADL (e). Merge de Gas1 + AQP2 (a y d). En azul los núcleos marcados con DAPI.



Gráfica. 15. Comparación de la cuantificación de píxeles de AQP2 del DPN1 y el ADL en la nefrona distal.  $P < 0.05$ .

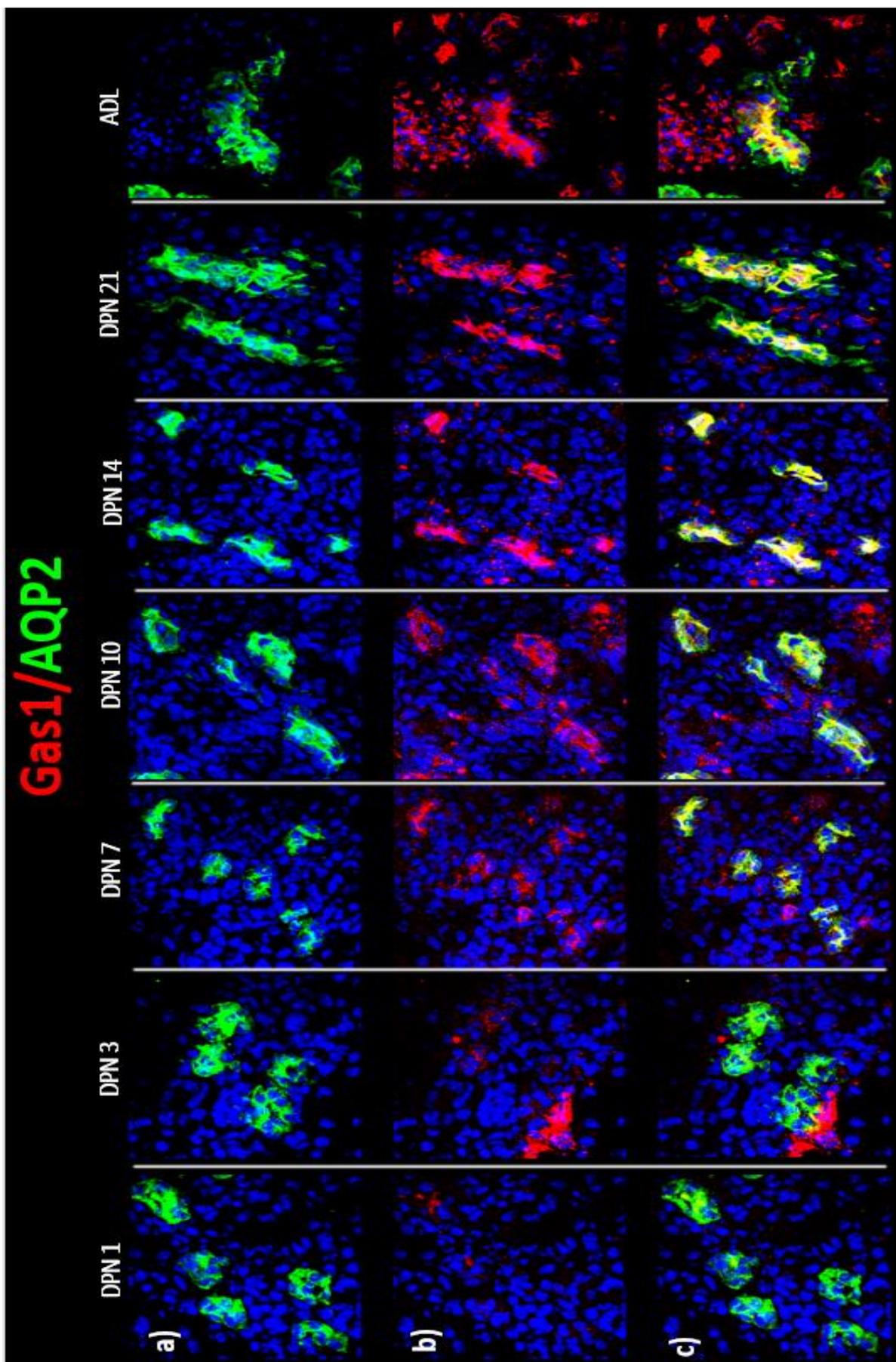


Fig. 17. Patrón de expresión renal de Gas1 y AQP2 en la nefrona distal durante el desarrollo postnatal en la rata. a) Gas1 (rojo), se observa el mismo patrón de expresión descrito anteriormente en la ND, su expresión incrementa conforme madura el riñón. b) AQP2 (verde), se expresa desde el DPN 1, disminuyendo en el ADL. c) Merge de Gas1 + AQP2, se observa que ambas proteínas colocalizan (color amarillo). Los núcleos se marcaron con DAPI en azul.

## IMF de la sección proximal de la nefrona

### Gas1 y DppD

Quisimos saber si Gas1 se expresaba en esta sección de la nefrona. Para delimitarla utilizamos la enzima DppD presente en el borde-cepillo de las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales del riñón.

En la Fig. 19 se muestra el patrón de expresión de esta enzima (a, verde). DppD se expresa desde el DPN 1 y su expresión incrementa conforme madura el riñón. Este incremento observado en las IMF se confirmó mediante la cuantificación de píxeles (Gráfica 16).

Algo muy interesante que encontramos fue que Gas1 no colocaliza con la enzima DppD (c, Fig. 19), en ningún DPN durante la maduración renal, es decir, Gas1 no se expresa en los túbulos contorneados proximales del riñón durante el desarrollo postnatal de la rata (Fig. 18).

