

Université de Montréal

Localisation et quantification du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance  
dans le rein de rat et humain

*Par*

Tracy Nami

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences  
en Sciences biomédicales, option médecine expérimentale

Septembre 2022

© Tracy Nami, 2023

Université de Montréal

Faculté de médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Localisation et quantification du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance dans le rein de rat et humain**

*Présenté par*

**Tracy Nami**

*a été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Réjean Couture**

Président-rapporteur

**Mélanie Dieudé**

Membre du jury

**Pierrette Gaudreau**

Directrice de recherche

# 1. Résumé

Le récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance (*GHRHR*) est un récepteur de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Il est fortement exprimé dans les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure de plusieurs mammifères. Ce récepteur exerce un rôle primordial dans la stimulation de la synthèse et de la sécrétion de l'hormone de croissance ainsi que dans la prolifération des somatotropes. Au niveau extrahypophysaire, les niveaux les plus élevés d'ARNm du *GHRHR* se retrouvent dans le rein. Toutefois, aucune analyse immunohistochimique n'existe encore sur la localisation précise et la quantification sur les niveaux de *GHRHR* dans les différents segments du rein de rat et sa dynamique d'expression en situation normale et pathologique telle que l'ischémie. De plus, dans le rein humain normal, aucune information n'est présentement disponible.

Le premier article de ce mémoire a pour objectif d'identifier, par immunofluorescence directe, la localisation du *GHRHR* à travers le système tubulaire rénal, chez le rat jeune en bonne santé. Nos résultats mettent en évidence que dans le rein de rat sain, le *GHRHR* est exprimé dans les cellules du tubule proximal contourné et droit, de l'anse de Henlé ascendante épaisse corticale et médullaire et de l'anse de Henlé ascendante mince. Le cortex et la bande externe de la médulla externe seraient les deux régions où l'expression est la plus élevée. À la suite d'une insulte rénale comme l'ischémie-reperfusion (IR) chaude, nos résultats démontrent que l'expression du *GHRHR* est régulée à la baisse dans ces mêmes régions. De plus, une augmentation de certains marqueurs de détérioration cellulaire est présente comme l'enzyme initiatrice, la caspase-9 clivée et effectrice (caspase-3 clivée), des fragments d'ADN et la surexpression d'indicateur d'injure tissulaire comme la protéine *Kidney Injury Molecule 1* (KIM-1). L'ensemble de ces résultats ouvre plusieurs pistes d'études concernant l'importance du *GHRHR* en néprotection.

Le deuxième article de ce mémoire a pour objectif d'identifier, par immunofluorescence directe, la localisation du *GHRHR* à travers le système tubulaire rénal humain. Nos résultats suggèrent que dans le rein humain sain, le *GHRHR* est davantage exprimé dans le cortex, plus précisément, au niveau du tubule proximal droit et contourné et l'anse de Henlé corticale ascendante épaisse.

L'expression du GHRHR est aussi notable au niveau de la région médullaire, pour être plus spécifique, au niveau de l'anse de Henlé médullaire ascendante épaisse et de la médulla. Ainsi, comme chez le rat, l'expression du *GHRHR* rénal est régio-spécifique.

Finalement, le troisième article de ce mémoire est une revue de la littérature ayant pour but d'établir un lien entre les mécanismes connus du stress oxydant dans un contexte d'IR rénale et son impact spécifique dans la médulla. Cet article met en évidence que les différents segments du rein réagissent différemment à une agression oxydante et que la médulla est la région la plus vulnérable. De plus, cette revue de la littérature souligne que les différents types de mécanismes connus du stress oxydant dans un contexte d'IR rénale, tel que la production de dérivés réactifs de l'oxygène, ciblent principalement deux structures du néphron : le tubule proximal et l'anse de Henlé ascendante épaisse médullaire. Les principales répercussions de ces mécanismes observables sont l'inflammation, l'apoptose cellulaire et la diminution des fonctions rénales. Ces mécanismes peuvent aussi être utilisés comme un outil de diagnostic ou de détermination de la santé de l'organe.

**Mots-clés** : récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance, *GHRHR*, rat, humain, cortex rénal, médulla rénale, tubule proximal, anse de Henlé ascendante mince, anse de Henlé ascendante épaisse, ischémie-reperfusion, immunofluorescence.

## 2. Abstract

The growth hormone-releasing factor receptor (GHRHR) is a receptor of the family of G-protein-coupled receptors. It is highly expressed in the somatotrophic cells of the anterior pituitary of several mammals. This receptor plays an essential role in the stimulation of the synthesis and secretion of growth hormone as well as in the proliferation of somatotrophs. At the extra-pituitary level, the highest levels of GHRHR mRNA are found in the kidney. However, no immunohistochemical analysis yet exists on precise localization and quantification of GHRHR levels in the different segments of the rat kidney and its expression dynamics in normal and pathological situations such as ischemia. Additionally, in the normal human kidney, no information is currently available.

The first article of this thesis aims to identify, by direct immunofluorescence, the localization of the GHRHR through the renal tubular system, in young healthy rats. Our results show that in the healthy rat kidney, GHRHR is expressed in the cells of the convoluted and right proximal tubule, of the cortical and medullary thick ascending loop of Henle and of the thin ascending loop of Henle. The cortex and the outer band of the outer medulla would be the two regions where the expression is the highest. Following a renal insult such as warm ischemia-reperfusion (RI), our results demonstrate that GHRHR expression is down-regulated in these same regions. In addition, an increase in certain markers of cellular damage is present including initiating enzymes, cleaved and effector caspase-9 (cleaved caspase-3), DNA fragments and overexpression indicative of tissue injury such as protein Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1). All these results open up several avenues of study concerning the importance of GHRHR in renoprotection.

The second article of this thesis aims to identify, by direct immunofluorescence, the localization of the GHRHR through the human renal tubular system. Our results suggest that in the healthy human kidney, the GHRHR is more expressed in the cortex, more precisely at the level of the right, convoluted proximal tubule and the thick ascending cortical loop of Henle. The expression of GHRHR is also appreciable at the level of the medullary region, more precisely at the level of the

thick ascending medullary loop of Henle, and the medulla. Thus, as in rats, the expression of renal GHRHR is region specific.

Finally, the third article of this thesis is a review of the literature aimed at establishing a link between the known mechanisms of oxidative stress in the context of renal IR and its specific impact in the medulla. This article highlights that the different segments of the kidney react differently to an oxidative attack and that the medulla is the most vulnerable region. In addition, this review of the literature underlines that the different types of known mechanisms of oxidative stress in a context of renal IR, such as the production of reactive oxygen species, mainly target two structures of the nephron: the proximal tubule and the thick ascending loop of Henle. The main repercussions of these observable mechanisms are inflammation, cellular apoptosis and reduced renal function. These mechanisms can also be used as a diagnostic tool or to determine the health of the organ.

**Key words:** growth hormone-releasing factor receptor, GHRHR, rat, human, renal cortex, renal medulla, proximal tubule, thin ascending loop of Henle, thick ascending loop of Henle, ischemia-reperfusion, immunofluorescence.

### 3. Table des matières

1.	Résumé .....	3
2.	Abstract .....	5
3.	Table des matières .....	7
4.	Liste des figures .....	11
5.	Liste des abréviations .....	12
6.	Remerciements.....	16
7.	INTRODUCTION .....	17
1.1.	Le récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance .....	18
1.1.1.	Les récepteurs couplés aux protéines G .....	18
1.1.2.	Distribution du <i>GHRHR</i> .....	19
1.1.3.	Structure et rôle du <i>GHRHR</i> et son ligand .....	20
1.1.4.	Mécanisme d'activation et voies de signalisation du <i>GHRHR</i> .....	22
1.1.5.	<i>GHRHR</i> : Expression génique et régulation.....	24
1.2.	Le rein .....	26
1.2.1.	Organisation et fonctions générales.....	26
1.2.2.	Corpuscule rénal .....	28
1.2.3.	Système tubulaire .....	30
1.2.4.	Différence entre la zone corticale et médullaire .....	35
1.3.	Le <i>GHRHR</i> rénal.....	36
1.3.1.	Localisation et structure du <i>GHRHR</i> rénal .....	36
1.3.2.	Rôle du <i>GHRHR</i> rénal .....	37
8.	HYPOTHÈSES & OBJECTIFS.....	38

Hypothèses .....	39
Objectifs.....	39
9. ARTICLE I : ÉTUDE ANIMALE .....	41
Abstract .....	42
Introduction.....	43
Materials and Methods .....	44
Animal sample and tissue Preparation .....	44
Immunofluorescence Localization of GHRHR .....	44
Fluorescence Characterization of Cell Damage Markers .....	45
Immunofluorescence Visualization and Quantification.....	46
Statistical Analysis .....	47
Results .....	47
Localization and quantification of the GHRHR in the kidney of naïve rat .....	47
Quantification of the GHRHR in the rat kidney following ischemia-reperfusion.....	49
Localization and quantification of KIM-1 in the injured rat kidney following ischemia-reperfusion .....	53
Localization and quantification of DNA fragments in the injured rat kidney following ischemia-reperfusion.....	54
Localization and quantification of apoptotic cells in the injured kidney following ischemia-reperfusion .....	55
Discussion .....	58
Conclusion .....	61
Conflict of Interest.....	61
Authors' contributions.....	61
Funding.....	61



Institutional Review Board Statement.....	62
Data Availability Statement: .....	62
Acknowledgments .....	62
Reference .....	62
10. ARTICLE II : ÉTUDE HUMAINE .....	66
Abstract .....	67
Introduction.....	67
Materials and Methods .....	68
Human Sample and Tissue Preparation.....	68
Immunofluorescence Experiments.....	68
Image Visualization.....	69
Immunofluorescence Quantification and Statistical Analysis .....	70
Results .....	70
Localization of the GHRHR in human renal cortex and medulla.....	70
Quantification of the GHRH receptor in the renal cortex and medulla .....	71
Discussion .....	72
Conclusion .....	74
Conflict of Interest.....	75
Author Contributions.....	75
Funding.....	75
Institutional Review Board Statement.....	75
Data Availability Statement .....	75
Acknowledgments .....	75
Reference .....	75

11.	ARTICLE III : MINI-REVIEW .....	79
	Abstract .....	80
	Introduction.....	80
	Renal Ischemia-Reperfusion Injury .....	81
	Oxidative Stress .....	82
	Oxidative Damage of the Renal Medulla: Preclinical and Clinical Observations .....	83
	Oxidative Stress Impact in the Outer Medulla .....	84
	Proximal Tubule .....	84
	Medullary Thick Ascending Limb of the Henle’s Loop .....	85
	Oxidative Stress Impact in the Inner Medulla .....	86
	Clinical Perspective .....	87
	Conflict of Interest.....	88
	Authors' Contributions .....	88
	Funding and Acknowledgments .....	88
	References.....	88
12.	DISCUSSION .....	96
13.	CONCLUSION .....	103
14.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	105

## 4. Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de l'hypophyse, une glande endocrine constituée d'un lobe antérieur et postérieur. ....	20
Figure 2. Structure du <i>GHRHR</i> chez le rat.....	21
Figure 3. Voies de signalisation cellulaire impliquées dans la sécrétion du GH suite à la liaison du GHRH au GHRHR dans les somatotropes .....	24
Figure 4. Représentation schématique du néphron juxtamédullaire (gauche) et du néphron cortical (droite).....	28
Figure 5. Structure schématique d'un glomérule .....	29

## 5. Liste des abréviations

AC : Adénylate cyclase

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

AQP-1: Aquaporine-1

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ATP: Adénosine triphosphate

BEME: Bande externe de la médulla externe

BIME: Bande interne de la médulla externe

BRCA1: *Breast cancer type 1 susceptibility protein* ou Gène BRCA1

CREB: *cAMP response element binding protein* ou Protéine CREB

cTAL: Cortical thick ascending limb ou Branche ascendante épaisse corticale

DAG: Diacylglycérol

GDP: Guanosine diphosphate

GH: *Growth hormone* ou Hormone de croissance

GHRH: *Growth Hormone Releasing Hormone* ou Facteur de libération de l'hormone de croissance

GHRHR: *Growth Hormone Releasing Hormone Receptor* ou Récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

GIP: *Gastric Inhibitory Polypeptide* ou Peptide insulino-trope dépendant

GPCR: *G protein-coupled receptor* ou récepteur couplé aux protéines G

GTP: Guanosine-triphosphate

IGF-1: *Insulin-like growth factor 1* ou Facteur de croissance analogue à l'insuline de type 1

IP<sub>3</sub> : Inositol triphosphate

IR: Ischémie-reperfusion

MI : Médulla interne

*mTAL*: Medullary thick ascending limb ou Branche ascendante épaisse médullaire

Na-K-ATPase: pompe sodium-potassium-ATPase

*NCC*: *Sodium chloride symporter* ou Co-transporteur d'ions chlorure et sodium

*NHE3*: *Sodium-hydrogen antiporter 3* ou Co-transporteur sodium-hydrogène 3

*NKCC2*: Co-transporteur Na-K-2Cl

*PACAP*: *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* ou Polypeptide hypophysaire activant l'adénylate cyclase

*Pit-1 (ou POU1F1)* : *Pituitary-specific positive factor 1* ou Facteur de transcription positif spécifique à l'hypophyse

PKA : Protéine kinase A

PLC : Phospholipase C

*PROP1*: *Homeobox protein prophet of Pit-1* ou Boîte homéotique protéique prophète de Pit-1

*RT-PCR*: *Real Time Polymerase Chain Reaction* ou Réaction en chaîne à la polymérase en temps réel

T3: Triiodothyronine

*TAL*: Thick ascending limb ou Branche ascendante épaisse

*tAL*: Thin ascending limb ou Branche ascendante mince

TCC: Tubule collecteur du cortex

TCD: Tubule contourné distal

TCME: Tubule collecteur de la médulla externe

TCMI: Tubule collecteur de la médulla interne

*tDL*: Thin descending limb ou Branche descendante mince

*THP*: *Tamm Horsfall Protein* ou Protéine Tamm-Horsfall

TPC : Tubule contourné proximal

TPD : Tubule proximal droit

*TRPM6* : *Transient Receptor Potential Cation Chanel Subfamily M Member 6* ou Récepteur transitoire potentiel du canal cationique du membre 6 de la sous-famille M

*ROMK*: *Renal Outer Medullary K+* ou Canal potassique de la médulla externe rénale

*VIP*: *Vasoactive intestinal peptide* ou Peptide intestinal vasoactif

*« La science, dans ses résultats, est plus magique que la magie : c'est une magie à preuves! »*

Jean-Marie Adiaffi, écrivain, scénariste, cinéaste et critique littéraire ivoirien  
(1941-1999).

## 6. Remerciements

Je souhaite d'abord et avant tout remercier ma directrice de recherche, la Pre Pierrette Gaudreau, de m'avoir donné la chance d'entrer et de fleurir dans le monde de la recherche académique. Ses conseils, son temps alloué et ses efforts ont permis de façonner ma curiosité et ma volonté de continuer une carrière en recherche.

Je suis spécialement reconnaissante envers Gilles Corbeil et Patricia L'Archer de leur présence dans le laboratoire et de leur aide pour s'assurer que je ne manquais jamais de rien.

Je remercie Liliane Meunier, Véronique Barrès et la plateforme de pathologie moléculaire du Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) pour leur service expert, les formations et les nombreux et précieux conseils qui m'ont permis de produire des résultats de qualité.

Je remercie la Dre Héloïse Cardinal, néphrologue au CHUM, spécialiste en transplantation rénale, et membre de mon comité de parrainage pour son temps et ses connaissances qui m'ont permis de mieux m'orienter dans mon projet de maîtrise.

Mes remerciements sincères au vice-rectorat aux études supérieures de l'Université de Montréal pour les bourses de formations offertes et au Centre de Recherche du CHUM pour le soutien financier du projet sur le récepteur rénal du *GHGHR* qui m'ont permis de réaliser mon projet de maîtrise sans obstacle.

À Leslie, Léa, Khalil, Ife et Alex, merci de m'avoir écouté, supporté et toujours réussi à me faire rire à chaque fois que vous aviez la chance de venir me voir à mon bureau.

