



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Caracterización de la proteína Gas1 en el riñón durante el desarrollo
postnatal en ratas intoxicadas con cadmio durante la gestación**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Andrea Cetina Palma

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Directores de la tesis:

DR. JOSÉ LUIS REYES SÁNCHEZ

DR. JOSÉ VÍCTOR SEGOVIA VILA

Ciudad de México

Septiembre, 2023

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

Resumen

Las nuevas nefronas (nefrogenesis) se generan a partir de Células Progenitoras Renales (CPR) durante el desarrollo embrionario y curiosamente, en algunos mamíferos como las ratas, termina durante el desarrollo posnatal. En el riñón adulto se ha reportado que la proteína Gas1 (Growth Arrest-Specific 1) actúa como un inhibidor endógeno de la proliferación celular pero también es necesario para el mantenimiento y proliferación de las CPR durante el desarrollo temprano, por lo que cumple importantes funciones en el riñón. Sin embargo, no se sabe si Gas1 se expresa o no en el túbulo contorneado proximal durante el desarrollo posnatal, una etapa crítica para la maduración tubular.

Trabajos previos descubrieron que en presencia de diversas nefropatías (nefritis mesangioproliferativa, carcinoma renal de células claras y diabetes) existe un cambio en la expresión de la proteína Gas1 con respecto a la condición sana y que estos cambios en su expresión están directamente relacionados con la proliferación celular. Se sabe que el túbulo contorneado proximal es el blanco principal de la toxicidad del cadmio (Cd), un metal pesado que provoca una nefropatía en donde existe disfunción generalizada del túbulo proximal. Por esta razón el principal objetivo de este trabajo fue explorar mediante inmunofluorescencia y análisis de Western blot si Gas1 se expresaba en el túbulo contorneado proximal durante el desarrollo posnatal de la rata sana, identificar si la expresión de Gas1 en el túbulo proximal se modificaba en crías expuestas a Cd durante su gestación y con nefropatía inducida por Cd, y finalmente, determinar si Gas1 podría estar involucrado en mecanismos de reparación celular inducidos por el Cd. Nosotros encontramos que Gas1 se expresa en el túbulo proximal de la rata sana desde el primer día postnatal (DPN 1) y durante todo el desarrollo, que se expresa principalmente en el citoplasma de las células epiteliales del túbulo proximal, que su expresión aumenta a medida que el riñón madura y que la expresión de Gas1 se mantiene en las células adultas completamente diferenciadas.

En nuestro modelo crónico a exposición a Cd en el útero descubrimos que las crías nacían con función renal y presión arterial normales pero al llegar a la edad adulta (45 y 60 DPN), estas crías desarrollaban hipertensión y daño renal. Concluimos que en una etapa temprana al daño renal (21 DPN) inducido por el Cd se activan mecanismos de reparación celular y que el mayor daño tubular se encuentra en las ratas de 60 DPN, ya que hay una pérdida de la

proteína dipeptidil peptidasa en el borde cepillo, un incremento significativo de la excreción en orina del biomarcador β -2-microglobulina y la ausencia de las proteínas Kim-1 (marcador de daño renal temprano), CD24 (marcador de CPR) y Ki67 (marcador de proliferación celular), en comparación con las ratas de 45 DPN en donde si hay presencia de Kim-1, CD24, de Ki67 pero ausencia de β -2-microglobulina. También descubrimos que la expresión de Gas1 se modificaba (aumenta, se localiza en el borde cepillo, colocaliza con Kim-1, CD24 y Ki67) específicamente con el daño inducido por el Cd. En conclusión, el hallazgo de que Gas1 está presente y aumenta significativamente su expresión en las células epiteliales del túbulo proximal durante el proceso de maduración posnatal en el riñón sano y que mantiene su expresión más alta en el adulto, sugiere que Gas1 podría estar relacionado con el control del ciclo celular, probablemente manteniéndolo detenido en las células epiteliales completamente diferenciadas. Y que probablemente Gas1 también podría estar regulando a las CPR durante la nefropatía inducida por el Cd, permitiendo su activación y manteniéndolas durante los mecanismos de reparación celular tempranos activos.

Abstract

New nephrons (nephrogenesis) are generated from Renal Progenitor Cells (RPC) during embryonic development and interestingly, in some mammals such as rats, it ends during postnatal development. In the adult kidney, the Gas1 (Growth Arrest-Specific 1) protein has been reported to act as an endogenous inhibitor of cell proliferation, but it is also necessary for the maintenance and proliferation of RPCs during early development, therefore it fulfills important functions in the kidney. However, it is not known whether or not Gas1 is expressed in the proximal convoluted tubule during postnatal development, a critical stage for tubular maturation.

Previous work discovered that in the presence of various nephropathies (mesangioproliferative nephritis, clear cell renal carcinoma, and diabetes) there is a change in the expression of the Gas1 protein with respect to the healthy condition and that these changes in its expression are directly related to cell proliferation. The proximal convoluted tubule is known to be the primary target of cadmium (Cd) toxicity, a heavy metal that causes a nephropathy where there is widespread dysfunction of the proximal tubule. For this reason, the main objective of this work was to explore by means of immunofluorescence and Western blot analysis whether Gas1 was expressed in the proximal convoluted tubule during postnatal development of the healthy rat, to identify if the expression of Gas1 in the proximal tubule was modified in the pups exposed to Cd during their gestation and with Cd-induced nephropathy, and finally, to determine if Gas1 could be involved in Cd-induced cell repair mechanisms. We found that Gas1 is expressed in the proximal tubule of the healthy rat from postnatal day (PND) 1 and throughout development, that it is expressed mainly in the cytoplasm of proximal tubule epithelial cells, that its expression increases as that the kidney matures and that Gas1 expression is maintained in fully differentiated adult cells.

In our chronic model of Cd exposure in utero, we found that pups were born with normal kidney function and blood pressure, but upon reaching adulthood (45 and 60 PND), these pups developed hypertension and kidney damage. We conclude that in an early stage of renal damage (21 PND) induced by Cd, cellular repair mechanisms are activated and that the greatest tubular damage is found in offspring of 60 PND, since there is a loss of the dipeptidyl peptidase protein in the brush border, a significant increase in the excretion in urine of the

biomarker β -2-microglobulin and the absence of the proteins Kim-1 (early renal damage marker), CD24 (marker of RPC) and Ki67 (cell proliferation marker), compared to 45 PND pups where there is the presence of Kim-1, CD24, and Ki67 but absence of β -2-microglobulin. We also found that Gas1 expression was modified (increased, localized to brush border, colocalized with Kim-1, CD24, and Ki67) specifically by Cd-induced damage.

In conclusion, the finding that Gas1 is present, and its expression significantly increased in proximal tubule epithelial cells during the postnatal maturation process in the healthy kidney and that it maintains its highest expression in the adult, suggests that Gas1 could be related to cell cycle control, probably by maintaining the arrested cell cycle of fully differentiated epithelial cells. And that Gas1 could probably also be regulating RPCs during Cd-induced nephropathy, allowing their activation, and maintaining them during active early cell repair mechanisms.

Abreviaturas

ADH	Hormona antidiurética
ADL	Adulto
AKT	Serine/threonine-protein kinase
AQP2	Acuaporina 2
B2M	β -2-microglobulina
Ca ⁺	Calcio
CB	Cápsula de Bowman
Cb	Cerebelo
CdCl ₂	Cloruro de cadmio
Cd	Cadmio
CD24	Clúster de diferenciación 24
Cln	Claudina
CPR	Células progenitoras renales
CTL	Control
CTM	Células troncales mesenquimales
°C	Grados centígrados
DPN	Día postnatal
DppD	Dipeptidil peptidasa
E	Día embrionario
Esq	Esquema
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
Fig	Figura
Gas1	Growth arrest specific 1
GDNF	Factor Neurotrópico Derivado de Células Gliales
h	Hora
IgG	Inmunoglobulina G
IMF	Inmunofluorescencia
K ⁺	Potasio
L	Litro
Mg ⁺	Magnesio

µg	Microgramo
mg	Miligramo
min	Minutos
µl	Microlitro
ml	Mililitro
µm	Micrómetro
MM	Mesénquima metanéfrica
MAP	Presión arterial media
N	Normalidad
Na ⁺	Sodio
NCAM	Neural cell adhesion molecule
ND	Nefrona distal
nm	Nanómetro
ns	No significativo
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehido
seg	Segundos
SNC	Sistema nervioso central
ST	Solución estándar
UA	Unidades arbitrarias
WT-1	Wilms tumor protein
YU	Yema ureteral

Índice

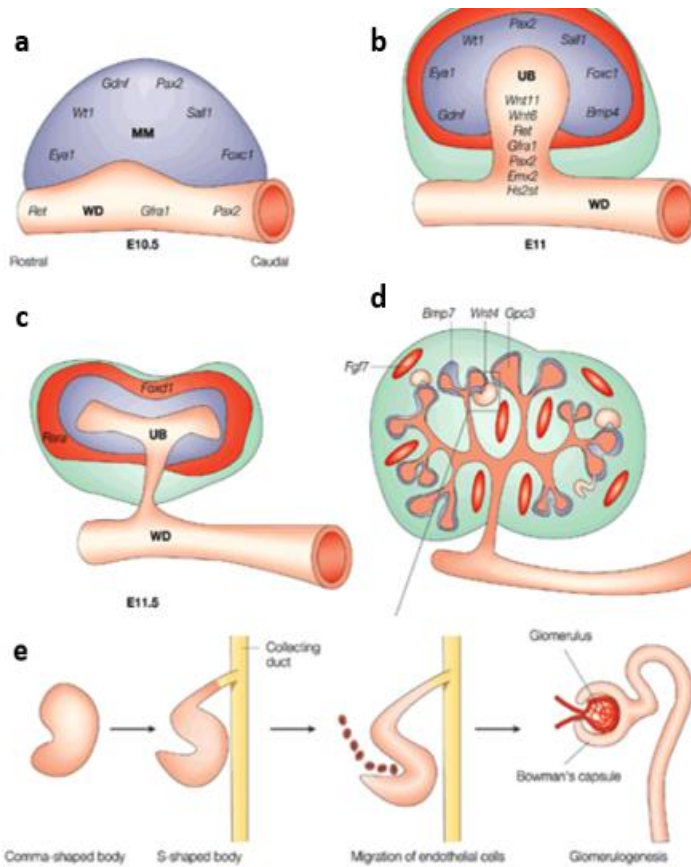
1. Introducción	10
1.1. Desarrollo renal embrionario	10
1.2. El riñón	12
1.3. La nefrona	12
1.4. Eventos postnatales renales.....	12
1.4.1. Maduración renal	12
1.4.2. Nefrogénesis renal	13
1.5. Gas1	14
1.6. Gas1 en el riñón	14
1.7. Gas1 en el desarrollo postnatal en la rata	15
1.8. Gas1 y nefropatías	16
1.9. Cadmio.....	17
1.10. Toxicidad del Cd en el riñón y en el túbulo proximal.....	17
1.11. Efecto del cadmio en crías	18
2. Antecedentes	19
3. Justificación.....	20
4. Objetivos	21
4.1. Objetivos particulares:	21
5. Materiales y métodos	22
5.1. Modelos experimentales	22
5.1.1. Modelo del desarrollo postnatal en la rata sana.....	22
5.1.2. Modelo crónico de exposición a Cd en el útero	22
5.2. Obtención de tejido renal	23
5.3. Parámetros fisiológicos y bioquímicos	23
5.4. Medición de la presión arterial	23
5.5. Medición del peso corporal.....	24
5.6. Aislamiento de túbulos proximales para inmunofluorescencia	24
5.7. Inmunofluorescencias	24
5.8. Método de gradiente de Percoll	25
5.9. Extracción de proteínas.....	26
5.10. Análisis por Western blot.....	26

5.11.	Western blot de orina	27
5.12.	Cuantificación de pixeles	27
5.13.	Análisis de datos.....	27
6.	Resultados	28
6.1.	Gas1 en el túbulo contorneado proximal durante el desarrollo renal postnatal en ratas sanas	28
6.2.	Efecto del cadmio en la ganancia del peso corporal en las crías expuestas durante su gestación.....	32
6.3.	Crías de 21 DPN expuestas durante su gestación	33
6.3.1.	Efecto del cadmio en la función renal en las crías de 21 DPN.....	33
6.3.2.	Gas1 y KIM-1 en los túbulos contorneados proximales en las crías de 21 DPN	34
6.3.3.	Marcadores de CPR y proliferación celular en las crías de 21 DPN	36
6.4.	Ratas de 45 DPN expuestas durante su gestación.....	38
6.4.1.	Efecto del cadmio en la función renal en las ratas de 45 DPN.....	38
6.4.2.	Alteración en la presión arterial inducida por cadmio en las ratas de 45 DPN	39
6.4.3.	Gas1 y KIM-1 en los túbulos contorneados proximales en las ratas de 45 DPN	40
6.4.4.	Marcadores de CPR y proliferación celular en las ratas de 45 DPN	42
6.5.	Ratas de 60 DPN expuestas durante su gestación.....	44
6.5.1.	Efecto del cadmio en la función renal en las ratas de 60 DPN.....	44
6.5.2.	Alteración en la presión arterial inducida por cadmio en las ratas de 60 DPN	45
6.5.3.	Daño tubular en las crías expuestas a cadmio durante su gestación	46
6.5.4.	Gas1 y KIM-1 en los túbulos contorneados proximales en las ratas de 60 DPN	47
6.5.5.	Marcadores de CPR y proliferación celular en las ratas de 60 DPN	49
7.	Discusión.....	51
8.	Conclusiones	63
9.	Referencias	64

1. Introducción

1.1. Desarrollo renal embrionario

En los vertebrados, durante el desarrollo embrionario del riñón se da la diferenciación secuencial de tres estructuras: el pronefros, mesonefros y metanefros, siendo este último el que dará origen al riñón funcional. La formación del riñón funcional comienza por la inducción de dos zonas embrionarias diferentes recíprocamente inducidas, el mesénquima metanéfrico (MM) y la yema ureteral (YU) derivada del conducto de Wolf (Little et al. 2010; Little et al. 2012). La YU comienza la morfogénesis en respuesta a señales provenientes del

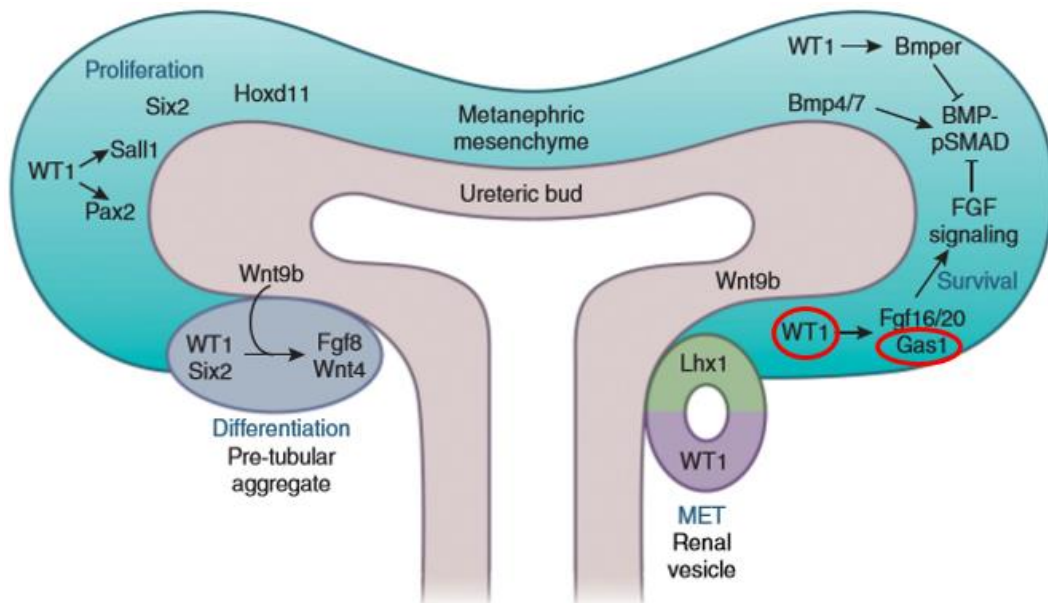


Esq. 1. Desarrollo embrionario de la nefrona. Se muestran los diferentes estados morfológicos renales en la embriogénesis renal del ratón. a) Se muestra al E10.5 las dos zonas embrionarias, el mesénquima metanéfrico (MM) y la yema ureteral (YU) derivada del conducto de Wolf (WD). b) E11, diferentes factores transcripcionales y agentes que regulan el balance entre proliferación, inhibición de la proliferación, apoptosis y diferenciación, necesarios en esta etapa de desarrollo. c y d) Después de las inducciones recíprocas entre el MM y la YU comienza la ramificación del árbol ureteral. e) formación de los agregados en coma y posteriormente en forma de S, finalmente células endoteliales migran y las estructuras glomerulares se forman (Vainio et al. 2002).

MM, que provoca que la YU se ramifique e invada el MM, induciendo que las células adyacentes al MM se condensan alrededor de las puntas de la YU, formando el mesénquima; las células del MM restantes serán el mesénquima estromal, posteriormente los agregados pretubulares provenientes del mesénquima comienzan la transición mesénquima-epitelial para dar lugar a las vesículas renales, que se fusionarán con el tallo ureteral generando los agregados en forma de coma (coma shape) que formarán a los agregados en forma de S (S shape) con hendiduras proximales y distales conforme se van diferenciando. La hendidura más proximal será infiltrada por células endoteliales

formando el penacho glomerular. Finalmente, interacciones recíprocas epitelio-mesénquima inducen a la YU a ramificarse repetidamente de una manera altamente reproducible, y nuevas nefronas se forman a partir del MM adyacente a cada punta de la YU. La YU que se ramifica, forma el sistema de túbulos colectores que conectarán las nefronas con el uréter que drenará la orina en la vejiga (Esq. 1) (Nigam et al. 1996; Costantini et al. 2010; Rizaldy et al. 2020).

El desarrollo renal embrionario está fuertemente regulado por agentes que inducen o inhiben la proliferación y diferenciación celular, por ejemplo, el crecimiento de la YU a partir del conducto de Wolff se da en respuesta a la secreción de GDNF (Factor Neurotrófico Derivado de Células Gliales) por parte de la MM. Esta señal inductora se asocia al receptor c-Ret que se localiza en las membranas plasmáticas de las células epiteliales de la YU temprana. La síntesis de GDNF está regulada por el factor transcripcional WT1. Este factor transcripcional regula la expresión de varios genes mediante su unión a los respectivos promotores. Por ejemplo, después de que el MM responde a la señal del FGF, la proteína Gas1 que es dependiente de la expresión de WT1, promueve la proliferación de la MM al activar la cascada de señalización FGF (Esq. 2)(Vainio et al. 2002; Dong et al. 2015; Takasato et al. 2015).



Esq. 2. WT1 contribuye a la autorenovación y proliferación de la MM. En círculos rojos se observa que WT1 regula directamente la señalización del FGF al regular a Fgf20/Fgf16 y la expresión de Gas1 para antagonizar la cascada BMP-Psmad necesario para la supervivencia y autorenovación de la MM (Dong et al. 2015).

1.2.El riñón

Los riñones son los órganos excretores en los vertebrados, cada individuo posee dos, uno a cada lado de la columna vertebral y están situados en la parte posterior del abdomen, en el retroperitoneo. Estos órganos filtran la sangre del aparato circulatorio y eliminan los desechos (diversos residuos metabólicos del organismo, como son la urea, el ácido úrico, la creatinina, el potasio y el fósforo) mediante la orina, a través de un complejo sistema excretorio que incluye mecanismos de filtración, reabsorción y secreción. El riñón se divide macroscópicamente en dos zonas, una zona externa denominada corteza y una zona interna denominada médula.

1.3.La nefrona

A nivel microscópico, el riñón humano está formado aproximadamente por 2 millones de nefronas (mientras que en las ratas es aproximadamente entre 30-34,000 por órgano). La nefrona es la unidad estructural y funcional del riñón, responsable de la homeostasis de la sangre y del líquido extracelular. Su principal función es filtrar la sangre para regular el agua y las sustancias solubles, reabsorbiendo lo que es necesario y excretando el resto como orina (Nigam et al. 1996; Rizaldy et al. 2020). La nefrona está constituida por el glomérulo, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle (delgada ascendente y descendente), el túbulo distal y los túbulos colectores. El funcionamiento de la nefrona está basado en un intercambio de iones que comienza cuando la sangre ingresa al glomérulo vía la arteriola aferente, el fluido filtrado pasa al tubo contorneado proximal donde el sodio, agua, aminoácidos y glucosa se reabsorben parcialmente, por mecanismos transcelulares y paracelulares (Nigam et al. 1996; Rizaldy et al. 2020).