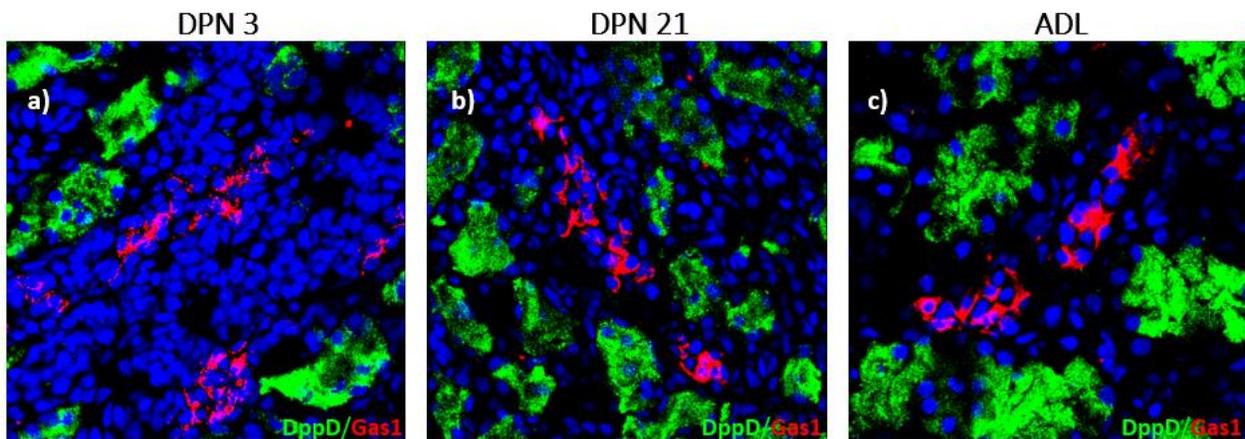
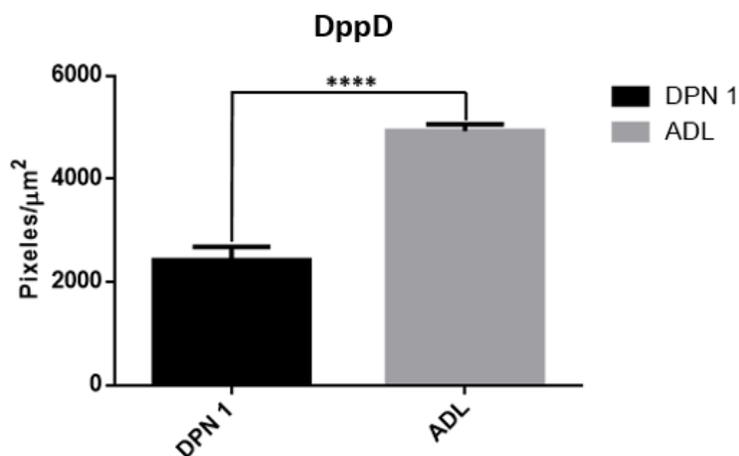


Fig. 18. Comparación de la expresión de Gas1/DppD del DPN 3, 21 y ADL en la sección proximal. Señal de Gas1 (rojo), se observa el mismo patrón de expresión de Gas1 descrito anteriormente para la sección distal en los DPN 3, 21 y ADL (a, b y c, respectivamente). Se observa a DppD (verde). No se encontró merge de Gas1 + DppD durante la maduración renal. En azul los núcleos marcados con DAPI.



Gráfica. 16. Comparación de la cuantificación de píxeles de DppD del DPN1 y el ADL en la sección proximal.  $P < 0.05$ .



## Expresión de marcadores de Células progenitoras renales en el proximal

### NCAM

Quisimos conocer el patrón de expresión en la sección proximal de los dos marcadores de las CPR utilizados anteriormente: NCAM y CD24.

En la Fig. 21 se muestra el patrón de expresión correspondiente a NCAM (b, verde). La expresión de esta proteína es muy baja (en comparación con lo encontrado en la ND  $\approx 1,000$  pixeles/ $\mu\text{m}^2$ ) en los túbulos contorneados proximales desde el DPN 1 (Fig. 20) y se observa que disminuye significativamente desde el DPN 21 hasta el ADL (Gráfica 17).

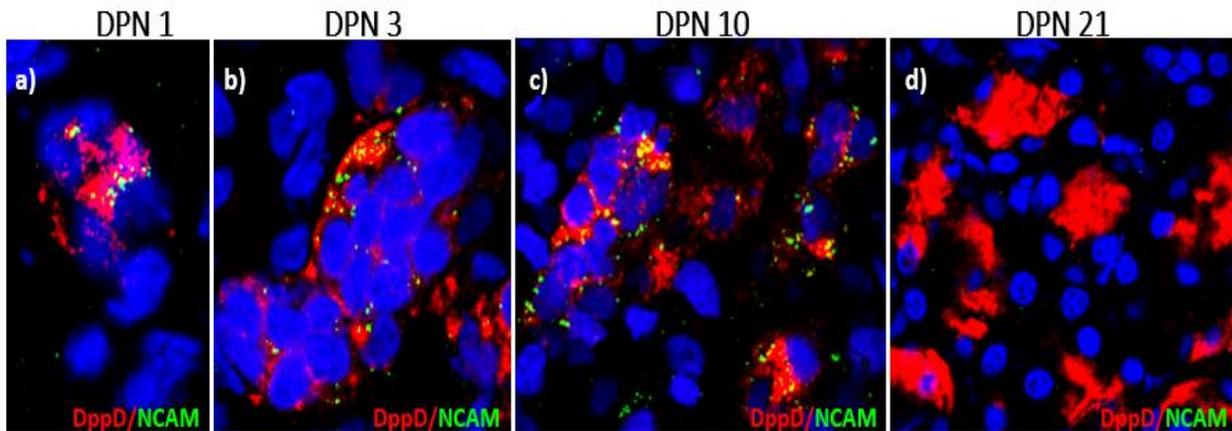
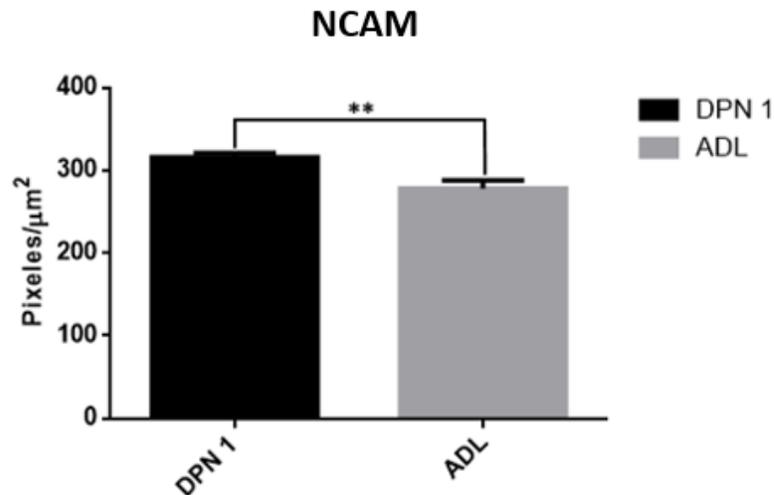


Fig. 20. Comparación de la expresión de DppD/NCAM del DPN 1, 3, 10 y 21 en la sección proximal. Señal de DppD (rojo), se observa el mismo patrón de expresión de DppD descrito anteriormente en los DPN 1, 3, 10 y 21 (a, b, c y d, respectivamente). Se observa una muy baja señal de NCAM en todos los DPN (verde) excepto en el DPN 21 en donde no se encontró señal (d). Merge de DppD + NCAM durante la maduración renal excepto en el DPN 21 (d). En azul los núcleos marcados con DAPI.



