



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

**Evaluación *in vivo* del daño tubular distal por la
exposición a cadmio**

T E S I S

Que presenta:

QFB. Ana Karen Pantaleón Gómez

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE
TOXICOLOGÍA**

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. Tania Libertad Jacobo Estrada

Dr. Olivier Christophe Barbier

Ciudad de México

Septiembre, 2020

Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Tania Libertad Jacobo Estrada y del Dr. Olivier Christophe Barbier. Con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca con número de registro 934198 y el proyecto CONACyT número 267755.

Resumen

El cadmio (Cd) es un metal nefrotóxico que causa daño celular a nivel del túbulo proximal (TP); sin embargo, un estudio reciente realizado *in vitro*, sugiere que este metal puede ingresar en el túbulo distal (TD) mediante la reabsorción del complejo cadmio-metalotioneína (CdMT) y que el TD también podría ser blanco de su toxicidad. Por ello, nuestro objetivo fue determinar si la exposición a cadmio podría inducir daño sobre el TD en un modelo *in vivo* de ratones expuestos a este metal.

Ratones macho de la línea C57BL/6J de entre 8-12 semanas de edad fueron administrados intraperitonealmente con 0.38, 0.76, 1.53, 2.14, 2.75, 3, 3.98 y 6.13 mg Cd/kg/día por 7 días. Se registró diariamente el peso de los animales y una vez finalizado el tratamiento, 24 horas después se colectaron muestras de plasma y de tejido renal. Posteriormente, se determinó la concentración de creatinina plasmática a través del método de Jaffé y la expresión tisular de biomarcadores de daño (nefrina y calbindina D_{28K}) por Western Blot.

De los 8 grupos de animales expuestos a cadmio, los grupos de 3.98 y 6.13 mg Cd/kg/día murieron antes de finalizar el tratamiento. El grupo administrado con 2.75 mg Cd/kg/día disminuyó significativamente su peso comparado contra el grupo control y el resto de los grupos no mostraron diferencia estadísticamente significativa comparado al grupo control. Con respecto a los biomarcadores de daño renal, no se modificaron ni los niveles plasmáticos de creatinina ni la expresión de nefrina, confirmando la ausencia de daño glomerular. Al evaluar el biomarcador específico de daño distal, calbindina D_{28K} , se pudo observar una disminución significativa a la dosis de 2.75 mg Cd/kg/día con respecto al grupo control, evidenciando un daño en el TD. En conclusión, la exposición a 2.75 mg Cd/kg/día durante 7 días ocasionó un daño en el TD de las nefronas de los ratones expuestos.

Estos resultados son de suma importancia ya que demuestran que el TD también puede verse afectado por la exposición a cadmio abriendo nuevas alternativas del modo de acción de la exposición a cadmio. Las alteraciones distales podrían tener consecuencias sobre la regulación fina de la homeostasis de cationes como el potasio o el calcio o en la regulación de la presión arterial a través de otro modo de acción acción como los receptores ATR1/2, por ejemplo.

Abstract

Cadmium (Cd) as a metal known nephrotoxic agent, causing cellular damage at proximal tubule level (PT); however, a recent study *in vitro* suggests that this metal can enter distal tubules (DT) by reabsorbing the cadmium-metlothionein complex (CdMT) and that DT could also be a target of its toxicity. Therefore, our objective was to determine if the exposure to cadmium could induce damage to DT in a model of mice exposed to this metal.

Male mice of the strain C57BL / 6J between 8-12 weeks of age, were intraperitoneally administered with 0.38, 0.76, 1.53, 2.14, 2.75, 3, 3.98 y 6.13 mg Cd/kg/day for 7 days. The weight of the animals was recorded daily and once the treatment was finished, 24 hours later plasma and kidney tissue samples were collected. Subsequently, plasma creatinine concentration was determined through the method of Jaffe and the protein expression of biomarkers of kidney damage (nephrin and calbindin D_{28K}) were assessed by Western Blot.

Of the 8 groups of animals exposed to cadmium, the groups exposed to 3.98 and 6.13 mg Cd/kg/day died before ending the treatment. The group administered with 2.75 mg Cd/kg/day significantly decreased their weight compared to the control group and the rest of the groups did not showed statistically significant difference with respect to the control group. Regarding the biomarkers of kidney damage, neither plasma creatinine levels nor nephrin expression were modified, confirming the absence of glomerular damage. When evaluating the specific biomarker of distal damage, calbindin D_{28K} , a significant decrease at the dose of 2.75 mg Cd/kg/day was observed compared with the control group, evidencing damage in the DT. In conclusion, exposure to 2.75 mg Cd/kg/day for 7 days caused damage to the DT of the nephrons of the exposed mice.

These results are of importance because demonstrate that the DT can also be affected by cadmium exposure. These distal alterations could have consequences on the fine regulation of homeostasis of cations, such potassium or calcium, or on the regulation of blood pressure through other mode of action as ATR1 / 2 receptors, for example.

Dedicatoria

Dedicada a mis padres, Briseida y Cris...

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), por el apoyo económico y la infraestructura para la realización de la presente tesis.

A mis directores de tesis, la Dra. Tania Libertad Jacobo Estrada y el Dr. Olivier Christophe Barbier, por brindarme la oportunidad de trabajar juntos, por su enseñanza, por su orientación durante el desarrollo de este trabajo, por su confianza, el tiempo y apoyo incondicional brindado durante la realización de este trabajo.

A mis asesores, la Dra. María de la Luz Del Razo Jiménez y el Dr. Fanis Missirlis, por sus valiosos comentarios, críticas constructivas y el tiempo otorgado para la revisión de esta tesis.

Al MVZ. Rafael Leyva Muñoz, por el apoyo brindado durante la realización del trabajo experimental.

A la QBP. Juana Narvárez Morales por el apoyo técnico brindado para la realización de este trabajo.

Nuevamente al Dr. Olivier y a los integrantes del Laboratorio 25, Juanita, Pamela, Esaú, Manolo, Jesica y Juan por haberme formado parte de este gran equipo. Un agradecimiento muy especial a Pame y Esaú, por haberme brindado su amistad, apoyo incondicional, por alentarme cuando lo necesitaba, fue un gusto haberlos conocido. Pame, gracias por iluminarme con tu sabiduría milenaria en el Western Blot, llegaste cuando más lo necesitaba!

Finalmente, el agradecimiento más grande es para mis padres, hermanas, hermano y sag; por ser mi fuente de inspiración, muchos de mis logros incluyendo este se los dedico a ustedes.

Índice general

Resumen	v
Abstract	vii
Índice de figuras	xv
Índice de tablas	xvii
Abreviaturas	xix
1. Introducción	1
1.1. Cadmio	1
1.1.1. Efectos a la salud	2
1.1.2. Límites de exposición	3
1.1.3. Toxicocinética y toxicodinamia	4
1.2. Metalotioneína	5
1.2.1. Regulación génica de la metalotioneína	7
1.3. Anatomía y fisiología renal	8
1.3.1. Nefrona	8
1.3.2. Receptores para metalotioneína	12
1.3.3. Marcadores de daño renal	15
1.4. Antecedentes directos	18
1.5. Justificación	20
1.6. Hipótesis	21
1.7. Objetivos	21

1.7.1. Objetivo general	21
1.7.2. Objetivos particulares	21
2. Métodos	23
2.1. Equipos	23
2.2. Materiales	23
2.3. Reactivos	24
2.4. Estrategia experimental	26
2.4.1. Animales de experimentación	26
2.5. Determinación de niveles plasmáticos de creatinina	27
2.5.1. Principio	27
2.5.2. Procedimiento	27
2.6. Semi cuantificación de nefrina y calbindina D_{28K} mediante Western Blot	28
2.6.1. Principio	28
2.6.2. Procedimiento	28
2.7. Análisis estadístico	30
3. Resultados	31
3.1. Estado general de los animales de experimentación	31
3.1.1. Comportamiento de los ratones durante la exposición a cadmio	31
3.1.2. Peso corporal de los animales	31
3.2. Efecto de la exposición con cadmio sobre marcadores de daño renal	33
3.2.1. Concentración de creatinina plasmática	33
3.2.2. Detección de nefrina	34
3.2.3. Semi cuantificación de calbindina D_{28K}	35
4. Discusión	37
4.1. Estado general de los animales de experimentación	38
4.2. Efecto del tratamiento con cadmio sobre marcadores de daño renal	39
5. Conclusión	45

6. Perspectivas

47

Bibliografía

49

Índice de figuras

1.1. Toxicodinamia del cadmio [52].	6
1.2. Regulación génica de la metalotioneína [58].	7
1.3. Anatomía renal. (A) Esquema de la superficie de un riñón cortado longitudinalmente. (B) Esquema de la nefrona. CCD, ducto colector cortical; CNT, túbulo conector; CTAL, rama ascendente gruesa cortical; DCT, túbulo contorneado distal; <i>IMCD_i</i> , porción inicial del ducto colector medular interno; <i>IMCD_t</i> , porción terminal del ducto colector medular interno; MTAL, rama ascendente gruesa medular; OMCD, ducto colector medular externo; PCT, túbulo contorneado proximal; PST, túbulo recto proximal; TL, rama delgada del asa de Henle [7].	9
1.4. Estructura del complejo MegaCUBAM [13].	14
1.5. Endocitosis de la albúmina. A) Las dos fotomicrografías muestran la localización endosomal de la albúmina - FITC después de 15 min de incubación y los productos de degradación después de los 120 min en células renales de zarigüeya. EEV, vesícula endocítica temprana; SE, división endosomal; LE, endosoma tardío; RE, reciclamiento del endosoma; LY, lisosoma. B) Esquema del complejo megalina - cubilina en la membrana apical, se indica la región NPXY, encargada de la señalización para la formación del endosoma. C) Componentes que contribuyen a la acidificación vesicular [20].	15

1.6. Representación esquemática de los mecanismos putativos involucrados en la captura luminal de cadmio. En el túbulo proximal, muchos transportadores de metales esenciales como transportadores de zinc (ejemplo: ZIP 8) pueden estar involucrados en la captura de las formas libres de cadmio. Reabsorción del cadmio conjugado con la metalotioneína (CdMT) por endocitosis a través del receptor megaCUBAM [4].	18
3.1. Área bajo la curva del peso corporal de los ratones C57BL/6J durante los 7 días de tratamiento con cadmio. Los datos se presentan como la media \pm SD (n=5, excepto para la dosis de 3 mg Cd/kg/día (n=3)). ANOVA de 1 vía y test de Dunnett como prueba post hoc. * * $p < 0,005$ vs el control. Los animales de los grupos correspondientes a las dosis de 3.98 y 6.13 mg Cd/kg/día murieron antes de finalizar el tratamiento.	32
3.2. Concentración de creatinina plasmática en ratones C57BL/6J tratados con cadmio por 7 días. Los datos se presentan como la media \pm SD (n= 3-5). ANOVA de 1 vía. $p=0.32$	33
3.3. Detección de las bandas de expresión de nefrina en tejido renal de ratones C57BL/6J tratados con cadmio durante 7 días. Inmunoblot representativo de nefrina y β actina, n= 2.	34
3.4. Semi cuantificación de la proteína calbindina D_{28K} en tejido renal de ratones C57BL/6J tratados con cadmio durante 7 días. (a) Análisis densitométrico de las bandas de expresión de calbindina D_{28K} normalizada con la expresión de β actina. Los datos se presentan como la media \pm SD (n= 4-5). ANOVA de 1 vía y test de Dunnett como prueba post hoc.*** $p = 0.0004$. (b) Inmunoblot representativo de calbindina D_{28K} y β actina.	35

Índice de tablas

1.1. Concentración (mg/kg) de cadmio en polvos de la calle reportados para distintos países [17].	2
1.2. Clasificación de las tubulopatías según la zona de la nefrona afectada [19]. . .	3

Abreviaturas

MT	Metalotioneína
CdMT	Complejo cadmio metalotioneína
MegaCUBAM	Receptor megalina:cubilina:amnionless
TP	Túbulo proximal
TD	Túbulo distal
DC	Ducto colector
DMT1	Transportador 1 de metales divalentes
24p3R	Receptor 24p3
aa	Aminoácidos
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
GSH	Glutación reducido
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
RME	Endocitosis mediada por receptores
$25(OH)D_3$	25 - hidroxivitamina D_3
$1,25(OH)_2D_3$	1,25 - dihidroxivitamina D_3
DBP	Proteína de unión a la vitamina D

1. Introducción

1.1. Cadmio

El cadmio es un metal que se encuentra de forma natural en la corteza terrestre, por lo general, no se encuentra en el ambiente como un metal puro, sino como un mineral combinado con otros elementos como el oxígeno (óxido de cadmio), el cloro (cloruro de cadmio) o el azufre (sulfato o sulfuro de cadmio), siendo el cloruro y el sulfato las formas que más fácilmente se disuelven en agua.

El cadmio se puede obtener como subproducto de los concentrados de Zn^{2+} , por medio del reciclaje de pilas, desechos de aleaciones de Cd-Cu y en la industria es producido durante la extracción de otros metales como Pb^{2+} y Cu^{2+} [3].

Generalmente el cadmio se presenta en el ambiente en concentraciones bajas, sin embargo, la actividad humana ha hecho que estos niveles incrementen. La exposición a cadmio ocurre por la actividad volcánica, consumo de tabaco, incineración de basura municipal (especialmente plásticos y baterías), fabricación y uso de fertilizantes, ingesta de alimentos contaminados con este metal, etc [32].

Uno de los problemas ambientales que se presentan en las zonas urbanas como la Ciudad de México es la contaminación debida a metales tóxicos como el cadmio. Estos metales se encuentran distribuidos en el aire, el suelo y el agua, sin embargo, en zonas urbanas, las principales fuentes de exposición la presentan los metales asociados a las partículas. Las partículas pueden presentarse como: aerosoles, polvos depositados en las calles, avenidas y estacionamientos.

Un estudio realizado por Flores y colaboradores (2002) reportó concentraciones elevadas de cadmio (0.33 - 4.65 mg/kg) en polvos de la calle de las alcaldías Azcapotzalco, Venustiano Carranza y Cuauhtémoc. De igual manera, en otras ciudades del mundo se han reportado diferentes concentraciones de cadmio en el polvo de las calles (Tabla. 1.1) [17].

País	Ciudad	Cadmio(mg/kg)	Referencia
México	CDMX	0.33 - 4.65	Flores y cols., 2002
Francia	Burdeos	4.8	Colandini y cols., 1995
Noruega	Oslo	1.4	De Miguel y cols., 1997
Suecia	Lulea	0.23	Viklander,1998

Tabla 1.1. Concentración (mg/kg) de cadmio en polvos de la calle reportados para distintos países [17].

En un estudio llevado a cabo entre mayo y junio de 2009 en la Ciudad de México, se encontró que la concentración de cadmio en PM_{10} fue de $37.2 \text{ ng}/m^3$ y en $PM_{2,5}$ fue de $35.7 \text{ ng}/m^3$ [25].