1.4.Eventos postnatales renales

1.4.1. Maduración renal

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

Los riñones de los mamíferos recién nacidos tienen una limitada capacidad de concentrar orina y una tendencia a retener sodio, cuando se compara con el adulto. Características estructurales y funcionales del riñón son las responsables de estas diferencias, por ejemplo, al nacer el asa de Henle es más corta, existe un bajo gradiente osmótico intersticial y un alto flujo sanguíneo medular, una alta permeabilidad del túbulo colector al sodio, una baja respuesta de las células del túbulo colector a la hormona antidiurética (ADH) relacionada a la escasez de sus receptores, mínima respuesta de la adenil ciclasa a ADH, disminución en el túbulo proximal de los transportadores de aniones orgánicos (SLC22a6 y SLC22a8), entre otras características morfológicas y estructurales (Reyes et al. 1990; Sweeney et al. 2011).

1.4.2. Nefrogénesis renal

Otro evento que ocurre en el periodo postnatal es la nefrogénesis en algunos mamíferos entre ellos, el ratón y la rata. La zona nefrogénica en el riñón en desarrollo genera varios grupos de nefronas antes de desaparecer alrededor de los DPN 6-7 en el ratón. La inducción de nuevas nefronas se completa probablemente en el DPN 3-4. Parece que la ventana de inducción de la mayoría de las nefronas es entre el día E16.5 y el DPN 2. Esto es congruente con lo observado por Cebrián y colaboradores, (Cebrián et al. 2004) los cuales encontraron que solo 700 nefronas estaban presentes en el día E16.5, pero incrementaban a 8,000 nefronas al DPN 2. En ratones la nefrogénesis se detiene poco tiempo después del nacimiento, cuando las CPR están completamente agotadas, mientras que en los humanos la inducción de nuevas nefronas ocurre completamente en el feto (la nefrogénesis termina en la semana 36 de gestación). Hasta la fecha los mecanismos que controlan la proliferación y que la detienen completamente en estas poblaciones es desconocido. Una fuente de células madre capaz de originar las unidades funcionales del riñón, las nefronas, no existe en el órgano adulto, ya que la población de las CPR en el riñón humano se agota al nacimiento. Aunque la población equivalente en los ratones persiste en los primeros días de vida, también se termina, lo que resulta en la incapacidad de generar nuevas nefronas en respuesta a un daño postnatal (Kreidberg et al. 2010).

1.5. Gas1

En los estados no proliferativos de diferentes tipos celulares la expresión de un grupo de 6 genes llamados: genes específicos del arresto del crecimiento o genes GAS se regulan positivamente, se encontró también que en células que se encontraban en etapas no proliferativas la proteína Gas1 se encontraba regulada positivamente. Gas1 (Growth arrest-specific protein 1, por sus siglas en inglés) es una proteína multifuncional, tiene funciones que van desde supresor de tumores, agente proapoptótico/antiapoptótico, regulador positivo del crecimiento del cerebelo durante el desarrollo embrional, entre otros (Spagnuolo et al. 2004; Schueler-Furman et al. 2006).

Gas1 es una proteína extracelular anclada a la membrana y posee una región glicosilfosfatidilinositol. Está formada por 345 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 37 KDa. El homólogo de Gas1 en humanos ha sido identificado y posee una homología con el Gas1 murino de 76.6% a nivel de aminoácidos. Gas1 detiene el ciclo celular en la transición de la fase G0 a la fase S. Gas1 actúa inhibiendo la señalización intracelular inducida por GDNF, reduciendo tanto el patrón de autofosforilación de Ret como la activación de AKT, induciendo así la detención celular y la apoptosis. En cultivos celulares, la sobre-expresión de esta proteína inhibe la síntesis de ADN y detiene la proliferación celular. En cultivos primarios se conoce su actividad como agente proapoptótico en neuronas del hipocampo, neuroblastomas y células gliales. Se encuentra expresada en cerebro, riñón, corazón, células endoteliales, pulmón, gónadas (próstata y glándulas mamarias) y músculo esquelético. Se propuso, que los efectos de Gas1 en el arresto celular e inducción de apoptosis a nivel del sistema nervioso son causados por su capacidad de inhibir la señalización intracelular inducida por GDNF, que se encuentra presente y juega un papel muy importante en la morfogénesis renal (Schueler-Furman et al. 2006; López-Ramírez et al. 2008; Dominguez-Monzon et al. 2011).

1.6. Gas1 en el riñón

La formación del riñón funcional (metanefros) durante el desarrollo embrionario depende de varios procesos biológicos, entre ellos la proliferación y diferenciación celular de las CPR. La investigación sobre la nefrogénesis y las CPR ha llevado a la identificación de agentes

que controlan este fino balance entre la autorenovación y la diferenciación de las CPR, incluyendo al factor transcripcional WT1. Se ha demostrado que WT1 activa directamente la expresión de Gas1 (al unirse a su promotor) promoviendo la proliferación de la MM (Vainio et al. 2002). Debido a que Gas1 es una proteína pleiotrópica, es decir, es una proteína que tienen un papel particular según el contexto celular en el que está presente (Segovia et al. 2014), se han descrito diferentes funciones de Gas1, por ejemplo, varios reportes han demostrado que Gas1 se expresa durante el desarrollo temprano y que su papel *in vivo* parece estar alineado a positivo en vez de negativo en la regulación de la proliferación celular. Un ejemplo de lo anterior nos lo da Kann en el 2015, demostró en un modelo murino que en ausencia de WT1 durante la embriogénesis la MM presenta apoptosis, resultando en agénesis renal, ya que WT1 controla la expresión de varios genes requeridos para la proliferación y diferenciación de las CPR, incluyendo Gas1. También observaron que al disminuir la expresión de WT1 durante el desarrollo renal también disminuía significativamente la expresión de Gas1 en la MM, y al nacer estos ratones tenían riñones hipoplásicos. Este grupo también realizó el silenciamiento de Gas1 y concluyó que el silenciamiento de Gas1 durante el desarrollo embrionario renal causaba una pérdida progresiva de CPR identificadas con los marcadores Six2 y NCAM, y que ésta pérdida en las células progenitoras era debido a la disminución en su proliferación; por lo tanto Gas1 tiene un papel clave durante el desarrollo renal embrionario manteniendo las CPR *in vivo* (Kann et al. 2015).

1.7. Gas1 en el desarrollo postnatal en la rata

En un trabajo reciente descubrimos que Gas1 presenta un patrón de expresión diferencial en las diversas regiones de la nefrona. Nosotros encontramos que Gas1 se expresa en la cápsula de Bowman, el glomérulo y la nefrona distal durante todo el desarrollo posnatal, es decir, Gas1 está presente y aumenta significativamente su expresión durante el proceso de maduración posnatal en el riñón, y su expresión más alta es durante la etapa adulta, lo que sugiere que Gas1 podría estar relacionado con el control del ciclo celular, probablemente manteniendo el ciclo celular detenido de células completamente diferenciadas en la nefrona. Adicionalmente, también encontramos que Gas1 se expresa en las CPR durante el desarrollo postnatal, y que los niveles más altos encontrados de Gas1 son en el adulto. Más aún, las CPR (NCAM⁺/CD24⁺) tiene un patrón de expresión inverso a Gas1 durante la maduración

renal posnatal (Tesis Maestría Cetina Palma 2016). Este resultado es importante ya que podría indicar un papel de Gas1 como regulador negativo de las CPR en las estructuras tubulares durante la maduración renal y en la edad adulta, de manera similar a la observada en la cápsula de Bowman (Luna-Antonio et al. 2017). Este posible papel de Gas1 como regulador de las células progenitoras también se ha descrito previamente en el cerebro posnatal sugiriendo que Gas1 podría estar regulando el ciclo celular en las células neurales; por otro lado, también se sabe que Gas1 se expresa en células madre que se encuentran arrestadas en la fase G0 del ciclo celular, a menos que se activen y entren en el ciclo celular (Martinelli et al. 2007).

1.8. Gas1 y nefropatías

Se ha descrito que la expresión de Gas1 cambia en diferentes nefropatías con respecto a la condición sana y que estos cambios en su expresión están directamente relacionados con la proliferación celular, reflejando un papel crítico de Gas1 como posible regulador de la proliferación celular a nivel renal.

Por ejemplo, se encontró que la expresión de Gas1 disminuye en la cápsula de Bowman en un modelo murino con hiperglucemia inducida experimentalmente, y esta disminución permite el incremento de marcadores de células progenitoras renales (NCAM⁺, CD24⁺, SIX1/2⁺) que se relaciona con una activación de mecanismos de reparación inducidos o provocados por las grandes concentraciones de glucosa presente en la sangre (Luna-Antonio et al. 2017). También se ha descrito que la expresión de Gas1 se encuentra disminuida significativamente en la nefritis mesangioproliferativa, atribuyéndole a Gas1 una posible función de inhibidor endógeno de la proliferación de las células mesangiales, ya que, en condiciones normales estas células expresan Gas1 (van Roeyen et al. 2013). Otro antecedente referente al cambio en la expresión de Gas1 en diversas patologías renales es el proporcionado por Conceição y colaboradores, quienes encontraron que en el carcinoma renal de células claras la expresión de Gas1 se encuentra regulada negativamente cuando lo comparaba con tejido renal sano e interesantemente encontró lo mismo al utilizar la línea celular 786-O, una línea celular de cáncer renal humano (Conceição et al. 2017).

1.9. Cadmio

El cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial, tóxico a muy bajas dosis, no biodegradable y con una vida media biológica muy larga. La forma tóxica del cadmio es la forma ionizada (Cd^{2+}), ya que cuando el cadmio está unido a una proteína no es tóxico. La forma divalente se unirá rápidamente a proteínas o enzimas ricas en grupos tioles, posteriormente este complejo de Cd-Proteína se catalizará dentro de los lisosomas y nuevamente la forma ionizada Cd^{2+} será liberada, siendo esta la responsable de la citotoxicidad, ya que altera la actividad mitocondrial provocando estrés oxidativo y muerte celular. Por lo tanto, su estado ionizado dependerá de si está o no unido a proteínas o enzimas. La exposición a Cd se ha convertido en un problema ambiental y de salud a nivel mundial (Jacobo-Estrada et al. 2017).

El cadmio (como óxido, cloruro o sulfato) se encuentra en el aire en forma de partículas o vapores, y por lo tanto puede ser transportado en la atmósfera para ser depositado (húmedo o seco) sobre la superficie del suelo o del agua y puede ser incorporado por plantas, entrando así a la cadena alimentaria. El Cd^{2+} ingresa a las células vegetales/animales a través de los transportadores de metales esenciales Fe^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+} y rápidamente se une a proteínas o enzimas ricas en grupos tioles acumulándose en diversas estructuras. Las plantas de tabaco poseen la capacidad específica y muy alta de absorber el Cd del suelo y acumularlo en sus raíces y hojas. Se ha reportado que al fumar un cigarro la concentración de Cd en la sangre es de 0.1-0.2 μg de Cd/L, ya que cada cigarro contiene aproximadamente 1-2 μg de Cd, sin embargo se ha demostrado que el contenido de Cd puede variar dependiendo del origen del tabaco, por ejemplo se encontró que los cigarros en México tienen una concentración de 2.5-2.8 μg de Cd (Thévenod et al. 2013; Jacobo-Estrada et al. 2017).

1.10. Toxicidad del Cd en el riñón y en el túbulo proximal

Este metal pesado daña diversos órganos, entre ellos se encuentra el riñón, el hígado, el pulmón y los huesos. El daño depende de la dosis, la ruta y la duración de la exposición a cadmio. Se ha reportado que la vida media del cadmio en el riñón es de aproximadamente de 6-38 años, debido a que su eliminación del cuerpo es mínima y extremadamente lenta, quedando almacenado principalmente en el hígado y en los riñones.

Debido a la baja concentración en la que se encuentra este metal pesado en el ambiente, en el humo del cigarro o en alimentos, existe un patrón de exposición crónica y en humanos el principal órgano dañado es el riñón. La nefropatía causada por el Cd es debida al daño en el túbulo proximal, caracterizado por poliuria, el incremento de excreción urinaria de glucosa, aminoácidos, diversos electrolitos (principalmente Na^+ , K^+ , y Ca^+) y proteínas de bajo peso molecular; así como también dañando la vía paracelular pasiva y una disminución en el transporte activo de iones transcelulares, entre otras cosas. Este daño tan severo y particular en el túbulo proximal es debido a que esta porción de la nefrona es el principal sitio de reabsorción del Cd, ya que más del 90% del cadmio filtrado es del complejo Cd-Proteína y que es reabsorbido en este segmento. (Jacquillet et al. 2007; Prozialeck et al. 2012; Jacobo-Estrada et al. 2017).

1.11. Efecto del cadmio en crías

Mediante modelos murinos se sabe que la intoxicación por cadmio daña la función renal de las crías de ratas intoxicadas durante el embarazo, presentando daño renal a partir del DPN 60, reflejado por una disminución de la tasa de filtración glomerular asociada con un incremento de la excreción de iones (Na^+ , K^+ , Mg^+ , entre otros), daño tubular, función alterada en la depuración de creatinina, entre otros. En trabajos previos se ha demostrado que hay altos niveles de Cd en sangre, hígado y riñones en las crías desde el DPN 1-60, así como una disminución del peso corporal de la progenie desde que nacen hasta el DPN 21. También se encontró una expresión desorganizada de las proteínas de las uniones estrechas Cln2 y Cln5, expresadas específicamente en el túbulo proximal y en el glomérulo, respectivamente. Por lo anterior, podemos concluir que en modelos murinos la exposición a Cd durante el embarazo tiene efectos dañinos en las crías (cuando llegan a la etapa adulta) ya que presentan un cuadro de nefropatía (Antonio Garcia et al. 2004; Jacquillet et al. 2007; Nakamura et al. 2012).

2. Antecedentes

En un trabajo previo de nuestro grupo se caracterizó el patrón de expresión de Gas1 en el riñón sano en la rata adulta, encontrando que Gas1 se expresa en el glomérulo, la cápsula de Bowman y en la nefrona distal, pero no en el túbulo proximal (Luna-Antonio et al. 2017).

En otro trabajo previo encontramos que durante el desarrollo postnatal Gas1 presenta un patrón de expresión diferencial a nivel renal, ya que su expresión aumenta conforme madura el riñón y su expresión más alta es en el adulto, sugiriendo un posible papel de Gas1 como marcador de estado de diferenciación celular a nivel glomerular y distal. De igual manera caracterizamos el patrón de expresión de marcadores de las CPR (NCAM+/CD24+) durante el desarrollo postnatal, encontrando que estos marcadores disminuyen conforme madura el riñón, observándose una relación inversa entre la expresión de Gas1 y NCAM+/CD24+, sugiriendo un posible papel de Gas1 como regulador negativo de las CPR en las estructuras tubulares durante la maduración renal y en la edad adulta (Tesis Maestría Cetina Palma 2016).

Por otro lado, se ha descrito que la expresión de Gas1 cambia en diferentes nefropatías respecto a la condición sana y que estos cambios están directamente relacionados con la proliferación celular. Por ejemplo, se encontró que la expresión de Gas1 disminuye en la cápsula de Bowman en ratas con hiperglucemia inducida experimentalmente, y esta disminución permite el incremento de marcadores de células progenitoras renales (NCAM+, CD24+, SIX1/2+) que se relaciona con un mecanismo de reparación inducido por las grandes concentraciones de glucosa en la sangre (Luna-Antonio et al. 2017). También se ha descrito que la expresión de Gas1 se encuentra disminuida en la nefritis mesangioproliferativa, atribuyéndole a Gas1 una posible función de inhibidor endógeno de la proliferación de las células mesangiales, ya que, en condiciones normales estas células expresan Gas1 (van Roeyen et al. 2013). Otro antecedente referente al cambio en la expresión de Gas1 en diversas patologías renales es el proporcionado en el 2017 por Conceição y colaboradores, quienes encontraron que en el carcinoma renal de células claras la expresión de Gas1 se encuentra regulada negativamente (Conceição et al. 2017).

3. Justificación

No existe información sobre si Gas1 se expresa o no en el túbulo contorneado proximal durante el desarrollo postnatal ni mucho menos en el adulto. Tampoco se sabe si la expresión de Gas1 se modifica en el túbulo proximal como consecuencia de la nefropatía inducida por algún metal pesado, y si se expresa que papel podría estar teniendo Gas1 durante la nefropatía.

Como vimos anteriormente, existen modificaciones en el patrón de expresión de Gas1 en presencia de ciertas nefropatías, como es el caso de la diabetes, nefritis mesangioproliferativa y carcinoma renal de células claras. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que en una nefropatía inducida por la exposición a un metal pesado como el Cd (ya que la exposición a cadmio durante periodos críticos en el desarrollo, como lo es la gestación y la maduración renal postnatal daña la función renal en etapas adultas)(Jacquillet et al. 2006; Jacquillet et al. 2007; Jacobo-Estrada et al. 2017), el patrón de expresión de Gas1 encontrado en las ratas sanas, estará modificado y estará relacionado con la activación de mecanismos de reparación celular a nivel del túbulo proximal involucrando a CPR.

4. Objetivos

Caracterizar el patrón de expresión de Gas1 en el túbulo proximal durante el desarrollo renal postnatal en ratas en un modelo de daño renal inducido por intoxicación con Cd durante el periodo gestacional.

4.1. Objetivos particulares:

- ☼ Identificar si Gas1 se expresa en el túbulo proximal de ratas sanas durante el desarrollo postnatal.
- ☼ Confirmar que Cd administrado durante el periodo gestacional genera nefropatía en las ratas púberes y adultas jóvenes.
- ☼ Identificar si existe algún cambio en el patrón de expresión de Gas1 en el túbulo contorneado proximal en las crías expuestas a Cd durante el periodo gestacional en comparación con la expresión de las crías sanas.
- ☼ Caracterizar el patrón de expresión de marcadores de células progenitoras renales en las crías expuestas a Cd.
- ☼ Evaluar si hay proliferación en las crías expuestas a Cd.

5. Materiales y métodos

5.1. Modelos experimentales

5.1.1. Modelo del desarrollo postnatal en la rata sana

Los experimentos con animales se llevaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y el Comité Institucional del Laboratorio de Cuidados Animales (UPEAL). Los animales experimentales fueron ratas hembra Wistar a diferentes días postnatales (DPN), a los DPN 1, 3, 7, 10, 14, 21 y adulto de 2 meses (ADL/60 DPN). Se mantuvieron con ciclos normales de 12/12 h luz/oscuridad a una temperatura promedio de 22 ± 1 °C y $50 \pm 5\%$ de humedad (Luna-Antonio et al. 2017). Los animales tuvieron acceso *ad libitum* al alimento y agua.

5.1.2. Modelo crónico de exposición a Cd en el útero

Se utilizaron ratas hembra Wistar gestantes de tiempo exacto (ratas madres), es decir, ratas hembra que después de ponerlas en cruce con un macho resultaron preñadas comenzando con el protocolo experimental desde el día 1 de embarazo. Los animales se mantuvieron con ciclos normales de luz/oscuridad (12/12 h) a una temperatura promedio de 22 ± 1 °C y $50 \pm 5\%$ de humedad. Los animales tuvieron acceso *ad libitum* al alimento y agua.

Grupo de madres tratadas con cloruro de cadmio ($CdCl_2$): ratas gestantes de tiempo exacto a las que se les administró $CdCl_2$ vía oral desde el primer día gestacional, con una dosis de $0.5 \mu\text{g}$ de $CdCl_2/\text{Kg}/\text{día}$ (Jacquillet et al. 2006; Jacquillet et al. 2007). La solución de $CdCl_2$ se administró a este grupo todos los días a la misma hora mediante una cánula intragástrica utilizando una cánula oral únicamente durante el periodo gestacional (aproximadamente 21 días de gestación). La exposición diaria a cadmio en las ratas preñadas se detuvo en el día del parto.

Grupo de madres control: el grupo control (CTL) fueron ratas gestantes de tiempo exacto a las que se les administro vía oral y desde el primer día gestacional solamente el vehículo del $CdCl_2$ que fue agua, mediante una cánula intragástrica utilizando una cánula oral.

La administración diaria del vehículo en las ratas de este grupo se detuvo en el día del parto. Después del nacimiento de las crías de ambos grupos (CTL y Cd), se realizó el sexado para seleccionar solamente las crías hembras en cada grupo. Posteriormente, ambos grupos de

crías (CTL y Cd) se mantuvieron con sus respectivas Madres durante toda la lactancia hasta el destete (DPN 21). Se evaluaron 3 tiempos postnatales diferentes en cada grupo de crías estudiado: crías de 21, 45 y 60 DPN.