Gráfica. 17. Comparación de la cuantificación de pixeles de NCAM del DPN1 y el ADL en la sección proximal.  $P < 0.05$ .

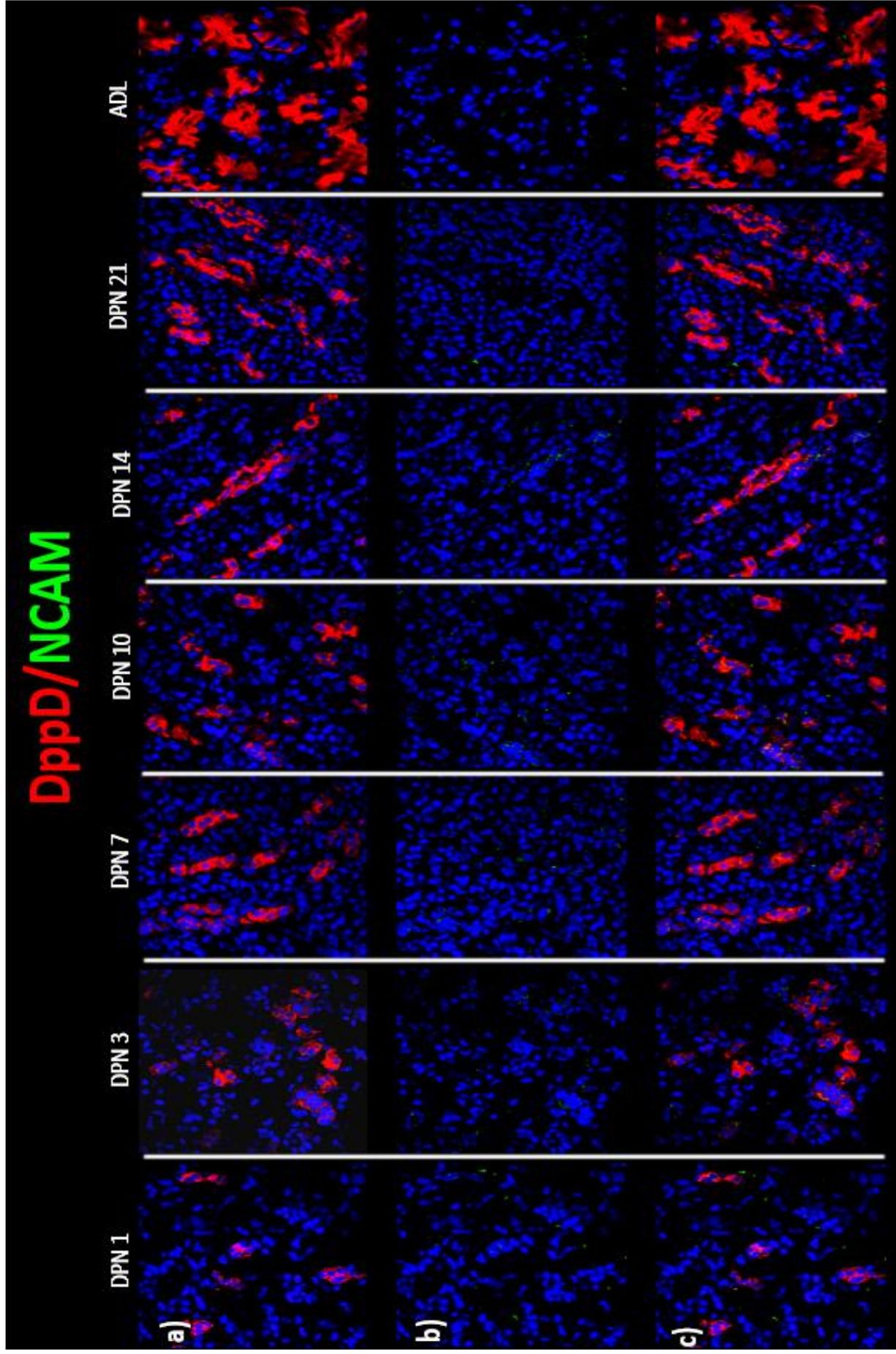


Fig. 21. Patrón de expresión renal de DppD y NCAM en la nefrona proximal durante el desarrollo postnatal en la rata. a) DppD (rojo), se expresa desde el DPN 1, su expresión incrementa conforme el riñón va madurando. b) NCAM (verde), se observa una expresión muy baja desde el DPN 1, su expresión disminuye significativamente a partir del DPN 21. c) Merge de DppD + NCAM, ambas proteínas colocalizan. Los núcleos se marcaron con DAPI en azul.

## CD24

Al evaluar el patrón de expresión de CD24 (representado en la figura 23) en la sección proximal encontramos que su nivel de expresión es muy bajo en los túbulos contorneados proximales (en comparación con lo encontrado en la ND  $\approx 5,000$  pixeles/ $\mu\text{m}^2$ ) desde el DPN 1 (Fig. 22) y se observa que disminuye significativamente desde el DPN 14 hasta el ADL (Gráfica 18).

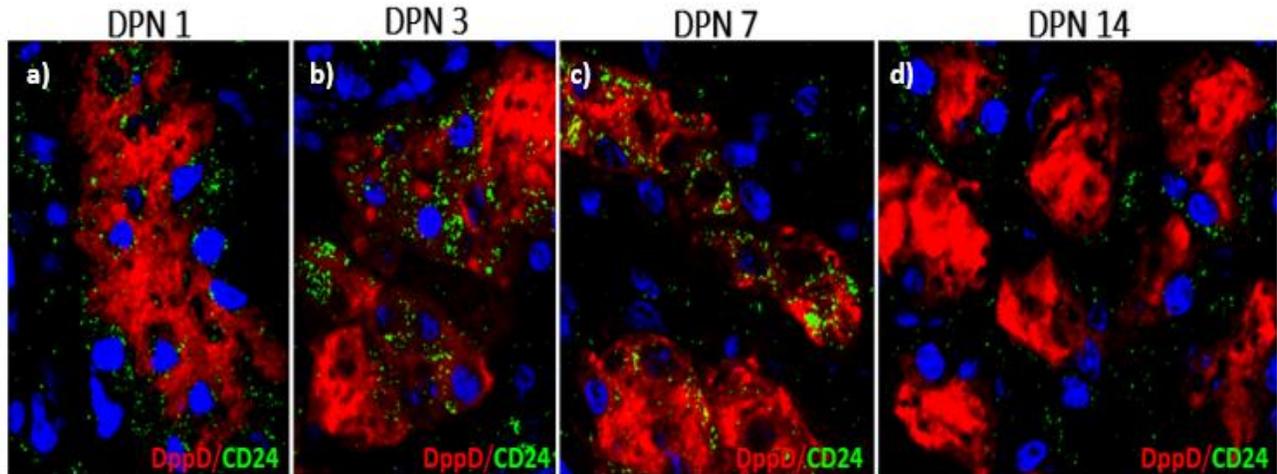
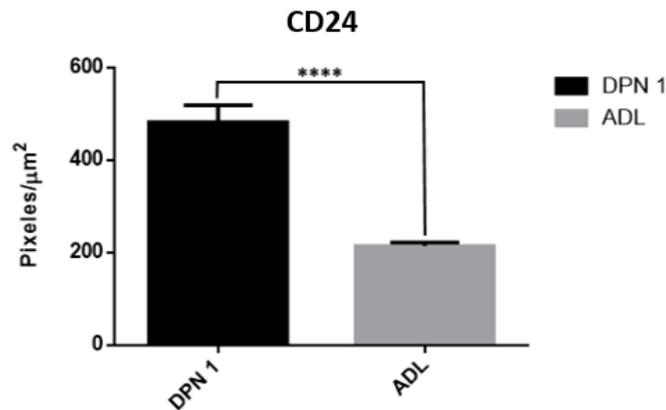