À Yoshie, Yaning, Thanisha, Nérija, Natalie, Lindsay et Emilie, après toutes ces années d'amitié, vous n'avez jamais raté l'occasion de me faire réaliser à quel point j'ai évolué et à quel point le travail que je fais est important.

Enfin, je remercie spécialement mes parents de leur soutien indéfectible durant mes périodes de doute à travers ce long cheminement.



## **7. INTRODUCTION**

## 1.1. Le récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

### 1.1.1. Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (*GPCR*) font partie d'un très grand groupe de récepteurs qui exercent un rôle majeur au niveau des systèmes de signalisation autocrine, paracrine et endocrine des mammifères. Tous les *GPCR* possèdent une topologie similaire. C'est-à-dire qu'ils possèdent la même architecture moléculaire constituée de sept domaines transmembranaires, trois boucles intracellulaires, trois boucles extracellulaires, une terminaison carboxylique intracellulaire et une amine extracellulaire.

À la suite d'études plus approfondies, les *GPCRs* ont été classifiés en six différentes familles de récepteurs, de A à F (1). Des études de clonage du récepteur de la sécrétine ont mis en évidence que la famille B se différencie des autres familles de récepteurs par la particularité d'avoir la capacité de réguler les concentrations intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) en se liant l'adénylate cyclase (AC) par l'activation de la sous-unité  $G_{s\alpha}$  (2, 3).

Une trentaine de différents gènes humains sont répertoriés dans la famille B des *GPCR*, à savoir les récepteurs de la famille des sécrétines. En subdivisant cette famille en trois sous-groupes (B1 à B3), il a été découvert que la sous-famille B1 représente près de la moitié des gènes répertoriés dans la famille B. En plus de réguler les niveaux intracellulaires d'AMPC, certains de ces récepteurs peuvent, à l'aide des sous-unités  $G_{\alpha}$  et  $G_{\beta\gamma}$  stimuler d'autres voies de signalisation par l'activation du phospholipase C (PLC).

Les gènes classés dans la sous-famille B1 encodent des récepteurs peptidergiques classiques dont le récepteur de la sécrétine, du peptide intestinal vasoactif (*VIP*), du polypeptide activant l'adénylate cyclase hypophysaire (*PACAP*), du peptide insulinothrique dépendant (*GIP*) et le récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance (*GHRHR*) (3, 4).

### 1.1.2. Distribution du *GHRHR*

Le *GHRHR* est connu pour être exprimé fortement au niveau de l'hypophyse, une glande endocrine constituée d'un lobe antérieur et postérieur (Figure 1) (5). Plus spécifiquement, ce récepteur est exprimé à la surface des cellules somatotropes qui synthétisent et sécrètent l'hormone de croissance (*GH*) en réponse à une stimulation du GHRH hypothalamique (6). Ce récepteur a été cloné chez différents mammifères incluant l'homme, le rat, la souris, le mouton et le bœuf (5, 7). Chez le rat et l'humain, la localisation immunohistochimique du *GHRHR* dans les somatotropes serait restreinte à certaines structures cellulaires dont la membrane plasmique, la membrane des granules de sécrétion du *GH*, la matrice cytoplasmique, la membrane nucléaire et la matrice nucléaire (8).

Grâce à la technique de réaction en chaîne à la polymérase en temps réel (*RT-PCR*), l'étude des niveaux d'acide ribonucléique messenger (ARNm) du *GHRHR* a démontré que le récepteur serait également présent dans plusieurs localisations extrahypophysaires, dont le testicule, le placenta, le tractus gastro-intestinal et le rein. Le rein est le seul organe où les niveaux d'ARNm du *GHRHR* sont suffisants pour être détectés sans amplification (9). De plus, les résultats de *RT-PCR* suggèrent que la séquence protéique du *GHRHR* rénal serait différente de celle du *GHRHR* hypophysaire (10). L'importance physiologique des *GHRHR* extrahypophysaires a été peu étudiée à ce jour.

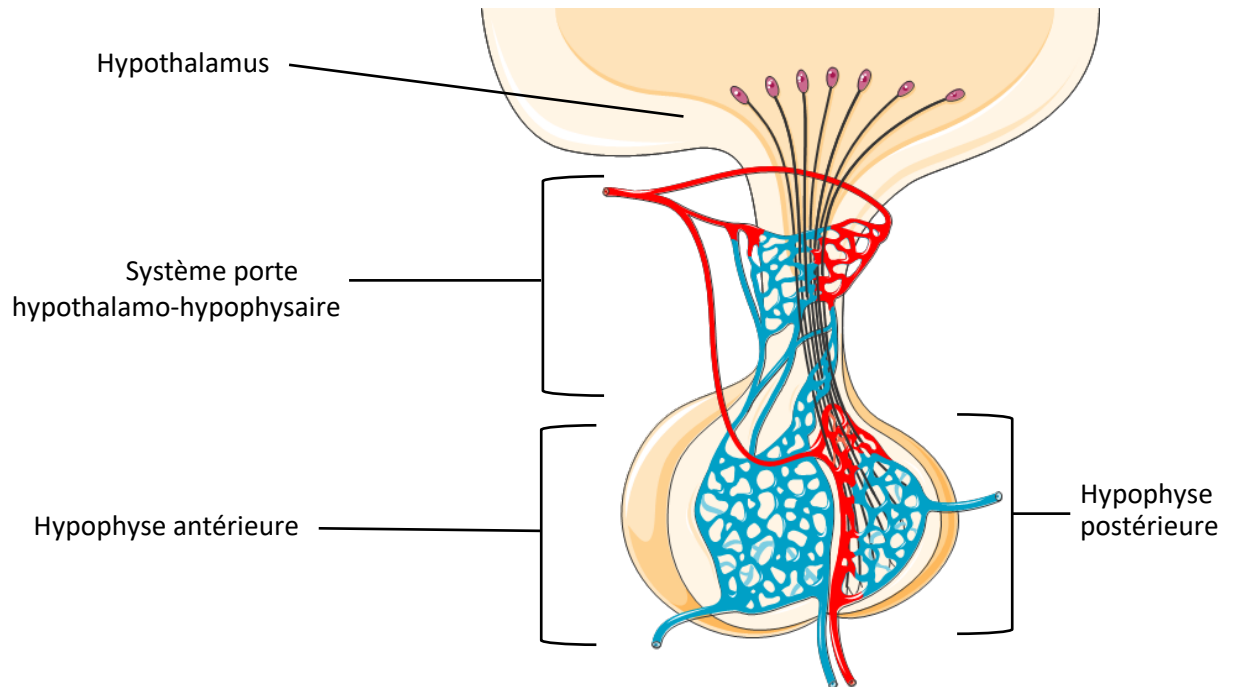


Figure 1. Représentation schématique de l'hypophyse, une glande endocrine constituée d'un lobe antérieur et postérieur.

Figure modifiée avec du texte après adaptation de l'«hypophyse» de Servier Medical Art de Servier (11)

### 1.1.3. Structure et rôle du *GHRHR* et son ligand

#### 1.1.3.1. Structure et rôle du *GHRHR*

Malgré les structures hautement conservées des *GPCR*, le *GHRHR* et les autres récepteurs de la famille B se distinguent par leur extrémité aminée extracellulaire qui possède un site potentiel de clivage et un site de glycosylation qui serait essentiel à l'interaction ligand-récepteur. Des conséquences comme l'accumulation de protéines dans les compartiments intracellulaires peuvent être observées (12-14). Nonobstant les différences qui distinguent les *GHRHR* des autres récepteurs de la famille B, leurs similitudes se retrouvent dans les résidus cystéines dans la seconde et la troisième boucle extracellulaire qui ensemble forment une liaison disulfure qui est un élément commun de tous les récepteurs de la sécrétine (Figure 2) (15-17).

La séquence peptidique (423 résidus d'acides aminés) du *GHRHR* est identique à travers différents mammifères comme le rat, la souris, le porc et l'humain. La conservation de cette séquence est très importante puisqu'une seule mutation ou délétion peut rendre le *GHRHR* non fonctionnel. Un *GHRHR* non fonctionnel a démontré être responsable de plusieurs formes de tumeurs neuroendocrines, de retard important dans la croissance postnatale et plus tard durant la puberté et de troubles dans la régulation de la croissance comme le nanisme (18, 19). Lors d'une étude menée sur des patients atteints de nanisme, il a été observé que ceux présentant une mutation nonsense du gène *GHRHR* présentaient des signes d'hypoplasie de l'hypophyse antérieure ainsi que des malformations au niveau des cellules somatotropes. (20, 21). Chez des souris dont le *GHRHR* était dysfonctionnel, un échec du développement normal des cellules somatotropes a été rapporté (22).

Le *GHRHR* exerce donc un rôle important au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Ce récepteur est nécessaire au développement et à la prolifération normale des cellules somatotropes ainsi qu'à la sécrétion et synthèse du GH (23).

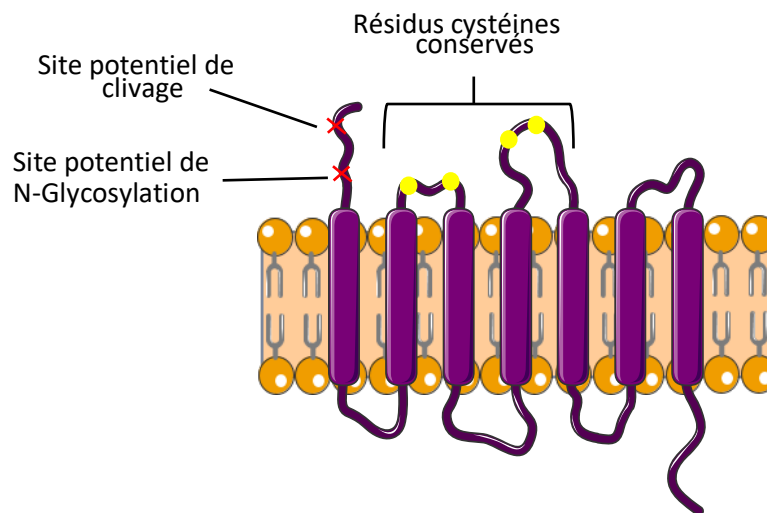


Figure 2. Structure du *GHRHR* chez le rat

Figure générée avec les illustrations du Servier Medical Art de Servier (11).

#### 1.1.3.2. Ligand du *GHRHR*

Le ligand naturel endogène du *GHRHR* est le facteur de libération de l'hormone de croissance (*GHRH*). Cette hormone peptidique est synthétisée principalement par les neurones du noyau arqué au niveau de l'hypothalamus (24). Le *GHRH* est par la suite sécrété dans le système porte hypothalamo-hypophysaire et active le *GHRHR* des somatotropes (Figure 1) (25). Cette activation permet la régulation de la synthèse et de la sécrétion du GH dans l'organisme et le contrôle de la prolifération des somatotropes (26, 27). La synthèse *de novo* du *GHRH* est stimulée par les glucocorticoïdes, les hormones sexuelles, la triiodothyronine (T3) et le *GH-releasing peptide*. Au contraire, son expression est inhibée par la *GHRH*, la somatostatine, le GH et le facteur de croissance analogue à l'insuline, de type 1 (*IGF-1*). De plus, l'*IGF-1* agit comme une rétroaction négative sur la production de GHRH dans le système endocrinien.

#### 1.1.4. Mécanisme d'activation et voies de signalisation du *GHRHR*

La liaison du *GHRH* à son récepteur provoque un changement conformationnel des sous-unités de la protéine G qui active la voie de synthèse du GH et sa sécrétion dans la circulation sanguine (Figure 3). L'activation des récepteurs du GH au niveau du foie permet la sécrétion d'*IGF-1* dans la circulation afin d'agir sur différents organes cibles tels que les muscles et le tissu adipeux. Une fois sécrété, les rôles du *IGF-1* sont liés à la régulation du GH, à la croissance durant l'enfance et aux effets anaboliques chez l'adulte (28).

Voie de signalisation de la synthèse et sécrétion du GH

La voie de signalisation du GH débute avec la sous-unité alpha du complexe de la protéine Gs ( $G_s\alpha$ ) qui se dissocie des sous-unités bêta et gamma après le changement de la guanosine diphosphate (GDP) à sa forme active la guanosine triphosphate (GTP) qui y est attachée. La  $G_s\alpha$  stimule l'AC, une enzyme qui mène à l'augmentation des niveaux intracellulaires d'AMPc avec l'aide de l'adénosine triphosphate (ATP). Par la suite, l'AMPc, un second messenger important dans plusieurs processus biologiques, mène à un événement majeur à l'intérieur de la cellule somatotrope (29). En effet, la stimulation de la protéine kinase A (PKA) et la phosphorylation du facteur de transcription *cAMP response element binding protein* (*CREB*) au niveau nucléaire permet la synthèse *de novo* du GH par la transcription du gène *GH1* (non illustré) et du gène

*pituitary-specific positive factor 1 (Pit-1)*. *Pit-1*, en combinaison avec ses cofacteurs plus ou moins connus, permet la transcription du gène *GH* et du gène *GHRHR* et de la restauration du récepteur à la surface cellulaire (12, 15). Un évènement mineur causé par l'AMPC serait l'ouverture d'un canal calcique permettant l'entrée de calcium dans la cellule. Cette action favoriserait la margination des vésicules de *GH* à la membrane cytoplasmique des cellules somatotropes et leur exocytose (15) (Figure 3).

Par ailleurs, les sous-unités bêta et gamma de la protéine G sont activées également grâce au changement de conformation du *GHRHR*. Elles provoquent l'activation du phospholipase C (PLC), un enzyme qui, à l'aide de la phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>), un phospholipide de la membrane cellulaire, provoque la production du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). L'IP<sub>3</sub> provoque un relargage du calcium intracellulaire emmagasiné dans le réticulum endoplasmique.

Ensemble, le PIP<sub>2</sub> et l'AMPC amènent l'ouverture des canaux sodiques à la surface de la membrane cytoplasmique. Une dépolarisation s'en suit et permet l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée de calcium extracellulaire (30). Grâce aux sous-unités bêta et gamma activées, ces deux évènements simultanés favorisent grandement la sécrétion de GH qui est emmagasinée à l'intérieur de vésicules du cytosol (6).

Comme la majorité des *GPCRs*, le niveau d'expression du *GHRHR* à la surface des somatotropes est régulé à la baisse après son activation. Une stimulation excessive du récepteur par son ligand peut provoquer une désensibilisation du récepteur. Le récepteur se détache par une cascade de signalisation qui provoque la phosphorylation du récepteur par des kinases spécifiques. Le recrutement de protéines comme les arrestines conduit à l'internalisation du récepteur (12, 14).

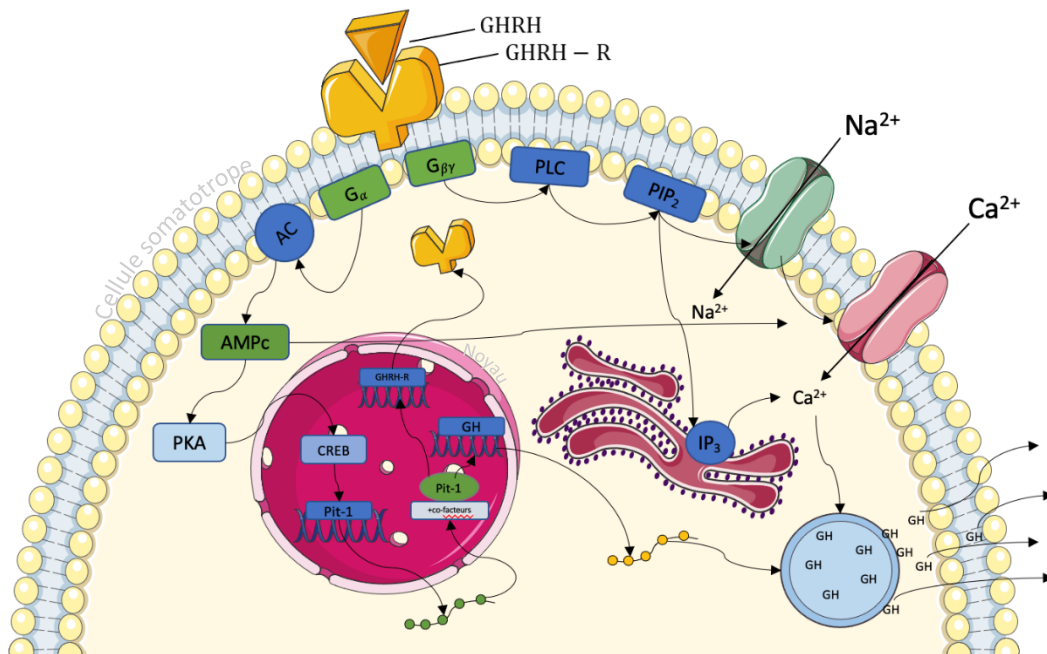


Figure 3. Voies de signalisation cellulaire impliquées dans la sécrétion du GH suite à la liaison du GHRH au GHRHR dans les somatotropes

Figure générée avec les illustrations de Servier Medical Art de Servier (11).