1.1.1. Efectos a la salud

El cadmio está clasificado como carcinógeno humano y ejerce efectos tóxicos sobre un gran número de sistemas: esquelético, nervioso central, hepático, cardiovascular, respiratorio, reproductivo y en el sistema urinario, del cual tiende acumularse en los riñones y puede llevar a disfunción tubular renal ya sea aguda o crónica [30, 33].

Las enfermedades del túbulo renal se caracterizan por alteraciones específicas de la función tubular, sin disminución primaria del filtrado glomerular (FG). La composición del ultrafiltrado glomerular se modifica a su paso por los túbulos renales mediante complejos mecanismos de reabsorción y secreción para su transformación en orina. En la parte proximal de la nefrona, se produce la reabsorción del mayor porcentaje de agua y solutos filtrados, mientras que en la parte distal de la nefrona tiene lugar el ajuste final de la excreción de estas sustancias, de la osmolaridad urinaria y la regulación del equilibrio ácido-base.

Las tubulopatías se pueden clasificar en :

- 1) Simples y complejas, según se altere uno o varios mecanismos de transporte tubular.
- 2) Primarias (congénitas) y secundarias (derivado de la exposición a tóxicos o por enfermedades sistémicas).

Otra clasificación útil desde el punto de vista didáctico es la que diferencia las anomalías en 3 grupos según la localización del daño en la nefrona (Tabla. 1.2) [19].

Zona de la nefrona afectada	Enfermedad
Túbulo proximal	Síndrome de Fanconi, acidosis tubular renal proximal, glucosuria renal, aminoacidurias y cistinosis.
Asa de Henle	Síndrome de Bartter y síndrome de Gitelman.
Túbulo distal	Acidosis tubular renal distal, síndrome de Bartter, acidosis tubular renal hipercaliémica y síndrome de Gitelman.

Tabla 1.2. Clasificación de las tubulopatías según la zona de la nefrona afectada [19].

A continuación, se describen algunas de las enfermedades más representativas:

Síndrome de Toni-Debré-Fanconi (tubulopatía proximal)

Consiste en una disfunción generalizada del túbulo proximal (TP) que determina aumento de la excreción urinaria de fosfato, bicarbonato, sodio, potasio, aminoácidos, proteínas de bajo peso molecular y glucosa. Se manifiesta, por tanto, clínicamente como glucosuria con poliuria, acidosis, deshidratación, hipopotasemia, hipofosfatemia y debilidad muscular. De acuerdo con su etiología, este síndrome puede ser de origen genético o adquirido; ya sea por trasplante renal, asociado a medicamentos (tetraciclinas, aminoglucósidos y ácido valproico) y tóxicos como los metales pesados entre los que encontramos al mercurio, uranio, plomo, cadmio y platino [19].

Síndrome de Gitelman (tubulopatía distal)

El síndrome de Gitelman es una tubulopatía de herencia autosómica recesiva en el que la alteración fundamental se halla en el túbulo distal, concretamente a nivel del cotransportador de Na-Cl sensible a tiazidas (NCC). Este síndrome se manifiesta clínicamente como hipocalemia, hipocalciuria e hipomagnesemia y una presión arterial baja. Su diagnóstico puede demorarse hasta la edad adulta, ya que los afectados pueden mantenerse asintomáticos durante largos períodos de tiempo [44].

1.1.2. Límites de exposición

De acuerdo con la guía establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre los límites de exposición al cadmio, la ingesta oral diaria debe ser máximo de 35 μg , en el agua de bebida debe ser máximo de 3 $\mu\text{g}/\text{L}$ y en el aire debe ser máximo de 5 ng/m^3 (promedio anual)[77, 73, 74, 76]. En México, la NOM-127-SSA1-1994 establece que el límite máximo

permisible de exposición a cadmio a través del agua para uso y consumo humano es de 0.005 ppm mientras que para productos derivados del mar, la NOM-031-SSA1-1993 establece un límite máximo permisible de 0.5 ppm [48, 50].

1.1.3. Toxicocinética y toxicodinamia

El cadmio puede ser absorbido por inhalación, vía oral o dérmica; sin embargo, se absorbe con mayor eficiencia por los pulmones (25-60 %) que por el tracto gastrointestinal (5-10 %) y la absorción vía dérmica es insignificante. Una vez en el organismo, este metal pasa al torrente sanguíneo formando complejos con diferentes proteínas como la albúmina, la metalotioneína (MT) y el glutatión reducido (GSH), ya que tiene alta afinidad por los grupos sulfhidrilos de las cisteínas [3]. Cabe destacar que el complejo cadmio-metalotioneína (CdMT) es la forma predominante del cadmio en circulación [22, 78].

El cadmio se distribuye ampliamente en el cuerpo (riñón, pulmones, huesos, intestino, hígado, páncreas y próstata), teniendo la mayor concentración corporal en el hígado y en el riñón; lo cual es relativamente independiente de la ruta de exposición. Además, las concentraciones de cadmio en ambos órganos son comparables después de una exposición corta; sin embargo, la concentración en los riñones excede la concentración en el hígado tras la exposición prolongada, debido a la redistribución hígado-riñón (ver apartado 1.2) [3, 82].

El $t_{1/2}$ para el cadmio en el riñón humano es de 6-38 años y el tiempo de vida media biológica en humanos es de 10-35 años [3, 38]. En el ratón, el $t_{1/2}$ estimado para el cadmio en el riñón tras una administración subcutánea de $CdCl_2$ es de 2.7 años y de 1.1 años tras una administración oral [45].

El cadmio no es metabolizado, siendo su forma iónica la que produce los efectos tóxicos. La principal ruta de excreción del cadmio es la orina como complejo CdMT, aunque también puede ser excretado en heces como cadmio- glutatión y en cabello y sudor como cadmio; cabe mencionar que la excreción del cadmio es limitada (<0.1 %) [66, 75].

1.2. Metalotioneína

Las metalotioneínas (MT) son una familia de proteínas con bajo peso molecular (6-7 kDa) localizadas en el citoplasma, ricas en cisteínas, termoestables y ubicuas en los mamíferos. Las MT son capaces de unirse con alta afinidad a una serie de cationes, incluyendo Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} y otros metales de transición. Una molécula de apo-MT es capaz de unirse con 7-9 iones de Cd^{2+} o Zn^{2+} y esta unión puede durar hasta 3 días. La afinidad de unión de las MT a los iones metálicos es dependiente del metal. Así, la constante de afinidad estimada de la MT para el Zn^{2+} es de $10^{10} - 10^{11} M^{-1}$ y para el Cd^{2+} es de $10^{13} - 10^{14} M^{-1}$ mostrando que el complejo CdMT tiene de 100-1000 veces mayor estabilidad que el complejo ZnMT. Estos datos indican que metales con alta afinidad por la MT como el Cd^{2+} pueden desplazar al Zn^{2+} y otros metales con baja afinidad a partir del complejo metal-MT [58].

Las MT se encuentran en varios órganos como el hígado, riñón, bazo, páncreas, testículos, pulmón, intestino, cerebro y corazón. Un estudio realizado por Waalkes y Klaassen reportó los niveles de MT en varios órganos (páncreas, hígado, intestino y el riñón) posterior a la administración de varios metales (Cd, Hg, Ni, Zn, Cr, Fe, Pb y Mn) encontrando que los niveles de MT incrementaron notablemente después de la administración de Zn y Cd en cada uno de los órganos analizados [71].

Se han descrito cuatro isoformas de la MT: MT-1, MT-2, MT-3 y MT-4. Las MT-1 y 2 representan las formas mayoritarias que son inducibles por cadmio en varios órganos animales incluyendo humanos. La MT-3 está presente en el cerebro y en el tejido renal y no es inducible por cadmio y la MT-4 es expresada en queratinocitos [14, 46, 52].

Debido a su peso molecular bajo, el complejo CdMT es filtrado a través del glomérulo renal y reabsorbido en el túbulo proximal (TP) por endocitosis dependiente del receptor megaCUBAM [53]. La degradación de las MT se da principalmente en los lisosomas por la acción proteolítica de las enzimas catepsina B y/o catepsina L, sin embargo, también se lleva a cabo en el citosol por la acción de las proteasas solubles [58]. Al degradarse el complejo CdMT en los lisosomas, el cadmio se libera de la MT y se transporta hacia el citosol a través del transportador 1 de metales divalentes (DMT1); ya en citosol, el cadmio liberado induce la síntesis de MT y se une nuevamente a ella, formando así, un ciclo que conduce a la

acumulación de este metal en las células del TP (Figura. 1.1).

El cadmio en complejo no es tóxico, mientras que el metal libre puede generar toxicidad y es que a pesar de que el cadmio no puede donar o aceptar electrones, es decir, no puede generar reacciones de óxido-reducción, favorece la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Un mecanismo propuesto es el desplazamiento de iones metálicos esenciales tales como Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} de proteínas intracelulares como la MT y la ferritina, lo que conlleva, por ejemplo, a un incremento en la concentración citoplasmática de Fe^{2+} , el cual puede causar estrés oxidante debido a la producción de ROS a través de reacciones de Fenton [24, 52]. Además, el cadmio tiende a acumularse en la mitocondria inhibiendo la cadena respiratoria, resultando en la generación de ROS con la subsecuente liberación de citocromo C, causando la activación de caspasas y desencadenando la muerte celular [34]. También, el cadmio disminuye la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa [2].

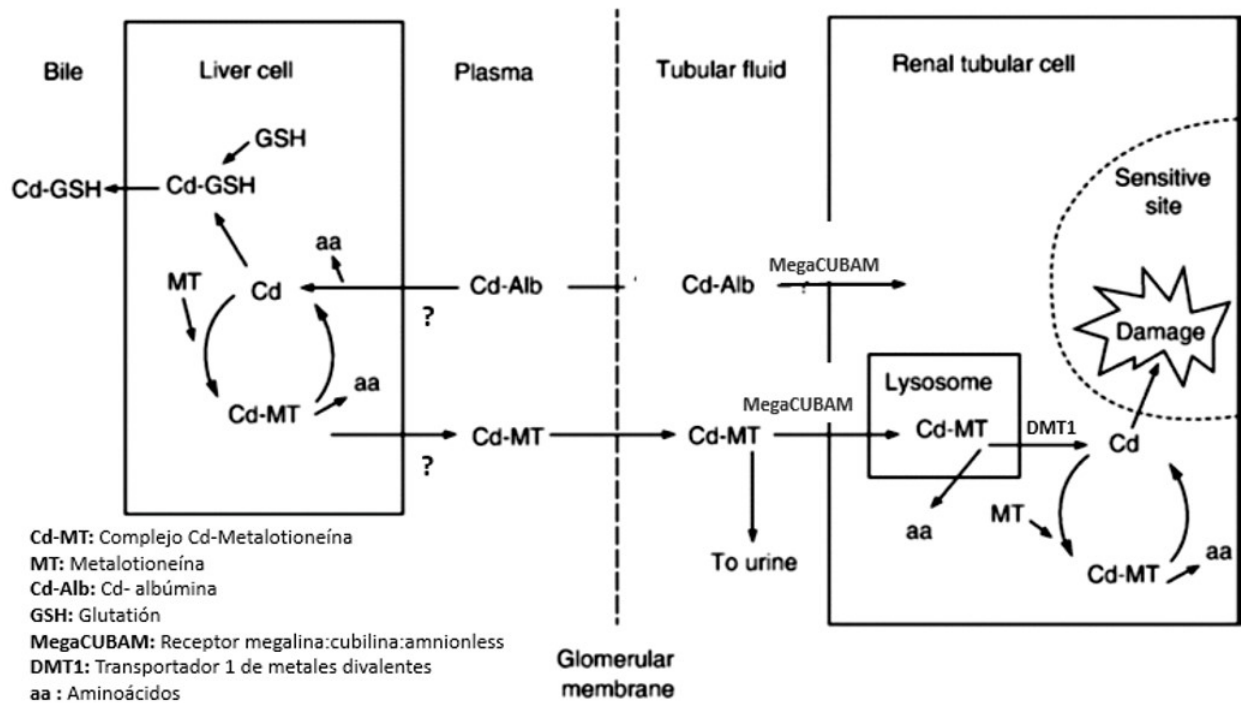


Figura 1.1. Toxicodinamia del cadmio [52].

1.2.1. Regulación génica de la metalotioneína

Las MT son inducibles por una gran variedad de estímulos como los metales pesados, las hormonas, citocinas, ROS, etc. La síntesis de las MT se regula por diversos elementos de respuesta que se encuentran en la región promotora del gen que codifica para las diferentes isoformas de la MT, dentro de estos elementos se incluyen: el elemento de respuesta a metales (MRE), el elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) y el elemento de respuesta antioxidante (ARE) [58].

El Zn^{2+} , pero no el cadmio, puede facilitar la unión del factor 1 de transcripción reguladora de metales (MTF-1) al MRE, activando de esta manera la transcripción del gen para la MT. De manera general, el Zn^{2+} se une a una apo-MTF-1 citoplasmática inactiva, induciendo su fosforilación y su posterior activación. El complejo activado se transloca al núcleo, donde se une al MRE y estimula la síntesis del mRNA para la MT. Palmiter sugirió que MTF-1 es inactivado por el inhibidor de MTF-1 (MTI) y que el cadmio puede activar a MTF-1 indirectamente, a través de la movilización del Zn^{2+} a partir de almacenes intracelulares (Figura. 1.2) [55].

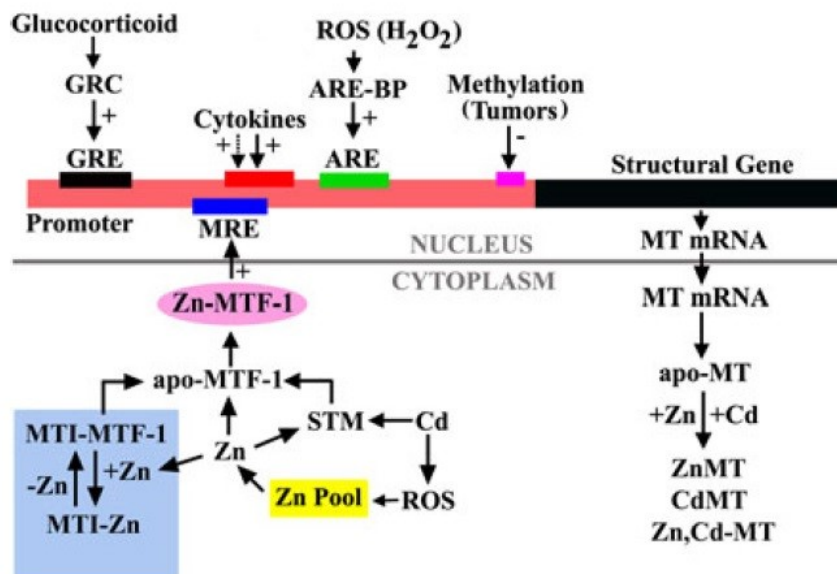


Figura 1.2. Regulación génica de la metalotioneína [58].