Fig. 22. Comparación de la expresión de DppD/CD24 del DPN 1, 3, 7 y 14 en la sección proximal. Señal de DppD (rojo), se observa el mismo patrón de expresión de DppD descrito anteriormente en los DPN 1, 3, 7 y 14 (a, b, c y d, respectivamente). Se observa una muy baja señal de CD24 en todos los DPN (verde) excepto en el DPN 14 en donde no se encontró señal (d). Merge de DppD + CD24 durante la maduración renal excepto en el DPN 14 (d). En azul los núcleos marcados con DAPI.



Gráfica. 18. Comparación de la cuantificación de pixeles de CD24 del DPN1 y el ADL en la sección proximal.  $P < 0.05$ .

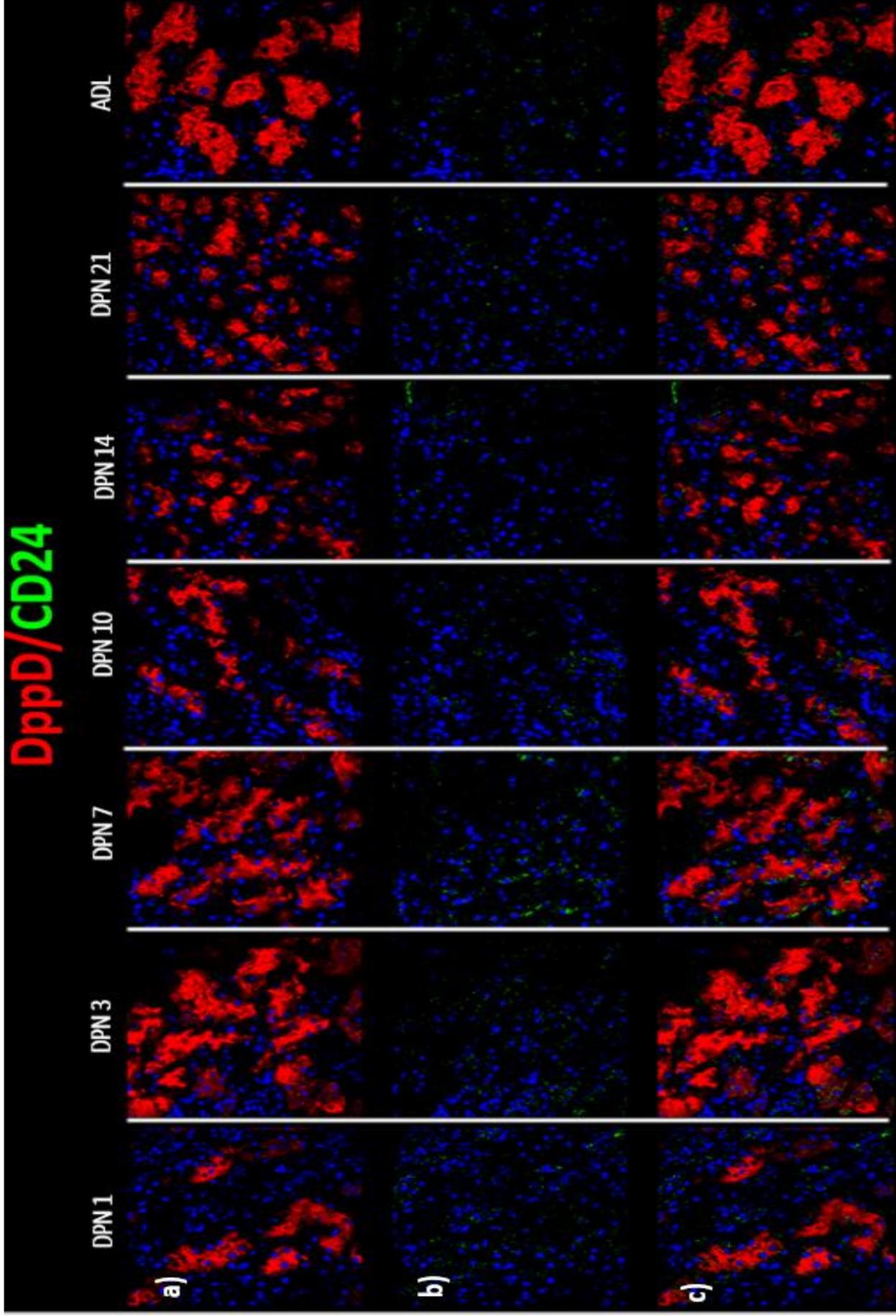


Fig. 23. Patrón de expresión renal de DppD y CD24 en la nefrona proximal durante el desarrollo postnatal en la rata. a) DppD (rojo), se expresa desde el DPN 1, su expresión incrementa conforme el riñón va madurando. b) CD24 (verde), se observa una expresión muy baja desde el DPN 1, su expresión disminuye significativamente a partir del DPN 14. c) Merge de DppD + CD24, ambas proteínas colocalizan. Los núcleos se marcaron con DAPI en azul.

### Patrón de expresión diferencial de las CPR a nivel tubular

Al comparar los resultados obtenidos de los marcadores de CPR, NCAM y CD24 en la sección proximal y en la ND, encontramos diferencias, es decir, tienen un patrón de expresión diferencial dependiendo de la sección de la nefrona.

En la sección proximal la proteína CD24 disminuye a partir del DPN 14, mientras que en la ND la misma proteína disminuye a partir del DPN 21 (Fig. 24, a y c, respectivamente).