5.2. Obtención de tejido renal

Se sacrificaron las ratas en cada DPN designado en cada grupo para evaluar, y se recolectaron muestras de tejido renal. Los riñones en cada DPN se perfundieron con solución salina (NaCl 0.9%) y fueron colocados en solución salina fría. Posteriormente, se crioconservaron sumergiéndolos en 2-metil-butano (Aldrich; Milwaukee, WI) por 30 seg, seguido por 2.5 min en nitrógeno líquido y después a temperatura ambiente por 2.5 min más (únicamente los DPN 1, 3, 7, 10, 14 y 21). Para los riñones de los grupos ADL, se cortaron rebanadas de un grosor aproximado de 0.3 mm y se sumergieron en 2-metil-butano por 1 min, seguido por 5 min en nitrógeno líquido y después a temperatura ambiente por 5 min más. Finalmente, el tejido se almacenó a -80°C.

5.3. Parámetros fisiológicos y bioquímicos

Se obtuvieron muestras de orina y sangre de cada grupo evaluado. Las muestras de sangre se adquirieron por punción cardiaca y se centrifugaron para obtener el suero. Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas y se recolectó la orina de 24 h para cada grupo experimental. El análisis de proteinuria se realizó mediante el método de Lowry (Bio-Rad Protein Assay Kit, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) y la depuración de creatinina mediante la reacción de Jaffe como se describe previamente (Bradford 1976; Molina-Jijón et al. 2014). Las muestras de orina y suero se almacenaron a -80°C previo a su uso. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y con una n>6 por grupo.

5.4. Medición de la presión arterial

Para obtener mediciones precisas de la presión arterial diastólica, sistólica y MAP (Presión Arterial Media, por sus siglas en inglés) de cada uno de los grupos evaluados, utilizamos el sistema de presión arterial no invasivo, el sistema CODA (Kent Scientific Corp.) La presión arterial se midió en la cola de cada rata utilizando la tecnología de sensor de registro de

presión de volumen (Daugherty et al. 2009). Cada toma de presión arterial se realizó por triplicado y con una n>8 por grupo.

5.5. Medición del peso corporal

Se pesaron las crías de ambos grupos (CTL y Cd) durante el desarrollo postnatal comenzando con la cría de 2 DPN y terminando con las crías adultas de 56 DPN. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y con una n>15 en las crías más pequeñas (2 DPN) y una n> 8 a partir de las crías de 7-56 DPN.

5.6. Aislamiento de túbulo proximales para inmunofluorescencia

Los túbulo renales proximales de las crías fueron aislados como se describió por Reyes et al. 1992. Brevemente, después de sacrificar las crías, los riñones fueron obtenidos rápidamente y colocados a 4°C en solución (mmol/L): 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 3.5 KCl, 1.25 KH₂PO₄, 1.25 CaCl₂, 1.25 MgSO₄, 5.5 dextrosa, 1.0 citrato de sodio, 1.0 lactato de sodio, 1.12 l-alanina, 0.9 glicina, 1 g albumina pH 7.4 (Sigma Co., St. Louis, MO, USA). Rebanadas de 1-2 mm de la región corticomedular del riñón se obtuvieron y se colocaron en cajas Petri de vidrio sumergidas en la misma solución a 4°C. Los túbulo proximales se identificaron y diseccionaron manualmente usando un microscopio estereoscópico (X20).

5.7. Inmunofluorescencias

El tejido renal criopreservado con 2-metil-butano se cortó en rebanadas (6 µm de grosor) y se colocó en portaobjetos previamente gelatinizados. La inmunofluorescencia fue realizada de acuerdo con la metodología utilizada por Molina-Jijón et al. 2015.

Corte renal: los cortes se fijaron con metanol por 10 minutos a 4°C, se incubaron las laminillas con buffer de citrato de sodio (J. T. Baker, Xalostoc, México) 10 mM pH 6.0 a 4°C durante 20 min. Se permeabilizó con PBS Tween 20 al 1% por 14 minutos a 4°C. Después se bloqueó con 0.5% de albúmina libre de IgG por 1.5 h a temperatura ambiente y se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario contra DppD (1:250, Bio Rad), CD24 (1:250, Pharmingen), Gas1 (1:100, Pro-Sci), KIM-1 (1:100, Invitrogen) y Ki67 (1:100, Santa Cruz).

Túbulos proximales aislados: se obtuvieron manualmente los túbulos contorneados proximales descrito por González-Mariscal et al. 2000. Los túbulos se fijaron 1 min en etanol y después 1 min en acetona a temperatura ambiente. Se incubaron con un amortiguador de citrato de sodio 10 mM pH 6.0 a 4 °C durante 20 min. Se permeabilizó con PBS Tween 20 al 1% por 10 minutos y se bloqueó con albúmina 0.5% libre de IgG por 1 h a temperatura ambiente y se incubó a 4°C toda la noche el anticuerpo primario Cln2 (1:250, Invitrogen) y Gas1 (1:100, Pro-Sci). Se usaron los anticuerpos secundarios levantados en cabra: Alexa Fluor 594 anti-conejo (rojo, 1:600, Invitrogen) y Alexa Fluor 488 anti-ratón (verde, 1:600, Invitrogen). Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio confocal (TCS-SP8, Leica, Heidelberg, Germany) y analizadas con el programa LAS AF LITE (Leica Microsystem). Cada experimento de inmunofluorescencia se realizó al menos 3 veces, en tiempos diferentes y en muestras de n>3 animales por grupo estudiado.

5.8.Método de gradiente de Percoll

Fraciones enriquecidas de túbulos proximales: se obtuvieron de la corteza renal mediante centrifugación en gradiente de densidad de Percoll como se describió en los trabajos de González-Mariscal et al. 2000 y Molina-Jijón et al. 2014. Brevemente, una vez obtenidos los riñones se colocaron en solución Ringer-Krebs HCO₃ (RKHCO₃) a 4°C. Se obtuvieron fragmentos corticales y se digirieron con colagenasa (15 mg/25 ml de RKHCO₃) . Posteriormente las muestras se transfirieron a un matraz Erlenmeyer previamente cubierto con silicón para evitar la adhesión del tejido a las paredes. El tejido en suspensión se gasifico con carbógeno por 30 min a 37°C y con agitación constante. La digestión enzimática se detuvo con RKHCO₃ a 4°C. La suspensión se filtró a través de una malla metálica para eliminar las fibras de colágeno y se resuspendió en 10 ml de RKHCO₃ a 4°C; se centrifugó por 20 min y el pellet se resuspendió en RKHCO₃ a 4°C, este paso se repite 2 veces más. Posteriormente, el tejido se resuspendió en albúmina al 5% por 5 min a 4°C y se centrifuga nuevamente. El pellet se resuspendió en la solución de Percoll (1:1) y se centrifugo a 4°C por 30 min a 20,000 × g, estableciéndose un gradiente que separa el tejido en 3 bandas: banda 1 (b1) túbulos distales; banda 2 (b2) mezcla de túbulos y banda 3 (b3) túbulos contorneados proximales. El contenido de proteína total en lisados de proximales (b3) se determinó por el método de Lowry (Bio-Rad Protein Assay Kit, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Para

confirmar el enriquecimiento de túbulos proximales mediante el análisis de Western blot, utilizamos como control positivo al Transportador de glucosa sodio 1 (SGLT1) y claudina 2 (Cln 2), y como control negativo utilizamos una proteína específica de la nefrona distal, la acuaporina 2 (AQP2).

5.9.Extracción de proteínas

Realizamos la extracción de proteínas totales de la fracción enriquecida de túbulos contorneados proximales (banda b3 de Percoll). Cada muestra la incubamos por 30 min a 4°C en buffer de lisis (RIPA; 10 mM): 40 Tris-HCl, pH:7.6, 150 NaCl, EDTA, glicerol al 10%, 1% Triton X-100, deoxiclorato de sodio 0.5% y SDS. Posteriormente, las muestras fueron sonicadas 3 veces durante 30 seg en un procesador ultrasónico de alta intensidad (Vibra cell; Sonics & Materials Inc., Danbury, CT, USA) y centrifugado a 4°C por 20 min recuperando los sobrenadantes. La cuantificación de la proteína total se realizó con el método de Lowry (Bio-Rad Protein Assay Kit, Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

5.10. Análisis por Western blot

Las muestras de proteína se prepararon con la solución de Laemmli, se desnaturalizaron y se cargaron (45 µg/pozo) en geles SDS-PAGE de 12%. Los geles se corrieron a 90 V por 150 min y las proteínas fueron transferidas a membranas fluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore Corp. Bedford, MA, USA). Posteriormente, la unión inespecífica de proteínas fue bloqueada con caseína 1% e incubadas a 4 °C toda la noche con los anticuerpos primarios, Gas1 (1:500, Pro Sci), Cln2 (1:250, Invitrogen), SGLT1 (1:500, Invitrogen), AQP2 (1:300, Santa Cruz) y tubulina (1:1000, Invitrogen). Las proteínas se detectaron por un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (1:10,000) a temperatura ambiente detectándose la quimioluminiscencia (UVP Biomaging Systems, Cambridge, UK). La cuantificación se realizó midiendo la intensidad de la señal de la banda de proteína con el programa Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y en diferentes tiempos.

5.11. Western blot de orina

Se recolectó la orina de 3 ratas por cada grupo experimental, posteriormente las muestras de orina se prepararon con la solución de Laemmli y se desnaturalizaron. Se cargó cada pozo con el mismo volumen (30 μ l/pozo) (Hepojoki et al. 2019) y la orina de una sola rata (1 rata/pozo) para cada uno de los grupos evaluados, en geles SDS-PAGE de 12%. Los geles se corrieron a 90 V por 150 min y las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Millipore Corp. Bedford, MA, USA). Posteriormente, la unión inespecífica de proteínas fue bloqueada con caseína 1% e incubadas a 4 °C toda la noche con el anticuerpo primario, β -2- microglobulina (1:200, Santa Cruz).

5.12. Cuantificación de pixeles

La cuantificación se realizó en imágenes utilizando los mismos parámetros de captura con el microscopio confocal (TCS-SP8, Leica, Heidelberg, Germany) y analizadas con el software Leica LAS AF Lite. Los valores de la cuantificación de pixeles se obtuvieron al sacar la relación entre el valor de los pixeles totales en un área específica. Se analizaron varios campos por muestra ($n > 6$, y varias muestras de diferentes ratas ($n > 3$) por cada condición experimental.

5.13. Análisis de datos

Todos los resultados se muestran como la media \pm la desviación estándar. Para la comparación de dos grupos se utilizó la prueba *t* de Student. Las diferencias estadísticas entre los grupos se analizaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y como prueba *post-hoc* se utilizó la prueba Tukey. Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

6. Resultados

6.1. Gas1 en el túbulo contorneado proximal durante el desarrollo renal postnatal en ratas sanas

Debido a que se ha reportado anteriormente que Gas1 posee diversas funciones, quisimos explorar si Gas1 se expresaba en el túbulo contorneado proximal. Mediante IMF de túbulos proximales aislados de la corteza renal de las diferentes edades postnatales estudiadas, encontramos que la expresión de Gas1 es principalmente citoplasmática, que está presente desde el nacimiento y que su patrón general de expresión es incrementar conforme el riñón madura (Fig. 1 A).

Como control positivo de esta sección de la nefrona utilizamos la proteína de las uniones estrechas claudina 2 (Cln2)(González-Mariscal et al. 2003; Venugopal et al. 2019), podemos observar que el patrón de expresión de malla de gallinero característico de Cln2 está presente desde el DPN 1 e interesantemente incrementa su expresión conforme madura el riñón (Fig. 1 B). También encontramos que al DPN 21 hay más Cln2 citoplasmática que colocaliza con Gas1 (color amarillo, Fig. 1 C). Con estos resultados en túbulos contorneados proximales aislados podemos confirmar sin duda que Gas1 se expresa en el citoplasma desde el primer día de nacida la rata y aumenta su expresión conforme madura el riñón.

Este aumento significativo en la expresión de Gas1 y Cln2 se observa mejor al comparar las IMF del DPN 1 con el ADL (Fig. 2 A, B), también observamos un incremento evidente en el tamaño del túbulo contorneado proximal en el adulto (Fig. 1 D y 2 C, D). Mediante el análisis de Western blot en una muestra enriquecida de túbulos proximales, confirmamos que hay un incremento progresivo en la expresión de las proteínas Gas1, Cln2 y del Transportador de glucosa-sodio 1 (SGLT1), utilizado como otro control positivo del túbulo proximal (Fig. 2 E), relacionado con la maduración tubular proximal, ya que la expresión más alta de Gas1, Cln 2 y SGLT1 son en la etapa adulta del riñón y estos incrementos son estadísticamente significativos (Fig. 2 F, no se muestra el análisis de Cln2); encontramos el mismo resultado en el análisis semicuantitativo de Gas1 y Cln2, ambas proteínas tienen un incremento estadísticamente significativo conforme madura el riñón (Fig. 2 G).

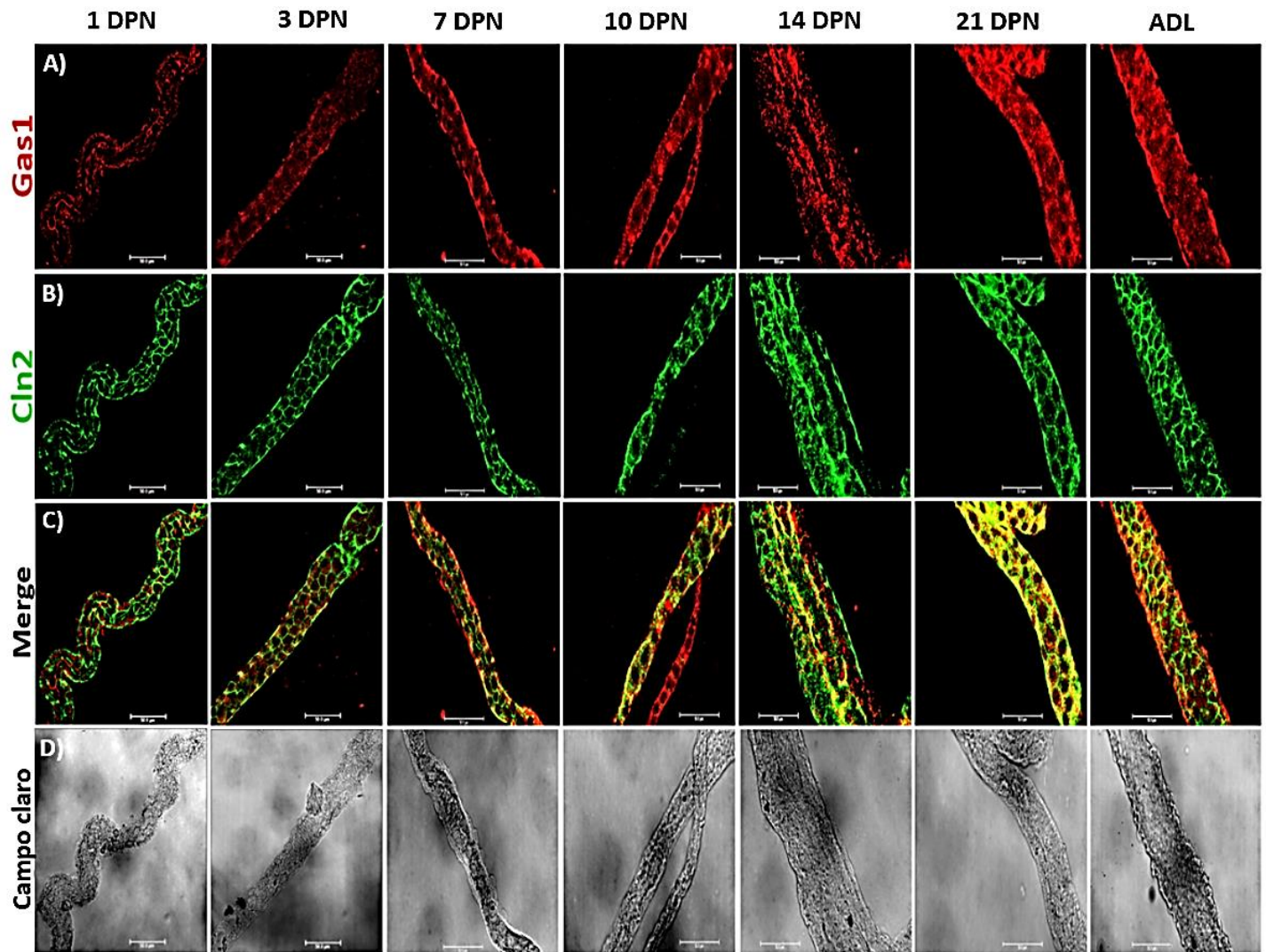


Fig. 1. Gas1 se expresa en el túbulo contorneado proximal en el riñón durante el desarrollo postnatal y en la etapa adulta en la rata. A) análisis mediante inmunofluorescencias del patrón general de expresión de Gas1 en túbulos proximales aislados de la corteza renal en las diferentes edades postnatales (DPN) estudiadas. Encontramos que Gas1 se expresa citoplasmáticamente e incrementa conforme el riñón va madurando. B) Proteína claudina 2 (Cln2) como marcador específico de la sección proximal de la nefrona. C) Superposición de la proteína Gas1 y Cln2, se observa que Gas1 colocaliza con Cln2 principalmente en los DPN 14 y 21. D) Campo claro, se observa la morfología clásica contorneada tubular proximal, en los DPN 14 y 21 se ve más de un túbulo proximal. En el DPN 10 se observa un túbulo proximal (Cln2⁺) y otro túbulo que no es proximal (Cln2⁻). Se muestra Gas1 (rojo), Cln2 (verde) y superposición (Gas1/Cln2, amarillo). Barras de escala = 50 μ m. Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron en túbulos proximales aislados. Se muestra un experimento representativo.

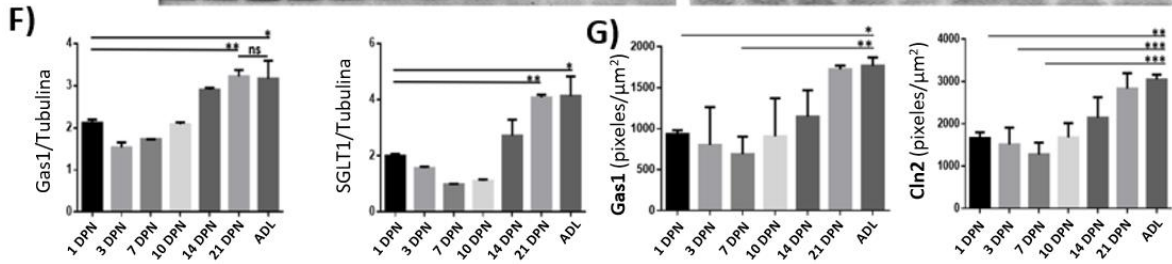
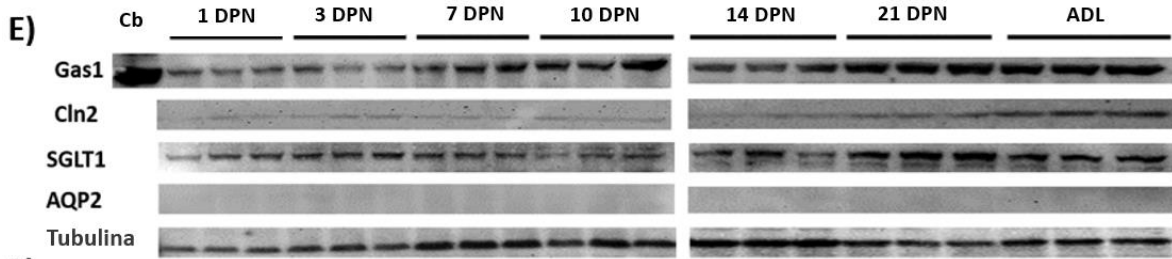
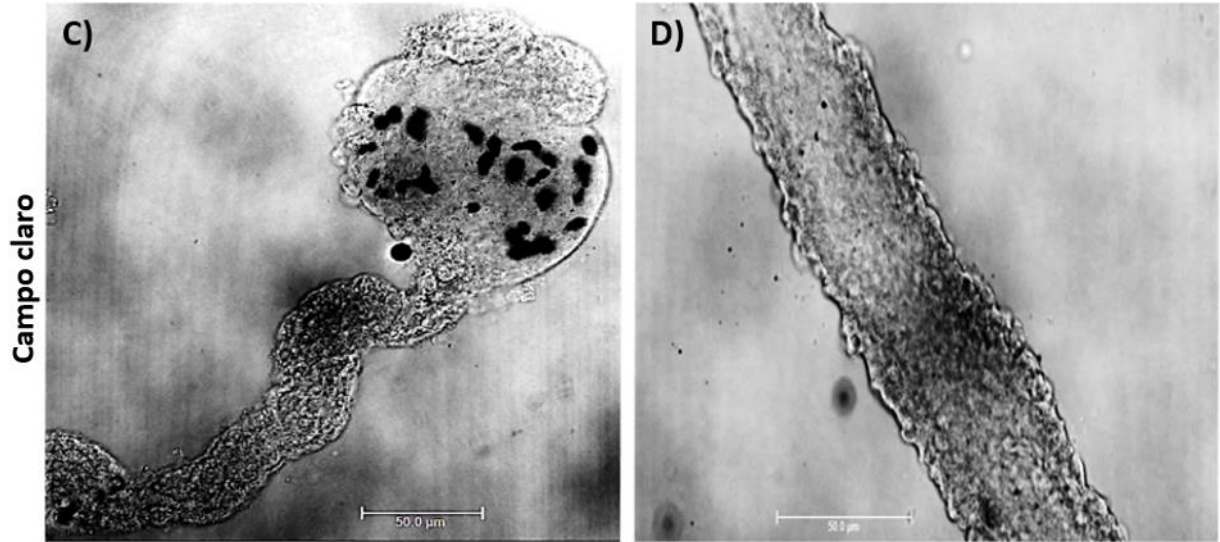
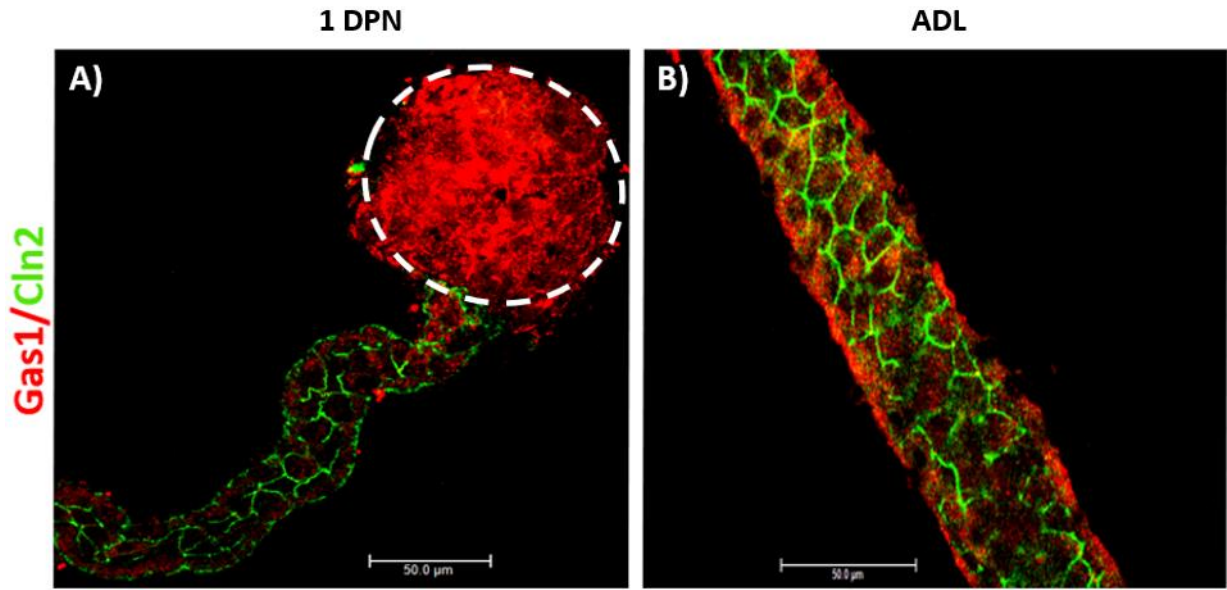