1.3. Anatomía y fisiología renal

Los riñones son los órganos centrales que se encargan de mantener la homeostasis corporal a través de la constante excreción de los desechos metabólicos, el exceso de agua y de solutos, así como de xenobióticos a través de la orina [67]. El agua filtrada y los solutos que todavía son necesarios para el cuerpo son eficientemente reciclados a la circulación por procesos de reabsorción en las secciones tubulares de las nefronas. Cerca de 180 L de filtrado primario son generados cada día para producir cerca de 1-3 L de orina; este dato indica que cerca del 99% del agua de la orina primaria es reabsorbida a lo largo de las nefronas [7].

Los riñones son dos órganos retroperitoneales situados en la parte posterior del abdomen a ambos lados de la columna vertebral. El peso de cada uno oscila entre 125-170 g en el hombre y entre 115-155 g en la mujer. En el ser humano miden de 11-12 cm de longitud, 5-7.5 cm de anchura y de 2.5-3 cm de grosor; al igual que en la mayoría de los mamíferos, cada riñón está irrigado por una única arterial renal. Al hemiseccionar un riñón longitudinalmente (Figura. 1.3), en la superficie de corte se pueden apreciar dos regiones distintas: una externa pálida (corteza) y otra interna oscura (médula). En el ser humano, la médula se divide en 8-18 pirámides renales, la base de cada una se sitúa en el límite corticomédular y su vértice se dirige hacia la pelvis renal, formando la papila. En la punta de cada papila se encuentran de 10 a 25 aberturas que representan los extremos distales de los tubos colectores (de Bellini). A diferencia del riñón humano, la rata y otros animales de experimentación poseen una sola pirámide renal, por lo que se les denomina *monopapilar*. Por lo demás, recuerdan al órgano del ser humano en su aspecto macroscópico. Finalmente, los uréteres se originan en la porción inferior de la pelvis renal y desembocan en la vejiga [7].

1.3.1. Nefrona

La unidad funcional del riñón es la nefrona, donde se realizan tres procesos simultáneos y continuos: filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción tubular. Cada riñón humano contiene unas $0.2 - 1.8 \times 10^6$ nefronas, lo que contrasta con las aproximadamente 2060 ± 92 nefronas presentes en un riñón de ratón adulto C57BL/6J [47]. Los componentes esenciales de la nefrona son (Figura. 1.3):

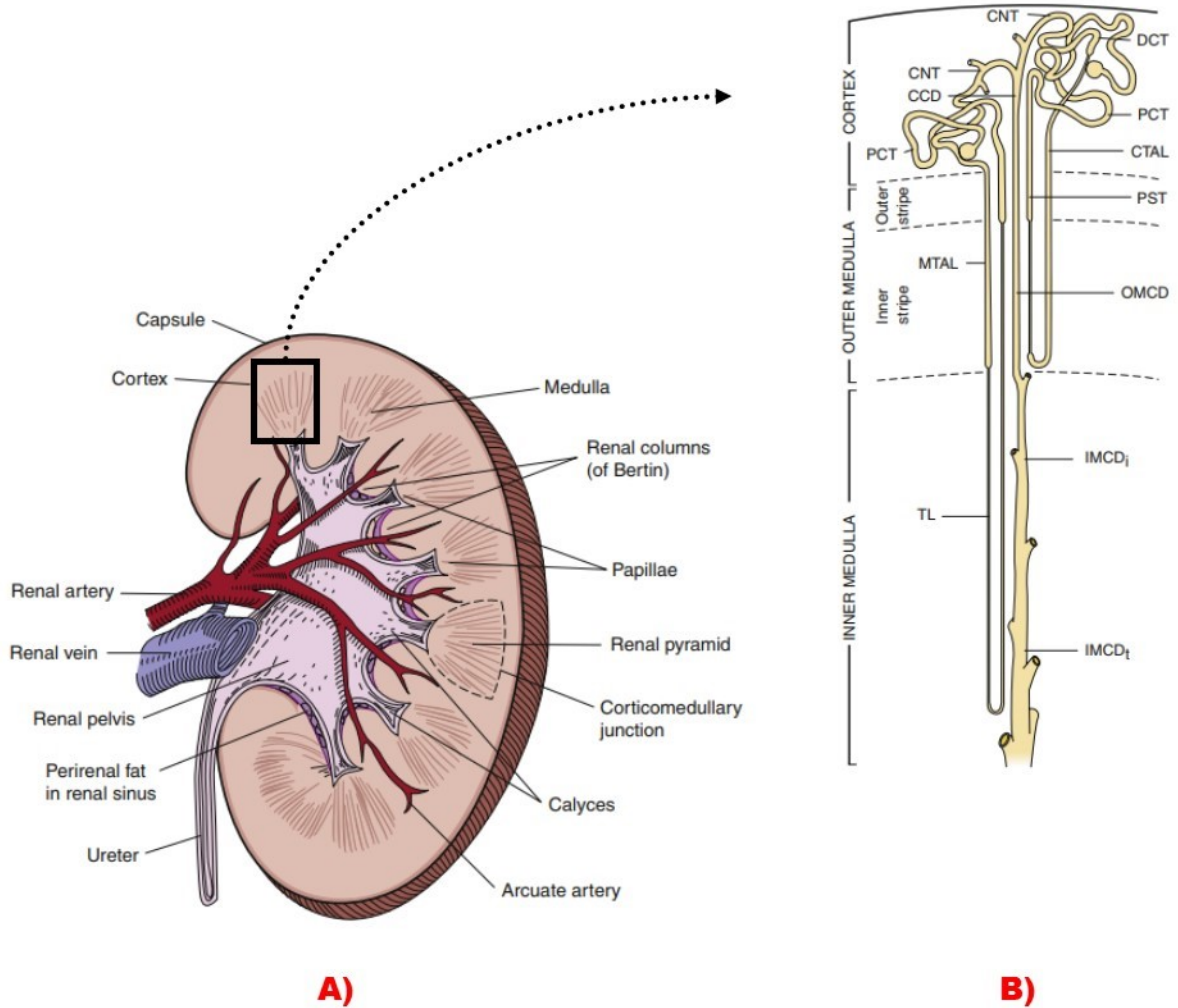


Figura 1.3. **Anatomía renal.** (A) Esquema de la superficie de un riñón cortado longitudinalmente. (B) Esquema de la nefrona. CCD, ducto colector cortical; CNT, túbulo conector; CTAL, rama ascendente gruesa cortical; DCT, túbulo contorneado distal; $IMCD_i$, porción inicial del ducto colector medular interno; $IMCD_t$, porción terminal del ducto colector medular interno; MTAL, rama ascendente gruesa medular; OMCD, ducto colector medular externo; PCT, túbulo contorneado proximal; PST, túbulo recto proximal; TL, rama delgada del asa de Henle [7].

El glomérulo

Consta de una red capilar revestida por una fina capa de células endoteliales, células mesangiales, podocitos en contacto con el espacio urinario [72] y la capa parietal de la cápsula de Bowman. El glomérulo es la unidad de filtración del riñón, donde los capilares glomerulares permiten el paso de una gran cantidad de agua (180 L/día en un riñón adulto) y solutos con un peso molecular menor a 80 kDa, un tamaño molecular menor a 42 ángstrom y con carga (catiónicos > neutrales > aniónicos), conservando la mayoría de las proteínas dentro de la circulación [7, 67].

El túbulo proximal

Está constituido de tres segmentos con morfologías diferentes, denominados S1, S2 y S3. El segmento S1 es la porción inicial del túbulo proximal (TP); comienza al terminar el glomérulo y constituye aproximadamente dos tercios de la porción contorneada; posee un borde en cepillo y un sistema endocítico-lisosómico bien desarrollado que participa en la reabsorción y degradación de las macromoléculas del ultrafiltrado. Además, cuenta con mitocondrias alargadas distribuidas por las inmediaciones de la membrana plasmática, una disposición característica de los epitelios que intervienen en el transporte activo de los iones.

El segmento S2 consta del resto de la porción contorneada y de la parte inicial de la porción recta; su estructura es semejante a la del segmento S1, sin embargo, el borde en cepillo es más delgado.

El segmento S3 lo forma la parte restante del TP; ocupa la corteza interna profunda y la banda externa de la médula externa; aún presenta borde en cepillo, pero el sistema endocítico-lisosómico destaca menos que en los segmentos S1 y S2 [7].

Aproximadamente la mitad del ultrafiltrado se reabsorbe a este nivel, reabsorbiéndose principalmente: Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} , agua y solutos orgánicos como la glucosa y aminoácidos (aa) [11]. Hoy en día, se acepta de forma casi unánime que la reabsorción de numerosas proteínas y polipéptidos en esta porción proximal se encuentra mediada por megalina: cubilina: amnionless (megaCUBAM), un receptor endocítico con múltiples ligandos.

El asa de Henle

Se localiza en la médula interna del riñón; el epitelio de la rama descendente del asa de Henle es permeable al agua pero apenas lo es al Na^+ , Cl^- y a la urea, esto permite la extracción del agua del líquido tubular a medida que la rama desciende, en cambio, la rama ascendente es altamente impermeable al agua pero muy permeable al Na^+ y al Cl^- [7].

El túbulo distal

Carece de un borde en cepillo bien desarrollado y del amplio sistema endocítico característico del túbulo proximal. El túbulo distal (TD) participa en la reabsorción de Ca^{2+} y posee la mayor actividad de la $Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATPasa$ de toda la nefrona [7].

El ducto colector

Se extiende desde el segmento conector en la corteza hasta la punta de la papila, pasando por la médula externa e interna, donde los segmentos medulares internos terminan como tubos colectores papilares o conductos de Bellini, que desembocan en la superficie de la papila para formar el área cribosa; el ducto colector (DC) participa en la acidificación de la orina, la cual parece ser la función primordial de este segmento.

También, el DC es requerido para la reabsorción de agua y generar pequeños volúmenes de orina concentrada “antidiuresis” preservando el agua corporal [7].

1.3.2. Receptores para metalotioneína

Receptor 24p3

Al receptor 24p3 se le denomina NGAL-R/hLCN2-R en humanos y 24p3R/mLCN2-R/rLCN2-R en ratón y rata. Pertenece a la familia de transportadores de iones orgánicos SLC22 y es una proteína transmembranal con un peso molecular de 60 kDa involucrada en el transporte de pequeñas moléculas cargadas o polares. Usualmente consiste en 12 segmentos transmembranales en forma de hélice organizados en 2 bloques de 6 segmentos transmembranales conectados por un loop intracelular, su dominio extracelular generalmente incluye de 2-3 sitios de N-glicosilación [8, 15].

Expresión y regulación

En el ratón, el receptor 24p3 se expresa en el corazón, pulmón, hígado, bazo, riñón, estómago, intestino delgado, timo y testículo [15]. En el riñón, el receptor 24p3 se expresa en la membrana apical de las células epiteliales del TD y el DC, mientras que en el glomérulo y en el TP no se expresa este receptor [41].

A pesar de que poco se sabe sobre la regulación fisiológica del receptor NGAL/24p3, parece que existe una co-regulación a la inversa entre el receptor 24p3 y su ligando (la proteína 24p3). En este sentido, Betten y colaboradores reportan que en células IMCD (células derivadas de la médula interna del ducto colector) bajo condiciones hiperosmóticas (600 mosmol/L) como las que se encuentran *in vivo* bajo condiciones fisiológicas, las células muestran una expresión incrementada del receptor 24p3 mientras que la expresión de la proteína 24p3 se encuentra disminuida. No obstante, cuando se producen cambios en la osmolaridad del medio (300 mosmol/L) o debido a la exposición a lipopolisacáridos se incrementa la expresión de la proteína 24p3 pero se disminuye la expresión del receptor 24p3, protegiendo de esta manera a las células contra el daño o muerte celular [5].

Receptor MegaCUBAM

Megalina

Es una proteína transmembranal con un peso molecular de aproximadamente 517 kDa que pertenece a la familia de los receptores de lipoproteínas de baja densidad. El receptor consiste en un dominio citoplasmático carboxilo terminal corto que tiene 2 secuencias asparagina - prolina - xaa - tirosina (Asn-Pro-xaa-Tyr), las cuales median la unión a proteínas adaptadoras y la formación de la vesícula endocítica (internalización mediada por clatrina), un solo dominio transmembranal y un dominio extracelular amino terminal que contiene 4 clústers ricos en cisteínas, los cuales constituyen las regiones de la unión al ligando, separadas por dominios homólogos a regiones del factor de crecimiento epidermal (EGF) entre los cuales encontramos repeticiones con una secuencia consenso del tetrapéptido tirosina - triptófano - treonina - ac. aspártico (Tyr-Trp-Thr-Asp), responsables de la liberación de ligandos, dependiente del pH. Algunos de los ligandos de este receptor son: proteínas unidas a vitaminas, proteínas acarreadoras, lipoproteínas, hormonas, fármacos, toxinas, enzimas, entre otros [12, 13].

Cubilina

Es una glicoproteína membranal periférica con un peso de aproximadamente 460 kDa. Su dominio amino terminal contiene un sitio de palmitoilación y una estructura α hélice anfipática, ambos contribuyen al anclaje del receptor en la membrana. La mayor parte del receptor está compuesto de dominios CUB (acrónimo para Clr/Clr, Uegf, y la proteína 1 morfogénica ósea) los cuales están involucrados con la unión al ligando. Algunos de los ligandos de este receptor son: proteínas acarreadoras, proteínas de unión a vitaminas y lipoproteínas [12, 13].

Amnionless

Amnionless (AMN) es una proteína transmembranal cuyo peso molecular es de 45 kDa, esta proteína interactúa con las regiones repetidas del factor de crecimiento epidérmico (EGF) presentes en cubilina, formando así el complejo endocítico CUBAM (cubilina-amnionless). La cubilina a través de su residuo 113 interactúa con megalina, conformando finalmente el complejo MegaCUBAM (Figura. 1.4) [18].

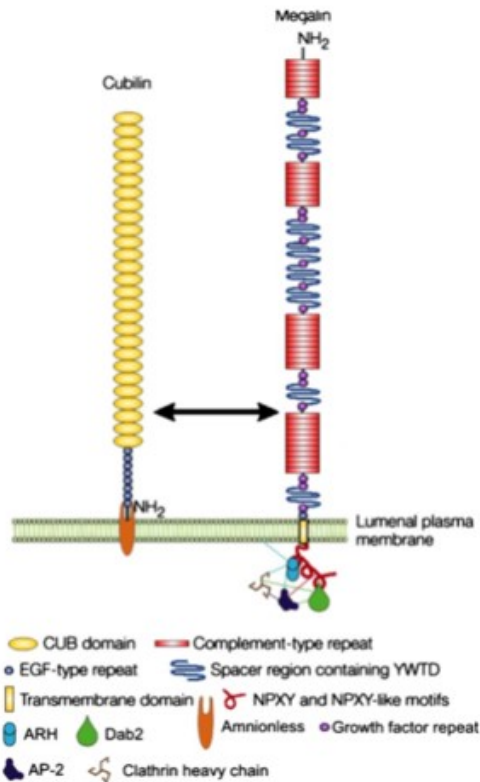


Figura 1.4. Estructura del complejo MegaCUBAM [13].