En la sección proximal la proteína NCAM disminuye a partir del DPN 21, mientras que en la ND la misma proteína disminuye a partir del ADL (Fig. 24, b y d, respectivamente).

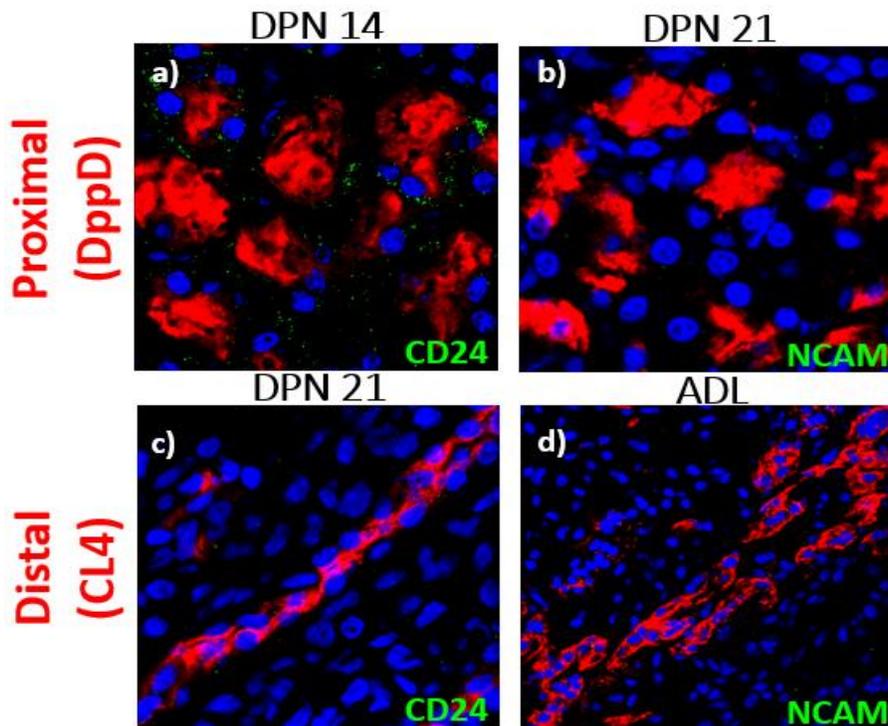
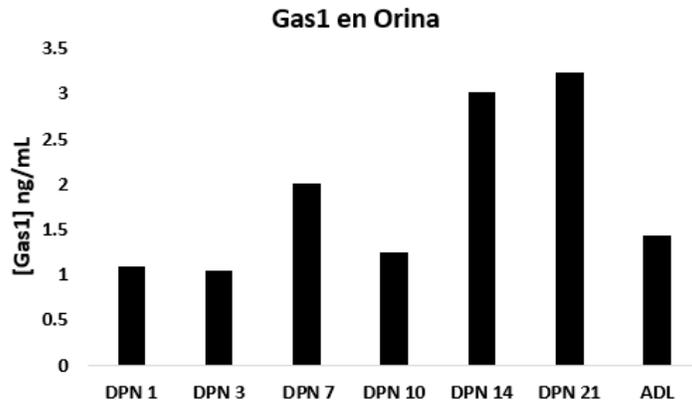


Fig. 24. Expresión diferencial de CD24 y NCAM a nivel tubular. Señal de DppD delimitando el túbulo contorneado proximal (rojo), disminución de colocalización de CD24 y NCAM (verde) al DPN 14 y 21 (a y b, respectivamente). Señal de CL4 delimitando la ND (rojo), disminución de colocalización de CD24 y NCAM (verde) al DPN 21 y ADL (c y d, respectivamente). En azul los núcleos marcados con DAPI.

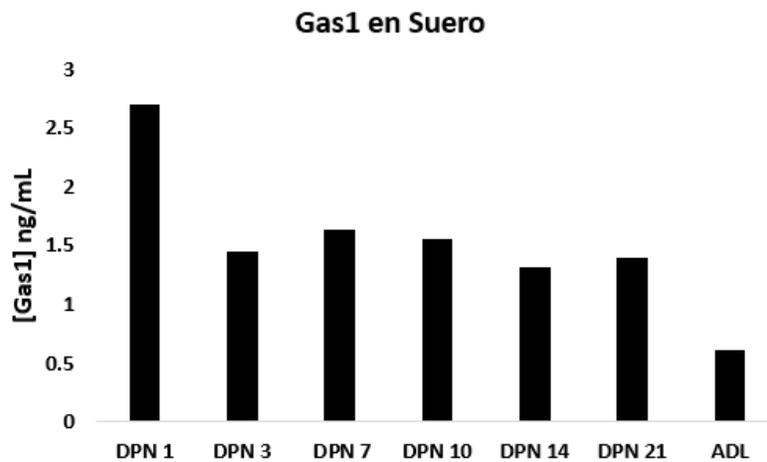
## Detección de Gas1 por ELISA

Con el fin de saber si Gas1 estaba siendo secretada, decidimos evaluar la concentración de Gas1 por medio de una ELISA en muestras de orina y suero en cada DPN.

En los datos obtenidos para la orina (Gráfica 19) podemos ver que Gas1 se encuentra en mayores concentraciones en los DPN 7, 14 y 21. No sabemos si estos datos son significativos o no debido a que solamente realizamos la cuantificación una vez, debemos aumentar la n. De igual manera con los datos obtenidos en el suero (Gráfica 20), pareciera que al nacer las ratas poseen una concentración mayor de Gas1 que disminuye a partir del DPN 3 y se mantiene hasta el 21, disminuyendo al parecer en el ADL casi 5 veces cuando se compara con el DPN 1.



Gráfica. 19. Concentraciones de Gas1 presente en orina obtenidas por medio de ELISA durante el desarrollo postnatal. No se muestra estadística debido a que la n=1.



Gráfica. 20. Concentraciones de Gas1 presente en suero obtenidas por medio de ELISA durante el desarrollo postnatal. No se muestra estadística debido a que la n=1.

## Discusión

El desarrollo renal de la rata comienza prenatalmente y termina tres semanas después de su nacimiento. Curiosamente para varios mamíferos, el poseer todas las estructuras de la nefrona al momento del nacimiento no es suficiente para que el riñón sea 100% funcional. El túbulo posee un patrón propio de maduración, fuertemente influenciado por diversos estímulos de la vida extrauterina. Al nacer los glomérulos están proporcionalmente más maduros que los túbulos, alcanzándose una armonía funcional alrededor del mes de vida en humanos y en la rata después del destete (DPN 21)<sup>25,28,29</sup>.