### 1.1.5. *GHRHR* : Expression génique et régulation

#### 1.1.5.1. Expression génique

Le gène du *GHRHR* humain a été localisé sur le chromosome 7p14 (31) et le chromosome 7p15 par hybridation in situ (32). La caractérisation de la séquence génomique humaine a relevé la présence de 13 exons sur une longueur d'environ 15 kilobases (15). Chez le rat, la séquence génomique démontre la présence de 14 exons sur une longueur de 15 kilobases sur le chromosome 4q24. C'est une organisation qui est très complexe à travers les récepteurs de la famille B des GPCR (33).

Les niveaux d'ARNm du *GHRHR* hypophysaire changent en fonction du stade de développement embryonnaire. Chez la souris et le rat, la première expression du *GHRHR* se produit au 16<sup>e</sup> et au 18<sup>e</sup> jour embryonnaire, respectivement, pour se stabiliser au niveau d'expression génique adulte



au 30<sup>e</sup> jour après la naissance. Chez le rat nouveau-né, les niveaux d'ARNm du *GHRHR* sont relativement élevés, alors que chez les rats âgés (18 mois), les niveaux sont nettement diminués (15, 34). Cette baisse d'expression est corrélée avec la diminution de réponse en GH suite à une stimulation par le GHRH (6).

Durant l'organogénèse de l'hypophyse antérieure, plusieurs facteurs de transcriptions sont requis pour assurer son développement et l'expression de certaines hormones. Le gène *PROP paired-like homeobox 1 (PROP1)* est le facteur de transcription préalable à l'expression de *Pit-1*, un gène membre de la famille des POU (*Pit-1, Oct-1 et Unc-1*) (35). Leur action combinée permet le développement d'une hypophyse antérieure normale et fonctionnelle, avec la formation de types cellulaires spécialisés, dont les cellules somatotropes, qui expriment le *GHRHR*. Des mutations géniques dans ces deux facteurs ont été associées à des effets délétères au niveau de la différenciation cellulaire menant à des déficiences hormonales (36). Le bon fonctionnement de ce gène permet une expression normale des gènes du *GHRHR* et du *GH*, une saturation du récepteur à la membrane cytoplasmique des somatotropes et une synthèse de novo de *GH* (15).

#### 1.1.5.2. Mécanismes de régulation du *GHRHR*

Chez le rat et l'humain, en plus du facteur de transcription *Pit-1*, la régulation des niveaux d'ARNm du *GHRHR* est affectée par trois types hormones : les hormones glucocorticoïdes, les hormones sexuelles et les hormones thyroïdiennes. Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes qui sont vastement utilisées dans le traitement de l'inflammation, de maladies auto-immunes et de cancers (16). Les hormones glucocorticoïdes sont connues pour réguler à la baisse l'expression du *GHRHR* hypophysaire. Dans le développement de l'hypophyse antérieure, elles stimulent la différenciation cellulaire et leur absence a été reliée à des retards de maturation de l'hypophyse (37).

Il existe toutefois des données contradictoires à ce sujet. En effet, une étude a rapporté qu'une stimulation à la dexaméthasone, un glucocorticoïde de synthèse, augmente significativement l'expression du *GHRHR* (38). De plus, d'autres études ont aussi mis en évidence que la présence de glucocorticoïdes aurait des effets positifs sur l'affinité de liaison du GHRH et sur l'expression génique du *GHRHR* (39).

Chez les mammifères, le dimorphisme sexuel est une caractéristique principale que l'on retrouve au niveau de la régulation de la sécrétion de *GH* (15). Chez le rat mâle, les pics de sécrétion du *GH* sont de plus grande amplitude que chez la femelle. De plus, le rat mâle possède des niveaux basaux de *GH* plus faible et des sécrétions de *GH* beaucoup moins fréquents que la femme (40). Cette différence s'explique par les effets répressifs de l'estrogène. On peut observer le même effet chez les rats mâles dont les hormones androgènes ont été réprimées (41).

Dans le cas des hormones thyroïdiennes, l'hypothyroïdie diminue l'expression du gène du *GHRHR* et la sécrétion de *GH* (42). Korytko et Cuttler ont mis en évidence que la présence de T3 dans des cultures de cellules d'hypophyse antérieure de rat mène à une nette augmentation des niveaux d'ARNm du *GHRHR* (43).

## **1.2. Le rein**

Le système urinaire des mammifères remplit deux fonctions importantes : il maintient l'équilibre hydroélectrolytique de l'organisme et élimine les déchets. Il se compose du rein et des voies excrétrices, à savoir l'uretère, la vessie et l'urètre. Le rein joue un rôle crucial dans la production d'urine en filtrant le sang et en éliminant les déchets métaboliques et les toxines. De plus, il est le site de production de l'érythropoïétine, une hormone qui régule la production de globules rouges. Le rein est également responsable de la synthèse des hormones du système rénine-angiotensine ainsi que la forme active de la vitamine D3 (44).

### **1.2.1. Organisation et fonctions générales**

Le rein peut être divisé en deux zones : la zone corticale et la zone médullaire. Cette dernière contient la bande externe de la médulla externe (BEME), la bande interne de la médulla externe (BIME) et la médulla interne (MI). L'ensemble des zones médullaires forme la pyramide de Malpighi dont la base est orientée vers la zone corticale (45). Certains mammifères comme les rongeurs ne possèdent qu'une seule pyramide de Malpighi par rein alors que l'humain en possède de 6 à 9 par rein. Chaque pyramide est séparée par les colonnes de Bertin qui sont une extension de la zone corticale (46, 47).

Le rein possède des unités fonctionnelles composées de tubules et de glomérules, à savoir le néphron (45) (Figure 4). Le néphron est la partie filtrante où se déroulent les étapes de la formation de l'urine en trois différents mécanismes : la filtration, la réabsorption et la sécrétion. Ces mécanismes permettent au néphron de réguler le volume et la composition de l'urine. Deux types de néphrons existent : le néphron *juxtamédullaire* et le néphron *cortical*. Ils se distinguent par deux éléments. Premièrement, le néphron cortical est de plus petite longueur en s'arrêtant à la bordure de la BIME et de la MI. Deuxièmement, le néphron cortical ne possède pas la branche ascendante mince de l'anse de Henlé (Figure 4) (48).

Chaque néphron est composé d'un corpuscule rénal et d'un système tubulaire. Le corpuscule rénal est responsable de filtrer le sang et produire l'urine primitive. Le système tubulaire est une suite de tubules ayant des fonctions de transport et des structures histologiques distinctes réparties à travers les différentes régions du rein et qui conduit l'urine du corpuscule rénal au tube collecteur (49).

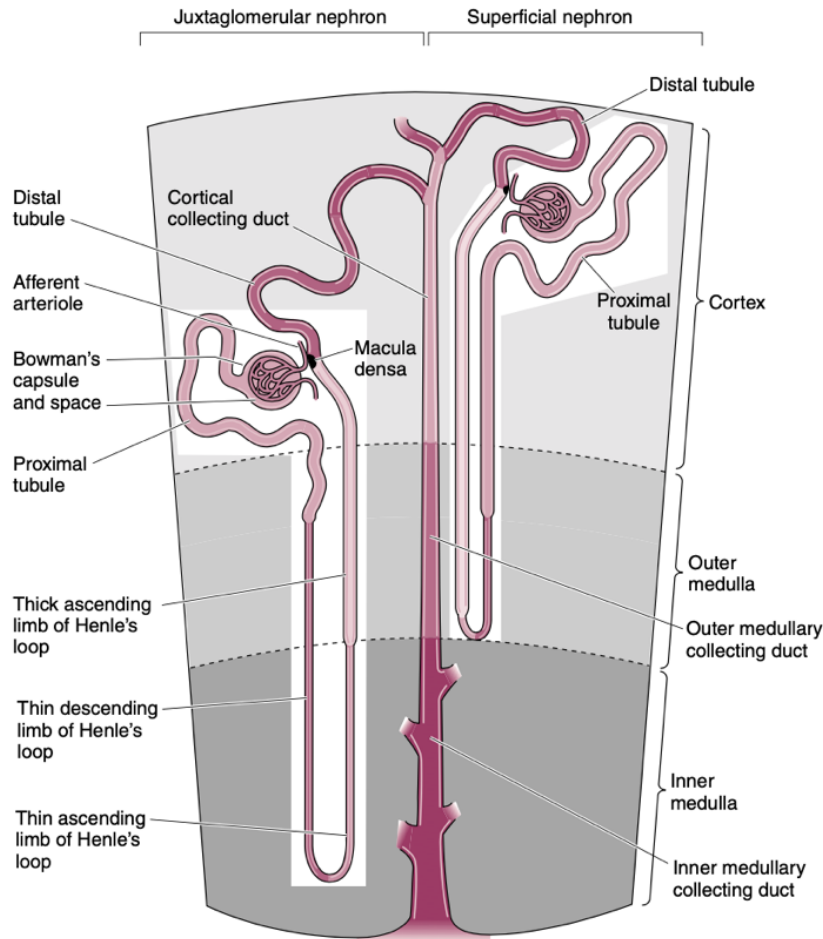


Figure 4. Représentation schématique du néphron juxtamédullaire (gauche) et du néphron cortical (droite)

Adaptée de Kriz, W., American Journal of Physiology-Regulatory, 1981 (50).

## 1.2.2. Corpuscule rénal

Le corpuscule rénal possède la particularité d'être exclusivement dans la zone corticale du rein. Il possède une forme sphérique où deux structures importantes sont retrouvées : le glomérule et la capsule de Bowman.

### 1.2.2.1. Glomérules – morphologie et fonctions

Les glomérules sont essentiellement constitués d'une agglomération de capillaires sanguins, entourés d'une capsule fibreuse, la capsule de Bowman (51). Les glomérules sont responsables de filtrer l'entièreté du volume sanguin et de produire un plasma sanguin, l'ultrafiltrat, qui est

l'urine primitive. La fenestration des capillaires sanguins et la charge électrique négative de ces derniers, à la membrane basale, permettent de produire une urine primitive qui est dépourvue de molécules excédant 90 kDa ou chargées négativement (52, 53). La composition de ce liquide change avec sa progression dans le néphron jusqu'au tube collecteur. Le débit de filtration du volume sanguin dans les glomérules est un paramètre très important. C'est un point d'évaluation pour déterminer l'état d'activité de l'organe. Toute dysfonction dans les glomérules peut se manifester par la présence de protéines ou de sang dans l'urine (44).

#### 1.2.2.2. Capsule de Bowman – morphologie et fonctions

Chaque glomérule est entouré de deux feuillets d'épithélium qui forme un sac nommé la capsule de Bowman. L'ultrafiltrat produit par les glomérules est recueilli à l'intérieur de la capsule de Bowman pour être acheminé dans le système tubulaire qui débute par le tubule contourné proximal. Entre le glomérule et la capsule de Bowman, il y a les podocytes, qui influencent et supportent la filtration glomérulaire en agissant comme des couches supplémentaires de filtration dans la production de l'urine primitive, et les cellules mésangiales qui contrôlent la contraction des capillaires glomérulaires. L'ultrafiltrat sortant du corpuscule rénal est directement déversé dans le premier tubule du système tubulaire : le tubule contourné proximal (Figure 5) (52).

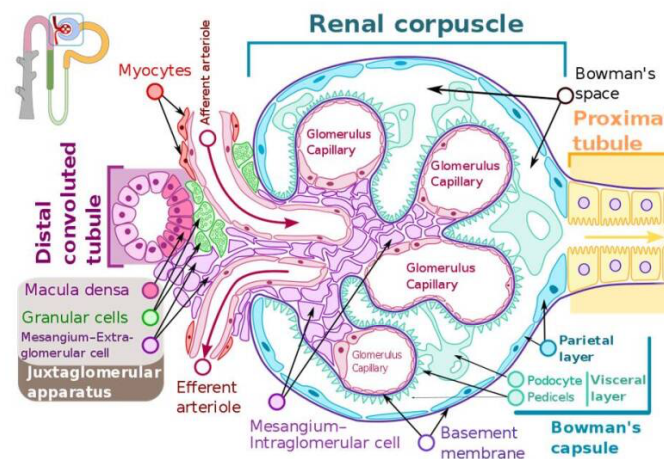


Figure 5. Structure schématique d'un glomérule

Figure adaptée de Murray et collab. StatPearls, 2022 (54).

### 1.2.3. Système tubulaire

Les cellules épithéliales des tubules sont interconnectées à l'aide de jonctions serrées l'une à l'autre pour former un cercle. Cet arrangement permet de séparer le fluide tubulaire qui est du côté de la membrane apicale, du milieu interstitiel qui communique avec la circulation sanguine du côté de la membrane basolatérale. Cet agencement implique que les solutés et macromolécules qui participent à la réabsorption peuvent seulement traverser l'épithélium de deux façons, soit la voie paracellulaire ou transcellulaire (55).

La voie paracellulaire implique le passage de solutés et macromolécules à travers l'espace intercellulaire. Induit par un gradient électrochimique. En revanche, la voie transcellulaire nécessite le passage de solutés et macromolécules à travers le cytoplasme des cellules épithéliales des tubules. Ce processus se produit contre le gradient électrochimique et requiert de l'énergie ainsi que la présence de co-transporteurs, échangeurs, canaux ioniques et enzyme situés à la fois du côté apical et basolatérale des cellules épithéliales (51). Par exemple, la pompe sodium-potassium-ATPase (Na-K-ATPase), présent à la membrane basolatérale du tubule proximal, est connu pour fournir une force motrice à tout mouvement provenant d'un couple sodium-soluté (e.g. : sodium-glucose) (56). Toute mutation menant à son dysfonctionnement contribue à l'expression de plusieurs pathologies, dont la maladie rénale chronique (57).

#### 1.2.3.1. Tubule proximal contourné et droit

Le tubule proximal est le segment du néphron qui débute à l'extrémité du corpuscule rénal et se termine à la transition vers la branche descendante mince de l'anse de Henlé. Il se divise en trois segments, S1, S2 et S3. Les segments S1 et S2 font partie du tubule proximal contourné (TPC) dans la zone corticale et le segment S3 fait partie du tubule proximal droit (TPD) dans la BEME (58). Ces segments se distinguent des autres tubules du néphron par son épithélium, à la membrane apicale, qui possède une microvillosité importante permettant d'augmenter significativement les surfaces de réabsorption de l'ultrafiltrat glomérulaire dans la lumière du tubule (59, 60).

En général, le TPC est très riche en mitochondries et nécessite une demande énergétique nettement supérieure au segment du TPD (61). Ce phénomène peut s'expliquer par deux facteurs. Premièrement, permettre une endocytose qui peut être nécessaire pour récupérer les protéines

filtrées dans la production de l'urine primitive. Cette action nécessite un mécanisme d'acidification contrôlé par le co-transporteur sodium-hydrogène-3 (*NHE3*). Deuxièmement, fournir l'énergie nécessaire à la pompe Na-K-ATPase puisqu'environ 70% de la réabsorption du sodium se fait au niveau du TPC (62). En situation de stress oxydant élevé, le segment S3 donne l'impression d'être le plus susceptible à subir des dommages irréversibles contrairement au segment S1, qui semble avoir la capacité de se protéger du stress oxydant. En effet, il a été rapporté que le segment S1 possède des capteurs qui modulent la réponse ou la sensibilité des segments S2 et S3 à l'insulte oxydante (63).