Fig. 2. Comparación de la expresión de Gas1 y claudina 2 (Cln2) en el túbulo contorneado proximal en la rata recién nacida y en la adulta. A y B) inmunofluorescencias de túbulos contorneados proximales aislados de la corteza renal de ratas del DPN 1 y ADL. Encontramos un patrón de expresión creciente de Gas1 y Cln2 conforme madura el riñón. C) campo claro de un túbulo proximal aislado unido a su respectivo glomérulo al DPN 1. D) campo claro de un túbulo proximal aislado de una rata adulta, se observa que es más grueso en comparación con el de 1 DPN. La metodología de inmunofluorescencia usada para los túbulos y el glomérulo son diferentes, por esta razón la señal observada de Gas1 en el glomérulo (A, delimitado por una línea circular blanca) no es la correspondiente a su expresión descrita previamente, la imagen se muestra como un control positivo del túbulo proximal, ya que anatómicamente solo el túbulo proximal está unido al glomérulo. E) análisis de Western Blot de Gas1 en una muestra enriquecida de túbulos proximales, usamos como control negativo la proteína (proteína de la nefrona distal) la acuaporina 2 (AQP2). Como control positivo de Gas1 usamos una muestra de cerebelo (Cb). No encontramos una señal significativa de AQP2, confirmando que las muestras analizadas eran principalmente de la sección proximal. F) análisis densimétrico del Western Blot de Gas1 y SGLT1. Los datos de los grupos están expresados como la densidad relativa de un grupo de 20 (edades más jóvenes) y 8 ratas (adultas) normalizado con tubulina como control de carga. G) análisis semicuantitativo de Gas1 y Cln2 en el túbulo proximal. Se muestra Gas1 (rojo) y Cln2 (verde). Barras de escala = 50 μ m. Los valores son medias \pm desviación estándar. ANOVA de una vía. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$, *** $p < 0.002$ y **** $p < 0.001$. Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron en túbulos proximales aislados. Se muestra un experimento representativo (n = 3).

6.2. Efecto del cadmio en la ganancia del peso corporal en las crías expuestas durante su gestación

Ya que en trabajos previos se ha demostrado que el cadmio tiene efectos negativos en la ganancia del peso corporal en las crías expuestas durante su gestación en comparación con las crías controles (Antonio Garcia et al. 2004), quisimos confirmarlo en nuestro modelo experimental. Como podemos observar en la Fig. 3, al comparar los grupos de crías controles (barras blancas) con las expuestas a cadmio (barras negras) encontramos una disminución significativa en la ganancia del peso corporal en este último grupo, esta disminución en el peso corporal es visible durante todo el desarrollo postnatal, siendo más drástico en los primeros DPN (2-7) y deja de ser significativo en la cría adulta (56 DPN).

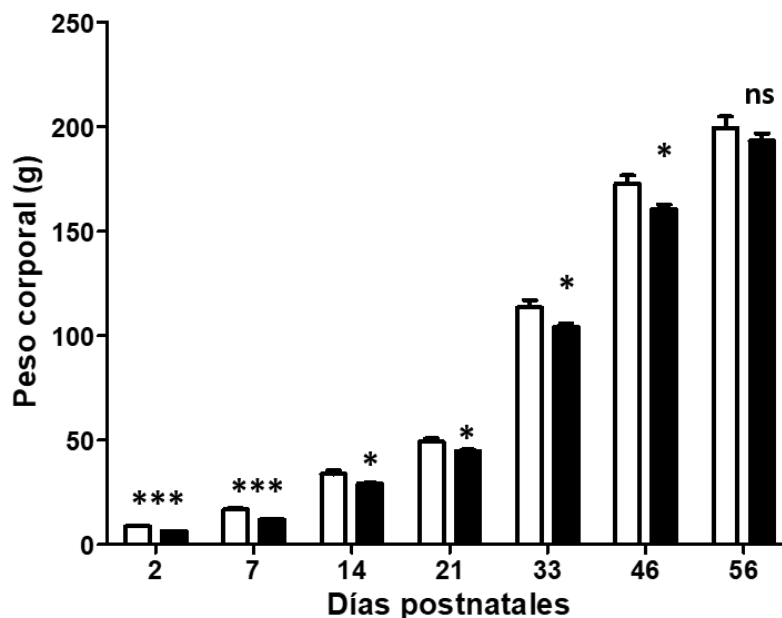


Fig. 3. Efecto del cadmio en la ganancia del peso corporal en las crías expuestas durante su gestación. Evaluamos el peso corporal de las crías durante su desarrollo postnatal, encontrando que en las crías expuestas a cadmio (barras negras) hay una disminución significativa en la ganancia del peso corporal en comparación con el grupo control (no expuestas a cadmio, barra blanca) y esto se puede observar desde el día postnatal (DPN) 2, siendo no significativo en las crías adultas de 56 DPN. Los valores son medias \pm la desviación estándar, *t* test. ns= no significativo, * $p < 0.05$, *** $p < 0.002$. n de 2 DPN = 24 y 16 ratas por grupo, respectivamente; n de 7-56 DPN = 11 y 8 ratas por grupo, respectivamente.

6.3. Crías de 21 DPN expuestas durante su gestación

6.3.1. Efecto del cadmio en la función renal en las crías de 21 DPN

Evaluamos si existía alguna alteración en la función renal durante el desarrollo postnatal de las crías de 21 DPN expuestas a cadmio durante su gestación, en comparación con las crías controles. Interesantemente no encontramos ninguna alteración en la función renal en este grupo (Fig. 4), confirmando que el daño inducido por el cadmio solo se observa en la cría adulta (45 y 60 DPN), Figura 7 y 11, respectivamente.

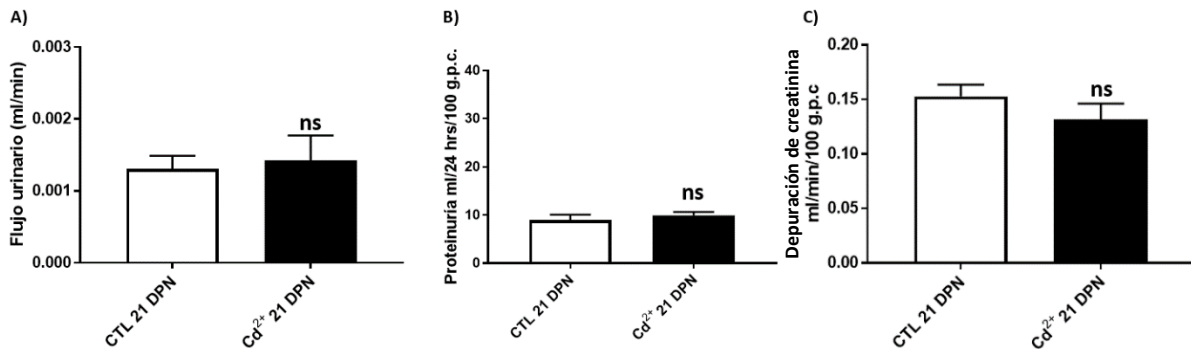


Fig. 4. Función renal de las crías de 21 DPN expuestas a cadmio durante su gestación. A) comparación del flujo urinario de las crías de 21 DPN controles (CTL, barra blanca) y las expuestas a cadmio (Cd²⁺, barra negra), no se observa ningún cambio estadísticamente significativo. B) comparación de la concentración de proteínas encontradas en la orina en los dos grupos evaluados, no se observa ningún cambio estadísticamente significativo. C) comparación de la depuración de creatinina en los dos grupos evaluados, no se observa ningún cambio estadísticamente significativo. Los valores son medias ± la desviación estándar, *t* test. ns= no significativo. n= 8 ratas por grupo.

6.3.2. Gas1 y KIM-1 en los túbulos contorneados proximales en las crías de 21 DPN

Caracterizamos el patrón de expresión de la proteína Gas1 en el túbulo contorneado proximal en las crías expuestas a cadmio durante su gestación. Utilizamos la proteína DppD como marcador específico del túbulo contorneado proximal, ya que se expresa específicamente en el borde en cepillo de esta sección de la nefrona. Quisimos confirmar mediante IMF la ausencia del marcador de daño renal KIM-1 (Lim et al. 2013), ya que no encontramos alteración en la función renal (Fig. 4). Encontramos que en las crías de 21 DPN no existe un cambio en el nivel de expresión de la proteína Gas1 y no encontramos la expresión de KIM-1, esto se puede observar en las IMF (Fig. 5 A y B) y en la cuantificación de pixeles (Fig. 5 C y D), congruente con los resultados anteriores, en donde no encontramos ningún daño renal en este grupo.

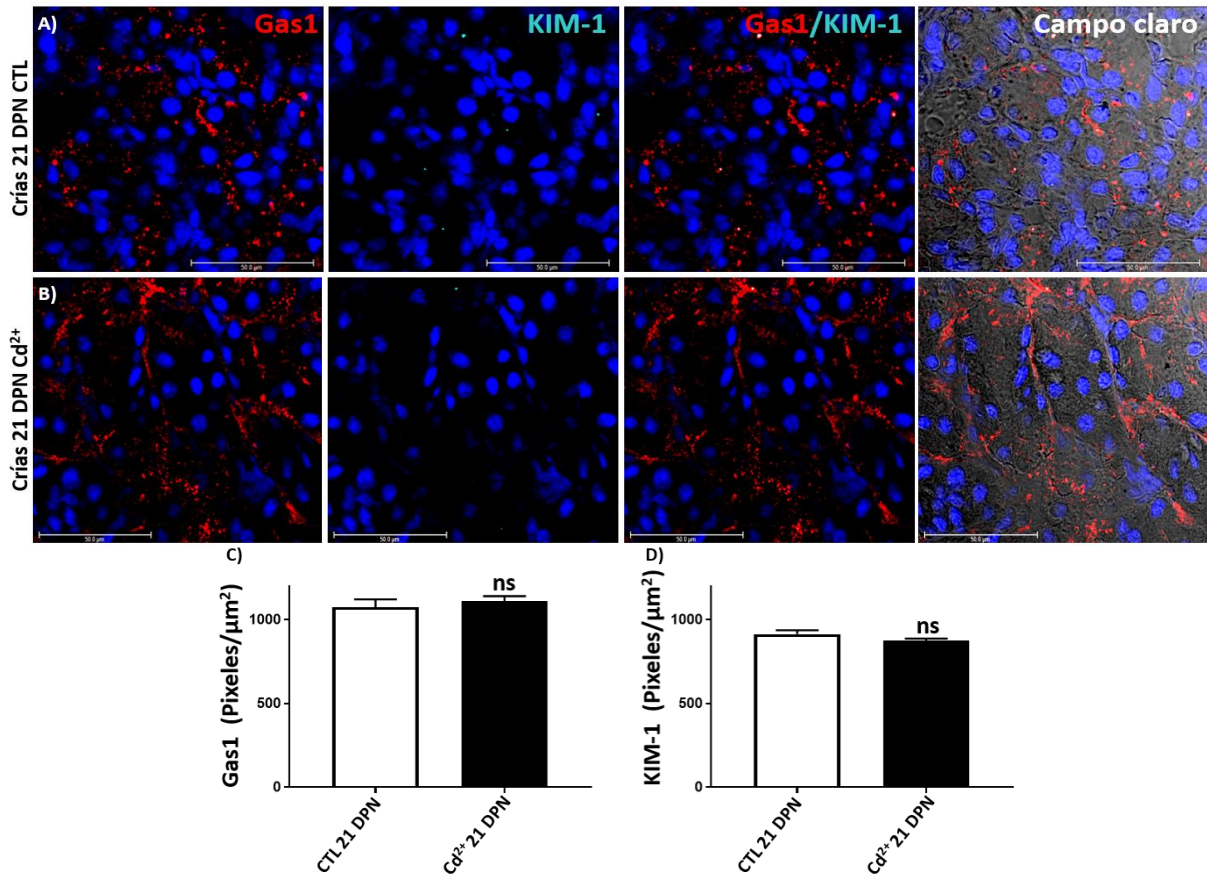


Fig. 5. Inmunofluorescencia de la expresión de Gas1/KIM-1 en los túbulos contorneados proximales en las crías de 21 DPN. A) expresión de Gas1/KIM-1 en crías controles. B) expresión de Gas1/KIM-1 en crías expuestas a cadmio durante su gestación, no encontramos ningún cambio en la expresión de ambas proteínas en comparación con el grupo control. C) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de Gas1 en los túbulos proximales de las crías de 21 DPN controles (CTL, barra blanca) y las expuestas a cadmio (Cd²⁺, barra negra), no se observa ningún cambio estadísticamente significativo. D) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de KIM-1 en los túbulos proximales de los dos grupos evaluados, no se observa ningún cambio estadísticamente significativo. Se muestra Gas1 (rojo), KIM-1 (azul) y los núcleos marcados con DAPI (azul). Barras de escala = 50 μm. Los valores son medias ± la desviación estándar, *t* test. ns= no significativo. n de C/D= 36 y 31 túbulos proximales por grupo, respectivamente. Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron en cortes de riñón. Se muestra un experimento representativo.

6.3.3. Marcadores de CPR y proliferación celular en las crías de 21 DPN

Quisimos saber si la exposición a cadmio en las crías de 21 DPN había activado mecanismos de reparación celular que involucran proliferación celular y la participación de células progenitoras renales, por lo que decidimos analizar las proteínas CD24 y Ki67, marcadores de células progenitoras renales y de proliferación celular, respectivamente.

Al evaluar mediante IMF la expresión de la proteína CD24, encontramos que estaba significativamente incrementada en comparación con el grupo control, esto se puede observar en la cuantificación de pixeles (Fig. 6 D). Es decir, había incrementado la población de células progenitoras renales en las crías de 21 DPN expuestas a cadmio durante su gestación.

Cuando evaluamos la proteína Ki67 (Fig. 6 C) no encontramos ningún cambio en el nivel de expresión respecto al control. Por lo tanto concluimos que no había cambios en la proliferación celular.

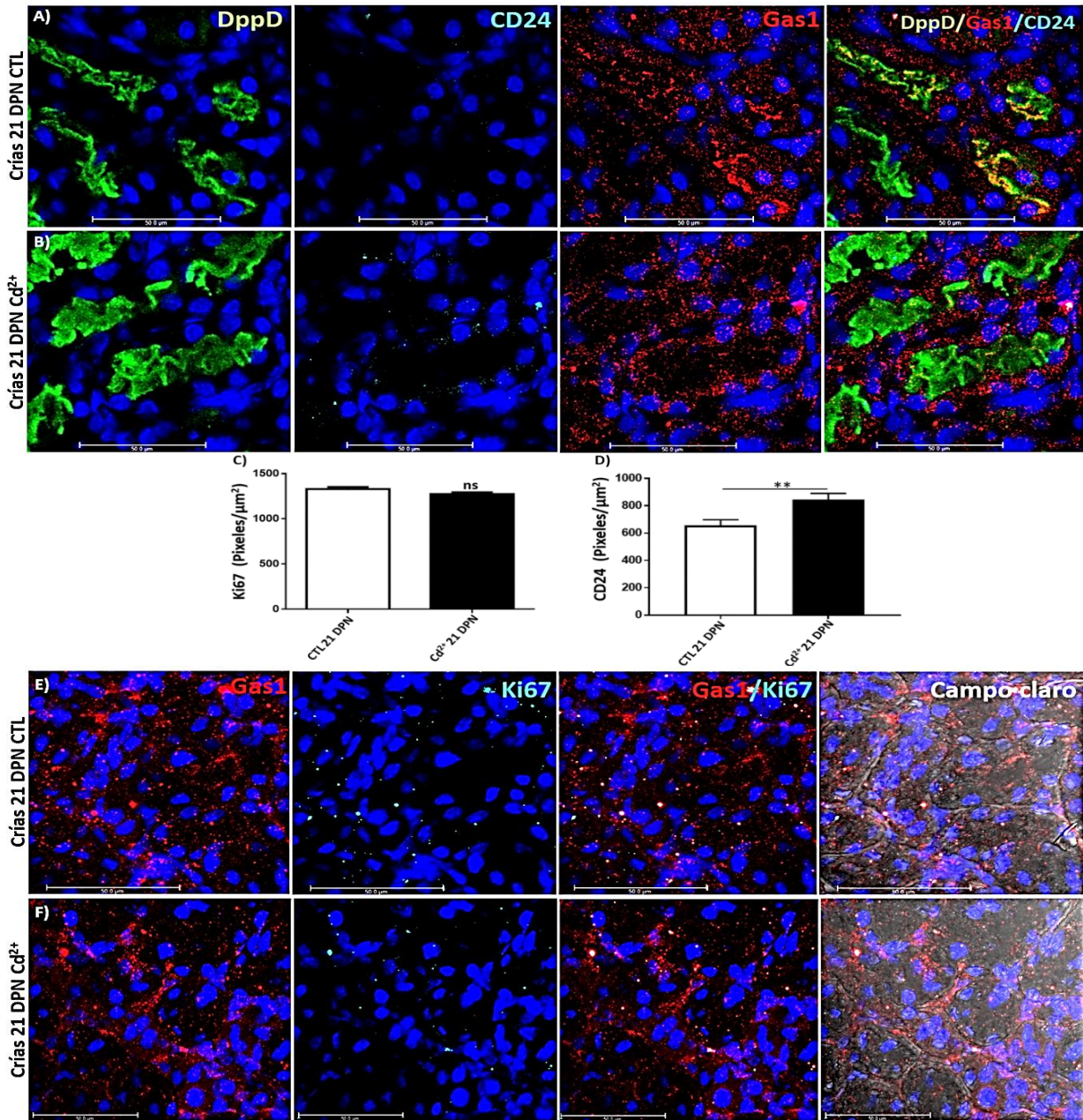


Fig. 6. Inmunofluorescencia de la expresión de DppD/CD24/Ki67/Gas1 en los túbulos contorneados proximales en las crías de 21 DPN. A) expresión de DppD/CD24/Gas1 en las crías controles. B) expresión de DppD/CD24/Gas1 en las crías expuestas a cadmio, no encontramos ningún cambio en la expresión de DppD y Gas1 en comparación con el grupo control, pero si encontramos un incremento significativo en la proteína CD24. C) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de Ki67, marcador de proliferación celular en las crías de 21 DPN controles (CTL, barra blanca) y las expuestas a cadmio (Cd²⁺, barra negra), no se observa ningún cambio estadísticamente significativo. D) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de CD24, marcador de células progenitoras renales de los dos grupos, se observa un incremento estadísticamente significativo. E) expresión de Gas1/Ki67 en las crías controles. F) expresión de Gas1/Ki67 en las crías expuestas a cadmio, no encontramos ningún cambio en la expresión de ambas proteínas en comparación con el grupo control. Se muestra Gas1 (rojo), CD24 (A/B) y Ki67 (E/F, azul) y los núcleos marcados con DAPI (azul). Barras de escala = 50 μm . Los valores son medias \pm la desviación estándar, *t* test. ns= no significativo, ***p* < 0.02. n de D= 56 y 61 túbulos proximales por grupo, respectivamente. n de C= 34 túbulos proximales por grupo. Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron en cortes de riñón. Se muestra un experimento representativo.