Proceso de endocitosis a través del receptor MegaCUBAM

La megalina y la cubilina son expresadas y co localizadas en el borde en cepillo del TP del riñón y en las vesículas endocíticas. El complejo ligando - receptor es internalizado por invaginación de la membrana plasmática por la unión de moléculas adaptadoras en los sitios Asn-Pro-xaa-Tyr de la cola citoplasmática del receptor. Posterior a la internalización, se disocian las invaginaciones de la membrana plasmática formando vesículas, donde el lumen intravesicular se acidifica provocando la disociación del ligando del receptor. La acidificación está a cargo de la H^+ - ATPasa vacuolar principalmente, aunque también participan canales de cloro e intercambiadores de sodio/protones. La vesícula se divide formando el lisosoma donde se encuentra el ligando y la otra parte donde se encuentra el receptor, el ligando es transportado en el lisosoma para su almacenamiento o degradación, mientras que el receptor es reciclado a la membrana luminal (Figura. 1.5) [12, 13, 18, 20].

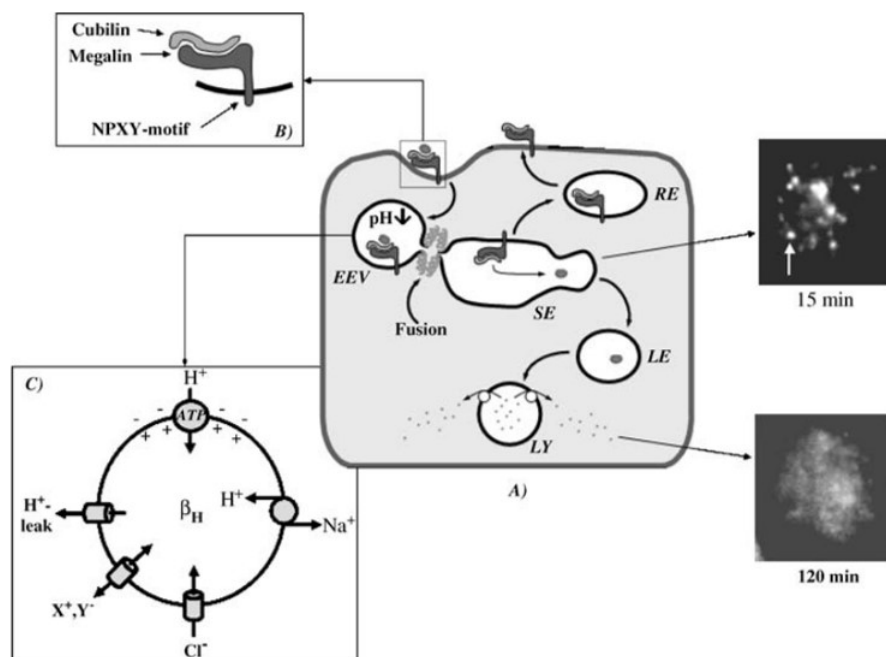


Figura 1.5. **Endocitosis de la albúmina.** A) Las dos fotomicrografías muestran la localización endosomal de la albúmina - FITC después de 15 min de incubación y los productos de degradación después de los 120 min en células renales de zarigüeya. EEV, vesícula endocítica temprana; SE, división endosomal; LE, endosoma tardío; RE, reciclamiento del endosoma; LY, lisosoma. B) Esquema del complejo megalina - cubilina en la membrana apical, se indica la región NPXY, encargada de la señalización para la formación del endosoma. C) Componentes que contribuyen a la acidificación vesicular [20].

A pesar de que un gran número de ligandos se unen a la megalina en comparación con la cubilina, ambos receptores son de suma importancia para la reabsorción de proteínas ya que tanto deficiencias en la megalina como en la cubilina, provocan un incremento en la excreción de proteínas [12, 13, 18, 20]. A la presencia de proteínas en la orina se le denomina proteinuria y es utilizado como un marcador de lesión renal, sin embargo, existen otros marcadores de daño renal.

1.3.3. Marcadores de daño renal

Creatinina

La creatinina deriva de una conversión no enzimática de creatina a fosfocreatina en el tejido muscular esquelético, posteriormente en el hígado la creatina sufre una metilación

del ácido guanidina aminoacético y se forma la creatinina [57]. Tiene un peso molecular de 113 Daltones (Da), es liberada dentro del plasma a una tasa constante y no circula unida a proteínas plasmáticas por lo que se filtra libremente por el glomérulo [29]. La creatinina es un marcador utilizado para determinar el daño a nivel glomerular debido a que bajo condiciones normales se filtra completamente y no se reabsorbe a nivel tubular. Si existe daño a nivel glomerular, la excreción de creatinina en la orina disminuirá y se irá acumulando en la sangre, aumentando así sus niveles plasmáticos [29, 57].

Nefrina

Es una proteína transmembranal con un peso molecular de 180 kDa y es modificada post traduccionalmente por N-glicosilación. Es de destacar que la adición de estos residuos de azúcar es crucial para el apropiado plegamiento y localización de nefrina en la membrana plasmática. Se expresa en los podocitos glomerulares, los cuales junto con las células endoteliales y la membrana basal glomerular forman la barrera de filtración glomerular. Consiste en dominios extracelulares que se alinean de un modo antiparalelo con dominios extracelulares de otras moléculas de nefrina proveniente de procesos interdigitados vecinos; esta alineación forma una especie de cierre que previene el escape de proteínas grandes hacia el espacio urinario. Así mismo, la nefrina contiene un motivo de fibronectina tipo 3 y un dominio citoplasmático con 8 sitios de fosforilación de tirosina que, una vez fosforilados, pueden actuar como sitios de unión a proteínas que contienen dominios SH_2 [21, 26, 28, 56, 72].

Actualmente, la microalbuminuria urinaria se usa como un indicador temprano de lesión glomerular, sin embargo, estudios llevados a cabo tanto en animales como en humanos, señalan que la nefrina se encuentra en la orina durante las fases iniciales de la lesión glomerular, inclusive antes de que se presente la albuminuria [35, 60, 81], lo que lo convierte en un importante biomarcador temprano de lesión glomerular.

Molécula de daño renal 1 (Kim-1)

Es una glicoproteína de membrana tipo 1 con dominios extracelulares tipo inmunoglobulina y mucina, además ha sido propuesto como marcador de daño y reparación.

Existen dos variantes de la proteína Kim-1: Kim-1a y Kim-1b, mientras que Kim-1a

se expresa principalmente en el hígado, Kim-1b se expresa principalmente en el riñón. La variante Kim-1b tiene un peso molecular de 104 kDa que bajo condiciones fisiológicas se expresa en niveles bajos; sin embargo, su expresión en las células epiteliales del TP aumenta tras una lesión renal ocasionada por agentes nefrotóxicos o después de una isquemia. En estudios preclínicos con diferentes modelos de daño renal, Kim-1 ha mostrado ser el marcador más temprano de daño renal cuando es comparado con los marcadores convencionales como creatinina, nitrógeno ureico en sangre (BUN), proteinuria, etc [31, 70].

Calbindina D_{28K}

Es una proteína de unión a 4 iones de Ca^{2+} dependiente de la 1,25-dihidroxitamina D_3 ($1,25(OH)_2D_3$), la cual es activada en el túbulo proximal e induce la transcripción de calbindina D_{28K} en el TD. Se han descrito 2 isoformas de esta proteína con un peso molecular de 9 KDa y 28 kDa respectivamente. La calbindina D_{9K} está presente en una variedad de tejidos, incluyendo hueso, útero, placenta, intestino, riñón y glándula pituitaria, mientras que calbindina D_{28K} se encuentra en el hueso, cerebro, páncreas, intestino, dientes y el riñón. En el riñón, calbindina D_{28K} se encuentra específicamente en el citosol de las células del túbulo distal y en el ducto colector [42, 79, 84].

Calbindina D_{28K} participa en el movimiento transcelular de Ca^{2+} , donde, una vez que el Ca^{2+} entra a la célula a través de los canales de calcio TRPV5 y TRPV6, se une a calbindina D_{28K} para excretarse al torrente sanguíneo a través de la bomba de calcio PMCA1b y el intercambiador Na^+ / Ca^{2+} (NCX1) presentes en la membrana basolateral; protegiendo a la célula contra niveles elevados de Ca^{2+} al amortiguar los niveles de Ca^{2+} citosólico [39, 40]. Cuando existe un daño a nivel de TD ocasionado por quimioterapias con cisplatino [65] o tras un procedimiento de litotricia extracorporeal por ondas de choque (LEOC) [64], los niveles urinarios de calbindina D_{28K} aumentan. Además, la correlación positiva entre las concentraciones de calbindina D_{28K} en suero y orina sugiere que esta proteína fluye directamente al torrente sanguíneo después del daño en el túbulo [64].

1.4. Antecedentes directos

De acuerdo con el modelo actual de nefrotoxicidad inducida por el cadmio, este metal se acumula particularmente en los segmentos S1 y S2 del TP [16]. Las células del TP son las más afectadas por el cadmio debido a que poseen transportadores y receptores donde el cadmio puede pasar en forma libre o como complejo CdMT utilizando diferentes mecanismos tales como: intercambio iónico y/o mimetismo molecular, a través de rutas paracelulares, transportadores de Zn^{2+} (como ZIP8) o Cu^{2+} , canales de Ca^{2+} y de manera particular, cuando el cadmio se encuentra unido a proteínas como la MT este complejo es reabsorbido por endocitosis dependiente del receptor megaCUBAM, cabe resaltar que este último mecanismo es la forma predominante por la cual el cadmio es reabsorbido en el riñón (Figura. 1.6) [4, 16, 53, 58].

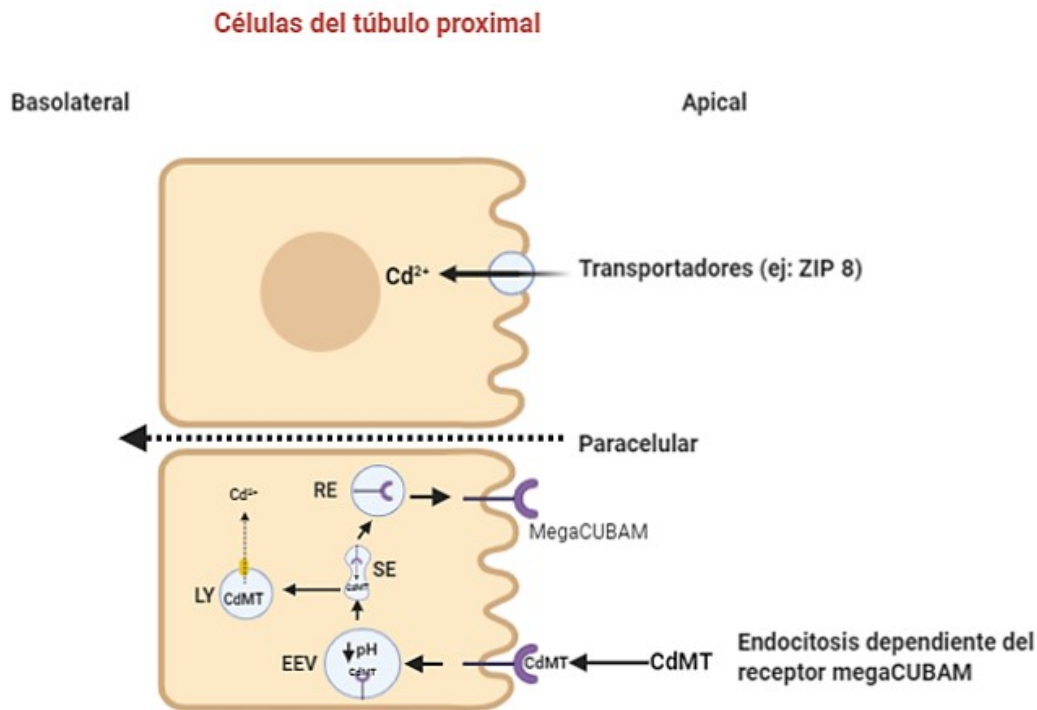


Figura 1.6. **Representación esquemática de los mecanismos putativos involucrados en la captura luminal de cadmio.** En el túbulo proximal, muchos transportadores de metales esenciales como transportadores de zinc (ejemplo: ZIP 8) pueden estar involucrados en la captura de las formas libres de cadmio. Reabsorción del cadmio conjugado con la metalotioneína (CdMT) por endocitosis a través del receptor megaCUBAM [4].

Actualmente es un dogma que ni el TD ni el DC tienen las características necesarias para la endocitosis mediada por receptores (RME) [67], no obstante, un estudio realizado recientemente por Thévenod y colaboradores [41] reportó que la concentración de MT en el ultrafiltrado es de $\sim 0.5-5$ nmol/L y su afinidad por el receptor megaCUBAM es muy baja ($\sim 100\ 000$ nmol/L) en comparación con otras proteínas como la transferrina (valor de la K_D igual a 20 nmol/L y una concentración en el filtrado glomerular de 2 nmol/L) o la albúmina (valor de la K_D igual a 630 nmol/L y una concentración en el filtrado glomerular de 53 nmol/L). Con base en lo anterior se sugiere que la transferrina y la albúmina tienen más oportunidad de acumularse en el TP que los complejos CdMT [67].

Células CHO (Chinese Hamster Ovary) transfectadas con el receptor 24p3 mostraron una endocitosis de la MT, transferrina y albúmina mediada por el receptor 24p3, siendo la MT quien mostró mayor captación por parte del receptor. Además, en células CHO transfectadas con el receptor 24p3, la co-localización de la Alexa Fluor 546-MT internalizada ($1.4\ \mu\text{M}$ por 18 h) con el marcador lisosomal catepsina L sugirió la endocitosis mediada por el receptor 24p3 y su subsecuente llegada a los lisosomas. De manera similar, la Alexa Fluor 546-MT ($2.8\ \mu\text{M}$ por 24 h) fue internalizada por las células mDCT209 (línea celular inmortalizada derivada del túbulo contorneado distal de riñón de ratón) quienes expresan al receptor 24p3 endógenamente. Aunado a lo anterior, tanto en las células CHO como las células mDCT209, la viabilidad celular cuantificada a través del ensayo de MTT mostró un decremento significativo en función de la concentración del complejo CdMT [41].

Adicionalmente, en células CHO y mDCT209, el complejo CdMT se co-incubó con una concentración de 500 pM de 24p3 (K_D para el receptor 24p3 de ~ 92 pM), dando como resultado una disminución significativa de la internalización del complejo CdMT y un aumento significativo de la viabilidad celular por la co- incubación con el ligando 24p3, lo cual fortaleció la hipótesis de la internalización del complejo CdMT a través del receptor 24p3 [41].

Estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo, indican que existe una mayor reabsorción del complejo CdMT en el segmento distal de la nefrona en ratas Wistar macho y ratones macho de la línea C57BL/6J después de inducir un daño en el TP tras la administración de gentamicina a una dosis de 10 mg/kg/día, vía sc durante 7 días [54, 83].

1.5. Justificación

El cadmio es un metal altamente tóxico que una vez dentro del organismo forma complejos con distintas proteínas como la metalotioneína debido a su elevada afinidad por los grupos sulfhidrilo. El complejo cadmio-metalotioneína (CdMT) es la forma predominante del cadmio en la circulación sanguínea, y éste es fácilmente filtrado por el glomérulo y reabsorbido en el túbulo proximal. Recientemente un estudio *in vitro* ha evidenciado la reabsorción de metalotioneína en el segmento distal de la nefrona, sugiriendo que el túbulo distal también podría ser blanco de toxicidad para el cadmio. Por lo tanto, fue de nuestro interés determinar si la exposición a cadmio era capaz de inducir daño sobre el túbulo distal en un modelo *in vivo*.

1.6. Hipótesis

La exposición a dosis repetidas de cadmio inducirá un daño en el túbulo distal de la nefrona evidenciado por un incremento de la expresión proteica de calbindina D_{28K} .

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición a dosis repetidas de cadmio sobre el túbulo distal en ratones macho de la línea C57BL/6J.

1.7.2. Objetivos particulares

- Evaluar la ganancia de peso en ratones macho de la línea C57BL/6J expuestos diariamente a distintas dosis de cadmio durante 7 días.
- Determinar los niveles plasmáticos de creatinina y la expresión tisular de la proteína nefrina para evaluar el daño glomerular en los ratones expuestos a cadmio.
- Evaluar el daño en el túbulo distal mediante la semi cuantificación de los niveles de expresión de la proteína calbindina D_{28K} en los ratones expuestos a cadmio.

2. Métodos

2.1. Equipos

Equipo	Marca, modelo
Balanza analítica	Denver Instrument, APX-200
Centrifuga refrigerada	Eppendorf, 5430R
Espectrofotómetro	Vital Scientific, Microlab 300
Lector de placas	Tecan, Infinite 200 Pro
Sistema de electroforesis y transferencia para western blot	Biorad, Mini protean Tetra
Sonicador	Sonics, Vibracell

2.2. Materiales

Material	Marca
Agitador	Apollo
Espátulas	Heathrow Scientific Stainless Steel Micro Spatulas
Jeringas	BD Ultra-Fine
Matraz aforado	Kimax
Papel filtro	Whatman
Pipetas automáticas	Eppendorf
Placas autoradiográficas	Fujifilm
Placas de 96 pozos	Corning
Portaobjetos	Velab
Probetas	Kimax
Selladora	American Int NL Electric
Tubos cónicos	Corning
Vasos de precipitado	Kimax

2.3. Reactivos

Reactivo	No. Catálogo	Marca
Acrilamida	161-0101	BioRad
Azul de bromofenol	B8026 %	Sigma Aldrich
2- mercaptoetanol	M7154-100ml	Sigma Aldrich
Buffer de fosfatos salina	D6662-10X1L	Sigma Aldrich
$CdCl_2$	6551-198-100G	Sigma Aldrich
COMPLETE	Ref 04 693 116 001	ROCHE
Creatinina	CR510	RANDOX
Dodecil sulfato de sodio	L3771-500G	Sigma Aldrich
EDTA	E-5134-500G	Sigma Aldrich
Glicina	G8898-1K	Sigma Aldrich
Leche descremada	Svelty	Nestle
Luminata	WBLUF 0500	Millipore
Metanol	646377-4L	Sigma Aldrich
NaCl	S1679-5Kg	Sigma Aldrich
N,N- metilen- bis acrilamida	146072-500G	Sigma Aldrich
NP-40	74385-1L	Sigma Aldrich
Persulfato de amonio	76322-100G	USB
Poly Freeze	P0091-120ml	Sigma Aldrich
Ponceau S	P3504-10G	Sigma Aldrich
Solución de Bradford	500-0201	BioRad
Temed	76320-100G	USB
Tris HCl	T5941-1K	Sigma Aldrich
Tween 20	P1379-500ml	Sigma Aldrich

Anticuerpo	Host	No. Catálogo	Casa comercial	Dilución
Anti mouse	Horse	Cat. C02-7076S	Cell Signalling	1:1000
Anti rabbit	Goat	Cat. sc-2004	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
β actina	Mouse	Cat. SC-4778	Santa Cruz Biotechnology	1:1000
Calbindina D_{28K}	Rabbit	Cat. 711443	Thermo Fisher Scientific	1:1000
Nefrina	Mouse	Cat. SC-377246	Santa Cruz Biotechnology	1:1000

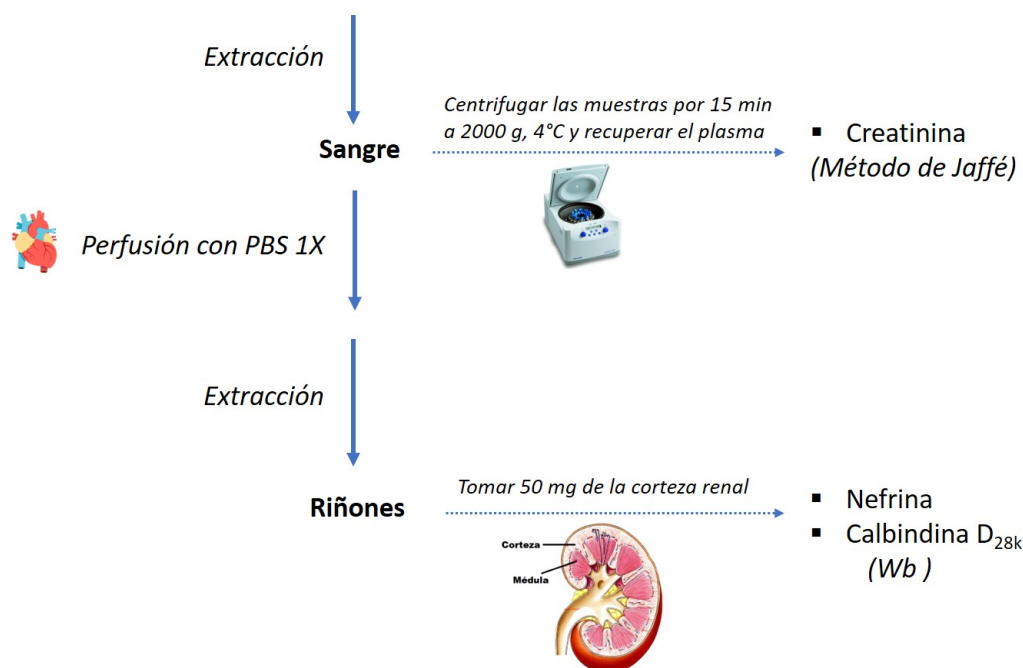
2.4. Estrategia experimental

Ratones macho de la línea C57BL/6J de 8-12 semanas (protocolo aceptado No.0188-16)

fueron administrados vía ip con $CdCl_2$ durante 7 días

Dosis: 0, 0.38, 0.76, 1.53, 2.14, 2.75, 3, 3.98 y 6.13 mg Cd/kg/día

n= 5 animales por grupo



2.4.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones macho de la línea C57BL/6J de 8-12 semanas con un peso de 25 ± 5 g que fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN. Los animales fueron alojados en cajas de plástico con camas de aserrín, alimento y agua *Ad libitum* con ciclos de luz/obscuridad de 12 h y a una temperatura de laboratorio de $22^\circ C \pm 2^\circ C$. Los animales fueron aclimatados durante 7 días antes de iniciar los experimentos.

Pasado el periodo de aclimatación los animales fueron administrados diariamente vía intraperitoneal con una solución de $CdCl_2$ durante 7 días; el $CdCl_2$ fue disuelto en solución salina y la solución fue esterilizada antes de cada administración.

Las dosis empleadas en este estudio fueron calculadas con base a la concentración de cadmio: 0.38, 0.76, 1.53, 2.14, 2.75, 3, 3.98 y 6.13 mg Cd/kg/día y cada grupo estuvo conformado por 5 animales.

Selección de las dosis. La dosis letal 50 (DL_{50}) del $CdCl_2$ es de 93.7 mg/kg. En el presente estudio, se seleccionó una gama de dosis inferiores a 1/15 de la DL_{50} del $CdCl_2$, dado que se buscaba una dosis efectiva donde se logrará observar el daño en el TD. Además, algunas de estas dosis son cercanas a la dosis empleada en el estudio de Almeer y colaboradores, donde, a dosis repetidas de 6.5 mg/kg de $CdCl_2$ por 1 semana vía i.p., causó nefrotoxicidad en ratones macho [2].

El cuidado, manejo y experimentación con los animales se realizó de acuerdo con la legislación Mexicana NOM-062-ZOO-1999 [49] y al reglamento interno para el cuidado de animales de laboratorio del CINVESTAV.

2.5. Determinación de niveles plasmáticos de creatinina

2.5.1. Principio

La cuantificación de creatinina por el método de Jaffé se basa en que la creatinina en solución alcalina reacciona con ácido pícrico para formar un complejo coloreado amarillo (ácido picrámico), donde la cantidad del complejo formado es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra [27].

2.5.2. Procedimiento

Al finalizar el tratamiento con cadmio, 24 horas después los ratones fueron anestesiados con isoflurano (nivel de oxígeno = 2 unidades, nivel de isoflurano para inducción = 3 unidades y 1.5 unidades para mantenimiento), las muestras de sangre se obtuvieron por punción cardiaca con una jeringa previamente heparinizada y se centrifugaron las muestras por 15 minutos a 2000 gs, 4°C. Para la determinación de los niveles plasmáticos de creatinina se utilizó el kit de Randox Laboratories. Se utilizó 50 μ L del estándar de referencia del kit de

Randox y se le agregó 500 μL de la solución de trabajo (250 μL de la solución A + 250 μL de la solución B), se agitó por 30 segundos y se tomó lectura en el equipo Microlab 300; este procedimiento se realizó de la misma manera con las muestras de plasma. Cada muestra se trabajó por duplicado. Los controles de calidad utilizados fueron: la precisión con una variación de ± 0.005 y el uso del control de Randox No.1231 cuyo valor debe encontrarse entre 1.14 y 1.72.

2.6. Semi cuantificación de nefrina y calbindina D_{28K} mediante Western Blot

2.6.1. Principio

Método utilizado para la detección de proteínas, las cuales son separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida, para posteriormente ser transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) o nitrocelulosa donde son identificadas usando anticuerpos específicos [43].

2.6.2. Procedimiento

Al finalizar las 7 dosis de la exposición con cadmio, 24 horas después los ratones fueron anestesiados con isoflurano, se obtuvieron las muestras de sangre por punción cardiaca con una jeringa previamente heparinizada y posteriormente se perfundió el corazón con PBS 1X con la finalidad de obtener más limpias las muestras de tejido renal. Finalmente se extrajeron ambos riñones y se descapsularon.

Los riñones izquierdos fueron almacenados en blisters con Poly Freeze y almacenados a -20°C . Los riñones derechos se colocaron en paraformaldehído al 4 % y se almacenaron a 4°C toda la noche. Se lavaron 3 veces con PBS 1X, se colocaron en sacarosa al 30 % almacenándose toda la noche a 4°C y se lavaron con PBS 1X. Finalmente, los riñones fueron colocados en Poly Freeze y almacenados a -20°C hasta su posterior uso.

De los riñones izquierdos se tomaron alrededor de 50 mg de la corteza renal, se lavó el

tejido con PBS 1X frío y se le agregaron 300 μL del buffer NP-40 (20 mM TrisHCl, 137 mM NaCl, 10 % Glicerol, 1 % NP-40, 2 mM EDTA y COMPLETE 1X). Se sonicaron las muestras 3 veces por 15 segundos, se centrifugaron a 10 000 rpm por 15 minutos, a 4°C , se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford [6]. Una vez cuantificadas las muestras, se tomó un volumen equivalente a 50 μg de proteína, se ajustó el volumen a 12.5 μL con agua destilada y se le agregaron 12.5 μL de loading buffer 2X (0.125 M TrisHCl (pH 6.8), 10 % β -mercaptoetanol, 4 % Dodecil sulfato de sodio, 0.004 % Azul de bromofenol, 20 % Glicerol, ajustar pH a 6.8). Se usaron 4 μL del marcador de peso molecular en cada gel y las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida del 10 o 12 %, dependiendo del peso molecular de las proteínas (10 % para nefrina, 12 % para calbindina D_{28K} y β actina) y se corrieron a 120 V durante 1.5 horas, excepto para nefrina cuyo tiempo de corrida fue de 2 horas 40 minutos, a 90 V.

Al terminar la electroforesis de las proteínas, la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) se activó con metanol y se realizó la transferencia de las proteínas, ya sea por transferencia semi seca (18 V por 1 hora) o transferencia húmeda (100 V por 3 horas) dependiendo del tamaño de las proteínas (semi seca para calbindina D_{28K} y β actina, húmeda para nefrina). La membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 5 % / PBS 1X / Tween 20 0.1 % durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se incubó con el anticuerpo primario apropiado (dilución 1:1000) a 4°C (ver apartado 2.3), durante toda la noche. Posteriormente, la membrana fue lavada 3 veces con PBS 1X / Tween 20 0.1 % (10 minutos por lavado) para después incubarse con el anticuerpo secundario apropiado (dilución 1:1000) durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante (ver apartado 2.3). La membrana fue lavada 3 veces con PBS 1X / Tween 20 0.1 % (10 minutos por lavado) y revelada en placas autoradiográficas. Se empleó la β - actina como control de carga. Se analizaron las placas autoradiográficas con el programa Image J para obtener la densitometría de las bandas y se reportaron los datos como unidades arbitrarias relativas.

2.7. Análisis estadístico

Se analizaron los supuestos de normalidad en los datos utilizando las pruebas de Shapiro Wilk, la prueba de Bartlett y la prueba de rachas. Para evaluar la diferencia entre tratamientos se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Dunnett como prueba post hoc. Todas las pruebas estadísticas se llevaron a cabo con el paquete estadístico GraphPad Prism 8 y los resultados con una $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3. Resultados

3.1. Estado general de los animales de experimentación

3.1.1. Comportamiento de los ratones durante la exposición a cadmio

Durante el periodo de tratamiento con cadmio los ratones mostraron pelaje erizo y a partir de la dosis de 2.75 mg Cd/kg/día se hizo evidente la presencia de deshidratación en los animales debido a que cuando los animales eran colocados en su caja después de administrarlos con cadmio, su pelaje tardaba alrededor de 3 minutos para restaurar su posición normal. Además, los animales mostraron disminución en su movilidad conforme aumentaba la dosis de exposición a cadmio, incluso, un animal perteneciente al grupo de la dosis de 2.75 mg Cd/kg/día mostró alteración en su movilidad ya que arrastraba las patas traseras.