La maduración renal se da en el periodo postnatal y se puede observar en los datos obtenidos de proteinuria (Gráfica 3), en donde el valor de proteinuria al DPN 1 es elevado, pero, disminuye significativamente desde el DPN 14. Se ha descrito que la orina fetal y de los neonatos de las ratas contiene proteínas de mayor tamaño y en mayor concentración que la orina de ratas adultas debido al incremento en la permeabilidad a proteínas por la membrana basal glomerular que es inmadura. Esto es congruente con lo observado por *Neiss et al*; que encontró que la morfogénesis renal se completa al DPN 15<sup>24</sup>.

El objetivo final de la función renal es mantener la homeostasis, para lo cual el riñón se adapta a necesidades variables. Esto se puede observar mejor en los datos obtenidos de la gráfica 1, donde no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones séricas de creatinina, pero si se encontraron diferencias entre la relación U/P a lo largo del desarrollo postnatal.

Durante los primeros meses de la vida de los neonatos los parámetros de función renal son cuantitativamente inferiores a la de los infantes o adultos. La filtración glomerular en el recién nacido es pequeña debida a un conjunto de factores: a) pequeña área capilar del glomérulo disponible para la filtración, b) inmadurez estructural de los capilares glomerulares, que trae como consecuencia poca permeabilidad al agua, c) menor presión

arterial media y por lo tanto disminución del flujo sanguíneo, así como de una disminución de la perfusión y un volumen minuto disminuido. Esta disminución en la filtración glomerular en los primeros días postnatales se observó en los datos obtenidos en la relación U/P (Gráfica 2)<sup>25,26,27</sup>.

Algunos investigadores relacionan la menor filtración glomerular presente en el neonato como un mecanismo de defensa de su composición corporal, pues el túbulo correspondiente a cada glomérulo es de menor tamaño y tiene menor capacidad para manejar una carga importante de electrolitos, y así se mantendría un adecuado balance glomerulotubular entre la capacidad de filtración y la de transporte tubular, y esto se logra a través de la vasoconstricción de la arteriola aferente el mismo mecanismo que ocurre en la Insuficiencia renal aguda donde la tasa de filtración glomerular permanece baja hasta que no adquiera la capacidad suficiente para el transporte tubular<sup>25,30</sup>.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el patrón de expresión durante el desarrollo postnatal de Gas1 por medio de IMF. Por reportes previos sabíamos que Gas1 se encontraba a nivel glomerular, en células mesangiales<sup>22</sup>. Esto coincide con la señal intraglomerular que obtuvimos de Gas1 mostrada en la figura 2. Gas1 se encuentra presente desde el DPN 1 y disminuye en el ADL. Tal vez el mayor nivel de expresión intraglomerular de Gas1 sea en los primeros días postnatales debido a que la maduración renal continua en este periodo de desarrollo y los cambios estructuras y morfológicos continúan hasta aproximadamente el DPN 15-21. La maduración de la corteza renal (en donde se encuentran la mayoría de los glomérulos) se caracteriza por la formación de nuevas nefronas, crecimiento intersticial y diferenciación de las nefronas ya existentes<sup>24</sup>.

La expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman es un hallazgo novedoso. Trabajos de previos de nuestro laboratorio (no publicados) encontraron que Gas1 se expresa en la cápsula de Bowman en ratas adultas en un modelo de diabetes temprana y que, su expresión disminuye activando a CPR<sup>23</sup>. Ésta expresión de marcadores de CPR

(NCAM<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>) está relacionada con mecanismos de reparación en presencia de un insulto, como es el caso de la hiperglucemia. En nuestro modelo experimental en donde las ratas son sanas, pero se encuentran en un proceso de maduración suponemos que las CPR que están activas desde el DPN 1 comienzan a diferenciarse y por lo tanto a lo largo de la maduración disminuyen y se pierden estos marcadores. Se ha descrito previamente que NCAM es expresada en las células progenitoras de la nefrona, pero también en las primeras etapas de epitelización<sup>31</sup>. Tal vez, Gas1 al expresarse de forma homogénea en la cápsula de Bowman (de igual manera que NCAM, Fig. 6) y siendo una proteína multifuncional está regulando negativamente a las CPR durante el desarrollo postnatal. Recordando que Gas1 es una proteína conservada durante la evolución, con homólogos en cordados (desde *Ciona* y *Amphioxus*), artrópodos y gusanos redondos. Un homólogo a Gas1 es el receptor GFR $\alpha$  (relacionado al SNC), interesantemente en *Drosophila*, los GFR $\alpha$  no interactúan con su receptor RET, pero si interactúan con un análogo de NCAM, FasII. Sí Gas1 es capaz de interactuar o no con NCAM o un homólogo, es desconocido<sup>32</sup>. También algo interesante que encontramos fue que WT1 disminuye conforme el riñón madura de igual manera que la señal intraglomerular de Gas1. Trabajos previos encontraron que WT1 regula directamente la expresión de Gas1 al promover la transcripción de su ARNm<sup>16</sup> y obtener el mismo patrón de expresión de ambas proteínas es congruente con lo observado por *Kann et al*<sup>16</sup>.

Los datos obtenidos en la nefrona distal fueron muy interesantes. Gas1 se expresa desde el DPN 1 en la nefrona distal (identificada por CL4), y su patrón de expresión es de incrementar conforme madura el riñón (Gráfica 12). Pero la expresión de Gas1 no es homogénea durante la maduración renal, es decir, no se expresa en todas las estructuras tubulares (CL4<sup>+</sup>) desde el DPN 1, sino que es a partir del DPN 21 que la expresión de Gas1 en la nefrona Distal se hace homogénea. Durante este periodo (DPN 21) es cuando la estructura renal se completa, es decir, la morfología renal está terminada y no cambia, y a partir de este tiempo solo se da un alargamiento de todas las partes del riñón por igual al menos hasta los 30 días de vida de la rata. Tal vez esta sea la explicación de la disminución de la concentración sérica de Gas1 observados en la ELISA (Gráfica 20). Es por esta razón que sugerimos a Gas1 como un