6.4. Ratas de 45 DPN expuestas durante su gestación

6.4.1. Efecto del cadmio en la función renal en las ratas de 45 DPN

Posteriormente, evaluamos si existía alguna alteración en la función renal en las ratas de 45 DPN inducido por el cadmio en comparación con las crías controles. En el grupo tratado con cadmio, encontramos claramente una alteración en la función renal, ya que observamos un incremento significativo en el flujo urinario y en la proteinuria, y una disminución también significativa en la depuración de creatinina (Fig. 7 A, B y C, respectivamente). Estos resultados confirman que hay un daño renal inducido por cadmio reflejado por una alteración en los parámetros de la función renal en las crías adultas de 45 DPN en comparación con las crías controles.

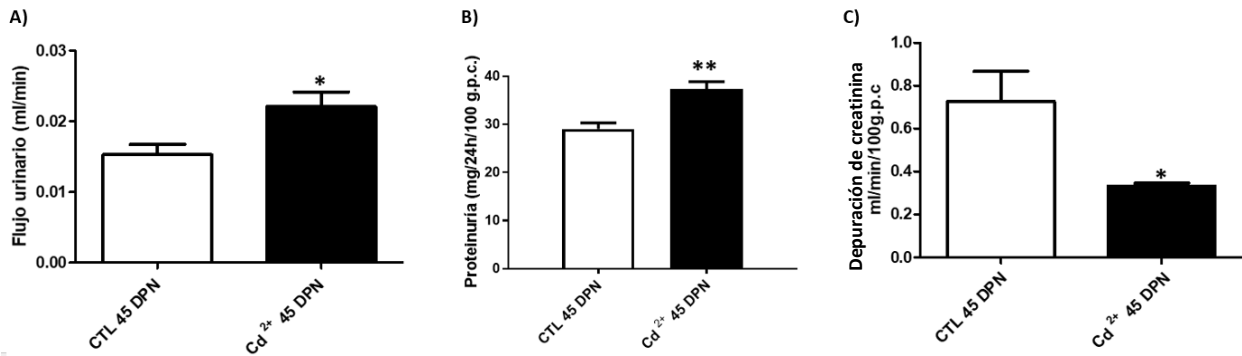


Fig. 7. Función renal de las ratas de 45 DPN expuestas a cadmio durante su gestación. A) comparación del flujo urinario de las ratas de 45 DPN controles (CTL, barra blanca) y las expuestas a cadmio (Cd²⁺, barra negra), se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. B) comparación de la concentración de proteínas encontradas en la orina en los dos grupos evaluados, se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. C) comparación de la depuración de creatinina en los dos grupos evaluados, se observa una disminución significativa en las crías expuestas a cadmio. Los valores son medias \pm la desviación estándar, *t* test. **p*<0.05, ***p*< 0.02. *n*= 8 ratas por grupo.

6.4.2. Alteración en la presión arterial inducida por cadmio en las ratas de 45 DPN

Debido a que se ha reportado que la exposición a cadmio no solamente daña los riñones sino que también causa hipertensión (Jacquillet et al. 2007), decidimos analizar la presión arterial en las crías que presentaban daño renal (45 y 60 DPN). Encontramos un incremento significativo en los 3 parámetros de presión arterial analizados (Fig. 8), la presión arterial sistólica, diastólica y MAP (presión arterial media, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, con estos resultados concluimos que las ratas de 45 DPN son hipertensas.

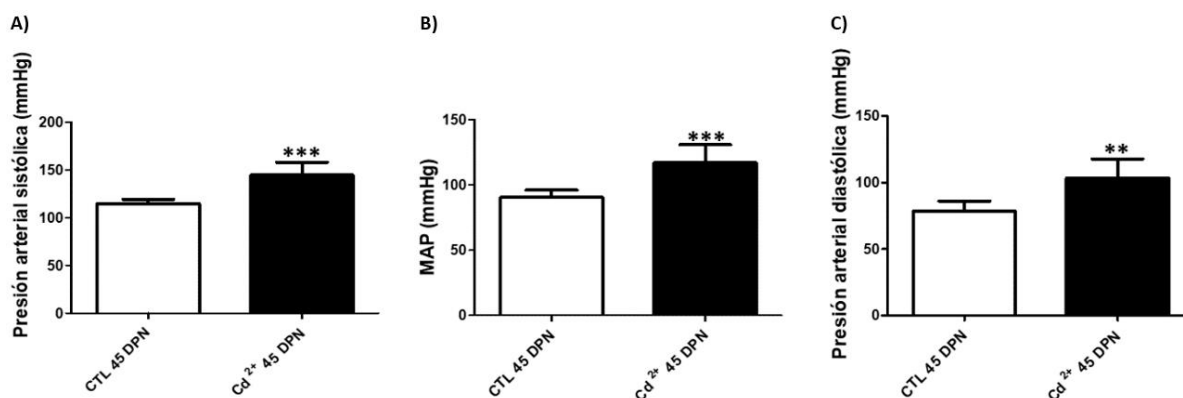


Fig. 8. Presión arterial de las ratas de 45 DPN expuestas a cadmio durante su gestación. A) comparación de la presión arterial sistólica de las ratas de 45 DPN controles (CTL, barra blanca) y las expuestas a cadmio (Cd²⁺, barra negra), se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. B) comparación de la presión arterial media (MAP) en los dos grupos evaluados, se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. C) comparación de la presión arterial diastólica en los dos grupos evaluados, se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. Los valores son medias \pm la desviación estándar, *t* test. ***p* < 0.02, ****p* < 0.002. *n* = 6 y 10 ratas por grupo, respectivamente.

6.4.3. Gas1 y KIM-1 en los túbulos contorneados proximales en las ratas de 45 DPN

Sabiendo que las ratas de 45 DPN tenían daño renal e hipertensión (Fig. 7 y 8, respectivamente), quisimos confirmar mediante IMF la presencia del marcador de daño renal, KIM-1. En la Fig. 9 B se puede observar la presencia de la proteína KIM-1 solamente en el grupo de crías expuestas a cadmio (Fig. 9 D), además observamos que su expresión está localizada principalmente en el borde en cepillo del túbulo proximal cómo se ha reportado ampliamente (Lim et al. 2013)(Fig. 9 B y E, campo claro).

También quisimos saber si la expresión de Gas1 en el túbulo contorneado proximal había cambiado debido al daño renal. Al analizar las IMF de las ratas de 45 DPN encontramos un incremento significativo en el nivel de expresión de la proteína Gas1 solamente en las crías expuestas a cadmio (Fig. 9 C), recordando que este grupo presenta hipertensión (Fig. 8) y daño renal confirmado por los valores de la función renal alterados (Fig. 7) y por la presencia de KIM-1 (Fig. 9 B).

Interesantemente encontramos que Gas1 y KIM-1 colocalizan fuertemente (Fig. 9 B, E, F, superposición en color blanco), es decir que el incremento observado de la expresión de Gas1 es específicamente en las células epiteliales de los túbulos proximales con daño, y que debido a este daño se expresa la proteína KIM-1. Para confirmar que Gas1 y KIM-1 realmente estaban colocalizando realizamos un corte en z y encontramos que efectivamente ambas proteínas se encontraban en el mismo sitio (corte en z de Gas1/KIM-1, Fig. 9 F).

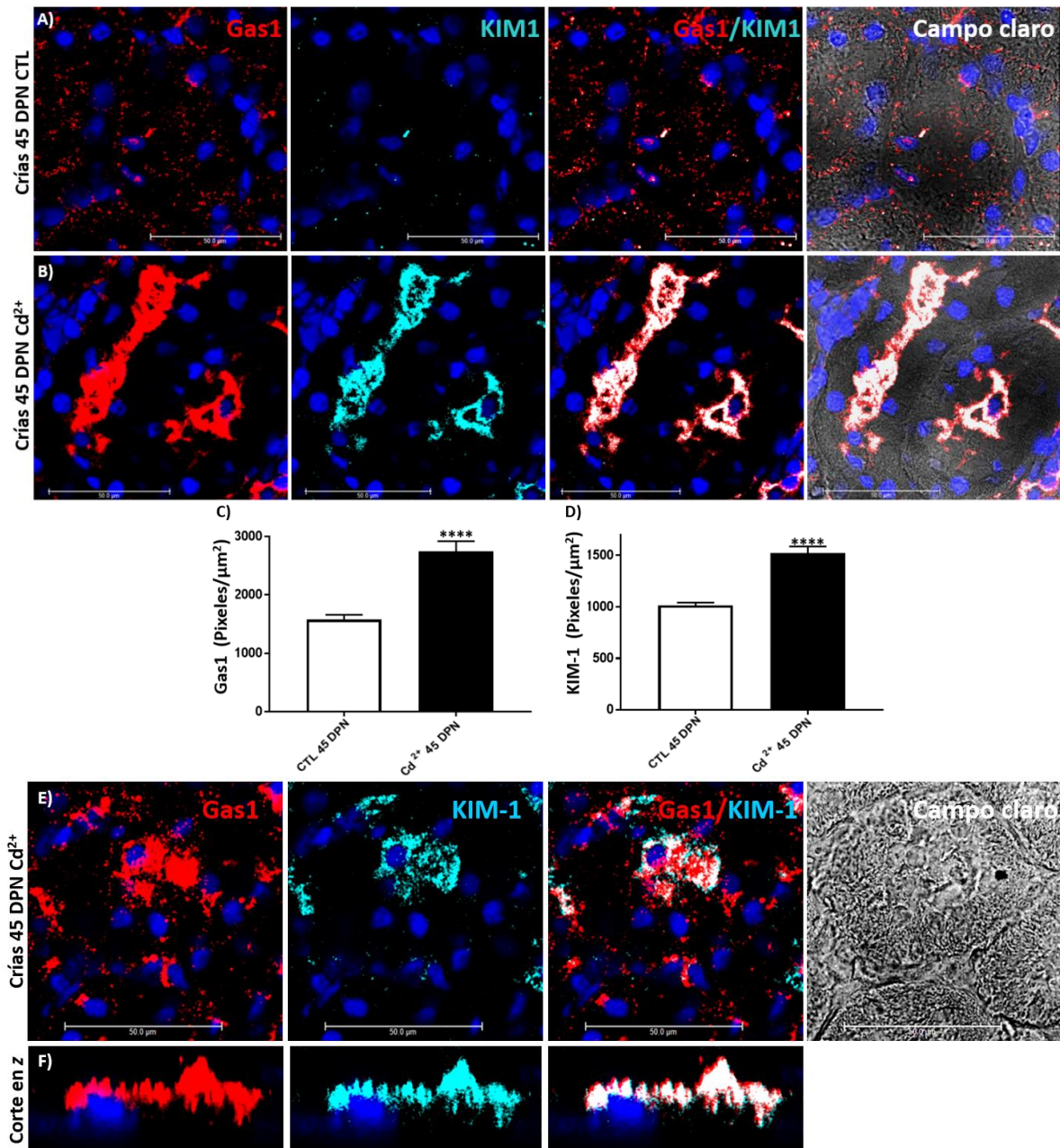


Fig. 9. Inmunofluorescencia de la expresión de Gas1/KIM-1 en los túbulos contorneados proximales en las crías de 45 DPN. A) expresión de Gas1/KIM-1 en crías controles. B) expresión de Gas1/KIM-1 en crías expuestas a cadmio durante su gestación, encontramos un incremento significativo en la expresión de Gas1, la presencia de la proteína KIM-1 y la colocalización de ambas proteínas (superposición de Gas1/KIM-1 en color blanco). C) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de Gas1 en los túbulos proximales de las ratas de 45 DPN controles (CTL, barra blanca) y las expuestas a cadmio (Cd^{2+} , barra negra), se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. D) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de KIM-1 en los túbulos proximales de los dos grupos evaluados, se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. E) localización de Gas1/KIM-1 en el borde en cepillo, se observa en blanco zonas en donde ambas proteínas colocalizan. F) corte en z de Gas1/KIM-1. Se muestra Gas1 (rojo), KIM-1 (azul), superposición (blanco) y los núcleos marcados con DAPI (azul). Barras de escala = 50 μm . Los valores son medias \pm la desviación estándar, *t* test. **** $p < 0.001$. n de C/D= 11 y 14 túbulos proximales por grupo, respectivamente. Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron en cortes de riñón. Se muestra un experimento representativo.

6.4.4. Marcadores de CPR y proliferación celular en las ratas de 45 DPN

Finalmente, decidimos evaluar si debido al daño renal y la hipertensión inducido por el cadmio que confirmamos anteriormente (Fig. 7 y 8, respectivamente) se habían activado mecanismos de reparación celular que involucraban la proliferación celular (Ki67) y la participación de células progenitoras renales (CD24) en el túbulo proximal.

Interesantemente encontramos que en las ratas de 45 DPN expuestas a cadmio durante su gestación, ambos marcadores estaban incrementados significativamente (Fig. 10 C y D). También observamos que ambos marcadores colocalizan con Gas1 (Fig. 10 B y F, superposición en color blanco).

Por lo tanto, podemos concluir que Gas1 se expresa en las células progenitoras renales (CD24⁺) y que posiblemente esta población celular está en un proceso de proliferación celular (Ki67⁺) inducido por la exposición a cadmio durante la gestación.

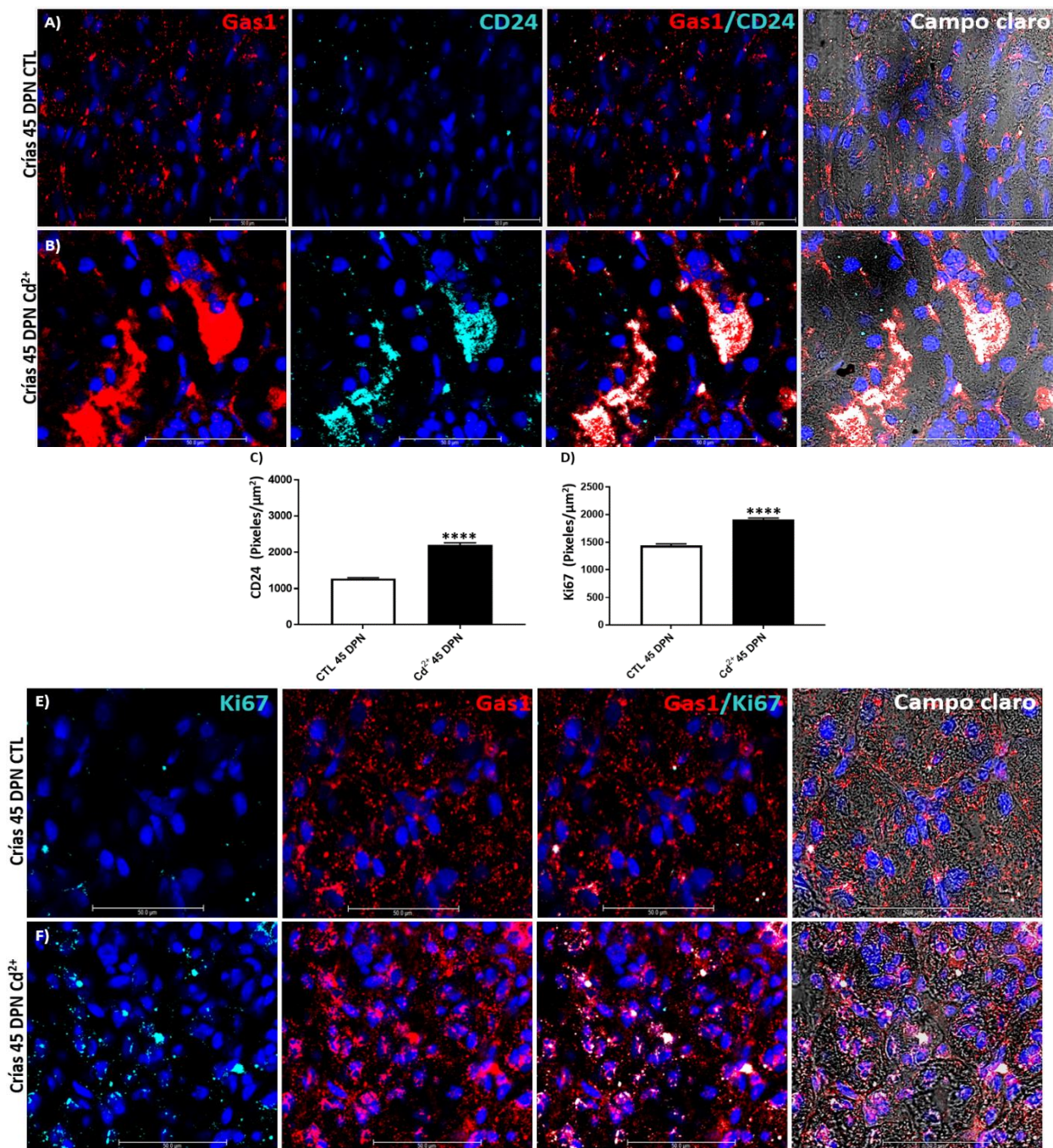


Fig. 10. Inmunofluorescencia de la expresión de Gas1/CD24/Ki67 en los túbulos contorneados proximales en las crías de 45 DPN. A) expresión de Gas1/CD24 en las crías controles. B) expresión de Gas1/CD24 en las crías expuestas a cadmio, confirmamos el incremento significativo de Gas1 descrito anteriormente, así como un incremento significativo en la expresión de la proteína CD24 en comparación con el grupo control y una fuerte colocalización de Gas1/CD24 (superposición de Gas1/CD24 en color blanco). Observamos que CD24 se expresa también en el borde en cepillo. C) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de CD24, marcador de células progenitoras renales de las ratas de 45 DPN controles (CTL, barra blanca) y las expuestas a cadmio (Cd²⁺, barra negra), se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. D) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de Ki67, marcador de proliferación celular de los dos grupos, se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. E) expresión de Gas1/Ki67 en las crías controles. F) expresión de Gas1/Ki67 en las crías expuestas a cadmio, encontramos un incremento significativo en la expresión de ambas proteínas en comparación con el grupo control y una fuerte colocalización de Gas1/Ki67 (superposición de Gas1/Ki67 en color blanco). Se muestra Gas1 (rojo), CD24 (A/B) y Ki67 (E/F, azul), superposición (blanco) y los núcleos marcados con DAPI (azul). Barras de escala = 50 μm . Los valores son medias \pm la desviación estándar, *t* test. *****p*<0.001. n de C= 18 y 20 túbulos proximales por grupo, respectivamente. n de D= 22 y 28 túbulos proximales por grupo, respectivamente. Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron en cortes de riñón. Se muestra un experimento representativo.

6.5. Ratas de 60 DPN expuestas durante su gestación

6.5.1. Efecto del cadmio en la función renal en las ratas de 60 DPN

De la misma forma que en los grupos anteriores (crías de 21 y de 45 DPN), evaluamos si existía alguna alteración en la función renal en las ratas de 60 DPN expuestas a cadmio durante su gestación en comparación con las crías controles. En este grupo también encontramos un daño en la función renal, reflejado por un incremento significativo en el flujo urinario y en la proteinuria, y una disminución significativa en la depuración de creatinina respecto al control (Fig.11 A, B, y C, respectivamente). Confirmando que el daño renal inducido por cadmio durante la gestación afecta solamente a las crías adultas (45 y 60 DPN).