Le TPC et le TPD réabsorbent une fraction majeure d'eau et de solutés provenant du fluide tubulaire, sécrètent des composés organiques et inorganiques dans la lumière du tubule et récupèrent des petites protéines et hormones peptidiques par endocytose. Ces processus permettent au néphron de réguler le volume et la composition de l'urine. L'eau est réabsorbée grâce à l'aquaporine-1 (AQP-1), un canal hydrique situé dans la membrane apicale et basolatérale des cellules épithéliales du TPC et du TPD. L'eau peut aussi être réabsorbée par la voie paracellulaire entre les jonctions serrées des cellules épithéliales du TPC, attribuable au gradient de concentration créé par la réabsorption du sodium (55). La majorité du sodium est réabsorbée dans les premiers segments du tubule proximal, au niveau du TPC, par un mécanisme de cotransport. Ce dernier doit être maintenu par un apport en énergie, puisque la réabsorption se fait à contre-courant du gradient électrochimique. La pompe Na-K-ATPase, à la membrane basolatérale du TPC, assure ce rôle en permettant au sodium de sortir de la cellule et gagner la circulation sanguine. Les solutés comme le glucose et les acides aminés sont réabsorbés grâce aux co-transporteurs liés au sodium à la surface apicale. L'entrée «forcée» du sodium par la pompe Na-K-ATPase permet aux solutés d'entrer dans les cellules du TPC et gagner la circulation sanguine par diffusion facilitée (64). Le potassium et l'urée sont principalement réabsorbés du fluide tubulaire par voie paracellulaire avec l'eau au niveau du TPC (55).

Dans le premier segment du tubule proximal, le TPC, une réabsorption importante de sodium et de chlore, par la voie paracellulaire, et une sécrétion importante de protons dans le fluide tubulaire sont observés (51, 65). La réabsorption de sodium joue un rôle important comme indicateur de volume plasmatique et de pression sanguine qui sont des déterminants

physiologiques critiques(66). La sécrétion de proton permet de réguler le pH du fluide tubulaire, une propriété importante utilisée en clinique (67).

#### 1.2.3.2. Branche descendante mince de l'anse de Henlé

La branche descendante mince de l'anse de Henlé (*tDL*) est le segment du néphron qui débute à la fin du TPD à la bordure de la BEME et de la BIME. Elle s'arrête à la boucle de l'anse de Henlé dans la MI pour le néphron juxtamédullaire et à la bordure de la BIME et de la MI pour le néphron cortical.

La *tDL* possède différents types d'épithéliums dans le néphron juxtamédullaire et cortical, type 1, 2 et 3. Le type 1 représente l'entièreté de la *tDL* dans le néphron cortical (50, 68). Avec une organisation très simple et uniforme, la membrane apicale possède de très petites microvillosités et des desmosomes qui sont des jonctions intercellulaires qui assurent une bonne adhésion entre les cellules. Ce segment du néphron cortical exprime l'AQP-1 et le transporteur de l'urée, *UT-A2*. // est donc perméable à l'eau et à l'urée (61).

La *tDL* du néphron juxtamédullaire est composée de cellules de type 2 pour la portion du tubule dans la BIME et les cellules de type 3 pour la portion du tubule dans la MI. Comparativement à la *tDL* du néphron cortical, l'adhésion intercellulaire est beaucoup plus faible, ce qui donne priorité au mouvement des solutés par la voie paracellulaire. Au niveau de ses fonctions, la *tDL* du néphron juxtamédullaire possède des cellules épithéliales beaucoup plus épaisses que celles retrouvées dans la *tDL* du néphron cortical. Ceci est dû à la présence de l'AQP-1 et de la pompe Na-K-ATPase au niveau de la membrane basolatérale (69).

#### 1.2.3.3. Branche ascendante mince de l'anse de Henlé

La branche ascendante mince de l'anse de Henlé (*tAL*) est uniquement présente au niveau des néphrons juxtamédullaires. Cette portion commence avant la courbure de l'anse de Henlé dans l'entièreté de la MI jusqu'à la bordure de la MI et de la BIME (47). La *tAL* est composée de cellules de type 3 et de type 4. L'épithélium de type 4 possède une forme entrelacée et les cellules sont réunies entre elles par des jonctions serrées avec une adhésion relativement faible. Cette organisation permet le mouvement des solutés par la voie paracellulaire et par diffusion passive, conférant une perméabilité ionique élevée (61). La transition entre le type 3 et 4 est caractérisée



par la disparition de l'expression du transporteur de l'urée et de l'AQP-1 et celle du canal chlore *CIC-K1* (rat) ou *CIC-Ka* (homme). Ainsi, la *tAL* est complètement imperméable à l'urée et à l'eau, mais perméable aux ions chlorure et sodium (70).

#### 1.2.3.4. Branche ascendante épaisse de l'anse de Henlé

La branche ascendante épaisse de l'anse de Henlé (*TAL*) est le segment du système tubulaire qui débute à la bordure de la MI et de la BIME pour le néphron juxtamédullaire et à la bordure de la BIME et de la BEME pour le néphron cortical. Ce tubule s'étend jusqu'au cortex rénal et s'arrête au niveau de son glomérule.

La réabsorption du chlore et du sodium dans la *TAL* est importante dans le mécanisme de concentration de l'urine (71). Grâce au transporteur Na-K-2Cl (*NKCC2*), qui est exclusivement exprimé du côté apical des cellules du *TAL*, l'entrée de sodium et de chlore dans la cellule est possible. Cette action est supportée par l'activité de la pompe Na-K-ATPase qui fournit l'énergie nécessaire pour maintenir le gradient (72). La présence de canaux potassiques apicaux (*renal outer medullary K+ (ROMK)*) à la surface des cellules du *TAL* permet d'éviter l'accumulation du potassium intracellulaire. Dans le milieu intracellulaire, le chlore gagne le milieu interstitiel grâce aux canaux chlore *CIC-Ka* et *CIC-Kb* à la membrane basolatérale (73). Les cellules du *TAL* sont aussi responsables de l'expression de la protéine Tamm-Horsfall (*THP*), qui est la protéine urinaire la plus abondante dans le rein des mammifères. Exprimée au niveau de la membrane apicale, sa fonction n'est pas encore complètement connue, cependant elle est responsable de la création de sédiments dans l'urine (71).

Le *TAL* se divise en deux segments, le *TAL* de la zone corticale (*cTAL*) et celle de la zone médullaire (*mTAL*). Leurs différences se situent tant au niveau de leur morphologie que de leurs fonctions. En effet, la *mTAL* débute dans la BIME et contribue à la concentration de l'urine alors que la *cTAL* participe plutôt à la dilution de l'urine. Ces deux fonctions qui semblent opposées résultent de leur différent environnement. La structure de l'anse de Henlé fait en sorte que les branches descendante et ascendante (*tDL* et *mTAL*) sont à proximité l'une de l'autre et provoque le mécanisme de multiplication à contre-courant (71). La *mTAL* réabsorbe du sodium qui augmente l'osmolarité du milieu interstitiel. Ce phénomène provoque une réaction immédiate de la *tDL* qui

réabsorbe de l'eau pour équilibrer l'osmolarité. L'action de la *tDL* augmente l'osmolarité du fluide tubulaire. Ce fluide se déplace vers la *mTAL* pour redémarrer le même phénomène de multiplication à contre-courant qui contribue à la concentration de l'urine et au maintien d'une osmolarité élevée dans l'espace interstitiel de la *mTAL* et de la *tDL* (74). Ce mécanisme met en évidence le fait que la *mTAL* nécessite une activité Na-K-ATPase nettement supérieure à celle de la *cTAL*. Dans la *cTAL*, la dilution du fluide tubulaire est beaucoup plus efficace puisqu'il s'avère plus facile de créer une différence de concentration entre le milieu interstitiel et le fluide tubulaire (50). Avec la progression du *TAL* de la médulla au cortex, on observe une réduction de l'épaisseur des cellules, une organisation de plus en plus entrelacée des cellules et une augmentation des microvillosités à la surface apicale. L'épithélium des cellules de la *cTAL* est organisé selon un mode entrelacé avec des jonctions serrées superficielles, permettant un transport paracellulaire facilité des ions calcium et magnésium. Même si ce transport se produit à une plus petite fréquence dans le *mTAL* comparativement au *cTAL*, la réabsorption des ions ammonium et bicarbonate se fait exclusivement au niveau de la *mTAL* (47).

#### 1.2.3.5. Tubule contourné distal

Au niveau de la transition entre le *TAL* et le tubule contourné distal (TCD), il se produit une augmentation de l'épaisseur des cellules épithéliales et le remplacement du co-transporteur *NKCC2* par le co-transporteur d'ions chlorure et sodium (*NCC*). Ce mouvement transcellulaire d'ions est supporté par une activité Na-K-ATPase. La densité de mitochondries dans les cellules du TCD est la plus élevée à travers tous les tubules (75, 76). La réabsorption du magnésium par mouvement transcellulaire est possible grâce à la présence du *transient receptor potential cation channel subfamily M member 6 (TRPM6)* à la membrane apicale et par le mouvement paracellulaire avec la claudine 16, une des protéines contribuant à la formation des jonctions serrées (77). Toute perte de fonction associée à une mutation génique qui empêche le transport et la réabsorption normale des ions chlorure et sodium est associée au phénotype du syndrome de Gordon, une affection caractérisée par de l'hypertension dès l'enfance, d'une hyperkaliémie à la naissance et d'une acidose métabolique (78, 79). Le TCD est suivi du tubule collecteur qui possède une morphologie très homologue au segment précédent et agit comme le point initial

du tubule collecteur cortical (TCC). Les seules différences avec le TCD sont l'expression d'un canal sodique, d'un canal calcique et la cessation de l'expression du co-transporteur *NCC* (61).

#### 1.2.3.5. Tubule collecteur

Le tubule collecteur peut se diviser en trois segments, le TCC, le tubule collecteur de la médulla externe (TCME) et le tubule collecteur de la médulla interne (TCMI). L'organisation cellulaire de chaque segment contient des cellules principales (75%) qui sont segment-spécifique et des cellules intercalées (25%) (80). Les cellules principales du TCC permettent la sécrétion du potassium et la réabsorption du sodium. Les cellules intercalaires, type A et type B, sont responsables de la sécrétion de protons et de bicarbonates, respectivement. Les cellules principales du TCME, spécifiquement dans la BEME, réabsorbent le sodium et sécrètent le potassium. Seules les cellules de type A, responsables de la sécrétion de protons, s'y retrouvent aussi. Le TCME, spécifiquement dans la BIME, ne possède que des cellules intercalaires de type A qui sécrètent des protons dans le fluide tubulaire (81).

Le TCMI se divise en deux régions, la portion initiale et la portion terminale. La première est composée de cellules principales et de cellules intercalaires de type A. Elle est responsable de l'acidification de l'urine par la sécrétion de protons dans le fluide tubulaire. La portion terminale n'est composée que de cellules principales qui réabsorbent le sodium et le potassium (82).

#### **1.2.4. Différence entre la zone corticale et médullaire**

Le système tubulaire et ses interactions constantes avec la circulation sanguine comme source d'énergie sont responsables du phénomène de shunt artérioveineux. Ce mécanisme permet à l'oxygène de contourner sa progression dans les capillaires sanguins et d'interagir avec les co-transporteurs à la surface basolatérale des cellules épithéliales du système tubulaire (44, 49). Les conséquences de ce mécanisme se voient sur les niveaux d'extraction d'oxygène à partir des capillaires. En effet, même si le rein reçoit une quantité importante d'oxygène, 20-25% du débit cardiaque, le rein n'en extrait que 10-15% comparativement à la majorité des organes qui en extrait environ 45% (83).

Ce mécanisme conduit à un appauvrissement progressif en oxygène dans les capillaires qui débute dans le cortex rénal jusqu'à la pointe de la MI. Avec des demandes en oxygène très élevées et un apport relativement faible, cet équilibre fait en sorte que le rein est constamment au bord de l'hypoxie (72). Cette situation est nécessaire dans la MI pour le maintien du gradient osmotique qui permet une concentration d'urine optimale. À l'inverse, les tubules dans la médulla externe, qui sont de grands consommateurs d'oxygène, souffrent de cette situation. Ainsi, en conditions délétères comme l'IR, les tubules de la médulla externe deviendront à risque. De plus, comme il est souvent rapporté que même avec le retour de la circulation sanguine, nous pouvons tout de même observer que la médulla rénale souffre d'une hypoperfusion prolongée causée par les dommages causés par l'IR comme l'obstruction et la nécrose des tubules (84, 85). L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'augmentation de stress oxydant suite à l'IR cause des effets hétérogènes dans les différentes régions du rein, mais qui sont d'avantage délétères dans la médulla rénale (86).

### **1.3. Le *GHRHR* rénal**

#### **1.3.1. Localisation et structure du *GHRHR* rénal**

Comme mentionné précédemment, les résultats des études de distribution du *GHRHR* dans le rein suggèrent qu'il y aurait un niveau d'ARNm du *GHRHR* appréciable au niveau de la médulla rénale (17). Son expression dans le système tubulaire semble restreinte à la branche ascendante mince et épaisse de l'anse de Henlé. Des études de séquençage ont permis de constater que le *GHRHR* rénal et le *GHRHR* hypophysaire comportent certaines différences structurales, dont la partie N-terminale du récepteur qui est tronquée de 23 et 52 acides aminés chez l'humain et le rat, respectivement en comparaison au récepteur hypophysaire (79). De plus, les tubules exprimant le *GHRHR* rénal n'expriment ni le récepteur du *GH*, ni l'*IGF* suggérant que les effets biologiques résultants de l'activation du *GHRHR* rénal sont dus à l'interaction du ligand avec le *GHRHR* et non pas à la sécrétion rénale de *GH*. Finalement, en plus d'exprimer le *GHRHR*, les cellules rénales expriment le *GHRH* (87).

### 1.3.2. Rôle du *GHRHR* rénal

Des évidences suggèrent que les niveaux d'ARNm du *GHRHR* rénal sont régulés en contexte physiopathologique. En effet, lorsque des rats jeunes et sains sont soumis à une diète riche en NaCl provoquant un stress oxydant, une régulation de l'expression du *GHRHR* rénal se produit en fonction de la durée de la diète (87). Un apport élevé en sel est connu pour causer une augmentation de production des espèces réactives de l'oxygène, comme les anions superoxydes, conduisant à l'apoptose et à la nécrose cellulaire (88). Après 48 h de diète, le niveau d'expression d'ARNm du *GHRHR* rénal diminue de façon significative dans la médulla rénale. Par contre, après 7 jours, le niveau d'ARNm du *GHRHR* augmente de façon progressive jusqu'au niveau initial, suggérant un rôle biologique potentiel du *GHRHR* rénal(87). Une administration sous-cutanée de *GHRH* quotidiennement durant la diète riche en NaCl cause une augmentation de la réparation de l'ADN au niveau mitochondrial suggérant une diminution d'apoptose (79). Ainsi, la stimulation, l'activation et la régulation de l'expression du *GHRHR* rénal pourraient avoir un rôle dans le maintien des fonctions rénales en situation de stress oxydant médullaire (10).

Un rôle potentiel pourrait donc être proposé pour le *GHRHR* suite à son activation dans la médulla rénale de rat autre que la sécrétion du GH tel que donné au niveau de l'hypophyse. En effet, d'après la littérature, malgré la présence des récepteurs du GH et de l'IGF dans le rein, il n'y a aucun signe de l'expression du GH. Par conséquent, les effets physiologiques qui se produisent suite à l'activation de la *GHRHR* rénale ne peuvent donc pas être attribués à une élévation de la sécrétion rénale du GH (89, 90). Par contre, il est important de mentionner que l'expression des récepteurs du GH et de l'IGF possède aussi des rôles importants dans le rein. Des études ont démontré que la signalisation du GH par son récepteur favorise la réabsorption rénale du sodium et augmente le débit sanguin rénal. La stimulation de récepteur de l'IGF a des effets bénéfiques sur les cellules rénales, car elle stimule leur croissance, leur survie et leur différenciation, des fonctions qui sont essentielles pour maintenir l'intégrité structurelle et fonctionnelle du rein (91). De plus, cette activation peut augmenter l'expression d'enzyme antioxydante dans le rein, offrant ainsi une protection contre les lésions rénales causées par le stress oxydatif (92, 93).