marcador de diferenciación celular a nivel de la nefrona distal, debido a que su expresión es homogénea a partir del DPN 21<sup>24</sup>. Debido a que la nefrona distal incluye a diferentes estructuras tubulares, quisimos saber si Gas1 se expresaba a nivel del túbulo colector, específicamente en las células principales AQP2<sup>+</sup>. En la figura 17 se muestra el patrón de expresión de Gas1 y AQP2<sup>+</sup>. Podemos observar que Gas1 se expresa desde el DPN 1. Por lo tanto, las estructuras tubulares Gas1<sup>+</sup> encontradas desde el DPN 1 en el marcaje con CL4, son células principales. Interesantemente los túbulos distales expresan a Gas1 más tardíamente en comparación con los túbulos colectores. Tal vez, esta expresión diferencial de Gas1 sea debida a que los túbulos colectores se encuentran en la medula renal y se sabe que, debido al patrón centrífugo de maduración renal, la médula madura más tardíamente en comparación a la corteza renal<sup>25</sup>. Otra explicación podría ser que, reportes previos describieron una población de células en la papila renal (en la medula interna) con características de células troncales, que en condiciones normales están en un estado quiescente (el gen GAS1 se expresa elevadamente en células quiescentes de mamíferos<sup>35</sup>) por periodos largos de tiempo y en presencia de un daño renal entran al ciclo celular rápidamente. Estas células troncales disminuyen conforme el animal crece y se encuentran presentes en las células de los túbulos colectores y células intersticiales<sup>33</sup>. También se ha descrito la presencia de una población tipo célula troncal mesenquimal en los riñones de ratones adultos. En nuestras IMF para NCAM y CD24, encontramos que éstas se encuentran en el glomérulo, en el túbulo proximal y en la nefrona distal. La expresión de estos marcadores de CPR fue mayor en la nefrona distal. Un grupo de investigadores identificó el túbulo colector (células AQP2<sup>+</sup>) como la fuente renal de este tipo de células troncales mesenquimales (CTM) y que, estas células epiteliales del túbulo colector sufren transición epitelio-mesénquima para dar lugar a las CTM. Estas CTM cuando se inyectan en los riñones a ratones neonatos migran y se localizan específicamente en las células AQP2<sup>+</sup> del túbulo colector medular, es decir estas CTM conservan la capacidad de formar estructuras epiteliales *in vitro* e *in vivo* (tal vez, es por esta razón que la expresión que encontramos de AQP2 es homogénea y desde el DPN 1) y en modelos de reparación epitelial confirmando la plasticidad del túbulo colector<sup>34</sup>. Tal vez la presencia de Gas1 en el túbulo colector desde

el DPN 1 sea para regular negativamente a las CPR presentes en ésta estructura ya que encontramos una relación inversa entre la expresión de Gas1 y marcadores de CPR (Fig. 14) y recordando que, en los datos obtenidos por *Luna et al.*, la disminución de la expresión de Gas1 favorecía la activación de las CPR en un modelo de hiperglucemia<sup>23</sup>.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el túbulo proximal son interesantes ya que no encontramos expresión de Gas1 en ningún DPN. Tal vez, debido a que el túbulo contorneado proximal en comparación con las demás estructuras tubulares, soporta un intenso proceso de reabsorción que supone un 65% del filtrado total tubular y que posee una gran cantidad de mitocondrias que refleja la elevada tasa metabólica que hay en ese tramo del epitelio tubular<sup>36</sup>, este regulado por mecanismos diferentes en condiciones de ratas sanas. Es posible que, al ser la porción tubular con más desgaste funcional, y por lo tanto es más probable que sufra algún daño y necesite activar los mecanismos de reparación celular con más frecuencia, Gas1 está más fuertemente regulado. En datos (no publicados) obtenidos por el grupo de investigación del Dr. Olivier Barbier, encontraron que en un modelo de ratas con daño específicamente en el túbulo contorneado proximal (expuestas a gentamicina y/o flúor) se expresaba Gas1, y al parecer la expresión de Gas1 es dosis-dependiente, es decir, que a dosis mayores de gentamicina o flúor había una mayor expresión de Gas1. No se sabe qué papel podría estar teniendo Gas1 en este modelo, ya que siendo una proteína pleiotrópica, tal vez Gas1 estaría como agente proapoptótico induciendo muerte celular a las células dañadas<sup>19</sup> o podría tener la función contraria. Se ha descrito a Gas1 como un agente antiapoptótico. En un modelo con células endoteliales se encontró que Gas1 reduce fuertemente la apoptosis sin afectar el crecimiento celular y tal vez contribuyendo a la integridad del resto del endotelio. Esto sugiere que el efecto antiproliferativo y el efecto antiapoptótico puedan estar inversamente relacionados, estos resultados tendrían un significado biológico más general de Gas1 como un promotor de la estabilización celular y resistencia a agentes tóxicos<sup>17</sup>.

Respecto a los datos obtenidos a las proteínas utilizadas como marcadores específicos de cada sección de la nefrona, encontramos un patrón de expresión similar. Para la CL4, DppD

y la Nefrina, utilizadas en este trabajo para identificar la ND, el túbulo proximal y el glomérulo, respectivamente, encontramos que poseen el mismo patrón de expresión: incrementar conforme madura el riñón, esto es de esperarse debido a la inmadurez estructural tubular y glomerular al momento de nacer. Se ha descrito que la expresión de Nefrina incrementa desde el nacimiento hasta la edad adulta<sup>37</sup>.

## Conclusiones

Encontramos que Gas1 presenta un patrón de expresión diferencial a nivel renal durante el crecimiento postnatal. Se encuentra en el glomérulo y en la nefrona distal. En el glomérulo, la expresión de Gas1 es a nivel intraglomerular y en la cápsula de Bowman. La expresión de Gas1 en la cápsula de Bowman es homogénea conforme madura el riñón, sugiriendo un posible papel de Gas1 como marcador de estado de diferenciación celular a nivel glomerular.

Gas1 no se expresa en el túbulo proximal durante el desarrollo postnatal ni en el adulto, en condiciones normales.

Gas1 se expresa desde el DPN 1 en las células principales AQP2<sup>+</sup> del túbulo colector. No se expresa en todas las estructuras de la nefrona distal en los DPN 1, 3, 7, 10 y 14. A partir del DPN 21 su expresión es homogénea y se mantiene en todas las estructuras distales. La expresión de Gas1 en la nefrona distal incrementa conforme madura el riñón, sugiriendo un posible papel de Gas1 como marcador de estado de diferenciación celular en la nefrona distal.

Se evaluó la expresión de marcadores de células progenitoras renales NCAM<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup> en las diferentes secciones de la nefrona encontrando que disminuye conforme madura el riñón, sugiriendo una relación inversa entre la expresión de Gas1 y NCAM/CD24, y un posible papel regulador de Gas1 en las CPR.

## **Perspectiva**

- ⊙ Conocer el posible papel funcional de Gas1 a nivel de la nefrona distal y el glomérulo durante la maduración renal en la rata sana.
- ⊙ Conocer si existe algún cambio en el patrón de expresión de Gas1 en presencia de un daño renal durante la maduración renal en la rata.