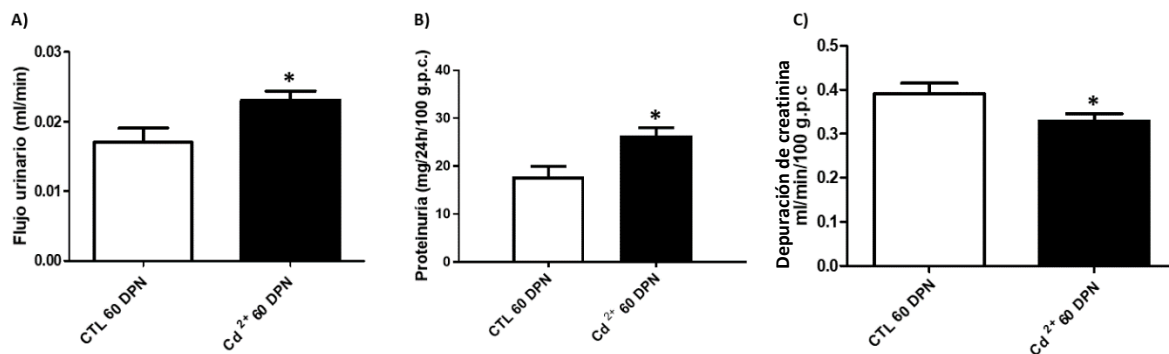


Fig. 11. Función renal de las ratas de 60 DPN expuestas a cadmio durante su gestación. A) comparación del flujo urinario de las ratas de 60 DPN controles (CTL, barra blanca) y las expuestas a cadmio (Cd²⁺, barra negra), se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. B) comparación de la concentración de proteínas encontradas en la orina en los dos grupos evaluados, se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. C) comparación de la depuración de creatinina en los dos grupos evaluados, se observa una disminución significativa en las crías expuestas a cadmio. Los valores son medias \pm la desviación estándar, *t* test. **p*<0.05. *n*= 16 ratas por grupo.

6.5.2. Alteración en la presión arterial inducida por cadmio en las ratas de 60 DPN

Al confirmar que las ratas de 60 DPN tenían daño renal de manera similar al encontrado en las ratas de 45 DPN (Fig. 7), decidimos evaluar si también presentaban hipertensión. Al analizar la presión arterial de las ratas de 60 DPN, encontramos un incremento significativo en los 3 parámetros de presión arterial analizados: la presión arterial sistólica, diastólica y MAP (presión arterial media, por sus siglas en inglés) (Fig. 12). Confirmando con estos resultados que las ratas de 60 DPN también son hipertensas.

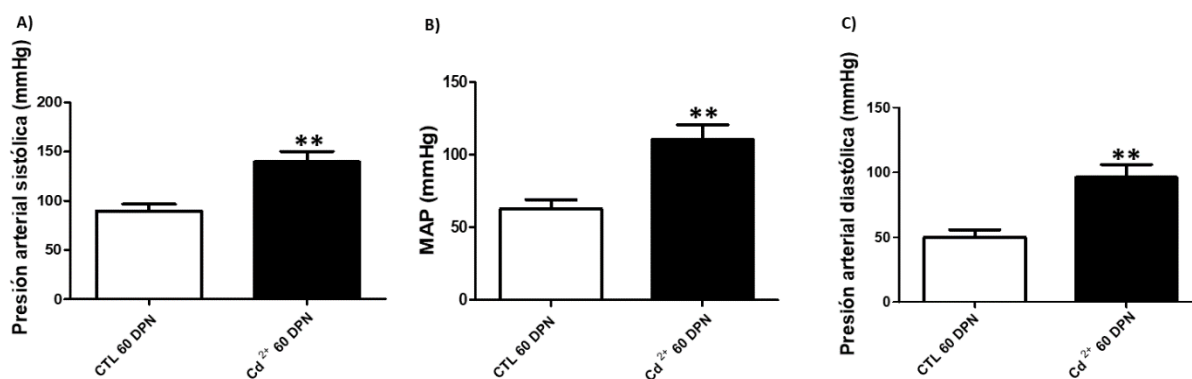


Fig. 12. Presión arterial de las ratas de 60 DPN expuestas a cadmio durante su gestación. A) comparación de la presión arterial sistólica de las ratas de 60 DPN controles (CTL, barra blanca) y las expuestas a cadmio (Cd²⁺, barra negra), se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. B) comparación de la presión arterial media (MAP) en los dos grupos evaluados, se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. C) comparación de la presión arterial diastólica en los dos grupos evaluados, se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. Los valores son medias \pm la desviación estándar, *t* test. ***p* < 0.02. *n* = 8 ratas por grupo.

6.5.3. Daño tubular en las crías expuestas a cadmio durante su gestación

Ya que encontramos en las crías expuestas a cadmio daño renal e hipertensión, quisimos confirmar la presencia de daño tubular, específicamente en el túbulo contorneado proximal. Para identificar el daño tubular causado por el cadmio decidimos utilizar el marcador urinario β -2-microglobulina (B2M). La B2M es una proteína de bajo peso molecular que en daño renal está presente en la orina ya que no se da su reabsorción correctamente a nivel del túbulo contorneado proximal (Prozialeck et al. 2012).

Al evaluar la presencia de B2M en la orina de las crías, encontramos que solamente las ratas de 60 DPN expuestas a cadmio presentaban un incremento significativo en comparación con el grupo control (Fig. 13 C), por lo tanto, podemos confirmar que solo las ratas de 60 DPN tienen un daño tubular, específicamente en el túbulo contorneado proximal.

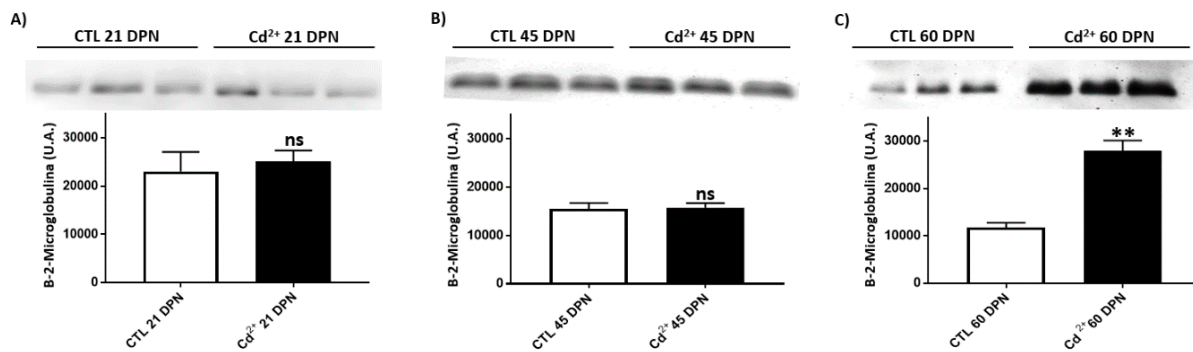


Fig. 13. Daño tubular en las ratas de 60 DPN expuestas a cadmio durante su gestación. A) comparación del western blot de β -2-microglobulina en la orina de las crías de 21 DPN controles (CTL, barra blanca) y las expuestas a cadmio (Cd^{2+} , barra negra), no se observa ningún cambio significativo en las crías expuestas a cadmio. B) comparación del western blot de β -2-microglobulina en la orina de las ratas de 45 DPN controles y las expuestas a cadmio, no se observa ningún cambio significativo en las crías expuestas a cadmio. C) comparación del western blot de β -2-microglobulina en la orina de las ratas de 60 DPN controles y las expuestas a cadmio, se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. Los valores son medias \pm la desviación estándar, *t* test. ns= no significativo, UA= unidades arbitrarias, ***p* < 0.02. n= 3 ratas por grupo.

6.5.4. Gas1 y KIM-1 en los túbulo contorneados proximales en las ratas de 60 DPN

Sabiendo que la expresión de Gas1 en el túbulo contorneado proximal en las ratas de 45 DPN había incrementado debido al daño renal inducido por el cadmio (Fig.9), decidimos analizar a las ratas de 60 DPN para saber si también había alguna alteración en la expresión de Gas1. Mediante IMF encontramos que la expresión de Gas1 también se encontraba incrementada significativamente en las crías expuestas a cadmio (Fig. 14 D) y que se expresaba principalmente en el área del borde en cepillo ya que colocaliza con la proteína del borde en cepillo DppD, la cual utilizamos como control del túbulo contorneado proximal (Fig. 14 B, color amarillo).

Interesantemente encontramos una disminución significativa en la expresión de DppD en las crías expuestas a cadmio en comparación con el control (Fig. 14 B y C).

Al analizar la expresión de KIM-1 encontramos una disminución significativa en este marcador de daño renal en las crías expuestas a cadmio en comparación con el control (Fig. 14 E).

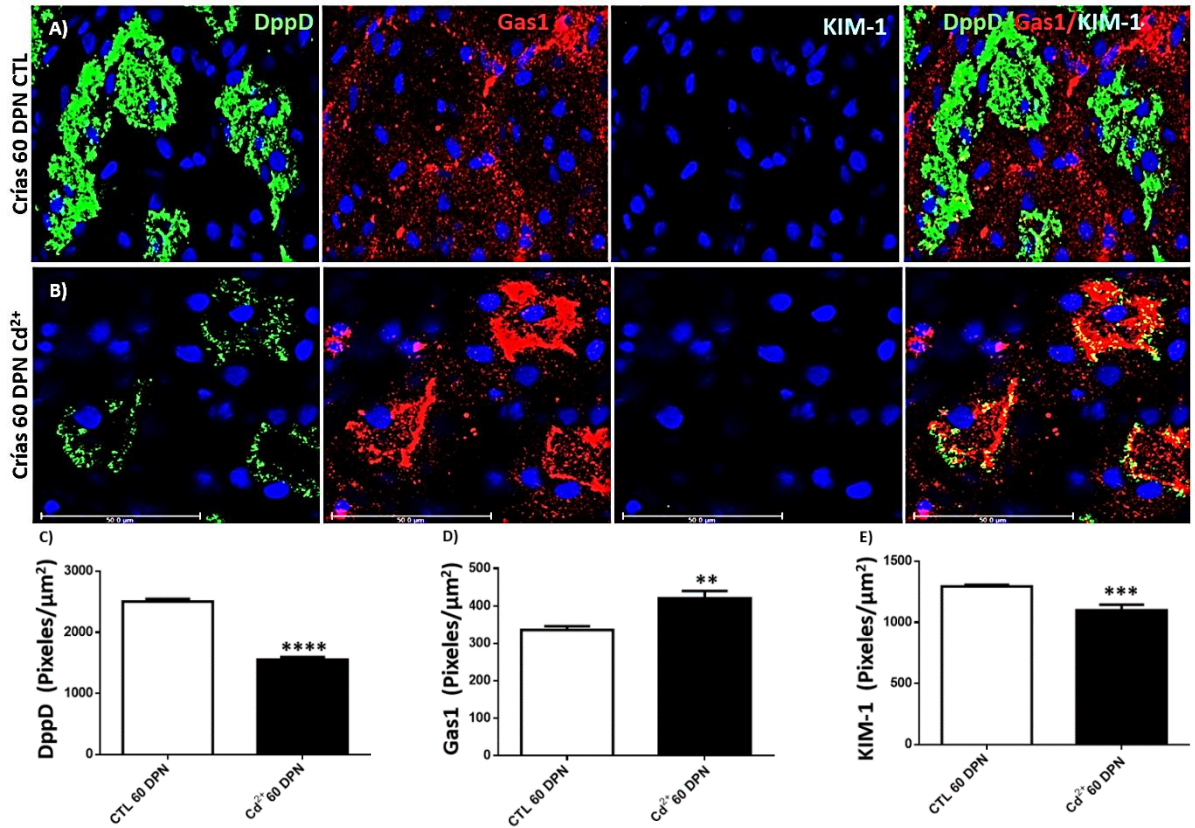


Fig. 14. Inmunofluorescencia de la expresión de DppD/Gas1/KIM-1 en los túbulos contorneados proximales en las ratas de 60 DPN. A) expresión de DppD/Gas1/KIM-1 en crías controles. B) expresión de DppD/Gas1/KIM-1 en crías expuestas a cadmio durante su gestación, encontramos un incremento significativo en la expresión de Gas1 y una disminución significativa en la expresión de KIM-1 y DppD; también observamos la colocalización de las proteínas Gas1/DppD (color amarillo). C) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de DppD en los túbulos proximales de las ratas de 60 DPN controles (CTL, barra blanca) y las expuestas a cadmio (Cd²⁺, barra negra), se observa una disminución significativa en las crías expuestas a cadmio. D) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de Gas1 en los túbulos proximales de los dos grupos evaluados, se observa un incremento significativo en las crías expuestas a cadmio. E) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de KIM-1 en los túbulos proximales de los dos grupos evaluados, se observa una disminución significativa en las crías expuestas a cadmio. Se muestra DppD (verde), Gas1 (rojo), KIM-1 (azul), superposición (amarillo) y los núcleos marcados con DAPI (azul). Barras de escala = 50 μm. Los valores son medias ± la desviación estándar, *t* test. ***p* < 0.02, ****p* < 0.002 y *****p* < 0.0001. *n* de C/D/E= 30 y 50 túbulos proximales por grupo, respectivamente. Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron en cortes de riñón. Se muestra un experimento representativo.

6.5.5. Marcadores de CPR y proliferación celular en las ratas de 60 DPN

Posteriormente, decidimos evaluar si existían cambios en los niveles de expresión del marcador de CPR (CD24) y el marcador de proliferación celular (Ki67) en las ratas de 60 DPN expuestas a cadmio durante su gestación. Interesantemente encontramos que a diferencia de las ratas de 45 DPN expuestas a cadmio en donde ambos marcadores estaban incrementados significativamente (Fig. 10 C y D), en las ratas de 60 DPN expuestas a cadmio encontramos lo opuesto, es decir, no encontramos diferencias en el nivel de expresión de CD24 respecto al control y el marcador Ki67 estaba significativamente disminuido (Fig. 15 C y D, respectivamente).

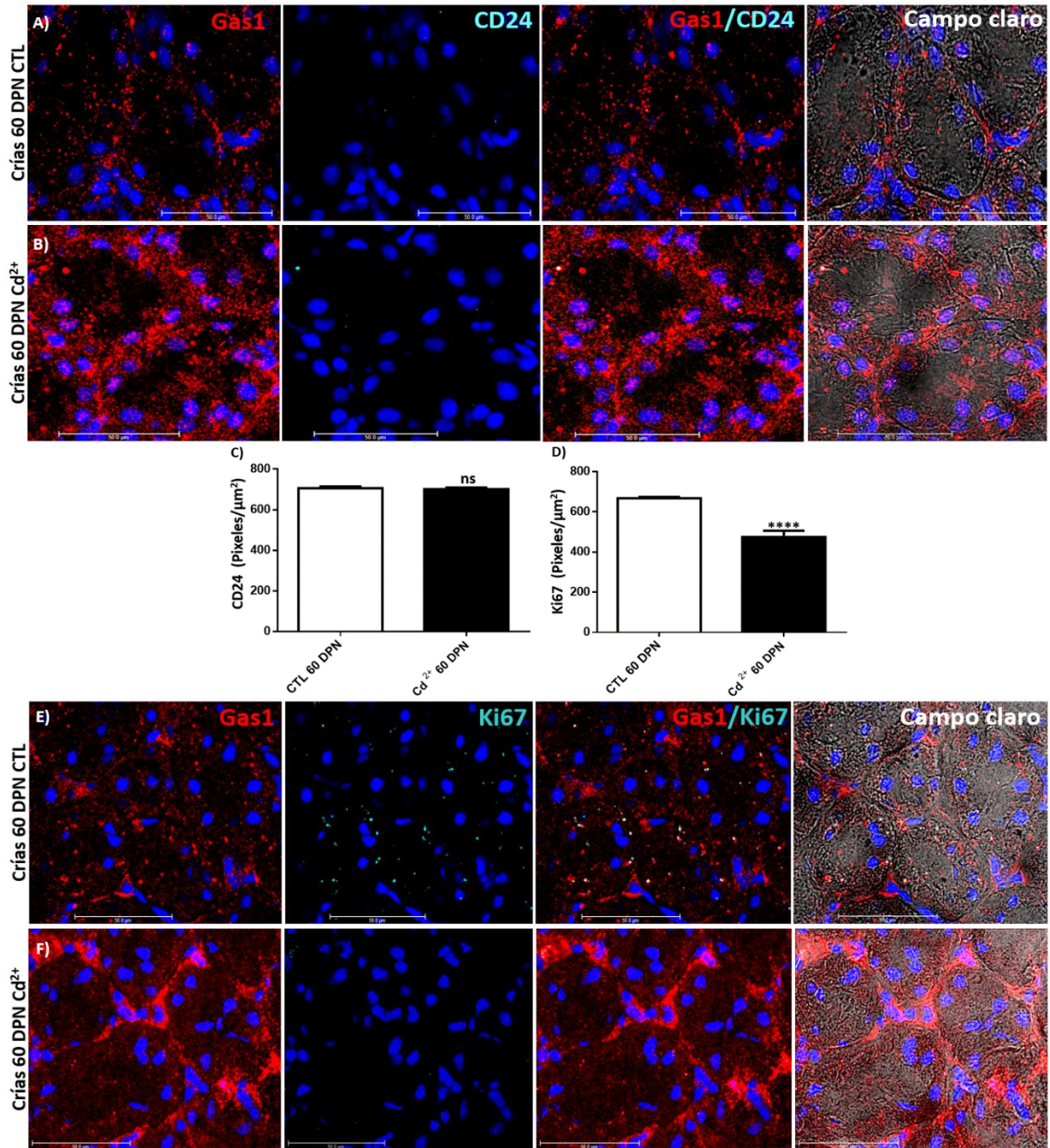


Fig. 15. Inmunofluorescencia de la expresión de Gas1/CD24/Ki67 en los túbulos contorneados proximales en las ratas de 60 DPN. A) expresión de Gas1/CD24 en las crías controles. B) expresión de Gas1/CD24 en las crías expuestas a cadmio, confirmamos el incremento significativo de Gas1 descrito anteriormente pero no encontramos ningún cambio en la expresión de la proteína CD24 en comparación con el grupo control. C) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de CD24, marcador de células progenitoras renales de las ratas de 60 DPN controles (CTL, barra blanca) y las expuestas a cadmio (Cd²⁺, barra negra), no se observa ningún cambio en la expresión de la proteína CD24 en comparación con el grupo control. D) comparación de la cuantificación de pixeles de la expresión de Ki67, marcador de proliferación celular de los dos grupos, se observa una disminución significativa en las crías expuestas a cadmio. E) expresión de Gas1/Ki67 en las crías controles. F) expresión de Gas1/Ki67 en las crías expuestas a cadmio, encontramos una disminución significativa de Ki67 respecto al control. Se muestra Gas1 (rojo), CD24 (A/B) y Ki67 (E/F, azul) y los núcleos marcados con DAPI (azul). Barras de escala = 50 μm . Los valores son medias \pm la desviación estándar, *t* test. ns= no significativo, *****p*<0.001. n de C= 25 y 43 túbulos proximales por grupo, respectivamente. n de D= 34 y 37 túbulos proximales por grupo, respectivamente. Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron en cortes de riñón. Se muestra un experimento representativo.

7. Discusión

Como es bien sabido el riñón está formado por la nefrona, la cual es la unidad estructural y funcional del riñón. A su vez, cada nefrona está conformada por el glomérulo, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle (delgada ascendente y descendente), el túbulo distal y los túbulos colectores (Nigam et al. 1996; Rizaldy et al. 2020). Las nuevas nefronas (nefrogenésis) se generan a partir de CPR durante el desarrollo embrionario y, curiosamente, en algunos mamíferos, como las ratas, termina durante el desarrollo posnatal (Kreidberg et al. 2010). Hay reportes que muestran un papel clave de Gas1 en el mantenimiento de las CPR durante el desarrollo renal embrionario (Kann et al. 2015), sin embargo, no hay reportes que describan si Gas1 se expresa en el riñón durante la siguiente etapa, el desarrollo posnatal. También es importante resaltar que durante esta etapa tiene lugar la maduración de la función renal (Neiss et al. 1981; Reyes et al. 1990; Gomez et al. 1999; Cebrián et al. 2004). Durante este período ocurren diversos cambios morfológicos y funcionales a nivel renal (Sweeney et al. 2011) y las células se multiplican rápidamente (Vogetseder et al. 2005), por lo que es fundamental la participación de agentes que regulen estos eventos.

Como vimos anteriormente, Gas1 es una proteína pleiotrópica con diferentes funciones (Segovia et al. 2014), en el riñón adulto Gas1 actúa como un inhibidor endógeno de la proliferación celular (van Roeyen et al. 2013) pero también es necesario para el mantenimiento y proliferación de las CPR durante el desarrollo temprano (Kann et al. 2015), por lo que cumple importantes funciones en el riñón en el desarrollo y en el adulto. Curiosamente, no existe información sobre si Gas1 se expresa o no durante el desarrollo posnatal temprano o sea durante el periodo infantil, una etapa crítica para el desarrollo y la maduración renal. Sin embargo, trabajos previos descubrieron que en presencia de diversas nefropatías (nefritis mesangioproliferativa, carcinoma renal de células claras y diabetes) existe un cambio en la expresión de la proteína Gas1 con respecto a la condición sana y que estos cambios en su expresión están directamente relacionados con la proliferación celular, reflejando un papel crítico de Gas1 como posible regulador de la proliferación celular a nivel renal (van Roeyen et al. 2013; Conceição et al. 2017; Luna-Antonio et al. 2017).