## **8. HYPOTHÈSES & OBJECTIFS**

## Hypothèses

Hypothèse 1: Dans le rein de rat, la localisation et le niveau de *GHRHR* devraient être similaires aux résultats déjà obtenus au niveau de l'ARNm dans les cellules de la médulla rénale, plus spécifiquement dans les cellules d'anse de Henlé ascendante épaisse et mince, et en quantité plus importante dans la médulla, comparativement au cortex.

Hypothèse 2: Dans le rein de rat, les niveaux de *GHRHR* devraient être régulés à la baisse dans des conditions délétères, causant une augmentation de stress oxydant, tel que IR chaude. Ces résultats pourraient être similaires à ceux obtenus chez des rats soumis à une diète riche en sel durant 48 h, où les niveaux d'ARNm du *GHRHR* sont significativement diminués. Les mécanismes cellulaires sous-jacents devraient impliquer les processus liés aux dommages oxydatifs et à la régulation de l'apoptose.

Hypothèse 3: Dans le rein humain, des évidences préliminaires montrent que les niveaux d'ARNm du *GHRHR* sont similaires dans la médulla et le cortex. La même tendance devrait donc être retrouvée au niveau du *GHRHR*.

Hypothèse 4: Dans la littérature, il est possible de cibler des mécanismes et des biomarqueurs qui démontrent de manière spécifique l'impact de l'IR rénal au niveau de la zone médullaire et des différents segments du néphron qui y sont situés spécifiquement.

## Objectifs

Objectif 1: Réaliser la première étude de localisation et de quantification du *GHRHR*, par immunofluorescence, dans les différentes régions et populations cellulaires rénales, chez le rat jeune en bonne santé et post-IR chaude, une condition qui mime en partie la situation physiopathologique qui prévaut lors d'une transplantation rénale, chez l'homme. Cet objectif inclut également la localisation et la quantification de marqueurs liés au dommage oxydatif inhérentes à l'IR dans le but d'établir une relation entre l'expression du *GHRHR* et de biomarqueurs de lésions rénales. Les résultats de ce premier objectif sont regroupés dans le premier article du mémoire (Chapitre 9) et répondent aux hypothèses 1 et 2.

Objectif 2 : Réaliser une première étude, par immunofluorescence, de localisation et de quantification des populations cellulaires rénales exprimant le *GHRHR* dans le tissu (i.e. cortex rénal et médulla rénale) humain post-mortem dans le but d'utiliser cette approche dans de futures conditions de greffe rénale. Les résultats de ce deuxième objectif sont regroupés dans le deuxième article du mémoire (Chapitre 10) et répondent à l'hypothèse 3.

Objectif 3 : Évaluer l'état des connaissances et la compréhension actuels de la relation qui existe entre les mécanismes cellulaires de l'IR dans la médulla rénale et la régulation de biomarqueurs connus dans des modèles animaux et chez l'humain. Cette revue de littérature est présentée dans le troisième article du mémoire (Chapitre 11) et répond à l'hypothèse 4.



## **9. ARTICLE I : ÉTUDE ANIMALE**

STATUT DE PUBLICATION : Soumission prochaine à la revue *Frontiers in Physiology*

**IMMUNOLOCALIZATION AND QUANTIFICATION OF THE RENAL GROWTH HORMONE-  
RELEASING HORMONE RECEPTOR IN THE RAT: EFFECT OF WARM ISCHEMIA-REPERFUSION  
INJURY**

**Tracy Nami<sup>1</sup> and Pierrette Gaudreau<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Centre and department of medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

\* **Correspondance:** Pierrette Gaudreau PhD, FCAHS, pierrette.gaudreau@umontreal.ca

**Keywords:** growth hormone-releasing hormone receptor, GHRH, kidney, renal medulla, warm ischemia-reperfusion, acute kidney injury, oxidative stress

## **Abstract**

The growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) is mainly known for its action on somatotroph cells to stimulate growth hormone secretion, synthesis, and proliferation. According to literature, this receptor would also be expressed in extra pituitary tissues such as the hypothalamus, placenta, and kidney. Moreover, it has been reported that the rat renal medulla has the highest level of GHRH mRNA in the kidney. However, there is still sparse information regarding the receptor regulation of expression under deleterious conditions and its potential role in the kidney. The aim of the present study is to use direct immunofluorescence to 1) localize the GHRHR in healthy male Sprague Dawley rats within the different cell populations and regions of the kidney, 2) identify the changes in renal GHRHR immunoreactive levels 24 h. following a warm ischemia-reperfusion injury (50 min) and 3) evaluate if the changes of GHRHR immunoreactive levels are related to those of known biomarkers of cell injury and apoptosis. Our results show that, in the healthy rat kidney, the cortex, outer stripe of the outer medulla (OSOM) and inner stripe of the outer medulla (ISOM), had a GHRHR immunoreactive level 1.6, 1.9 and 1.4 times higher than in the inner medulla. Following ischemia-reperfusion, GHRHR levels decreased significantly in all regions of the kidney ( $p < 0.001$ ): 35% in the cortex, 40% in the OSOM and ISOM, and 47% in the inner medulla. At the same time, increasing levels of kidney injury molecule 1 and caspase-3 and DNA fragments were found in these regions. These results represent the first step

towards the identification of a potential role for the renal GHRHR, considering that the kidney is one of the most susceptible organs to a variety of ischemic insults, and more specifically transplantation.

## **Introduction**

The rat growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) is a receptor protein that belongs to the family of the G protein-coupled receptors. When activated by its ligand in the anterior pituitary somatotrophs, it stimulates growth hormone (GH) secretion, synthesis, and proliferation. The GHRHR is also expressed in extra pituitary tissues. The kidney is the organ possessing the highest level of GHRHR mRNA (Mayo et al., 2006).

Our previous results have shown that the renal medulla is enriched in GHRHR mRNA, more particularly the Henle's loop (HL). Lower levels of GHRHR mRNA were detected in the cortex and pelvis. Moreover, it has been reported that, desensitization to GHRH involves internalization of the GHRHR and down regulation of GHRHR mRNA levels (Boisvert et al., 2002). Lastly, in healthy rats exposed to a high-salt diet (NaCl), generating high levels of oxidative stress (OS), a differential regulation of the renal medulla GHRHR mRNA with time. Altogether, these results suggest a potential role of the receptor in HL cells, associated to the maintenance of the kidney functional integrity (Boisvert, 2003).

However, information is still sparse on the renal GHRHR expression and regulation when the kidney is exposed to high levels of OS such as in acute kidney injury (AKI) and more particularly in ischemia-reperfusion (I/R). Therefore, this study aimed to use direct immunofluorescence to 1) localize the GHRHR in healthy male Sprague Dawley rats within the different cell populations and regions of the kidney, 2) identify the changes in renal GHRHR immunoreactive levels 24 h. following a warm ischemia-reperfusion injury (50 min) compared to a sham group and 3) evaluate if the changes of GHRHR immunoreactive levels are related to those of known biomarkers of cell injury and apoptosis. These results will provide a better understanding of the renal GHRHR behaviour under normal and AKI (I/R) conditions. They represent the first step towards the identification of a potential role for the renal GHRHR, considering that the kidney is one of the most susceptible organs to a variety of ischemic insults, and more particularly transplantation.

## **Materials and Methods**

### **Animal sample and tissue Preparation**

Two-month-old healthy male Sprague Dawley rats (220 g - 250 g) were purchased from Charles River Canada (Saint-Constant, Canada). They were kept in temperature-, humidity- and light-controlled rooms (22 °C, 65%, and 12 h, light on at 7 AM) with free access to standard chow and water. The acclimatization period in the Research Center animal facilities was for a minimum of four days.

I/R rats were anaesthetized with 2–3% isoflurane/oxygen by inhalation and bupivacaine (2 mg/kg) was used as a local anesthetic. The abdominal cavity was exposed by a midline laparotomy. The left renal pedicle was isolated and clamped with a non-crushing microvascular clamp to achieve complete cessation of renal blood flow. After a 50 min warm ischemia, the left kidney was unclamped, allowing the return of blood flow, and the right kidney was rapidly removed. The abdominal cavity was closed and covered by a piece of gauze soaked with warm lactate-Ringer to prevent undue loss of body fluids. A 24 h reperfusion period was chosen to minimize variability when assessing the extent of damage (Elshiekh et al., 2015). After a rapid decapitation, the left kidney was immediately dissected out (the renal capsule and pelvis were removed) and fixed in formalin. Results from the I/R rats were compared with sham-operated rats that were subjected to all procedures except for I/R.

All tissues, from naïve, I/R and sham-operated rats, were fixed in formalin and embedded in paraffin. Four micrometres-thick sections were mounted on glass slides. Deparaffinization and antigen retrieval steps were performed using a Ventana BenchMark XT system (Ventata Medical Systems Inc., Arizona, United States).

### **Immunofluorescence Localization of GHRHR**

The tissue sections were incubated with a series of fluorescent primary antibodies, known to identify specific cell population and segments of the nephron, in order to colocalize and quantify the GHRHR in the kidney. The rabbit anti-Tamm-Horsfall protein (THP) polyclonal antibody was obtained labelled with Alexa Fluor 488 (Bioss Antibodies, Woburn, Massachusetts, USA), dilution

1:75. THP is present in the HL cortical thick ascending limb (cTAL) and medullary TAL (mTAL) (Bachmann et al., 1990). The rabbit anti-chloride channel-a and -b (ClC-Ka/b) polyclonal antibody (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) was conjugated in our laboratory to Alexa Fluor 488, according to the manufacturer's recommendations (Molecular Probes, Waltham, Massachusetts, USA), dilution 1:50. The ClC-Ka protein is found in the thin ascending limb (tAL) and the ClC-Kb protein in TAL of HL (Andrini et al., 2015). The rabbit anti-aquaporin 1 (AQP1) polyclonal antibody was obtained labelled with Alexa Fluor 647 (Bioss Antibodies, Woburn, Massachusetts, USA), dilution 1:75. AQP1 is present in the proximal convoluted (PCT) and straight tubules (PST) and in the thin descending limb (tDL) of HL (Hara-Chikuma and Verkman, 2006). The rabbit anti-GHRHR was obtained labelled with Alexa Fluor 594 (Bioss Antibodies, Woburn, Massachusetts, USA), dilution 1:25.

### **Fluorescence Characterization of Cell Damage Markers**

To determine cell damage levels, a series of fluorescent primary antibodies were used. The rabbit anti-kidney injury molecule 1 (KIM-1) polyclonal antibody (Novus Biologicals, Toronto, ON, Canada) was conjugated in our laboratory using Alexa Fluor 488 according to manufacturer's recommendations (Molecular Probes, Waltham, Massachusetts, USA), dilution 1:50. KIM-1 transmembrane protein is found in injured proximal tubules apical membrane (Han et al., 2002). The rabbit anti-cleaved caspase 3 (CASP3) and anti-cleaved caspase 9 (CASP9) polyclonal antibodies were obtained labelled with Alexa Fluor 647 (Bioss Antibodies, Woburn, Massachusetts, USA), dilution 1:50. Those antibodies show the expression of the activated caspase-3 and -9 found in apoptotic cell pathway.

Renal DNA damage was evaluated using the Click-iT Plus TUNEL assay labelled with Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, Waltham, Massachusetts, USA). This assay contains a modified dUTP which attaches itself to the 3'-OH of fragmented DNA.

The various antibodies used were incubated on glass slide-mounted sections for 18 h at 4 ° C, washed 3 times for 10 min in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, at room temperature (RT), incubated with nuclear fluorescent dye 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), rewashed in PBS once for 5 min at RT, and mounted with the ProLong Gold Antifade reagent (Molecular Probes,

Waltham, Massachusetts, USA). The glass slide-mounted sections used for the Click-iT Plus TUNEL assay were washed once for 5 min in PBS, incubated in DAPI, rewashed in PBS once for 5 min at RT, and mounted with the ProLong Gold Antifade reagent. The PBS (Gibco, Waltham, Massachusetts, USA) was exempt of calcium, magnesium, and phenol red. All immunofluorescence experiments were performed in the absence of direct light.

### **Immunofluorescence Visualization and Quantification**

Each slide-mounted tissue section was scanned on the Olympus VS-120 slide scanner using the Olympus VS-ASW software (version 2.9) (Olympus Life Science, Waltham, Massachusetts, USA) with a magnification of 20X. Image acquisition was performed at the CHUM Research Centre molecular pathology platform. Visual adjustments of the scanned slides were made with OlyVIA version 3.3 image viewer software (Olympus Life Science, Waltham, Massachusetts, USA). The filters used to visualize antibodies coupled to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 and Alexa Fluor 647 were FITC, TRITC and Cy5 respectively. Colocalization of GHRHR immunofluorescence with that of other fluorescent markers was made possible by overlapping the image obtained with different filters.

The fluorescence intensity of the various immunolabeled cell populations was measured using the Visiopharm Image Analytical System software (version 5) (Visiopharm A/S, Hørsholm, Denmark). The analysis was carried out in five steps. First, four areas of the kidney were identified: the cortex, the outer stripe of the outer medulla (OSOM), the inner stripe of the outer medulla (ISOM) and the inner medulla (IM). Second, in each area, a random region of interest (ROI) was selected and identified. Each ROI had an area of 136 000  $\mu\text{m}^2$ . Third, to obtain specific immunofluorescence, background subtraction was achieved using the mean fluorescence intensity (MFI) of a blank slide for each filter used (Lazarus et al., 2019). Fourth, the specific fluorescent structures were manually delimited using ROI delimitation. Lastly, the MFI and the number of stained cells in each selected ROI was determined.