3.1.2. Peso corporal de los animales

El análisis del peso corporal de los ratones durante los 7 días de exposición a cadmio se realizó integrando el evento durante toda la semana, lo que se consigue a través del cálculo del área bajo la curva.

De los 8 grupos de ratones tratados con cadmio, todos los animales del grupo correspondiente a la dosis de 3.98 mg Cd/kg/día murieron al tercer día de tratamiento, mientras que los animales del grupo correspondiente a la dosis de 6.13 mg Cd/kg/día murieron al segundo día de tratamiento. Al analizar los datos se encontró que el grupo administrado con 2.75 mg Cd/kg/día disminuyó significativamente su peso en un 15 % comparado contra el grupo control (Figura. 3.1).

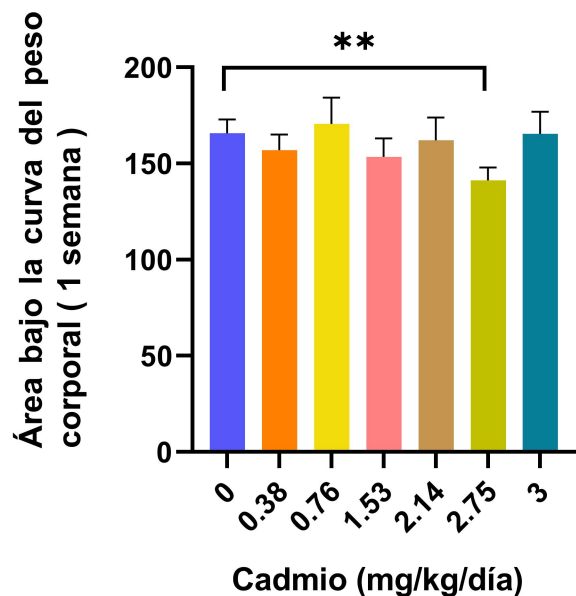


Figura 3.1. **Área bajo la curva del peso corporal de los ratones C57BL/6J durante los 7 días de tratamiento con cadmio.** Los datos se presentan como la media \pm SD (n=5, excepto para la dosis de 3 mg Cd/kg/día (n=3)). ANOVA de 1 vía y test de Dunnett como prueba post hoc. ** $p < 0,005$ vs el control. Los animales de los grupos correspondientes a las dosis de 3.98 y 6.13 mg Cd/kg/día murieron antes de finalizar el tratamiento.

3.2. Efecto de la exposición con cadmio sobre marcadores de daño renal

3.2.1. Concentración de creatinina plasmática

Para evaluar si la exposición con cadmio causó daño a nivel glomerular se utilizó como marcador de daño a la creatinina plasmática. No se observó aumento significativo en los niveles plasmáticos de creatinina de los grupos tratados con cadmio con respecto al grupo control, lo que sugiere que el cadmio no afectó el glomérulo (Figura. 3.2), sin embargo, una limitante de la creatinina como biomarcador de daño renal es que requiere tiempo para acumularse antes de ser detectado como anormal, lo que contribuye a un posible retraso en el diagnóstico de daño renal agudo. Por ello, este resultado se corroboró analizando a nefrina, el cual es un biomarcador temprano de lesión glomerular.

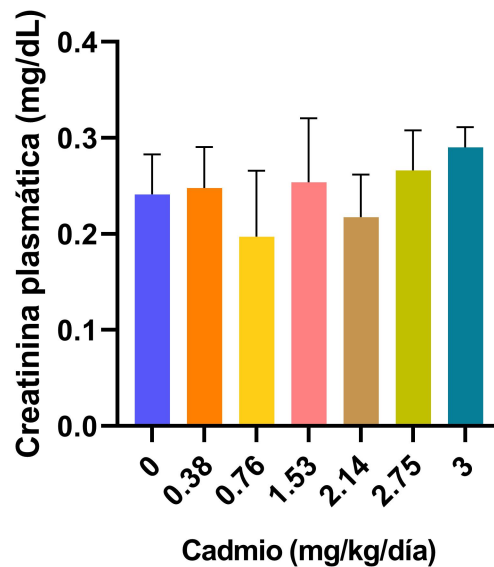


Figura 3.2. Concentración de creatinina plasmática en ratones C57BL/6J tratados con cadmio por 7 días. Los datos se presentan como la media \pm SD (n= 3-5). ANOVA de 1 vía. $p=0.32$.

3.2.2. Detección de nefrina

En el inmunoblot representativo de nefrina se puede apreciar una doble banda alrededor de los 100 KDa. No se observó ningún cambio en las bandas correspondientes a nefrina, a las dosis de 1.53 y 2.75 mg Cd/kg/día con respecto al grupo control, lo cual sugiere la ausencia de daño glomerular por la exposición a dosis repetidas de cadmio (Figura. 3.3); sin embargo, esto no puede ser asegurado debido al número de muestras que pudieron ser procesadas.

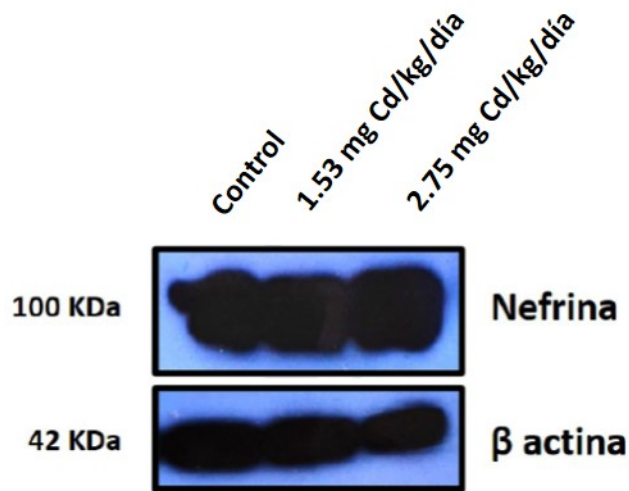


Figura 3.3. Detección de las bandas de expresión de nefrina en tejido renal de ratones C57BL/6J tratados con cadmio durante 7 días. Inmunoblot representativo de nefrina y β actina, n= 2.

3.2.3. Semi cuantificación de calbindina D_{28K}

Para evaluar el daño a nivel distal se empleó como marcador de daño a la proteína calbindina D_{28K} . No se observó algún cambio significativo en los niveles de calbindina D_{28K} a la dosis de 1.53 mg Cd/kg/día con respecto al grupo control, sin embargo, a la dosis de 2.75 mg Cd/kg/día se observó una disminución significativa de la proteína con respecto al grupo control, lo que indica que a esta dosis existe un daño en el túbulo distal de los ratones expuestos (Figura. 3.4).

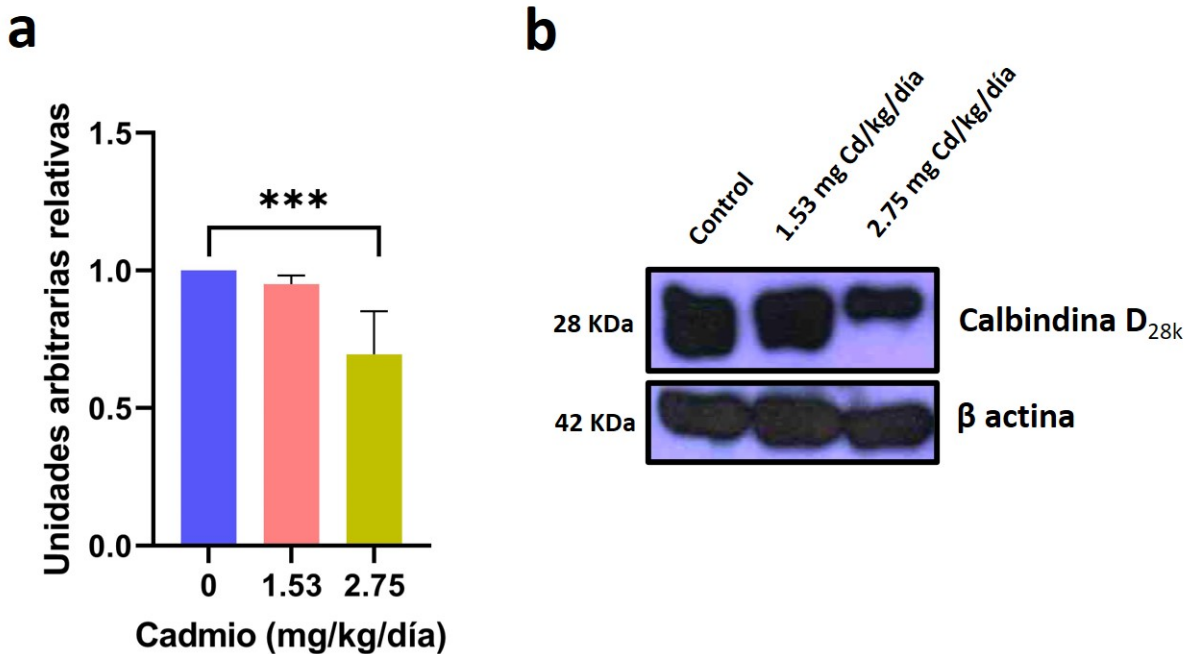


Figura 3.4. Semi cuantificación de la proteína calbindina D_{28K} en tejido renal de ratones C57BL/6J tratados con cadmio durante 7 días. (a) Análisis densitométrico de las bandas de expresión de calbindina D_{28K} normalizada con la expresión de β actina. Los datos se presentan como la media \pm SD (n= 4-5). ANOVA de 1 vía y test de Dunnett como prueba post hoc.*** p = 0.0004. (b) Inmunoblot representativo de calbindina D_{28K} y β actina.

4. Discusión

El cadmio es un elemento que se encuentra de forma natural en la corteza terrestre. Generalmente se presenta en el ambiente en bajos niveles, sin embargo, la actividad humana ha hecho que estos niveles incrementen [32]. La exposición a este metal puede ocurrir por la actividad volcánica, consumo de tabaco, incineración de basura municipal (especialmente plásticos y baterías), fabricación y uso de fertilizantes, ingesta de alimentos contaminados con este metal, etc [3, 32].

Una vez en el organismo, este metal pasa a torrente sanguíneo formando complejos con diferentes proteínas, entre ellas, la MT ya que tiene alta afinidad por los grupos sulfhidrilos [3]. El cadmio se distribuye ampliamente en el cuerpo, teniendo la mayor concentración corporal en el riñón tras una exposición prolongada [3, 38, 82], particularmente en los segmentos S1 y S2 del TP [16]. Las células del TP son las más afectadas por el cadmio debido a que poseen transportadores y receptores a través de los cuales el cadmio puede pasar en forma libre o como complejo CdMT (Figura. 1.6), siendo la endocitosis del complejo CdMT a través del receptor megaCUBAM la forma mayoritaria por la cual el cadmio es reabsorbido en el riñón [4, 16, 53, 58].

Es un dogma actual que el TD no tiene las características necesarias para llevar a cabo la endocitosis mediada por receptores [67]. Sin embargo, recientemente un estudio realizado por Thévenod y colaboradores [41] evidencio en un modelo *in vitro* la internalización de proteínas como la MT a través del receptor 24p3 presente en el TD. Considerando que el complejo CdMT es la forma predominante del cadmio en la circulación sanguínea, este estudio sugiere que es importante reexaminar la nefrotoxicidad inducida por el cadmio pues existe la posibilidad de que el daño no solo se limite a nivel proximal si no también afecte al segmento distal de la nefrona.

Para estudiar esta posibilidad se propuso exponer diariamente a ratones macho de la línea C57BL/6J a distintas dosis de cadmio durante 7 días con la finalidad de conocer si el cadmio inducía daño en el TD de la nefrona, para lo cual se evaluaron algunos marcadores de daño renal.

4.1. Estado general de los animales de experimentación

Durante la exposición con cadmio los animales mostraron algunos signos clínicos de toxicidad incluyendo pelaje erizo, arrastre de patas traseras, disminución del movimiento y deshidratación (datos no mostrados). Cabe destacar que los ratones de los grupos expuestos a las dosis de 3.98 y 6.13 mg Cd/kg/día fueron letales antes de finalizar el tratamiento.

Al analizar los datos, se encontró que el grupo administrado con la dosis de 2.75 mg Cd/kg/día disminuyó significativamente su peso con respecto al grupo control (Figura. 3.1), por su parte, el grupo expuesto a la dosis de 3 mg Cd/kg/día no mostró disminución de peso significativa, sin embargo, cabe destacar que en este grupo murieron 2 animales (n=3), mientras que en el resto de los grupos se mantuvo el mismo número de animales durante todo el tratamiento (n=5), por lo que es posible que esto afectara los efectos observados.

Almeer y colaboradores empleando un modelo de ratones macho Swiss administrados diariamente con 6.5 mg $CdCl_2$ /kg/día (equivalente a 3.98 mg Cd/kg/día), vía i.p. por 7 días, reportaron que los ratones tratados con cadmio mostraron algunos signos clínicos de toxicidad, incluyendo inapetencia y disminución del peso corporal [2]. Con respecto a la disminución en el movimiento de los animales observado durante este estudio, es un efecto que ya ha sido reportado en estudios previos [3].

Aunado a lo anterior, un estudio llevado a cabo por Chapatwala y colaboradores, señala que ratas macho Sprague Dawley administradas con 0.25, 0.75 y 1.25 mg $CdCl_2$ /kg/día por vía intraperitoneal, durante 7 y 14 días resultó en un incremento dosis-dependiente de la glucosa en sangre, así como en un incremento de enzimas gluconeogénicas hepáticas y renales [9]. En su conjunto, se podría suponer que, a raíz de la disminución en su movilidad, los animales tratados con 2.75 mg Cd/kg/día disminuyeron su consumo de agua y alimento, por lo que para compensar esta falta de fuente de energía en el cuerpo de estos animales, se promovió la movilización y utilización de depósitos de grasa para la síntesis de glucosa, lo que trajo como consecuencia una disminución de su peso corporal; sin embargo, esto requiere de confirmación experimental.

4.2. Efecto del tratamiento con cadmio sobre marcadores de daño renal

En la actualidad, el diagnóstico del daño renal depende en gran medida de la detección de cambios en biomarcadores de la función renal como son la creatinina, nefrina y calbindina D_{28K} .

La creatinina es utilizada para determinar daño a nivel glomerular debido a que bajo condiciones normales, se filtra completamente y no se reabsorbe [59]. Si existe daño glomerular se disminuye la excreción de creatinina en la orina y se acumula en la sangre, aumentando así sus niveles plasmáticos.