Por otro lado, se sabe que el túbulo contorneado proximal es la estructura de la nefrona encargada de realizar casi toda la reabsorción y secreción de los principales solutos en el riñón (Wallace et al. 1998) y que además posee una gran cantidad de mitocondrias lo que

refleja su elevada tasa metabólica (Schiffer et al. 2018). También se conoce ampliamente que el túbulo proximal es el blanco principal de la toxicidad del cadmio, un metal pesado que provoca una nefropatía caracterizada por una disfunción generalizada del túbulo proximal generando poliuria y aumentos en la excreción urinaria de proteínas de bajo peso molecular (proteinuria), electrolitos, aminoácidos y glucosa (Prozialeck et al. 2009).

Por esta razón el principal objetivo de este trabajo fue explorar si Gas1 se expresaba en el túbulo contorneado proximal durante el desarrollo posnatal de la rata sana, identificar si la expresión de Gas1 en el túbulo proximal se modificaba en crías expuestas a cadmio durante su gestación y con nefropatía inducida por cadmio, y finalmente, determinar si Gas1 podría estar involucrado en mecanismos de reparación celular inducidos por el cadmio.

Encontramos que Gas1 se expresa en el túbulo proximal de la rata durante todo el desarrollo postnatal. Interesantemente, encontramos que Gas1 se expresa principalmente en el citoplasma de las células epiteliales del túbulo proximal desde el DPN 1 (Fig. 1 A), que su expresión aumenta a medida que el riñón madura y que la expresión de Gas1 se mantiene en las células adultas completamente diferenciadas (ADL, Fig. 2 B). Considerando que Gas1 es una proteína con anclaje GPI (Stebel et al. 2000; Zarco et al. 2012) y que una característica común de este tipo de proteínas es que se encuentran tanto unidas a la membrana como en forma soluble, nuestros resultados sugieren que en el túbulo proximal puede estar presente principalmente una isoforma soluble.

Ésta es una observación muy relevante ya que si recordamos que el túbulo contorneado proximal es la región de la nefrona que realiza casi toda la reabsorción y secreción de los principales solutos en el riñón (Wallace et al. 1998), y dado que hay evidencia que indica que Gas 1 es secretado por podocitos y/o células mesangiales en el adulto (van Roeyen et al. 2013) y por células perivasculares en el hígado (Ayala-Sarmiento et al. 2016), creemos que se necesita más trabajo en el futuro para determinar las poblaciones celulares específicas de la nefrona que están expresando Gas1 pero que también pueden secretarlo.

Por otro lado, el túbulo contorneado proximal: a) tiene la mayor tasa de proliferación celular en el riñón sano y es particularmente susceptible al daño por necrosis tubular (Vogetseder et al. 2007); b) el segmento S3 tiene la capacidad de proliferar a lo largo de la vida y c) su rápida capacidad de reclutar células para entrar en división y proliferar se debe al hecho de que tiene

una gran reserva de células detenidas en la fase G1 (Vogetseder et al. 2008). Por lo tanto, consideramos que tal vez esta sección de la nefrona podría tener diferentes controles del ciclo celular en la progresión G1-S en comparación con otras estructuras tubulares y, por lo tanto, es probable que Gas1 esté participando como otro control deteniendo el ciclo celular de las células completamente diferenciadas que permanecen inactivas después de alcanzar la "madurez".

Nuestros hallazgos son consistentes con un posible papel de Gas1 como un potencial regulador del ciclo celular en las células epiteliales del túbulo contorneado proximal. Creemos que esto es así, porque encontramos que Gas1 aumenta significativamente a medida que el riñón madura (Fig. 2), y porque, aunque la morfología renal está completamente desarrollada a partir de DPN 15, ya que todas las nefronas se han formado y su número ya no cambia a lo largo de la vida del individuo, el crecimiento renal posterior resulta de la proliferación celular y del crecimiento celular de estructuras ya formadas (Neiss et al. 1981). Después del DPN 21 el volumen de la corteza renal aumenta debido al crecimiento intersticial longitudinal de los túbulos y hay un agrandamiento uniforme de todas las partes del órgano al menos hasta el día 30 de vida postnatal. La madurez de las estructuras renales se alcanza cuando se alcanzan los parámetros de la función renal, como la tasa de filtración glomerular elevada y la proteinuria disminuida características de los adultos (ya que en los jóvenes se presenta proteinuria)(Gomez et al. 1999), y es justamente en estas células completamente diferenciadas y arrestadas en su ciclo celular, cuando la expresión de Gas1 es mayor y se mantiene.

Esta correlación entre los estadios de desarrollo y el grado de maduración renal se puede observar en la transición paulatina de los valores de los parámetros de función renal analizados (proteinuria y depuración de creatinina) de las ratas controles de 45 y 60 DPN. Podemos observar que las ratas de 45 DPN controles tienen mayor proteinuria y por lo tanto mayor depuración de creatinina en comparación con las ratas de 60 DPN controles. Estos parámetros de la función renal disminuyen y se mantienen estables en la rata adulta de 8 semanas, lo que refleja que las estructuras renales han alcanzado la madurez completa (Neiss et al. 1981). Esta maduración renal también se puede observar en el incremento en el tamaño tubular observado en el panel de la Fig. 1 y 2.

Nuestra hipótesis es que Gas1 puede estar participando en la señalización local (autocrina y/o endocrina), así como en la comunicación paracrina y quizás a un nivel sistémico el cual ha sido poco explorado, ya que se ha encontrado una amplia distribución de la forma soluble de Gas1 en los fluidos corporales de la rata (líquido cefalorraquídeo (LCR), plasma sanguíneo (Ayala-Sarmiento et al. 2016) y orina (van Roeyen et al. 2013)). Interesantemente, en un reporte previo no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de Gas1 soluble presente en el plasma sanguíneo y en el LCR (Ayala-Sarmiento et al. 2016), lo que refleja el importante papel que probablemente está desempeñando el riñón en la regulación de la concentración de Gas1 a nivel sistémico para mantener una concentración isotónica.

Posteriormente, una vez sabiendo que Gas1 se expresaba en túbulo proximal de las ratas sanas y conociendo su patrón de expresión, nuestro siguiente objetivo fue confirmar que nuestro modelo de daño renal provocado por intoxicación crónica con cadmio realmente estaba induciendo una nefropatía en las ratas expuestas a cadmio durante su desarrollo embrionario. Al analizar nuestros resultados, encontramos que las ratas intoxicadas con cadmio durante su gestación tenían un peso corporal más bajo durante todo el desarrollo postnatal en comparación con las ratas controles, y que al llegar a la adultez (56 DPN) se perdía esta diferencia entre el peso corporal entre las ratas expuestas a Cd y las controles (Fig. 3). Se ha reportado que el bajo peso al nacer no solamente está fuertemente relacionado con deficiencias en la nutrición, sino también a un número reducido de nefronas, y como un mecanismo compensatorio intrarrenal, los riñones se hipertrofian para mantener la tasa de filtración glomerular normal, lo cual con el tiempo tendrá un mayor riesgo de enfermedad renal progresiva (Bagby et al. 2007).

Se ha descrito previamente que el Cd es un ion metálico divalente y, por lo tanto, se absorbe utilizando transportadores para iones metálicos esenciales. Durante la etapa gestacional la absorción gastrointestinal y el transporte de elementos esenciales se encuentran elevados, a comparación de los valores que se encuentran después del nacimiento. También durante esta etapa, la exposición al Cd se ha asociado con concentraciones alteradas de micronutrientes en los órganos internos, por ejemplo, disminuyen los niveles de hierro en el hígado, los riñones, en el feto y también en la placenta; mientras que los niveles de zinc aumentan en el hígado y disminuyen en los riñones y en la placenta, llegando a la conclusión de que el Cd

induce concentraciones más bajas de micronutrientes en los fetos (Antonio Garcia et al. 2004; Jacquillet et al. 2007; Jacobo-Estrada et al. 2017). Esta cantidad significativa de cadmio durante la gestación y posteriormente a través de la lactancia (ya que la lactancia materna es una fuente importante de exposición al Cd después del nacimiento, Jacobo-Estrada et al. 2017) podría ser la razón por la que se observó un menor peso corporal en las crías más jóvenes y en las ratas jóvenes.

También encontramos daño renal en las ratas de 45 y 60 DPN (Fig. 7 y 11, respectivamente) evidenciado por un incremento significativo del flujo urinario (poliuria), de proteinuria y una disminución también significativa de la depuración de creatinina, pero interesantemente no encontramos ningún daño renal en las crías de 21 DPN. En reportes previos se encontró que después del nacimiento las crías que fueron expuestas a Cd durante su gestación, las concentraciones de Cd en los riñones aumentaron significativamente desde el día 2 posnatal hasta el día 60, presumiblemente debido a dos factores: 1) la presencia de Cd en la leche materna, y transmitida a la cría durante la lactancia y 2) por liberación del contenido de Cd en el hígado neonatal (Jacquillet et al. 2007).

Probablemente la ausencia de daño renal que encontramos en las crías de 21 DPN se deba a que no se ha alcanzado aún la concentración tóxica de cadmio en el riñón ($150 \mu\text{g/g}$ de tejido) (Gobe et al. 2010; Prozialeck et al. 2010), y que posteriormente se alcanza en las ratas de 45 y 60 DPN debido a la redistribución del Cd hepático hacia el riñón (Jacquillet et al. 2007) y por la nueva carga de Cd que la cría está recibiendo como producto de la lactancia, la cual acaba justamente a los 21 DPN. Ambos eventos están contribuyendo al incremento de la concentración neta de Cd en los riñones en la adultez. Cabe resaltar que estos resultados fueron los esperados, ya que en este trabajo utilizamos el modelo experimental de intoxicación crónica con Cd de Jacquillet et al. 2006; Jacquillet et al. 2007, cuya dosis $0.5 \mu\text{g}$ de $\text{CdCl}_2/\text{Kg}/\text{día}$ esta estandarizada para alcanzar las concentraciones toxicas renales en la rata adulta.

Nuestros resultados son congruentes con los obtenidos por Jacquillet et al. (2007) en donde describen en su modelo crónico de exposición a cadmio en el útero, que las crías nacen con la función renal y la presión arterial normales, pero al llegar a la edad adulta, desarrollan hipertensión y daño renal, concluyendo que existe un riesgo importante de exposición

intrauterina a Cd sobre el desarrollo de hipertensión arterial y daño renal en la vida adulta (Reyes et al. 2013). Nuestros resultados son similares a los de este grupo ya que nosotros también encontramos los parámetros de la función renal alterados (45 y 60 DPN, Fig. 7 y 11, respectivamente) e hipertensión en las crías en la etapa adulta (45 y 60 DPN, Fig. 8 y 12, respectivamente) que fueron expuestas a Cd durante su gestación.

Debemos tener en cuenta que una de las principales fuentes de exposición a Cd durante la gestación es el humo del tabaco y que el Cd posee una larga vida media en el humano (10 a 30 años), por lo tanto, es importante resaltar este riesgo crítico de hipertensión y daño renal en la descendencia. Fumar un cigarrillo aumenta la concentración en sangre en aproximadamente 0.1 a 0.2 μg de Cd por litro porque cada cigarrillo contiene de 1 a 2 μg de Cd; sin embargo, el contenido de Cd puede variar dependiendo del origen de las hojas de tabaco. En estudios en cigarrillos mexicanos se encontró que cada cigarrillo contenía de 2.5 a 2.8 μg de Cd (Jacobo-Estrada et al. 2017).

Como hemos visto anteriormente, la amplia distribución en el medio ambiente y algunas otras características que posee el cadmio lo han convertido en un gran peligro para el ser humano, es por esto que a lo largo del tiempo se han usado diferentes biomarcadores urinarios sensibles de las primeras etapas de daño del túbulo proximal, por ejemplo la proteína metalotioneína unida a Cd, y varias proteínas de bajo peso molecular como la β -2-microglobulina y la Proteína de células Clara-16 (CC-16, por sus siglas en inglés) (Prozialeck et al. 2009).

Aquí nos enfocamos en el biomarcador β -2-microglobulina, proteína presente en la orina. Normalmente, esta proteína de bajo peso molecular es fácilmente filtrada por el glomérulo y posteriormente reabsorbida por el túbulo proximal; sin embargo, a medida que el Cd se acumula en las células epiteliales del túbulo proximal la reabsorción de esta proteína de bajo peso molecular disminuye y el aumento resultante de su excreción urinaria es característico de las primeras etapas de daño en el túbulo proximal inducida por Cd (Prozialeck et al. 2009). Al analizar los resultados de la determinación de β -2-microglobulina en la orina de los diferentes grupos (Fig. 13), encontramos un incremento significativo de esta proteína solamente en la orina de las ratas de 60 DPN expuestas a Cd en comparación con las ratas controles, confirmando que hay un daño más severo a nivel del túbulo proximal en las ratas

de 60 DPN en comparación con las de 45 DPN expuestas a Cd en donde encontramos la expresión del marcador temprano Kim-1 el cual se expresa mucho antes de que se presente el fenotipo patológico inducido por el Cd (Lim et al. 2013) y que no se encontró en las ratas de 60 DPN.

Otro resultado que evidencia que el daño tubular severo se observa principalmente en las ratas de 60 DPN expuestas a Cd (Fig. 14), en donde encontramos una disminución significativa en la expresión de la proteína dipeptidil peptidasa IV (DppD), la cual es específica del túbulo proximal y normalmente se expresa abundantemente en la membrana del borde en cepillo de los segmentos S1-S3 (Zavala-Guevara et al. 2021). Reportes previos han demostrado que varias proteínas de las células epiteliales del túbulo proximal son blanco de la toxicidad del cadmio, por ejemplo, se sabe que la proteína E-caderina, se pierde y se ha hipotetizado que la pérdida de adhesión mediada por E-caderina inducida por cadmio en el túbulo proximal podría conducir a cambios en la polaridad epitelial y la función de barrera (Molitoris et al. 1999; Prozialeck et al. 2007). También se ha descrito que hay una desorganización de la proteína de las uniones estrechas, la claudina 2 en la descendencia de ratas expuestas a cadmio durante su gestación (Jacquillet et al. 2007).

Al observar estos resultados quisimos confirmar el daño renal evaluando la presencia de la proteína Kim-1, uno de los biomarcadores en orina más comunes de daño renal temprano que cambia inclusive antes que la creatinina. Kim-1, molécula de daño renal 1 (Kidney Injury Molecule, por sus siglas en inglés), es una glicoproteína transmembranal que normalmente no es detectable en el riñón sano, pero se regula positivamente y se elimina en la orina durante las primeras etapas de daño del túbulo proximal después de isquemia o un daño tóxico (entre ellos el cadmio) (Prozialeck et al. 2009).

Interesantemente, al analizar la expresión de Kim-1 mediante IMF solamente la encontramos incrementada significativamente en las crías expuestas a cadmio hasta la edad de 45 DPN (Fig. 9). Este resultado nos sorprendió ya que, si recordamos, las ratas de 45 y 60 DPN expuestas a Cd tienen daño renal confirmado por la presencia de poliuria, proteinuria y disminución de la depuración de creatinina, (Figs. 7 y 11, respectivamente) en comparación con sus controles y, por lo tanto, nosotros esperábamos encontrar Kim-1 en ambos grupos. Sin embargo, se ha descrito en reportes previos que el aumento en la expresión de Kim-1

inducido por cadmio ocurre en una etapa del daño renal en donde hay poca o ninguna evidencia de necrosis o apoptosis de las células epiteliales del túbulo proximal, es decir en una etapa de daño temprana (Prozialeck et al. 2009). El hecho de que no hayamos encontrado a Kim-1 en las ratas expuestas a Cd de los 60 DPN refleja que en este grupo hay un daño más severo a nivel del túbulo proximal en comparación con las ratas más jóvenes de 45 DPN, las cuales también tienen daño renal pero aparentemente en una etapa temprana en la que todavía no hay evidencia de necrosis y/o apoptosis de las células epiteliales del túbulo proximal.

Sabemos por reportes previos (Jacquillet et al. 2007) que después del destete de las crías (21 DPN), se debe tener en cuenta que la cantidad total de cadmio presente en cada cría permanece igual desde los 21 DPN hasta que alcanza los 60 DPN, lo que indica que, una vez en el cuerpo, el cadmio solo se redistribuye pero no se elimina o se elimina de manera deficiente. Ya que, durante el desarrollo posnatal, se ha visto que en estas crías hay una disminución en la cantidad de cadmio en el hígado y posteriormente, un aumento de cadmio en el riñón, lo que sugiere una transferencia de cadmio del hígado al riñón conforme la cría llega a la adultez (Jacquillet et al. 2007). Algo que debemos tener siempre presente es que el cadmio es un nefrotóxico acumulativo clásico (Prozialeck et al. 2012) por lo tanto, con niveles más altos de exposición, que se presentan con la edad por la transferencia del Cd del hígado al riñón se presentan los efectos nefrotóxicos que vemos en las ratas de 45 DPN.

Probablemente este mayor daño se deba a los efectos crónicos del Cd que presentan las ratas de 60 DPN con una mayor carga neta de Cd en las células epiteliales del túbulo proximal en comparación con las ratas de 45 DPN. Por lo tanto, el severo y tardío daño renal encontrado solamente en las ratas de 60 DPN expuestas a Cd lo confirmamos con los últimos tres resultados descritos anteriormente: 1) incremento significativo de la excreción de β -2-microglobulina en la orina (Fig. 13), 2) una disminución significativa de la expresión de la proteína DppD en el borde cepillo de las células epiteliales del túbulo proximal (Fig. 14) y 3) ausencia de la proteína Kim-1 en el túbulo proximal (Fig. 14).

Después de confirmar que nuestro modelo crónico de exposición a cadmio durante la gestación induce daño renal manifestándose en la edad adulta, observándose disfunción del túbulo proximal y que el daño severo tubular está en las ratas a los 60 días de edad, nuestro

siguiente objetivo fue analizar si la expresión de Gas1 estaba siendo afectada debido a la nefropatía inducida por el cadmio.

Al analizar los resultados encontramos que la expresión de Gas1 no se modifica en las crías de 21 DPN expuestas a Cd en comparación con las crías controles (Fig. 5), pero al observar las ratas de 45 y 60 DPN expuestas a Cd (Fig. 9 B y 14 B, respectivamente) encontramos 2 modificaciones interesantes en la expresión de Gas1 que se mantienen en ambos grupos: 1) un incremento significativo en su expresión y 2) una localización “intracelular” diferente en las células epiteliales del túbulo proximal en comparación con sus grupos controles, es decir, encontramos que Gas1 además de estar incrementada también se localizaba principalmente en el borde cepillo de las células epiteliales del túbulo proximal en las crías de 45 y 60 DPN expuestas a Cd, en comparación con las crías controles en donde Gas1 tiene un patrón de expresión citoplasmático y homogéneo (Fig. 9 A y 14 A, respectivamente).

Algo sorprendente que encontramos fue que estas modificaciones en la expresión de Gas1 se correlacionaban con el daño tubular inducido por el Cd, ya que encontramos que Gas1 colocalizaba fuertemente con el marcador de daño renal, Kim-1 en las ratas de 45 DPN expuestas a Cd (Fig. 9 B, E y F) y también colocalizaba con la proteína DppD en las ratas de 60 DPN expuestas a Cd (Fig. 14 B, color amarillo). Confirmando que la expresión de Gas1 si se modifica en las células epiteliales dañadas (ya que están expresando Kim-1 y/o tienen una pérdida de DppD) de los túbulos proximales inducido por el cadmio en las ratas de 45 y 60 DPN que presentan daño renal e hipertensión.

Sabiendo que la expresión de Gas1 se modificaba solamente en las crías adultas con nefropatía inducida por el cadmio, el siguiente objetivo fue saber si Gas1 estaba participando en los mecanismos de reparación celular inducidos por el cadmio. Para lograr este objetivo, decidimos evaluar la proliferación celular utilizando la proteína Ki67, y el marcador de células progenitoras renales (CPR), la proteína CD24.

Al evaluar el marcador de las CPR (CD24) solamente encontramos un incremento significativo en las crías de 21 y ratas de 45 DPN expuestas a Cd (Fig. 6 B y D, y Fig. 10 B y C, respectivamente) y una completa ausencia en las ratas de 60 DPN (Fig. 15 B y C). Como podemos ver en la Fig. 6, el marcador CD24 se expresa en un nivel bajo en las crías de 21 DPN expuestas a Cd en comparación con las ratas de 45 DPN (Fig. 10). Este cambio en el

nivel de expresión de CD24 evidencia que en las crías de 21 DPN que todavía no desarrollan hipertensión, ni evidencian daño renal y daño tubular inducido por el cadmio, probablemente la concentración de cadmio presente en sus células epiteliales del túbulo proximal es suficiente para la activación de mecanismos controlados de reparación celular tempranos que probablemente involucra la desdiferenciación de las células epiteliales del túbulo proximal que proliferan y se regeneran, ya que comienzan a expresar marcadores como CD24 (Bonventre et al. 2003; Houghton et al. 1976; Witzgall et al. 1994 o el posible reclutamiento de CPR de nichos cercanos (Gupta et al. 2006; Maeshima et al. 2003; Oliver et al. 2004).