## Statistical Analysis

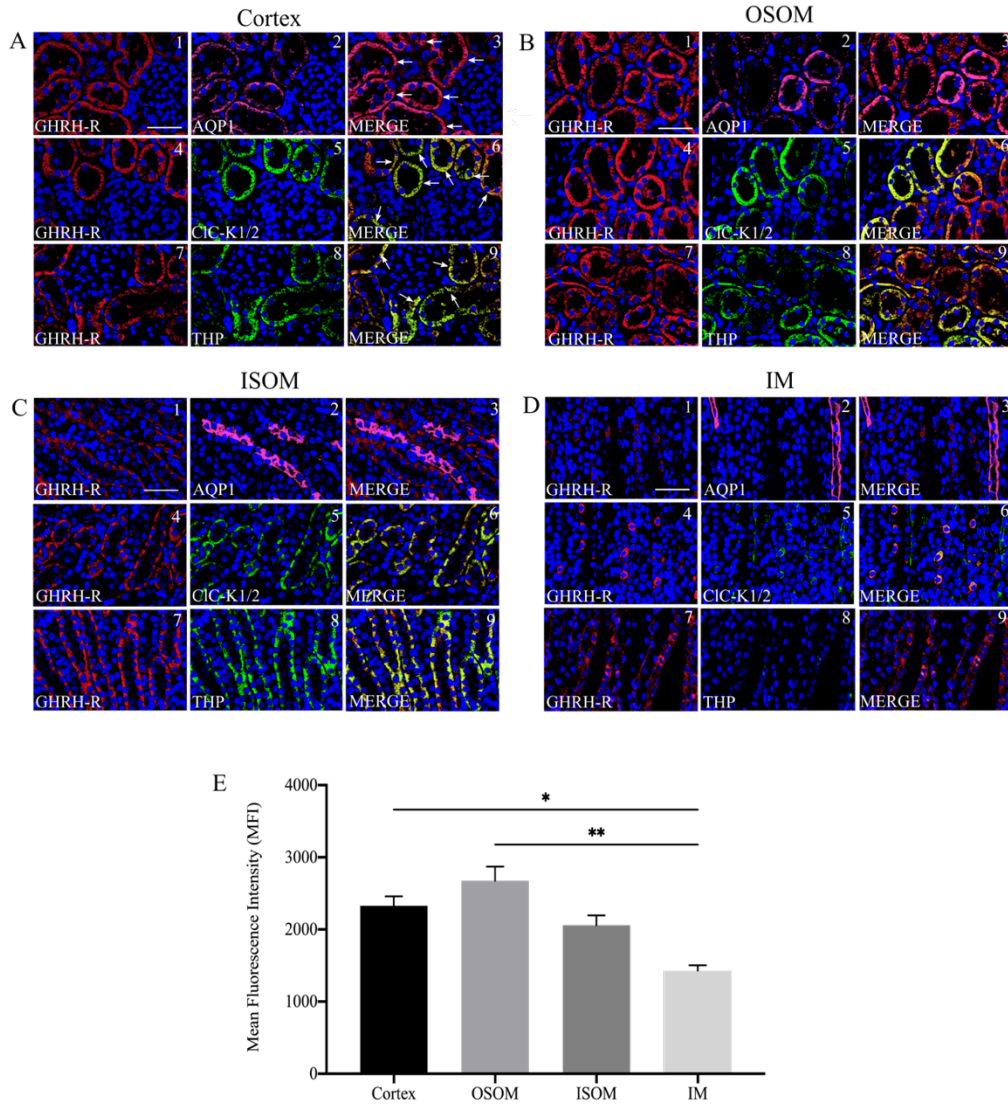
The sham and I/R groups were each comprised of four Sprague-Dawley rats. To ensure thorough analysis, a minimum of 15 slides per group was examined for each fluorescent antibody and marker, resulting in each rat having a minimum of 2 slides analyzed. Data are expressed as mean MFI  $\pm$  standard error (SEM). For the naïve rats, a one-way ANOVA (Kruskal-Wallis test) was performed. For the I/R and sham-operated rats two-way ANOVA (Multi-Effect Analysis) was performed. The statistical analysis was carried out using the GraphPad Prism software, version 9.0 (San Diego, California, USA). The P values were two-sided and  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Localization and quantification of the GHRHR in the kidney of naïve rat

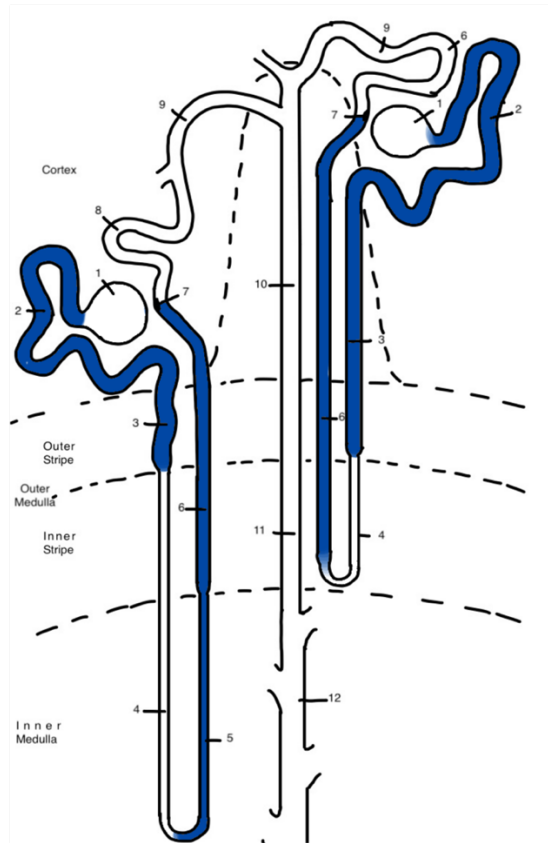
First, the structures of the naïve rat kidney were examined to identify those expressing GHRHR. The GHRHR specific immunofluorescence was colocalized with that of proteins known to be expressed in specific segments of the nephron such as AQP1, CIC-K1, CIC-K2 and THP (see Materials and Methods). As shown in Figure 1, in the renal cortex and OSOM, co-immunolabeling of GHRHR and AQP1 (Fig. 1. A and B, top panel) shows tubular colocalization in neon pink in PCT and PST. Co-immunolabelling of GHRHR and CIC-K1/2 (Fig. 1 A and B, middle panel) and of GHRHR and THP (Figures 1A and 1B, bottom panel) show tubular colocalization in a yellow-green colour in the cTAL and mTAL tubules. In ISOM (Fig. 1 C), co-immunolabelling of AQP1 and GHRHR (Figure 1C, top panel) shows that GHRHR is not expressed in the tDL tubules. However, in mTAL cells of the ISOM, co-immunolabelling of CIC-K1/2 with GHRHR (Figure 1C, middle panel) and THP with GHRHR are observed (Fig. 1 C, bottom panel). In the IM (Fig. 1 D), as in ISOM, co-immunolabelling of AQP-1 and GHRHR shows that GHRHR is not expressed in the tDL tubules (Fig. 1 D, top panel). However, co-immunolocalization of CIC-K1/2 and GHRHR is observed in the tAL tubules (Fig. 1 D, middle panel) but not of THP and GHRHR due to the absence of mTAL tubules in the IM (Fig. 1 D, bottom panel).

Taken together, our results suggest that GHRHR expression is specific to certain segments of the nephron such as PCT, PST, cTAL, mTAL, and tAL tubules (Figure 2). Moreover, since the immunofluorescence of GHRHR was quantified using the MFI as the output value. (Fig. 1 E), the data indicate that the IM has the lowest level compared to the renal cortex (1.6 times,  $P=0.0327$ ) and OSOM (1.9 times,  $P=0.0021$ ).



**Figure 1.** Immunofluorescent localization of GHRHR (red) in the renal cortex (Fig. 1 (A)), the OSOM (Fig. 1 (B)), the ISOM (Fig. 1 (C)) and the IM (Fig. 1 (D)); magnification 20X, scale bar 50  $\mu$ m. (A, B, C, D) Top panel: co-immunolabelling of GHRHR and AQP1 (see Merge, bright neon pink). White arrows in renal cortex and OSOM are PCT & PST. (A, B, C, D) Middle panel: co-immunolabelling of GHRHR and CIC-K1/2 (see Merge, yellow). White arrows in cortex and OSOM/ISOM are cTAL and mTAL respectively. White arrows in IM are tAL. (A, B, C, D) Bottom panel: co-immunolabelling of GHRHR and THO (see Merge, yellow). White arrows in cortex and OSOM/ISOM are cTAL and mTAL respectively. Nuclear counterstaining using DAPI (blue). (E) Quantification of the MFI of the fluorescent GHRHR antibody within the cortex, OSOM, ISOM and IM. Data are presented as mean  $\pm$  SEM., \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ .





**Figure 2.** Scheme suggestion the distribution of GHRHR immunofluorescent localization in renal tubule. Drawing is on the basis of the original Renal Commission of the International Union of Physiology Sciences publication (Kriz et al., 1988)

- 1= Renal corpuscle including Bowman's capsule and the glomerule
- 2= Proximal convoluted tubule
- 3= Proximal straight tubule
- 4= Descending thin limb of Henle
- 5= Ascending thin limb of Henle
- 6= Ascending thick limb of Henle
- 7= Macula densa within the final portion of the thick ascending limb of Henle
- 8= Distal convoluted tubule
- 9= Connection Tubule
- 10= Cortical collecting duct
- 11= Outer medullary collecting duct
- 12= Inner medullary collecting duct

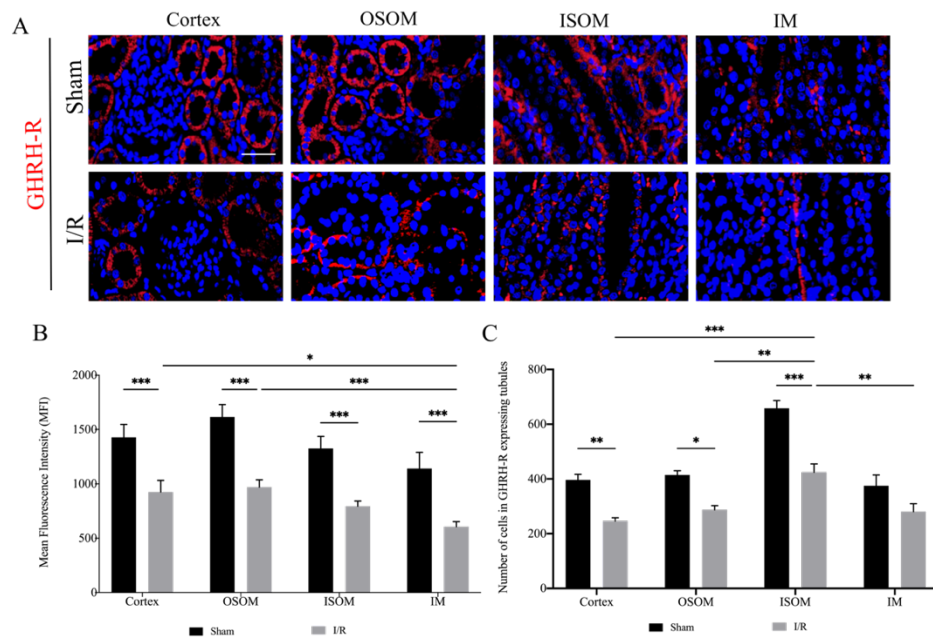
### **Quantification of the GHRHR in the rat kidney following ischemia-reperfusion**

We next investigated the effects of ischemia-reperfusion (I/R) on the immunoreactivity of GHRHR in the kidney. As shown in Fig. 3 A, the renal cortex, OSOM, ISOM, and IM were immunolabeled with the GHRHR antibodies in both I/R and sham-operated rats. The intensity of GHRHR's immunoreactivity was quantified with the MFI as an output value in both groups (Fig. 3 A). The

data indicate that the level of immunofluorescence decreased in all regions of the kidney following I/R ( $P < 0.001$ ). The diminution was of 35, 40, 40 and 47% in the renal cortex, OSOM, ISOM and IM, respectively when compared to the sham-operated rats.

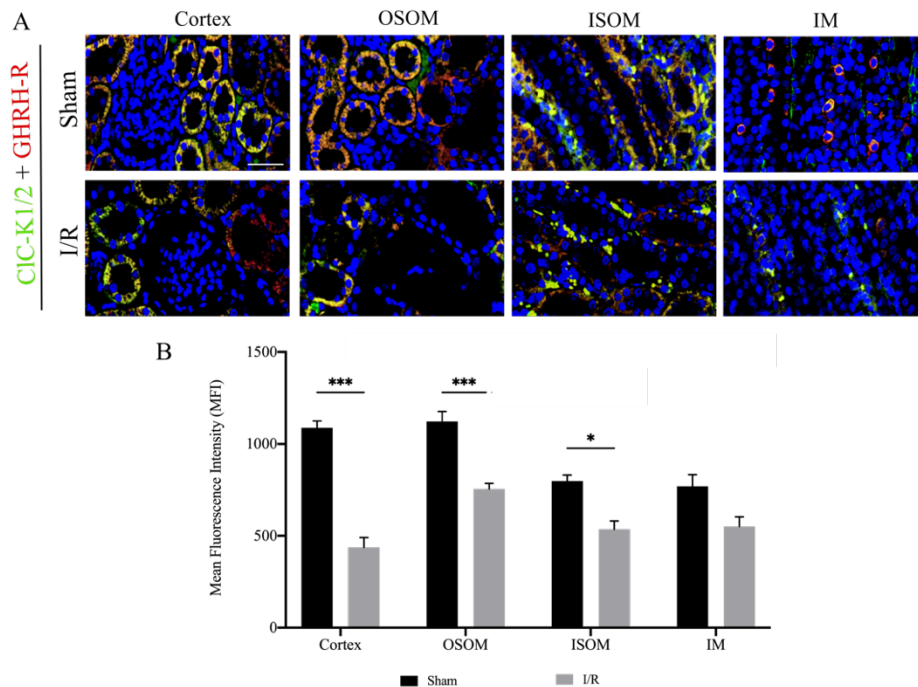
In agreement with the localization and quantification studies in the kidney of naïve rats, in our experimental conditions of I/R, the IM has the lowest MFI compared to the renal cortex ( $P < 0.05$ ) and OSOM ( $P < 0.001$ ). It suggests that I/R would initiate a dynamic loss of GHRHR expression in various regions of the kidney without changing significantly the fluorescence intensity ratios between regions.

The number of viable cells bearing GHRHR immunofluorescence was analyzed using the nuclear counterstaining agent DAPI (Fig. 3 C). Compared to sham-operated rats, I/R significantly decreases the number of viable cells in GHRHR-expressing tubules throughout the kidney. This was proportional to the loss of fluorescent intensity apart from the IM, suggesting an increase of apoptosis.

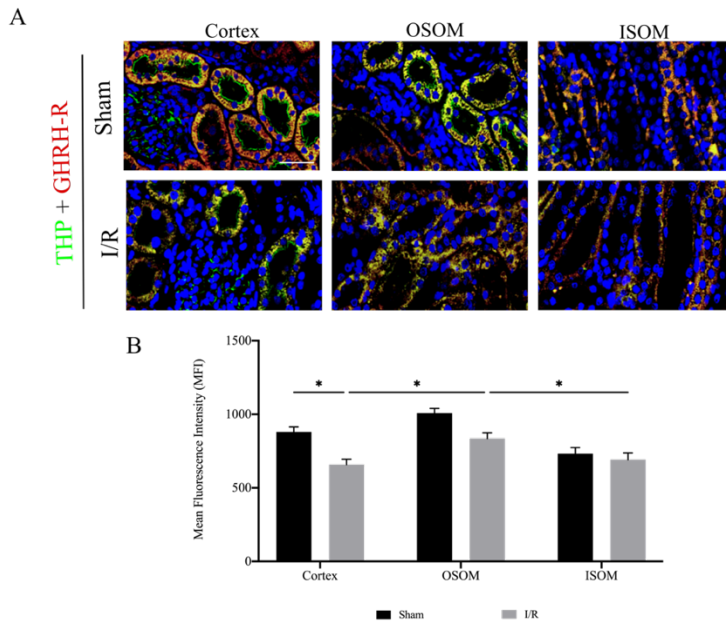


**Figure 3.** Immunoreactivity of GHRHR (red) in sham-operated (Fig. 3 (a, top panel)) and I/R rats (Fig. 3 (a, bottom panel)); magnification, 20X; scale bar - 50 $\mu$ m. Nuclear counterstaining using DAPI (blue). (b) Mean fluorescence intensity (MFI) of fluorescent GHRHR antibody within the renal cortex, OSOM, ISOM and IM. (c) Number of cells in GHRHR receptor that express tubules within the renal cortex, OSOM, ISOM and IM. Data are presented as mean  $\pm$  SEM., \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , ns: non-significant.