En nuestro estudio, los grupos tratados con cadmio no presentaron ningún cambio significativo en los niveles de creatinina plasmática con respecto al grupo control (Figura. 3.2), sugiriendo que la exposición a cadmio no causó daño a nivel glomerular. Un estudio realizado por Almeer y colaboradores [2] en ratones macho Swiss administrados diariamente vía intraperitoneal con 6.5 mg $CdCl_2$ /kg (equivalente a 3.98 mg Cd/kg/día) por 7 días, observaron un incremento significativo en los niveles de creatinina plasmática; este resultado no se pudo observar en nuestro estudio dado que no se pudieron obtener las muestras correspondientes a las dosis de 3.98 y 6.13 mg Cd/kg/día, porque los animales murieron antes de finalizar el tratamiento.

Dados nuestros resultados y el reportado por Almeer y colaboradores, es probable que los ratones macho Swiss sean más resistentes a la toxicidad inducida por cadmio comparados con los ratones C57BL/6J. Ahora bien, la dosis que ellos emplean es mayor a las dosis que se pudieron analizar en este estudio, así que es comprensible que en dosis menor a 3.98 mg Cd/kg/día no existan cambios significativos en los niveles de creatinina plasmática.

Una limitante de la creatinina como biomarcador de daño renal es que requiere tiempo para acumularse antes de ser detectado como anormal, lo que contribuye a un posible retraso en el diagnóstico de daño renal agudo [57]. Por ello, el resultado obtenido para evaluar el daño glomerular se corroboró evaluando a nefrina, la cual es una proteína transmembranal con un peso molecular de 180 kDa considerada una de las moléculas esenciales para mantener

la función de barrera en las paredes capilares glomerulares, además, es utilizada como un biomarcador de lesión glomerular temprano.

Este biomarcador únicamente fue evaluado en los grupos expuestos a 1.53 y 2.75 mg Cd/kg/día, en un afán de optimizar los tiempos de análisis por Western Blot y también considerando que no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en los resultados de creatinina de los grupos expuestos a cadmio con respecto al grupo control.

En el inmunoblot representativo de nefrina se observa una proteína con una masa molecular de aproximadamente 100 KDa (Figura. 3.3), así mismo, se aprecia una banda ancha separada en dos bandas. Con respecto a la diferencia de tamaño de las moléculas reconocidas por el anticuerpo anti-nefrina se podría explicar por la diferencia de glicosilación en los sitios múltiples de glicosilación en la secuencia de nefrina [37], es importante recordar que la nefrina sufre modificaciones post traduccionales por N-glicosilación debido a que la adición de estos residuos de azúcar es crucial para el apropiado plegamiento y localización de nefrina en la membrana plasmática [56]. Consistente con lo anterior, un estudio realizado por Yan y colaboradores menciona que la banda inferior corresponde a una fracción intracelular de nefrina, mientras que la banda superior corresponde a la fracción de nefrina N glicosilada localizada en la membrana plasmática [80].

Como biomarcador de daño glomerular, específicamente de daño en los podocitos, la nefrina es liberada del diafragma de hendidura por escisión proteolítica, disminuyendo sus niveles en tejido e incrementando la cantidad de proteína encontrada en la orina [26]. En el inmunoblot obtenido se observa que la exposición a dosis repetidas de cadmio durante una semana aparentemente no modifica la expresión de nefrina a la dosis de 1.53 y 2.75 mg Cd/kg/día con respecto al grupo control (Figura. 3.3), sugiriendo la inexistencia de daño glomerular. Sin embargo, dado el tamaño de la muestra ($n=2$) es recomendable incrementar el número de muestras para poder realizar un análisis estadístico y poder afirmar con certeza la ausencia de daño glomerular. No obstante, y tomando en consideración los resultados obtenidos hasta el momento con ambos biomarcadores de daño glomerular, se concluye la inexistencia de daño a nivel del glomérulo por la exposición a dosis repetidas de cadmio durante una semana.

Finalmente, para evaluar el daño a nivel distal se empleó como marcador de daño a la pro-

teína calbindina D_{28K} , la cual es dependiente de la 1,25 - dihidroxivitamina D_3 ($1, 25(OH)_2D_3$) y es responsable del transporte de Ca^{2+} en el túbulo distal [39, 40, 79].

Con base en el análisis densitométrico, se puede observar que a la dosis de 1.53 mg Cd/kg/día no existe ningún cambio significativo en la expresión de calbindina D_{28K} con respecto al grupo control, no obstante, a la dosis de 2.75 mg Cd/kg/día existe un decremento significativo de la proteína con respecto al grupo control, lo que indica que a esta dosis existe un daño en el TD por la exposición diaria a cadmio por 7 días en el modelo *in vivo* (Figura. 3.4).

Al encontrarse dañado los segmentos proximales de la nefrona por el efecto del cadmio [4, 16], los niveles del receptor 24p3 se incrementarían en la porción distal de la nefrona como un mecanismo compensatorio en la reabsorción de proteínas [83], esto favorecería el aumento en la reabsorción del complejo CdMT en el TD [54], ya que recordemos, el receptor 24p3 tiene gran afinidad por la MT. Una vez ingresado el cadmio dentro de la célula del TD, favorecería la formación de ROS y posteriormente la muerte celular [24, 52].

Queda en perspectiva confirmar lo anterior evaluando el daño en el TP empleando biomarcadores de daño como Kim -1, la internalización del complejo CdMT a través del receptor 24p3 y la producción de ROS en las células del TD.

Hasta donde se tiene conocimiento, no existen trabajos que evalúen los efectos de la exposición a cadmio y su efecto sobre los niveles tisulares de calbindina D_{28K} , no obstante, el resultado obtenido a la dosis de 2.75 mg Cd/kg/día concuerda con lo que se ha reportado con nefrotóxicos como la ciclosporina A (CsA), donde en un modelo *in vivo* existe disminución en la proteína calbindina D_{28K} y un incremento en la excreción urinaria de calcio por la exposición a CsA [1]. Estas observaciones sugieren una relación entre la disminución en la proteína de calbindina D_{28K} y el aumento de calcio en la orina, el cual es soportado por el conocimiento que se tiene sobre la función de calbindina D_{28K} como facilitador en el movimiento transcelular de Ca^{2+} . En consecuencia, una disminución en los niveles de calbindina D_{28K} lleva a una disminución en la reabsorción de calcio en el TD y con ello un incremento en la excreción de calcio en la orina. Queda en perspectiva confirmar lo anterior midiendo el calcio presente en la orina por la exposición a cadmio.

Por otro lado, se conoce que la expresión renal de calbindina D_{28K} es inducido por la

forma activa de la vitamina D, cuya depleción podría ser otro mecanismo por el cual los niveles de calbindina D_{28K} disminuyeron.

La vitamina D_3 (colecalfiferol) es la forma natural de la vitamina D y se produce en la piel a partir de la 7-deshidrocolesterol que bajo irradiación ultravioleta produce la vitamina D_3 . La vitamina D_3 es transportada en la sangre por la proteína de unión a la vitamina D (DBP) hacia el hígado, en donde es hidroxilada en el carbono 25 por el CYP2R1 para producir la 25 - hidroxivitamina D_3 ($25(OH)D_3$). Este metabolito es transportado por la DBP al riñón, donde es filtrado a través del glomérulo e internalizado endocíticamente por el receptor megaCUBAM en las células tubulares proximales. En el túbulo proximal renal, la $25(OH)D_3$ es hidroxilado por la 1α hidroxilasa (CYP27B1 mitocondrial) en la posición del carbono 1 del anillo A formando la 1,25 - dihidroxivitamina D_3 ($1,25(OH)_2D_3$), la cual pasa al fluido intersticial y a nivel distal induce la transcripción de calbindina D_{28K} [10, 61].

En este estudio no se evaluó el daño a nivel proximal, sin embargo, se ha reportado que las células del túbulo proximal son las más afectadas por el cadmio debido a que poseen transportadores y receptores donde el cadmio puede pasar en forma libre o como complejo CdMT [53]. Bajo este concepto es probable que la dosis de 2.75 mg Cd/kg/día haya dañado el túbulo proximal, en consecuencia los niveles del receptor megaCUBAM se encontraran disminuidos, generando con ello una disminución en la reabsorción del $25(OH)D_3$, que como se explicó anteriormente, es esencial para la producción de la $1,25(OH)_2D_3$ [79]. Adicionalmente, se ha reportado que el cadmio reduce la actividad de la 1α hidroxilasa, enzima renal que media la conversión de la $25(OH)D_3$ a la $1,25(OH)_2D_3$, en consecuencia la biosíntesis de calbindina D_{28K} también podría verse afectada [51, 63].

Para confirmar esta hipótesis sería necesario evaluar los niveles del receptor megaCUBAM, la 1α hidroxilasa, la $1,25(OH)_2D_3$ y el mRNA de calbindina D_{28K} . Si no hay efecto sobre ninguno de estos niveles se podría asumir que la disminución en la proteína calbindina D_{28K} a la dosis de 2.75 mg Cd/kg/día más que por su transcripción es debido al daño ocasionado por el cadmio sobre el TD.

En resumen, los datos muestran que la exposición diaria a 2.75 mg Cd/kg/día durante 7 días vía intraperitoneal ocasionó una disminución en la expresión de la proteína calbindina D_{28K} , evidenciando un daño en el segmento distal de las nefronas de los ratones expuestos, no obstante, otras partes de la nefrona como el glomérulo parecen no afectarse.

5. Conclusión

En la exposición repetida a cadmio por 7 días con la concentración de 2.75 mg Cd/kg/día en el modelo *in vivo* empleado se observó una afectación del túbulo distal de las nefronas de los ratones expuestos, lo que abre la posibilidad de nuevos modos de acción relacionados con la exposición a cadmio.

6. Perspectivas

- Evaluar la distribución temporal del cadmio en los principales órganos reservorios (hígado y riñón) de ratones expuestos.
- Evaluar la posible deshidratación o modificación del consumo de agua o alimento de ratones expuestos a cadmio.
- Cuantificar algunas enzimas gluconeogénicas y la cantidad de glucosa presente en muestras de sangre de ratones expuestos a cadmio.
- Evaluar otro biomarcador de daño distal para corroborar el resultado obtenido con calbindina D_{28K} .
- Evaluar los niveles del receptor megaCUBAM, la 1α hidroxilasa, la $1,25(OH)_2D_3$ y el mRNA de calbindina D_{28K} en ratones administrados con cadmio.
- Cuantificar la concentración de calcio presente en la orina de ratones expuestos a cadmio.
- Evaluar el efecto de la exposición a cadmio sobre la reabsorción del complejo CdMT-FITC en los túbulos proximales y distales de ratones expuestos a cadmio.
- Evaluar la expresión del receptor 24p3 en el tejido renal de ratones expuestos a cadmio.
- Investigar la importancia del receptor 24p3 en la endocitosis de proteínas a través de su bloqueo o utilizando un modelo knockout para este receptor.
- Evaluar la producción de ROS en el segmento distal de la nefrona de ratones expuestos a cadmio.
- Investigar los mecanismos involucrados en la entrada y salida de los complejos Cd-proteína en las células hepáticas de ratones expuestos a cadmio.

Bibliografía

- [1] Aicher, L., Meier, G., Norcross, A.J., Jakubowski, J., Varela, M.C., Cordier, A., y Steiner, S. (1997). *Decrease in kidney calbindin D_{28K} as a possible mechanism mediating cyclosporine A and FK-506 induced calciuria and tubular mineralization. Biochemical Pharmacology*; 53: 723-731.

- [2] Almeer, R.S., AlBasher, G.I., Alafari, S., Alkahtani, S., Ali, D., y Abdel-Moneim, A.E. (2019). *Royal jelly attenuates cadmium - induced nephrotoxicity in male mice. Scientific Reports*; 9: 1-12.

- [3] ATSDR. (2012). *Toxicological profile for cadmium*. Recuperado de: <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp5.pdf>

- [4] Barbier, O., Jacquillet, G., Tauc, M., Cougnon, M., y Poujeol, P. (2005). *Effect of heavy metals on, and handling by, the kidney. Nephron Physiology*; 99: 105-110.

- [5] Betten, R., Scharner, B., Probst, S., Edemir, B., Wolff, N.A., Wing-Kee, L., y Thévenod, F. (2018). *Tonicity inversely modulates lipocalin-2 (Lcn2/24p3/NGAL) receptor (SLC22A17) and Lcn2 expression via Wnt/ β -catenin signaling in renal inner medullary collecting duct cells: implications for cell fate and bacterial infection. Cell Communication and Signaling*; 4-20.

- [6] Bradford, M.M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. Analytical Biochemistry*; 72: 248-254.

- [7] Brenner, B.M. (2005). *El riñón. Tratado de nefrología*. 7^a ed, Volumen 1, España: ELSEVIER.
- [8] Cabedo-Martinez, A.I., Weinhaupl, K., Wing-Kee, L., Wolff, N.A., Storch, B., Zerko, S., Konrat, R., Kozminski, W., Breuker, K., y Thévenod, F. (2016). *Biochemical and Structural Characterization of the Interaction between the Siderocalin NGAL/LCN2 (Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin/Lipocalin 2) and the N-terminal Domain of Its Endocytic Receptor SLC22A17**. *The Journal of Biological Chemistry*; 291 (6): 2917-2930.
- [9] Chapatwala, K.D., Boykin, M., Butts, A., y Rajanna, B. (1982). *Effect of intraperitoneally injected cadmium on renal and hepatic gluconeogenic enzymes in rats*. *Drug and Chemical Toxicology*; 5 (3): 305-317.
- [10] Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., y Carmeliet, G. (2016). *Vitamin D: Metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects*. *Physiological Reviews*; 96: 365-408.
- [11] Christensen, E.I., y Birn, H. (2001). *Megalin and cubilin: Synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule*. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*; 280: 562-570.
- [12] Christensen, E.I., y Birn, H. (2002). *Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors*. *Nature* ; 3: 1-11.
- [13] Christensen, E.I., y Nielsen, R. (2006). *Role of megalin and cubilin in renal physiology and pathophysiology*. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*: 1-22.
- [14] Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C., y Rofe, A.M. (2002). *Metallothionein: the multi-purpose protein*. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 59: 627-647.
- [15] Devireddy, L.R., Gazin, C., Zhu, X., y Green, M.R. (2005). *A Cell-Surface Receptor for Lipocalin 24p3 Selectively Mediates Apoptosis and Iron Uptake*. *Cell*; 123: 1293-1305.