## Bibliografía

1. Arreola-Mendoza L, Del Razo LM, Mendoza-Garrido ME, Martin D, Namorado MC, Calderon-Salinas JV, et al. The protective effect of alpha-tocopherol against dichromate-induced renal tight junction damage is mediated via ERK1/2. *Toxicology letters*. 2009;191(2-3):279-88.
2. Escalante-Gómez, Carlos, Zeledón-Sánchez, Fernando, & Ulate-Montero, Guido. (2007). Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada. *Acta Médica Costarricense*, 49(2), 83-89.
3. Hervey GR. Determination of creatinine by the Jaffe reaction. *Nature*. 1953;171(4364):1125.
4. Kann M, Bae E, Lenz MO, Li L, Trannguyen B, Schumacher VA, et al. WT1 targets Gas1 to maintain nephron progenitor cells by modulating FGF signals. *Development*. 2015;142(7):1254-66.
5. Little MH, McMahon AP. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(5).
6. Little M, Georgas K, Pennisi D, Wilkinson L. Kidney development: two tales of tubulogenesis. *Current topics in developmental biology*. 2010;90:193-229.
7. Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Developmental cell*. 2010;18(5):698-712.
8. Nigam, Aperia and Brenner. Development and maturation of the kidney. Chapter 2. 72-98.
9. Rizaldy P, Scott YM, Jordan Kreidberg and Susan E. Quaggin. Chapter 1: Embryology of the Kidney. Brenner and Recto'r The Kidney Tenth Edition. 2016:2-41.
10. Takasato M, Little MH. The origin of the mammalian kidney: implications for recreating the kidney in vitro. *Development*. 2015;142(11):1937-47.
11. Dong L, Pietsch S, Englert C. Towards an understanding of kidney diseases associated with WT1 mutations. *Kidney international*. 2015;88(4):684-90.

12. Vainio S, Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(7):533-43.
13. Reyes JL, Melendez E. Effects of eicosanoids on the water and sodium balance of the neonate. *Pediatric nephrology*. 1990;4(6):630-4.
14. Sweeney DE, Vallon V, Rieg T, Wu W, Gallegos TF, Nigam SK. Functional maturation of drug transporters in the developing, neonatal, and postnatal kidney. *Molecular pharmacology*. 2011;80(1):147-54.
15. Kreidberg JA. WT1 and kidney progenitor cells. *Organogenesis*. 2010;6(2):61-70.
16. Kann M, Bae E, Lenz MO, Li L, Trannguyen B, Schumacher VA, et al. WT1 targets Gas1 to maintain nephron progenitor cells by modulating FGF signals. *Development*. 2015;142(7):1254-66.
17. Spagnuolo R, Corada M, Orsenigo F, Zanetta L, Deuschle U, Sandy P, et al. Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis. *Blood*. 2004;103(8):3005-12.
18. Schueler-Furman O, Glick E, Segovia J, Linial M. Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands? *Trends in pharmacological sciences*. 2006;27(2):72-7.
19. Dominguez-Monzon G, Gonzalez-Ramirez R, Segovia J. Molecular Mechanisms of Action of Gas1 and its Possible Therapeutic Applications. *Curr Signal Transd T*. 2011;6(1):106-12.
20. Lopez-Ramirez MA, Dominguez-Monzon G, Vergara P, Segovia J. Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signaling. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2008;26(5):497-503.
21. van Roeyen CR, Zok S, Pruessmeyer J, Boor P, Nagayama Y, Fleckenstein S, et al. Growth arrest-specific protein 1 is a novel endogenous inhibitor of glomerular cell activation and proliferation. *Kidney international*. 2013;83(2):251-63.
22. Zhang L, He S, Guo S, Xie W, Xin R, Yu H, et al. Down-regulation of miR-34a alleviates mesangial proliferation in vitro and glomerular hypertrophy in early diabetic nephropathy mice by targeting GAS1. *Journal of diabetes and its complications*. 2014;28(3):259-64.

23. Luna Antonio B. Activación de células parietales de la cápsula de Bowman por disminución en la expresión de la proteína GAS1 en diabetes murina. Tesis de Maestría. 2014.
24. Neiss WF, Klehn KL. The postnatal development of the rat kidney, with special reference to the chemodifferentiation of the proximal tubule. *Histochemistry*. 1981;73(2):251-68.
25. Colomba Norero V, Andrés Maturana P. Fisiología renal en el recién nacido. *Rev. Chil. Pediatr*. 65 (4); 234-240, 1994
26. Rodríguez- Soriano J. Maduración del Riñón Neonatal. En su *Nefrología Pediátrica*. Ed Mosby/Doyma, México: 1996: 348.
27. J. J. Navas Palacios, B. Encabo Mayoral. Estructura renal. En su: *Tratado de Nefrología*. Editorial Ciencias Médicas, 1994: 1- 18.
28. Oh W. Funciones renales y trastornos clínicos en el neonato. *Clin Perinat* 1981; 8 (2): 215.
29. Álvarez J. Trastornos renales frecuentes en el recién nacido: En Tapia JL, Santiago de Chile. Editorial Mediterráneo, 1995: 456-65.
30. Pedraza A M, Gastelbondo R. Función renal en neonatos a término y preterminos. *Pediatría* 1995; 30 (3); 192.
31. Hohenstein P, Pritchard-Jones K, Charlton J. The yin and yang of kidney development and Wilms' tumors. *Genes & development*. 2015;29(5):467-82.
32. Rosti K, Goldman A, Kajander T. Solution structure and biophysical characterization of the multifaceted signalling effector protein growth arrest specific-1. *BMC biochemistry*. 2015;16:8.
33. Oliver JA, Klinakis A, Cheema FH, Friedlander J, Sampogna RV, Martens TP, et al. Proliferation and migration of label-retaining cells of the kidney papilla. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20(11):2315-27.
34. Li J, Ariunbold U, Suhaimi N, Sunn N, Guo J, McMahan JA, et al. Collecting duct-derived cells display mesenchymal stem cell properties and retain selective in vitro and in vivo epithelial capacity. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015;26(1):81-94.

35. Lee KK, Leung AK, Tang MK, Cai DQ, Schneider C, Brancolini C, et al. Functions of the growth arrest specific 1 gene in the development of the mouse embryo. *Developmental biology*. 2001;234(1):188-203.
36. Borge, M. J. N. Funciones tubulares. Retrieved October 26, 2016, from OCW Universidad de Cantabria. Tema 3. 2011, May 18.
37. Bonnet F, Tikellis C, Kawachi H, Burns WC, Wookey PJ, Cao Z, et al. Nephric expression in the post-natal developing kidney in normotensive and hypertensive rats. *Clinical and experimental hypertension*. 2002;24(5):371-81.