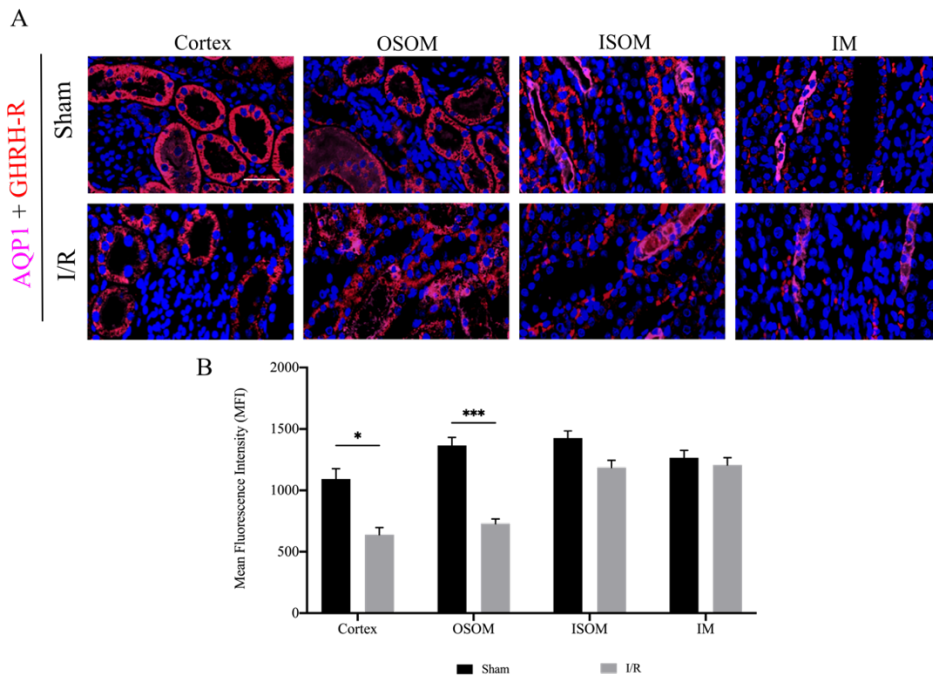
The loss of immunoreactivity not only affects the GHRHR but appears to affect the immunoreactivity of the antibodies used as structure localization references. For the CIC-K1/2 antibody (Figure 4), the loss of the immunoreactivity in the I/R rat was significant through all regions of the kidney apart from the IM. We can see a reduction in the immunoreactivity of CIC-K1/2 in renal cortex, OSOM, ISOM and IM. The reduction percentages are 60%, 33%, 33%, and 28% respectively when compared to the sham group. For the THP antibody (Figure 5), the loss of immunoreactivity in the I/R rats wasn't highly significant through all regions of the kidney which normally express the THP protein. Each region that expression of the THP protein, namely the renal cortex, OSOM, and ISOM, showed a reduction in immunoreactivity of 25%, 17%, and 6%, in that order, in the I/R rat group. Lastly, for the AQP1 (Figure 6), the loss of immunoreactivity in the I/R rats was only significant in the renal cortex and OSOM. We can observe that following I/R, the immunoreactivity of AQP-1 undergoes a decrease of 42% in the renal cortex, 47% in the OSOM, 17% in the ISOM, and 5% in the IM.



**Figure 4.** Immunoreactivity of GHRHR (red) co-immunolabelled with CIC-K1/2 (Merge in yellow) in sham-operated (Fig. 4 (a, top panel)) and I/R rats (Fig. 4 (a, bottom panel)); magnification, 20X; scale bar - 50µm. Nuclear counterstaining using DAPI (blue). (b) Mean fluorescence intensity (MFI) of fluorescent CIC-K1/2 antibody with the renal cortex, OSOM, ISOM and IM. Data are presented as mean ± SEM. \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001.



**Figure 5.** Immunoreactivity of GHRHR (red) co-immunolabelled with THP (Merge in yellow) in sham-operated (Fig. 5 (a, top panel)) and I/R rats (Fig. 5 (a, bottom panel)); magnification, 20X; scale bar - 50 $\mu$ m. Nuclear counterstaining using DAPI (blue). (b) Mean fluorescence intensity (MFI) of fluorescent THP antibody with the renal cortex, OSOM and ISOM. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*P < 0.05.



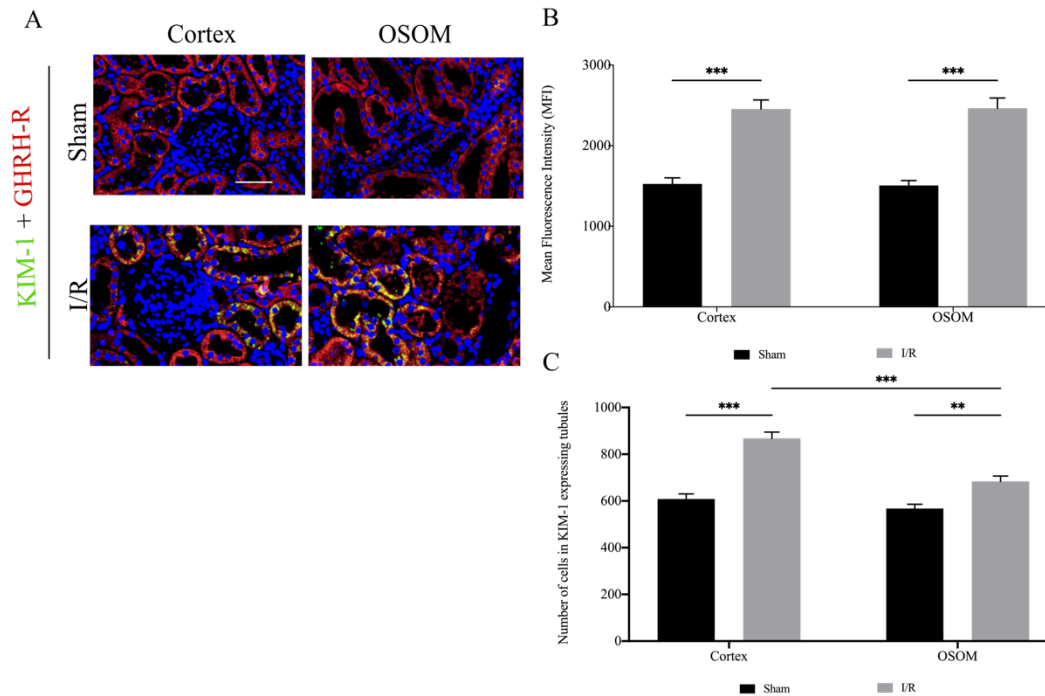
**Figure 6.** Immunoreactivity of GHRHR (red) co-immunolabelled with AQP-1 (Merge in neon pink) in sham-operated (Fig. 6 (a, top panel)) and I/R rats (Fig. 6 (a, bottom panel)); magnification, 20X; scale bar - 50 $\mu$ m. Nuclear counterstaining using DAPI (blue). (b) Mean fluorescence intensity (MFI) of fluorescent AQP-1 antibody with the renal cortex, OSOM, ISOM and IM. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001.

## **Localization and quantification of KIM-1 in the injured rat kidney following ischemia-reperfusion.**

The loss of GHRHR immunofluorescence and viable cells resulting from I/R prompt us to assess the extent of damage generated in the kidney, using KIM-1 immunofluorescence. KIM-1 is known to be an early injury biomarker expressed in post-ischemic PCT and PST (Han et al., 2002). As expected, an increased expression of KIM-1 in PCT and PST (Fig. 7 A) are observed I/R rat kidney. Moreover, some KIM-1 expressing tubules appear to be colocalized with GHRHR immunofluorescence.

KIM-1 immunofluorescence was quantified in the renal cortex and OSOM using the MFI as the output value (Fig. 7 B). The data suggest that I/R causes an increase of tubular injury in the proximal tubules, which in turn increases KIM-1. KIM-1 immunoreactivity was 1.6 times higher in I/R kidneys compared to sham-operated, in both the renal cortex and OSOM. These results are inversely proportional to the loss of GHRHR immunofluorescence (Fig. 3 A).

The number of cells in KIM-1 immunoreactive tubules was also quantified (Fig. 7 C). In agreement with the MFI results, I/R increases the number of cells expressing KIM-1 which is superior in the cortex ( $P < 0.001$ ) compared to the OSOM.



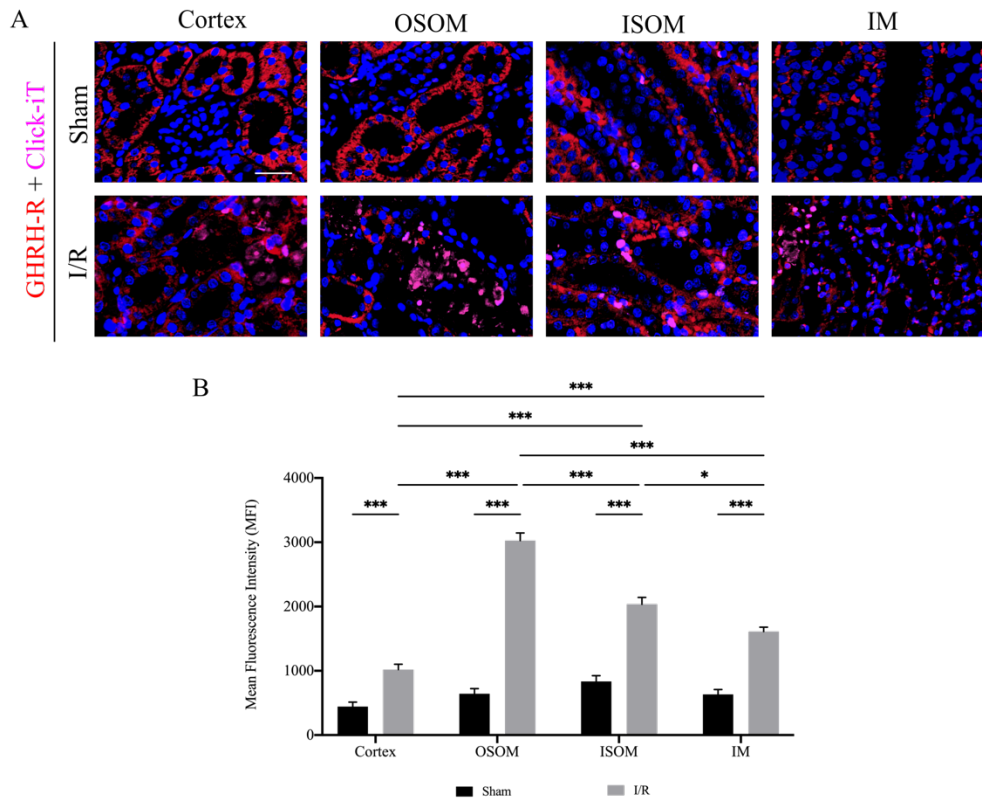
**Figure 7.** Immunoreactivity of GHRHR (red) co-immunolabelled with KIM-1 (Merge in yellow) in sham-operated (Fig. 7 (a, top panel)) and I/R rats (Fig. 7 (a, bottom panel)); magnification, 20X; scale bar, 50  $\mu$ m. Nuclear counterstaining using DAPI (blue). (b) Mean fluorescence intensity (MFI) of fluorescent KIM-1 antibody within the renal cortex and OSOM. (c) Number of cells within the renal cortex and OSOM that express KIM-1. Data are presented as the means  $\pm$  SEM. \*\*:P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

## Localization and quantification of DNA fragments in the injured rat kidney following ischemia-reperfusion.

DNA damage caused by an increase of OS is a good measure of apoptosis. Click-iT Plus TUNEL assay staining allows to detect DNA fragments, one of the hallmarks of apoptosis. The immunofluorescence results show that I/R leads to an increase of DNA fragments. A mark difference is seen in the appearance of stained DNA fragments in pink (Fig. 8 A). Quantification of the intensity of the Click-iT Plus TUNEL Assay staining with MFI as an output value show that compared to the sham group, all regions of the I/R rat kidney show an increase in fluorescence (Fig. 8 B). The DNA fragment immunoreactivity was 2.3, 4.7, 2.4 and 2.5 times higher in the renal cortex, OSOM, ISOM and IM, respectively.

Moreover, all regions are significantly different from each other. The OSOM seems to have the highest MFI of DNA fragments followed by the ISOM, IM, and renal cortex. These results are going

in the same direction than the loss of GHRHR immunoreactivity, being more intense in the OSOM compared to the other regions (Fig. 3 B).



**Figure 8.** Immunoreactivity of GHRHR (red) co-immunolabelled with Click-iT Plus TUNEL Assay (pink) in sham-operated (Fig. 8 (a, top panel)) and I/R rats (Fig. 8 (a, bottom panel)); magnification, 20X; scale bar, 50  $\mu$ m. Nuclear counterstaining using DAPI (blue). (b) Mean fluorescence intensity (MFI) of fluorescent Click-iT Plus TUNEL Assay within the renal cortex, OSOM, ISOM and IM. Data are presented as the means  $\pm$  SEM. \*:  $P < 0.05$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ .

## Localization and quantification of apoptotic cells in the injured kidney following ischemia-reperfusion.

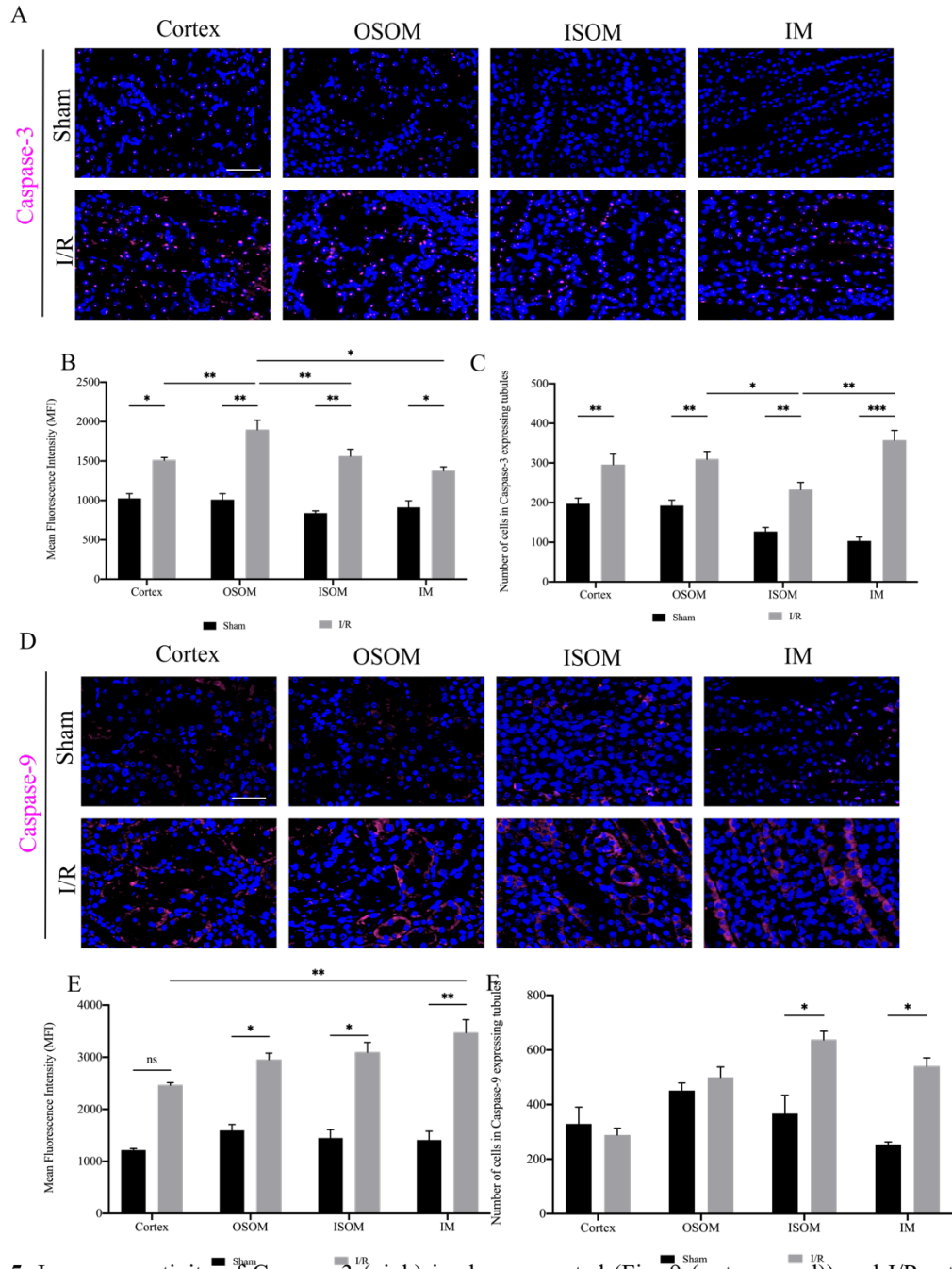
In situations of I/R, before cells reach the final state of apoptosis, an increase of OS and an overproduction of reactive oxygen species (ROS) occur. OS is known to facilitate and regulate the activation of key caspases (initiators and executioners) essential to the apoptotic process (Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2016). In addition to the Click-iT Plus TUNEL Assay results, cleaved caspase-3 (executioner) and cleaved caspase-9 (initiator) immunolabeling should help to draw a sequential picture of events leading to apoptosis. Caspase-9 plays an important role in the

initiating phase of cell apoptosis by its interaction with caspase-3 activation. It allows caspase-3 to play its role in the execution phase of cell apoptosis (Shi, 2004).