- [16] Dorian, C., Gattone II, V.H., y Klaasen, C.D. (1992). *Renal cadmium deposition and injury as a result of accumulation of cadmium - metallothionein (CdMT) by the proximal convoluted tubules - A light microscopic autoradiography study with CdMT¹⁰⁹. Toxicology and applied pharmacology ; 114 : 173-181.*
- [17] Flores, J., Vaca, M., López, R., González, A., y Barceló, M. (2002). *Plomo, cadmio y zinc en polvos sedimentados a diferentes alturas en la Ciudad de México. Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales; AIDIS. Memorias. México, FEMISCA. pp.1-8.*
- [18] García, G., Hernández, S., Ramón, O., Báez, S., y García, A. (2007). *Biología y patobiología humana del complejo de absorción y transporte epitelial megacubam. Review of Medicine; 15 (1): 94-104.*
- [19] García-Pose, A., y Espinosa, L. (2008). *Tubulopatías. Anales de Pediatría Continuada; 6 (5) : 249-257.*
- [20] Gekle, M. (2005). *Renal tubule albumin transport. Annual Review of Physiology; 67: 573-594.*
- [21] Gerke, P., Huber, T.B., Sellin, L., Benzing, T., y Walz, G. (2003). *Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. Journal of the American Society of Nephrology; 14: 918-926.*
- [22] Girolami, J.P., Bascands, J.L., Pécher, C., Cabos, G., Moatti, J.P., Mercier, J.F., Haguenoer, J.M., y Manuel, Y. (1989). *Renal kallikrein excretion as a distal nephrotoxicity marker during cadmium exposure in rats. Toxicology ; 55: 117-129.*
- [23] Goyer, R.A. (1995). *Nutrition and metal toxicity. The American Journal of Clinical Nutrition; 61: 646S-650S.*
- [24] Goyer, R., y Clarkson, T. (2001). *Toxic effects of metals. Casarett and Doulls Toxicology, the basic science of poisons. 6ª ed, U.S.A.: McGraw Hill.*

- [25] Guerra, R., Vera-Aguilar, E., Uribe-Ramírez, M., Gookin, G., Camacho, J., Osornio-Vargas, A.R., Mugica-Álvarez, V., Angulo-Olais, R., Campbell, A., Froines, J., Kleinman, T.M., y De Vizcaya-Ruiz, A. (2013). *Exposure to inhaled particulate matter activates early markers of oxidative stress, inflammation and unfolded protein response in rat striatum. Toxicology Letters* ; 222 (2): 146-154.
- [26] Hauser, P.V., Collino, F., Bussolati, B., y Camussi, G. (2009). *Nephrin and endothelial injury. Current Opinion in Nephrology and Hypertension* ; 18 (1) : 3-8.
- [27] Hervey, G.R. (1953). *Determination of creatinine by the Jaffe reaction. Nature*; 171: 1125.
- [28] Huber, T.B., Hartleben, B., Kim, J., Schmidts, M., Schermer, B., y Keil, A. (2003). *Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. Molecular and Cellular Biology*; 23: 4917–4928.
- [29] Huidobro, J.P., Tagle, R., y Guzmán, A.M. (2018). *Creatinina y su uso para la estimación de la velocidad de filtración glomerular. Revista Médica de Chile*; 146: 344-350.
- [30] IARC. (1993). *Beryllium, cadmium, mercury, and exposure in the glass manufacturing industry. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 58.*
- [31] Ichimura, T., Hung, C.C., Yang, S.A., Stevens, J.L., y Bonventre, J.V. (2003). *Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1): A tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. Journal of Physiology Renal*; 286: 552-563.
- [32] IPCS. (1992). *Cadmium environmental aspects, World Health Organization International Programme on Chemical Safety.* Recuperado de: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc135.htm>.
- [33] IPCS. (2005-2007). *Cadmium, cadmium chloride, cadmium oxide, cadmium sulphide, cadmium acetate, World Health Organization International Programme on Chemical Safety.* Recuperado de : <http://www.who.int/ipcs/publications/icsc/en/index.html>

- [34] Johri, N., Jacquillet, G., y Unwin, R. (2010). *Heavy metal poisoning : the effects of cadmium on the kidney. Biometals ; 23: 783-792.*
- [35] Kandasamy, Y., Smith, R., Lumbers, E.R., y Rudd, D. (2014). *Nephrin – a biomarker of early glomerular injury. Biomarker Research; 2 (21): 1-8.*
- [36] Kastner, C., Pohl, M., Sendeski, M., Stange, G., Wagner, C.A., Jensen, B., Patzak, A., Bachmann, S., y Theilig, F. (2009). *Effects of receptor-mediated endocytosis and tubular protein composition on volume retention in experimental glomerulonephritis. The American Journal of Physiology-Renal Physiology ; 296: 902-911.*
- [37] Kawachi, H., Koike H., Kurihara, H., Yaoita, E., Orikasa, M., Shia, M.A., Sakai, T., Yamamoto, T., Salant, D.J., y Shimizu, F. (2000). *Cloning of rat nephrin: Expression in developing glomeruli and in preproteinuric states. Kidney International; 57 : 1949-1961.*
- [38] Kjellstrom, T., y Nordberg, G.F. (1985). *Cadmium and health: A toxicological and epidemiological appraisal. Vol. 1. Exposure, dose and metabolism, U.S.A.: CRC Press, 179-197.*
- [39] Kojetin, D.J., Venters, R.A., Kordoys, D.R., Thompson, R.J., Kumar, R., y Cavanagh, J. (2006). *Structure, binding interface and hydrophobic transitions of Ca^{2+} – loaded calbindin- D_{28K} . Nature structural and molecular biology; 13 (7): 1-7.*
- [40] Lambers, T.T., Mahieu, F., Oancea, E., Hoof, L., De Lange, F., Mesenkamp, A.R., Voets, T., Nilius, B., Clapham, D.E., Hoenderop, J.G., y Bindels, R.J. (2006). *Calbindin- D_{28K} dynamically controls TRPV5- mediated Ca^{2+} transport. The EMBO Journal; 25: 2978-2988.*
- [41] Langelueddecke, C., Roussa, E., Fenton, R.A., Wolff, N., Wing-Kee, L., y Thévenod, F. (2012). *Lipocalin-2 (24p3/Neutrophil Gelatinase- associated Lipocalin (NGAL)) Receptor is expressed in distal nephron and mediates protein endocytosis. The Journal of Biological Chemistry; 287 (1): 159-169.*

- [42] Li-Ping, Y., Ya-Ping, D., Wen-Tin, L., Tong, Z., Qi-Wei, L., Li-Jun, Z., Kong, J., Zheng-Wei, Y., y Qun, Z. (2018). *Tissue - Specific Regulatory Effects of Vitamin D and its receptor on Calbindin-D_{28K} and Calbindin-D_{9K}*. *Biochemistry & Molecular Biology Journal*; 4(3): 1-9.
- [43] MacPhee, D.J. (2010). *Methodological considerations for improving Western blot analysis*. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*; 61: 171-177.
- [44] Martín-Miguel, V., Lafarga-Giribets, M.A., Garcia-Esteve, L., y Rodrigo-Claverol, M.D. (2014). *Diagnóstico casual de un síndrome de Gitelman*. *Semergen*; 40 (7) : e95-e98.
- [45] Matsubara-Khan, J. (1974). *Compartmental analysis for the evaluation of biological half lives of cadmium and mercury in mouse organs*. *Environmental Research*;7: 54-67.
- [46] Miles, A.T., Hawksworth, G.M., Beattie, J.H., y Rodilla, V. (2000). *Induction, regulation, degradation and biological significance of mammalian metallothioneins*. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*; 35: 35-70.
- [47] Murawski, I., Maina, R., y Gupta, I. (2010). *The relationship between nephron number, kidney size and body weight in two inbred mouse strains*. *Organogenesis*; 6(3): 189-194.
- [48] NOM 031. (1993). *Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA1-1993, Bienes y servicios. Productos de la pesca, moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias*. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/031ssa13.html>
- [49] NOM 062. (1999). *Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999- Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. Recuperado de: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
- [50] NOM 127. (1994). *Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano- Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización"*. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html>

- [51] Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., y Friberg, L. (2007). *Handbook on the toxicology of metals*. 3 ed. : Academic Press.
- [52] Nordberg, G.F., Jin, T., Wu, X., Lu, J., Chen, L., Lei, L., Hong, F., y Nordberg, M. (2009). *Prevalence of kidney dysfunction in humans. Relationship to cadmium dose, metallothionein, immunological and metabolic factors*. *Biochimie*; 91: 1282-1285.
- [53] Nordberg, M., Nordberg, G.F. (2009). *Metallothioneins: Historical Development and Overview*. *Metal Ions in Life Sciences*; 5: 1–29.
- [54] Ortega-Romero, M.S. (2015). *Reabsorción/acumulación de Cadmio-Metalotioneina (Cd-MT) en el Túbulo Distal en un Modelo de Rata con Actividad Tubular Proximal Reducida (Tesis de Maestría)*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México.
- [55] Palmiter, R.D. (1994). *Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 91: 1219-1223.
- [56] Patrakka, J., y Tryggvason, K. (2007). *Nephrin - a unique structural and signaling protein of the kidney filter*. *TREND in Molecular Medicine*; 13(9) : 396-403.
- [57] Ronco, C., Grammaticopoulos, S., Rosner, M., De Cal, M., Soni, S., Lentini, P., y Piccinni, P. (2010). *Oliguria, Creatinine and Other Biomarkers of Acute Kidney Injury*. *Diagnosis*; 164: 118-127.
- [58] Sabolic, I., Breljak, D., Skarica, M., y Herak-Kramberger, C.M. (2010). *Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs*. *Biometals*; 23: 897-926.
- [59] Schnellmann, R.G. (2008). *Cassarett & Doull's Toxicology, the basic science of poisons*. 8ª ed, USA: McGraw Hill.

- [60] Shih, N.Y., Li, J., Cotran, R., Mundel, P., Miner, J.H., y Shaw, A.S. (2001). *CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. The American Journal of Pathology*; 159: 2303–2308.
- [61] Sooy, K., Kohut, J., y Christakos, S. (2000). *The role of calbindin and 1,25 dihidroxi-vitamin D₃ in the kidney. Mineral metabolism*; 9: 341-347.
- [62] Straus, W. (1964). *Factors affecting the cytochemical reaction of peroxidase with benzidine and the stability of the blue reaction product. Journal of Histochemistry & Cytochemistry*; 12: 470-480.
- [63] Swiergosz-Kowalewska, R. (2001). *Cadmium Distribution and Toxicity in Tissues of Small Rodents. Microscopy Research and Technique*; 55: 208-222.
- [64] Takashi, M., Hasegawa, S., Ohmuta, M., Ohshima, S., y Kato, K. (1998). *Significant elevation of urinary 28-kD calbindin-D and N-Acetyl, β -D- glucosaminidase levels in patients undergoing extracorporeal shock wave lithotripsy. International Urology and Nephrology*; 30 (4): 407-415.
- [65] Takashi, M., Zhu, Y., Miyake, K., y Kato, K. (1996). *Urinary 28-kD calbindin -D as a new marker for damage to distal renal tubules caused by cisplatin - based chemotherapy. Urologia Internationalis*; 30: 407-415.
- [66] Thévenod, F. (2003). *Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. Nephron Physiology*; 93: 87-93.
- [67] Thévenod, F., y Wolff, N. (2015). *Iron transport in the kidney: implications for physiology and cadmium nephrotoxicity. The Royal Society of Chemistry*: 1-26.
- [68] Thun, M. (1991). *Scientific basis for an occupational standar for cadmium. American journal of industrial medicine*; 20: 629-642.
- [69] Tojo, A., y Endou, H. (1992). *Intrarenal handling of proteins in rats using fractional micropuncture technique. American Journal of Physiology*; 263: 601-606.

- [70] Vaidya, V.S., Ferguson, M.A., y Bonventre, J.V. (2008). *Biomarkers of Acute Kidney Injury. Annual Review of Pharmacology and Toxicology*; 48: 463-493.
- [71] Waalkes, M.P. y Klaassen, C.D. (1985). *Concentration of Metallothionein in major organs of rats after administration of various metals. Fundamental and applied toxicology*; 5: 473-477.
- [72] Welsh, G.I., y Saleem, M.A. (2010). *Nephrin- signature molecule of the glomerular podocyte? The Journal of Pathology*; 220: 328-337.
- [73] WHO. (2000). *Cadmium, in: air quality guidelines for Europe*. Recuperado de: [http : //www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/74732/E71922.pdf](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/74732/E71922.pdf)
- [74] WHO. (2004). *Cadmium in drinking - water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking - water quality*. Recuperado de: [http : //www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cadmium.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/cadmium.pdf)
- [75] WHO. (2007). *Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution*. Recuperado de: <http://www.euro.who.int/document/E91044.pdf>
- [76] WHO. (2008). *Cadmium. In: Guidelines for drinking-water quality, 3rd edition incorporating 1st and 2nd addenda*. Recuperado de: [http : //www.who.int/water_sanitation_health/dwq/GDW12rev1and2.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/GDW12rev1and2.pdf)
- [77] WHO. (2010). *Safety evaluation of certain food additives and contaminants in food*. Recuperado de: [http : //www.who.int/entity/foodsafety/publications/chem/summary73.pdf](http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/chem/summary73.pdf)
- [78] Wolff, N.A., Abouhamed, M., Verroust, P.J., y Thévenod, F. (2006). *Megalin-dependent internalization of cadmium-metallothionein and cytotoxicity in cultured renal proximal tubule cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 318: 782-791.
- [79] Yang, Ch.W., Kim, J., Kim, Y.H., Cha, J.H., Mim, S.Y., Kim, Y.O., Shin, Y.S., Kim, Y.S., y Bang, B.K. (1998). *Inhibition of Calbindina-D_{28K} Expression by Cyclosporin A in Rat Kidney: The Possible Pathogenesis of Cyclosporin A-Induced Hypercalciuria. Journal of the American Society of Nephrology*; 9: 1416-1426.

- [80] Yan, K., Khoshnoodi, J., Routsalainen, V., y Tryggvason, K. (2002). *N-Linked Glycosylation Is Critical for the Plasma Membrane Localization of Nephrin*. *Journal of the American Society of Nephrology*; 13 : 1385-1389.
- [81] Yu, D., Petermann, A., Kunter, U., Rong, S., Shankland, S.J., y Floege, J. (2005). *Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria*. *Journal of the American Society of Nephrology*; 16: 1733-1741.
- [82] Zalups, R.K., y Ahmad, S. (2003). *Molecular handling of cadmium in transporting epithelia*. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 186: 163-188.
- [83] Zavala-Guevara, I.P. (2019). *Reabsorción del complejo Cadmio-Metalotioneína (CdMT) por el receptor NGAL/24p3 en el segmento distal de la nefrona en un modelo in vivo con actividad tubular proximal reducida (Tesis de Doctorado en curso)*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México.
- [84] Zhu, Y., Takashi, M., Miyake, K., y Kato, K. (1991). *Sensitive enzyme immunoassay for human 28 kDa calbindin-D*. *Clinica Chimica Acta*; 201: 183.

El jurado designado por el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional aprueba la tesis:

Evaluación *in vivo* del daño tubular distal por la exposición a cadmio

Que presenta la QFB. Ana Karen Pantaleón Gómez para su examen final de Maestría en Ciencias en la Especialidad de Toxicología, el día 8 de septiembre del año 2020.

Dra. Tania Libertad Jacobo Estrada

Dr. Olivier Christophe Barbier

Dra. María de la Luz Del Razo Jiménez

Dr. Fanis Missirlis