Nuestra hipótesis la cual planteamos con base en los resultados aquí presentados es que en la cría de 21 DPN expuesta a Cd está comenzando a activar mecanismos de reparación celular tempranos al incrementar el número de células progenitoras y se evidencia un aumento en el proceso de proliferación celular hasta los 45 días de edad al observarse más células positivas a Ki67 (Fig. 10 D y F). Con este resultado podemos concluir que efectivamente se están activando mecanismos de reparación celular tempranos, ya que comienzan a activarse antes de que se presente daño renal y/o hipertensión. Es decir, comienza a expresarse el marcador de CPR (el marcador CD24 siempre está presente en las CPR) en las crías de 21 DPN expuestas a Cd pero que no presentan nefropatía y probablemente sea esta la razón del porque no encontramos la expresión de Ki67 en este grupo, ya que, si aún no se disminuye el número de las células en el epitelio no hay necesidad de que las células del túbulo proximal estén proliferando. Mientras transcurre el tiempo, las crías de 21 DPN expuestas a Cd comienzan a incrementar su carga neta de Cd hasta llegar a la edad de 45 DPN, en donde ya presentan hipertensión y un daño renal no tan severo (ya que hay presencia de Kim-1 y ausencia de β -2-microglobulina) en comparación con las ratas de 60 DPN. Posiblemente esta sea la causa de encontrar un mayor nivel de expresión de CD24 y de Ki67, en donde incrementa el marcador de CPR y hay una proliferación activa de las células epiteliales de túbulo proximal. Conforme pasa el tiempo, las ratas de 45 DPN expuestas a Cd siguen incrementando su carga neta de Cd llegando a la edad de 60 DPN en donde el daño es mayor/severo (hay muerte celular y/o necrosis) confirmado con la pérdida de DppD en el borde cepillo (evidenciando la pérdida de las microvellosidades y por lo tanto disminución en la reabsorción de solutos, entre ellos la microglobulina), el incremento significativo de la excreción en orina de β -2-microglobulina y la ausencia de Kim-1, CD24 y Ki67.

Es probable que la concentración neta de cadmio alcanzada en las ratas de 45 DPN permitiera a las células epiteliales del túbulo proximal la implementación de los mecanismos de reparación que se activaron previamente ya que hay proliferación celular activa (Ki67+) en el túbulo proximal y la presencia de Kim-1 demostrando que se encuentran en una etapa temprana y posiblemente reversible del daño renal. Sin embargo, al seguir incrementando la concentración y los daños inducidos por la presencia del Cd que no puede ser eliminado a los 60 DPN, probablemente se supera y/o se pierde la capacidad de estos mecanismos de reparación que se activaron en etapas tempranas en donde la carga de cadmio era menor y tolerable para las células epiteliales del túbulo proximal, ya que en las ratas de 60 DPN expuestas a Cd ya no encontramos CPR ni proliferación celular y probablemente haya pérdida de células epiteliales del túbulo proximal.

Cabe destacar que probablemente Gas1 está teniendo un papel clave en la activación de estos mecanismos tempranos de reparación celular que se están llevando a cabo en el túbulo proximal como respuesta al daño inducido por el cadmio. Llegamos a esta conclusión debido a que encontramos que Gas1 colocalizaba con CD24 en las crías de 21 DPN (Fig. 6 B), esta interacción entre ambas proteínas es baja en comparación a la encontrada en las ratas de 45 DPN, tal vez esto sea porque el incremento que encontramos de Gas1 y CD24 es causado por el daño renal inducido por el cadmio y debido a que en este grupo (crías de 21 DPN) no hay daño aparente (ni hipertensión ni daño renal) esta interacción entre Gas1 y CD24 es muy baja, pero existe. Esto se sostiene al analizar las ratas de 45 DPN expuestas a Cd, encontrando que Gas1 colocaliza también fuertemente con Kim-1, CD24 y Ki67 (Fig. 9 y 10, respectivamente), cuando probablemente están en marcha estos mecanismos de reparación en el túbulo proximal. Podemos observar que en estas crías (45 DPN) las células epiteliales del túbulo proximal con daño no severo (Kim-1+) tienen incrementada la expresión de Gas1 y su expresión se concentra en el borde cepillo igual que Kim-1, mientras que las células epiteliales del túbulo proximal CD24+ también colocalizan fuertemente con Gas1. Por lo tanto, pareciera que el incremento de Gas1 y su localización principalmente en el borde cepillo en las células epiteliales dañadas del túbulo proximal, es un paso fundamental para que se lleve a cabo la proliferación celular como respuesta al daño inducido por el cadmio.

Hasta la fecha existe un amplio debate sobre el origen de las células epiteliales renales recién formadas, en este caso debido al daño inducido por el metal pesado. Algunos estudios muestran que las células nuevas se derivan de divisiones de células residentes sobrevivientes completamente diferenciadas del túbulo proximal (Bonventre et al. 2003; Houghton et al. 1976; Witzgall et al. 1994), mientras que otros trabajos afirman que una subpoblación de células epiteliales tubulares renales funciona como células progenitoras (Gupta et al. 2006; Maeshima et al. 2003; Oliver et al. 2004). Teniendo en cuenta estos dos posibles orígenes de las células epiteliales recién formadas en el túbulo proximal como respuesta al Cd, podemos proponer con nuestros resultados la importancia que tiene Gas1 como regulador del ciclo celular en las células epiteliales del túbulo proximal en la condición sana pero, también durante la nefropatía inducida por el cadmio, en donde posiblemente también este regulando el ciclo celular de las CPR CD24+ involucradas activamente en los mecanismos tempranos de reparación celular ante el daño ocasionado por el cadmio.

Trabajos previos han demostrado el papel clave que tiene Gas1 en el mantenimiento y proliferación de CPR durante el desarrollo temprano en el riñón, ya que en ausencia de Gas1, existe una muerte masiva de esta población de células (Kann et al. 2015), pero también en nefropatías como la diabetes (Luna-Antonio et al. 2017). Tal vez el incremento de Gas1 durante la nefropatía inducida por Cd, está activando y manteniendo a las CPR del túbulo proximal durante los mecanismos de reparación activos, ya que en las ratas de 45 DPN cuando Gas1 incrementa significativamente también incrementan las CPR (CD24+), incrementando significativamente también la proliferación celular (Ki67).

Otra posible explicación podría estar relacionada con un significado biológico más general de Gas1 como un promotor de la estabilización celular y resistencia a agentes tóxicos, como lo sugiere Spagnuolo et al. (Spagnuolo et al. 2004) en un modelo con células endoteliales en donde encontró que Gas1 reduce fuertemente la apoptosis sin afectar el crecimiento celular y tal vez contribuyendo a la integridad del resto del endotelio.

8. Conclusiones

Gas1 está presente y aumenta significativamente su expresión en las células epiteliales del túbulo proximal desde que la rata nace y durante todo el proceso de maduración posnatal en el riñón sano, manteniendo su expresión más alta en el adulto. Este resultado sugiere que Gas1 podría estar relacionado con el control del ciclo celular (Stebel et al. 2000) de las células epiteliales del túbulo proximal, probablemente manteniendo el ciclo celular detenido de células epiteliales completamente diferenciadas.

La expresión de Gas1 incrementa significativamente en las células epiteliales del túbulo proximal como consecuencia de la nefropatía inducida por el cadmio en las crías adultas expuestas durante la gestación.

Las CPR (CD24+) y las células epiteliales con daño temprano (Kim-1+) expresan Gas1 durante la nefropatía inducida por cadmio. Posiblemente, en presencia de daño renal inducido por cadmio durante la gestación, Gas1 también podría estar regulando a las CPR durante la nefropatía, permitiendo su activación (Luna-Antonio et al. 2017) y manteniéndolas durante los mecanismos de reparación celular tempranos activos.

9. Referencias

- Antonio Garcia T, Corredor L. Biochemical changes in the kidneys after perinatal intoxication with lead and/or cadmium and their antagonistic effects when coadministered. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2004;57(2):184-189. doi:10.1016/S0147-6513(03)00063-0
- Ayala-Sarmiento AE, Estudillo E, Pérez-Sánchez G, et al. GAS1 is present in the cerebrospinal fluid and is expressed in the choroid plexus of the adult rat. *Histochem Cell Biol.* 2016;146(3):325-336. doi:10.1007/s00418-016-1449-0
- Bagby SP. Maternal nutrition, low nephron number, and hypertension in later life: pathways of nutritional programming. *J Nutr.* 2007;137(4):1066-1072. doi:10.1093/jn/137.4.1066
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 14, Suppl 1: S55–S61, 2003.
- Cebrián C, Borodo K, Charles N, Herzlinger DA. Morphometric index of the developing murine kidney. *Dev Dyn.* 2004;231(3):601-608. doi:10.1002/dvdy.20143
- Conceição AL, Da Silva CT, Badial RM, et al. Downregulation of OCLN and GAS1 in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2017;37(3):1487-1496. doi:10.3892/or.2017.5414
- Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Dev Cell.* 2010;18(5):698-712. doi:10.1016/j.devcel.2010.04.008
- Daugherty A, Rateri D, Hong L, Balakrishnan A. Measuring blood pressure in mice using volume pressure recording, a tail-cuff method. *J Vis Exp.* 2009;(27):1291. doi:10.3791/1291
- Dominguez-Monzon G, Gonzalez-Ramirez R, Segovia J. Molecular mechanisms of action of Gas1 and its possible therapeutic applications. *Curr Signal Transduct Ther.* 2011; 6(1), 106–112. <https://doi.org/10.2174/157436211794109433>

- Dong L, Pietsch S, Englert C. Towards an understanding of kidney diseases associated with WT1 mutations. *Kidney Int.* 2015;88(4):684-690. doi:10.1038/ki.2015.198
- Gobe G, Crane D. Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. *Toxicol Lett.* 2010;198(1):49-55. doi:10.1016/j.toxlet.2010.04.013
- Gomez RA, Sequeira Lopez ML, Fernandez L, Cherñavvsky DR, Norwood VF. The maturing kidney: development and susceptibility. *Ren Fail.* 1999;21(3-4):283-291. doi:10.3109/08860229909085090.
- Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, et al. Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int.* 2000;57(6):2386-2402. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00098.x
- Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kren S, Eidman K, Connaire J, Heremans Y, Lund T, Blackstad M, Jiang Y, Luttun A, Rosenberg ME. Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. *J Am Soc Nephrol* 17: 3028–3040, 2006.
- Hepojoki S, Kareinen L, Strandin T, et al. Urine and free immunoglobulin light chains as analytes for serodiagnosis of hantavirus infection. *Viruses.* 2019;11(9):809. doi:10.3390/v11090809
- Houghton DC, Hartnett M, Campbell-Boswell M, Porter G, Bennett W. A light and electron microscopic analysis of gentamicin nephrotoxicity in rats. *Am J Pathol* 82: 589–612, 1976.
- Jacobo-Estrada T, Santoyo-Sánchez M, Thévenod F, Barbier O. Cadmium handling, toxicity and molecular targets involved during pregnancy: lessons from experimental models. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1590. doi:10.3390/ijms18071590
- Jacquillet G, Barbier O, Cougnon M, et al. Zinc protects renal function during cadmium intoxication in the rat. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290(1):F127-F137. doi:10.1152/ajprenal.00366.2004
- Jacquillet G, Barbier O, Rubera I, et al. Cadmium causes delayed effects on renal function in the offspring of cadmium-contaminated pregnant female rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(5):F1450-F1460. doi:10.1152/ajprenal.00223.2007
- Kann M, Bae E, Lenz MO, Li L, Trannguyen B, Schumacher VA, et al. WT1 targets Gas1 to maintain nephron progenitor cells by modulating FGF signals. *Development.* 2015; 142(7):1254–1266. <https://doi.org/10.1242/dev.119735> PMID: 25804736

- Kreidberg JA. WT1 and kidney progenitor cells. *Organogenesis*. 2010;6(2):61-70. doi:10.4161/org.6.2.11928
- Lim AI, Tang SC, Lai KN, Leung JC. Kidney injury molecule-1: more than just an injury marker of tubular epithelial cells?. *J Cell Physiol*. 2013;228(5):917-924. doi:10.1002/jcp.24267
- Little M, Georgas K, Pennisi D, Wilkinson L. Kidney development: two tales of tubulogenesis. *Curr Top Dev Biol*. 2010;90:193-229. doi:10.1016/S0070-2153(10)90005-7
- Little MH, McMahon AP. Mammalian kidney development: principles, progress, and projections. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(5):a008300. Published 2012 May 1. doi:10.1101/cshperspect.a008300
- López-Ramírez MA, Domínguez-Monzón G, Vergara P, Segovia J. Gas1 reduces Ret tyrosine 1062 phosphorylation and alters GDNF-mediated intracellular signaling. *Int J Dev Neurosci*. 2008;26(5):497-503. doi:10.1016/j.ijdevneu.2008.02.006
- Luna-Antonio BI, Rodríguez-Muñoz R, Namorado-Tonix C, Vergara P, Segovia J, Reyes JL. Gas1 expression in parietal cells of Bowman's capsule in experimental diabetic nephropathy. *Histochem Cell Biol*. 2017;148(1):33-47. doi:10.1007/s00418-017-1550-z
- Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 14: 3138–3146, 2003.
- Martinelli DC, Fan CM. The role of Gas1 in embryonic development and its implications for human disease. *Cell Cycle*. 2007;6(21):2650-2655. doi:10.4161/cc.6.21.4877
- Molina-Jijón E, Rodríguez-Muñoz R, Namorado Mdel C, Pedraza-Chaverri J, Reyes JL. Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy. *Free Radic Biol Med*. 2014;72:162-175. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.040
- Molina-Jijón E, Rodríguez-Muñoz R, Namorado M del C, et al. All-trans retinoic acid prevents oxidative stress-induced loss of renal tight junction proteins in type-1 diabetic model. *J Nutr Biochem*. 2015;26(5):441-454. doi:10.1016/j.jnutbio.2014.11.018
- Molitoris BA, Marris J. The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *Am J Med*. 1999;106(5):583-592. doi:10.1016/s0002-9343(99)00061-3

- Nakamura Y, Ohba K, Suzuki K, Ohta H. Health effects of low-level cadmium intake and the role of metallothionein on cadmium transport from mother rats to fetus. *J Toxicol Sci.* 2012;37(1):149-156. doi:10.2131/jts.37.149
- Neiss WF, Klehn KL. The postnatal development of the rat kidney, with special reference to the chemodifferentiation of the proximal tubule. *Histochemistry.* 1981;73(2):251-268. doi:10.1007/BF00493025
- Nigam, S.K.; Aperia, A.C.; Brenner, B.M. Development and maturation of the kidney. In *The Kidney*. Brenner, B.M., Reector, F.C., Eds.; Saunders: Philadelphia, PA. 1996; 72-98.
- Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* 114: 795–804, 2004.
- Prozialeck WC, Edwards JR. Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury. *Pharmacol Ther.* 2007;114(1):74-93. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.01.001
- Prozialeck WC, Edwards JR, Lamar PC, Liu J, Vaidya VS, Bonventre JV. Expression of kidney injury molecule-1 (Kim-1) in relation to necrosis and apoptosis during the early stages of Cd-induced proximal tubule injury. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;238(3):306-314. doi:10.1016/j.taap.2009.01.016
- Prozialeck WC, Edwards JR. Early biomarkers of cadmium exposure and nephrotoxicity. *Biometals.* 2010;23(5):793-809. doi:10.1007/s10534-010-9288-2
- Prozialeck WC, Edwards JR. Mechanisms of cadmium-induced proximal tubule injury: new insights with implications for biomonitoring and therapeutic interventions. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;343(1):2-12. doi:10.1124/jpet.110.166769
- Reyes JL, Melendez E. Effects of eicosanoids on the water and sodium balance of the neonate. *Pediatr Nephrol.* 1990;4(6):630-634. doi:10.1007/BF00858640
- Reyes JL, Nava E, Namorado MC. Receptor-mediated effect of a synthetic thromboxane-analogue on cytosolic calcium in isolated proximal tubules. *Prostaglandins.* 1992;44(2):145-154. doi:10.1016/0090-6980(92)90076-6
- Reyes JL, Molina-Jijón E, Rodríguez-Muñoz R, Bautista-García P, Debray-García Y, Namorado Mdel C. Tight junction proteins and oxidative stress in heavy metals-induced nephrotoxicity. *Biomed Res Int.* 2013;2013:730789. doi:10.1155/2013/730789

- Rizaldy Paz Scott, Yoshiro Maezawa, Jordan Kreidberg, Susan E. Quaggin. Embryology of the kidney. Brenner and Rector's the Kidney, 2-Volume Set. Chapter: 1 Embryology of the Kidney. Elsevier. 2020.
- Schiffer TA, Gustafsson H, Palm F. Kidney outer medulla mitochondria are more efficient compared with cortex mitochondria as a strategy to sustain ATP production in a suboptimal environment. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;315(3):F677-F681. doi:10.1152/ajprenal.00207.2018
- Schueler-Furman O, Glick E, Segovia J, Linial M. Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands?. *Trends Pharmacol Sci*. 2006;27(2):72-77. doi:10.1016/j.tips.2005.12.004
- Segovia J, Zarco N. Gas1 is a pleiotropic regulator of cellular functions: from embryonic development to molecular actions in cancer gene therapy. *Mini Rev Med Chem*. 2014;14(14):1139-1147. doi:10.2174/1389557514666141127142301
- Spagnuolo R, Corada M, Orsenigo F, et al. Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis. *Blood*. 2004;103(8):3005-3012. doi:10.1182/blood-2003-07-2459
- Stebel M, Vatta P, Ruaro ME, Del Sal G, Parton RG, Schneider C. The growth suppressing gas1 product is a GPI-linked protein. *FEBS Lett*. 2000;481(2):152-158. doi:10.1016/s0014-5793(00)02004-4
- Sweeney DE, Vallon V, Rieg T, Wu W, Gallegos TF, Nigam SK. Functional maturation of drug transporters in the developing, neonatal, and postnatal kidney. *Mol Pharmacol*. 2011;80(1):147-154. doi:10.1124/mol.110.070680
- Takasato M, Little MH. The origin of the mammalian kidney: implications for recreating the kidney in vitro. *Development*. 2015;142(11):1937-1947. doi:10.1242/dev.104802
- Thévenod F, Lee WK. Cadmium and cellular signaling cascades: interactions between cell death and survival pathways. *Arch Toxicol*. 2013;87(10):1743-1786. doi:10.1007/s00204-013-1110-9
- Vainio S, Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nat Rev Genet*. 2002;3(7):533-543. doi:10.1038/nrg842

- van Roeyen CR, Zok S, Pruessmeyer J, et al. Growth arrest-specific protein 1 is a novel endogenous inhibitor of glomerular cell activation and proliferation. *Kidney Int.* 2013;83(2):251-263. doi:10.1038/ki.2012.400
- Venugopal S, Anwer S, Szászi K. Claudin-2: Roles beyond Permeability Functions. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22):5655. Published 2019 Nov 12. doi:10.3390/ijms20225655
- Vogetseder A, Karadeniz A, Kaissling B, Le Hir M. Tubular cell proliferation in the healthy rat kidney. *Histochem Cell Biol.* 2005;124(2):97-104. doi:10.1007/s00418-005-0023-y
- Vogetseder A, Palan T, Bacic D, Kaissling B, Le Hir M. Proximal tubular epithelial cells are generated by division of differentiated cells in the healthy kidney. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(2):C807-C813. doi:10.1152/ajpcell.00301.2006
- Vogetseder A, Picard N, Gaspert A, Walch M, Kaissling B, Le Hir M. Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;294(1):C22-C28. doi:10.1152/ajpcell.00227.2007
- Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN J.* 1998; 68(5):800–824. [https://doi.org/10.1016/s0001-2092\(06\)62377-6](https://doi.org/10.1016/s0001-2092(06)62377-6) PMID: 9829131
- Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest* 93: 2175–2188, 1994.
- Zarco N, González-Ramírez R, González RO, Segovia J. GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway. *Apoptosis.* 2012;17(6):627-635. doi:10.1007/s10495-011-0696-8
- Zavala-Guevara IP, Ortega-Romero MS, Narváez-Morales J, et al. Increased endocytosis of cadmium-metallothionein through the 24p3 receptor in an in vivo model with reduced proximal tubular activity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(14):7262. Published 2021 Jul 6. doi:10.3390/ijms22147262