The cleaved caspase-3 immunofluorescence is increased in all regions of the renal parenchyma of I/R rats (Fig. 9 A). It is 1.5, 1.9, 1.9 and 1.5 times higher in the renal cortex, OSOM, ISOM and IM, respectively, compared to sham-operated rats (Fig. 9 B). The number of immunolabeled cells was similar in the different regions of the kidney except for the ISOM (Fig. 9 C). However, when immunoreactivity of the cleaved caspase-3 was compared, region by region, between I/R and sham-operated rat kidney, it was 1.5, 1.6, 1.8 and 3.5 times higher in the renal cortex, OSOM, ISOM and IM, respectively.

Just like the cleaved caspase-3, the immunofluorescence of the cleaved caspase-9 was increased throughout the kidney in I/R rats (Fig. 9 D). The MFI data indicate that in I/R rat kidney, the immunolabeling of cleaved caspase-9 was different in the renal cortex compared to IM (Fig. 9 E). However, in each kidney region, the MFI of the cleaved caspase-9 in the I/R compared to sham-operated rat kidney was 2.0, 1.9, 2.1 and 2.5 times higher in the renal cortex, OSOM, ISOM and IM, respectively. Moreover, only ISOM and IM of I/R kidneys showed a significant increase of cleaved caspase-9 immunoreactive cells compared with the cortex and OSOM (Fig. 9 F). Altogether, it seems that I/R causes uneven states of cell apoptosis in the various regions of the kidney and especially in cells expressing GHRHR.





**Figure 5.** Immunoreactivity of Caspase-3 (pink) in sham-operated (Fig. 9 (a, top panel)) and I/R rats (Fig. 9 (a, bottom panel)); magnification, 20X; scale bar, 50  $\mu$ m. Nuclear counterstaining using DAPI (blue). (b) Mean fluorescence intensity (MFI) of fluorescent Caspase-3 antibody within the renal cortex, OSOM, ISOM and IM. (c) Number of cells within the renal cortex, OSOM, ISOM and IM expressing Caspase-3. Immunoreactivity of Caspase-9 (pink) in sham-operated (Fig. 9 (d, top panel)) and I/R rats (Fig. 9 (d, bottom panel)); magnification, 20X; scale bar, 50  $\mu$ m. Nuclear counterstaining using DAPI (blue) (e) Mean fluorescence intensity (MFI) of fluorescent Caspase-9 antibody within the renal cortex, OSOM, ISOM and IM. (f) Number of cells within the renal cortex, OSOM, ISOM and IM expressing Caspase-9. Data are presented as the means  $\pm$  SEM. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ .

## Discussion

In this study, we first evaluated the localization of the GHRHR in the various regions and cell population of the naïve rat kidney. By direct immunofluorescence, we identified the PCT, PST, cTAL, MTAL and tAL cells are the only portions of the tubule bearing GHRHR specific immunofluorescence. Previous studies demonstrated that the renal GHRHR mRNA is expressed in the renal medulla and thin and thick ascending HL cells (Matsubara et al., 1995;Boisvert et al., 2002). However, our findings show that in addition to the thin and thick HL cells, significant GHRHR immunoreactivity is detected in the PCT and PST tubule of the renal cortex. The quantification analysis even showed that the renal cortex and OSOM possess the highest MFI without significant differences between the two (Fig. 1). To date, this is the first detailed immunofluorescence study of GHRHR in the rat kidney.

However, there is an important discordance between our results and the results observed in the GHRHR mRNA studies. Indeed, results from Mayo and al. in 2006 highlighted that the majority of the GHRHR mRNA was found in the renal medulla and the pelvis. Therefore, the renal cortex would be the regional where the GHRHR is less expressed. In contrast, based on our results and quantitative analysis, the cortex would express significantly more GHRHR than the renal medulla. This discordance is not synonymous of the invalidity of our or the published results. It is important to underline that there is a major difference which lies in the method of experimentation. The RT-PCR method measures the amount of mRNA while the direct immunofluorescence identifies protein expression. In the literature, it is well known that there is a discrepancy between the research that can be observed in immunofluorescence and in RT-PCR (De et al., 2010). A study that compares the immunofluorescence and RT-PCR results in lung cancer patients demonstrated that there was no correlation between mRNA and protein expression for different genes and proteins related to lung cancer including the breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1). According to this study, the immunofluorescence technique would be more effective since it has more effective discrimination capacities than RT-PCR (Vilmar et al., 2012). In contrast, a study determining the level of detected sensitivity of the human papillomavirus in oral squamous-cell carcinomas suggest that RT-PCR have the best sensitivity for detection and characterized diagnosis at immunofluorescence (Awan et al., 2017).

We also studied the changes in GHRHR's immunofluorescence in the deleterious condition of warm I/R, a valid model mimicking renal pathological condition (e.g., kidney transplant). We observed a significant decrease in the renal GHRHR immunoreactive levels characterized by a lower MFI compared to the sham-operated rat kidneys. However, it did not change the pattern of expression between the regions as observed in the naïve rat kidney studies (Fig. 3 B). Moreover, we were able to suggest that the immunoreactive levels of GHRHR do not seem to be affected in the same way by I/R compared to the other markers of cellular populations used (Fig. 4, 5 and 6). By comparing the levels of statistical significance, we can suggest that the renal GHRHR is more affected by I/R damage than other important protein expression in the rat kidney.

The decreased GHRHR MFI also translates to fewer live cells in various portions of the tubules. These results are consistent with the observations that under high levels of OS, such as a high-salt diet, the renal medulla GHRHR mRNA levels are decreased (Boisvert et al., 2002). Thus, following I/R, all markers, including GHRHR, demonstrate a reduction in the number of viable renal cells, suggesting that a diverse range of established cellular death pathways contribute to the destruction of renal cell populations.

Our results also show that the renal GHRHR have the highest expression in tubule regions exhibiting the greater susceptibility to ischemia, namely the PST and mTAL within the outer medulla. Indeed, the outer medulla is known to be susceptible to high levels of OS. It was reported that during I/R, the reduced blood flow to the outer medulla will lead to a disruption in the transport activity and to ROS and free radical production leading to increasing levels of OS in the organ (Brezis and Rosen, 1995; Heyman et al., 2008).

Therefore, we examined if the loss of GHRHR immunoreactivity agreed with signs of acute kidney injury (AKI) caused by I/R. KIM-1 is a protein whose expression tends to increase in post-ischemic tissues. Found in urine and only express in the PCT and PST tubules, it is a well-known biomarker of AKI and chronic kidney disease (Song et al., 2019). Our results confirmed that in deleterious conditions, we can simultaneously observe the increase of the KIM-1 expression and the decrease of the renal GHRHR expression.

Lastly, we examined if the loss of GHRHR immunoreactivity and the signs of OS such as caspases and DNA fragment changes during I/R. Restricted blood flow promotes the ROS production and accumulation in the kidney which in turn stimulates the caspase pathways of cell apoptosis (Kannan and Jain, 2000). Two important caspases were studied, the cleaved caspase-9, associated with the initiation phase, and the cleaved caspase-3, associated with the execution phase of cell apoptosis (Danial and Hockenbery, 2018).

The cleaved caspase-3 is involved in the apoptotic pathway and has a high importance in the kidney's microvascular regulation post-I/R (Yang et al., 2018). The cleaved caspase-3 results indicate that 24 h post-reperfusion, all regions of the kidney show an increase of the cleaved caspase-3 immunoreactivity. In the OSOM, a simultaneous high increase of apoptotic cells and a decrease of the renal GHRHR immunoreactivity occurs. In addition, the cleaved caspase-3 appears to be in the proximal tubules and mTAL. A previous study demonstrated that cleaved caspase-3 is required to lead to DNA fragmentation and apoptosis (Al-Awqati and Oliver, 2002). Using a TUNEL assay, we observed that DNA fragments were present in all regions of the kidney. The highest level of DNA fragment was detected in the OSOM of I/R rat kidneys with a similar decrease of the GHRHR immunolabeling. The cleaved caspase-9 is involved in the activation of effector caspases such as caspase-3 (Li et al., 2017). Our results show that compared to the sham-operated rat kidney, I/R kidneys exhibit a significant increase of the cleaved caspase-9 immunoreactivity. However, within the I/R rat kidney regions, this increase is significantly different.

In the present study, we have shown how the renal GHRHR is affected by I/R. The expression of the receptor appears to be more affected in regions of the kidney known to be more susceptible to injury. At the same time, we evaluated a significant increase in cell apoptosis and tissue injury.

A previous study has shown that GHRH-induced GHRHR activation has a cardioprotective effect in myocardial infarction and protects the heart against I/R injury (Granata et al., 2009; Kanashiro-Takeuchi et al., 2015). I/R-induced injuries is a widespread and unavoidable consequence encountered in transplant and total/partial nephrectomy. Both cold and warm I/R in kidney transplant have negative effects on graft function and graft rejection (Kamińska et al., 2016). Whether renal GHRHR activation could play a protective role in these deleterious situations

remains to be established. A stimulation and activation of the renal GHRHR prior to the warm or cold ischemia might have the same beneficial effects than those reported in the rat heart I/R studies. It could potentially protect or rescue certain renal cell populations and help the kidney to maintain its functional integrity.

## **Conclusion**

We established that the GHRHR is present in specific cell populations of the rat kidney. Following warm I/R, changes in the immunofluorescence intensity of the GHRHR are observed. These changes agree with increasing levels of kidney injury and cell apoptosis. Furthermore, the present study found that the impact of I/R on GHRHR immunoreactive levels differs from that of other cellular population markers. GHRHR was found to be more susceptible to I/R damage than other markers, as indicated by statistical analysis. Future studies should identify the temporal dynamics of GHRHR levels and cells regulation at different times prior and after the 24 h reperfusion. This would allow determining the best time to activate the renal GHRHR.

## **Conflict of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

## **Authors' contributions**

PG designed the research project. TN and PG performed the experiments. TN analyzed the data and wrote the manuscript. PG reviewed and edited the manuscript. The authors approved the submitted version.

## **Funding**

This research was funded by a competitive grant from the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Center. T Nami was the recipient of a studentship from the Biomedical Sciences MSc program, Faculty of Medicine, Université de Montréal.

## Institutional Review Board Statement

Ethical review and approval of this study were granted by the Research Ethics Committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Center (protocol number CM18026PGr).

## Data Availability Statement:

The data presented in this study can be made available upon request to the corresponding author.

## Acknowledgments

The authors recognize the technical assistance of the Molecular pathology platform of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Center.

## Reference

Al-Awqati Q, Oliver JA. Stem cells in the kidney. *Kidney Int.* 2002;61(2):387-395. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00164.x

Andrini O, Keck M, Briones R, Lourdel S, Vargas-Poussou R, Teulon J. ClC-K chloride channels: emerging pathophysiology of Bartter syndrome type 3. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2015;308(12):F1324-F1334. doi:10.1152/ajprenal.00004.2015

Awan MS, Irfan B, Zahid I, Mirza Y, Ali SA. Comparison of Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemistry Assays for Analysing Human Papillomavirus Infection in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J. Clin Diagn Res.* 2017;11(6):XC10-XC13. doi:10.7860/JCDR/2017/24742.10119

Bachmann S., Metzger R., Bunnemann B. Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney. *Histochemistry.* 1990;94(5):517-523. doi:10.1007/BF00272616

Boisvert C. Localisation, régulation et fonction du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat Thèse de doctorat : Université de Montréal; 2003: 1-294.

Boisvert C, Paré C, Veyrat-Durebex C, et al. Localization and regulation of a functional GHRH receptor in the rat renal medulla. *Endocrinology.* 2002;143(4):1475-1484. doi:10.1210/endo.143.4.8746

Brezis M., Rosen S. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N. Engl J. Med.* 1995;332(10):647-655. doi:10.1056/NEJM199503093321006

Danial NN, Hockenbery DM. Cell death. *Hematology.* 2018:186-196. doi:10.1016/b978-0-323-35762-3.00018-4

De P, Smith B.R., Leyland-Jones B. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing: Where Are We? *Journal of Clinical Oncology.* 2010;28(28):4289-4292. doi:https://doi.org/10.1200/jco.2010.29.5071

Elshiekh M., Kadkhodae M., Seifi B., Ranjbaran M., Ahghari P. Ameliorative Effect of Recombinant Human Erythropoietin and Ischemic Preconditioning on Renal Ischemia Reperfusion Injury in Rats. *Nephrourol Mon.* 2015;7(6):e31152. Published 2015 Nov 29. doi:10.5812/numonthly.31152

Granata R, Trovato L, Gallo MP, et al. Growth hormone-releasing hormone promotes survival of cardiac myocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Cardiovasc Res.* 2009;83(2):303-312. doi:10.1093/cvr/cvp090

Han WK, Bailly V., Abichandani R., Thadhani R., Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002;62(1):237-244. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x

Hara-Chikuma M., Verkman AS. Aquaporin-1 facilitates epithelial cell migration in kidney proximal tubule. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(1):39-45. doi:10.1681/ASN.2005080846

Heyman S.N., Khamaisi M., Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia response and the progression of chronic kidney disease. *Am J. Nephrol.* 2008;28(6):998-1006. doi:10.1159/000146075

Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, Chudoba P, et al. The influence of warm ischemia elimination on kidney injury during transplantation - clinical and molecular study. *Sci Rep.* 2016;6:36118. Published 2016 Nov 3. doi:10.1038/srep36118

Kanashiro-Takeuchi RM, Szalontay L, Schally AV, et al. New therapeutic approach to heart failure due to myocardial infarction based on targeting growth hormone-releasing hormone receptor. *Oncotarget*. 2015;6(12):9728-9739. doi:10.18632/oncotarget.3303

Kannan K., Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 2000;7(3):153-163. doi:10.1016/s0928-4680(00)00053-5

Kriz W., Kaissling B. Structural Organization of the Mammalian Kidney. *Seldin and Giebisch's The Kidney*. Published online 2008:479-563. Doi:10.1016/b978-012088488-9.50023-1

Lazarus J, Akiska Y, Perusina Lanfranca M, et al. Optimization, Design and Avoiding Pitfalls in Manual Multiplex Fluorescent Immunohistochemistry. *J Vis Exp*. 2019;(149):10.3791/59915. Published 2019 Jul 26. doi:10.3791/59915

Li Y, Zhou M, Hu Q, et al. Mechanistic insights into caspase-9 activation by the structure of the apoptosome holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114(7):1542-1547. doi:10.1073/pnas.1620626114

Matsubara S., Sato M., Mizobuchi M., Niimi M., Takahara J. Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology*. 1995;136(9):4147-4150. doi:10.1210/endo.136.9.7649123

Mayo KE, Miller TL, DeAlmeida V, Zheng J, Godfrey PA. The growth-hormone-releasing hormone receptor: signal transduction, gene expression, and physiological function in growth regulation. *Ann N. Y. Acad Sci*. 1996;805:184-203. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb17483.x

Redza-Dutordoir M., Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(12):2977-2992. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.09.012

Shi Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci*. 2004;13(8):1979-1987. doi:10.1110/ps.04789804

Song J, Yu J, Prayogo GW, et al. Understanding kidney injury molecule 1: a novel immune factor in kidney pathophysiology. *Am J. Transl Res*. 2019;11(3):1219-1229. Published 2019 Mar 15.



Vilmar A, Garcia-Foncillas J, Huarritz M, Santoni-Rugiu E, Sorensen JB. RT-PCR versus immunohistochemistry for correlation and quantification of ERCC1, BRCA1, TUBB3 and RRM1 in NSCLC. *Lung Cancer*. 2012;75(3):306-312. doi:10.1016/j.lungcan.2011.08.016

Yang B., Lan S, Dieudé M., et al. Caspase-3 Is a Pivotal Regulator of Microvascular Rarefaction and Renal Fibrosis after Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(7):1900-1916. doi:10.1681/ASN.2017050581

## **10. ARTICLE II : ÉTUDE HUMAINE**

STATUT DE PUBLICATION : Soumission prochaine à la revue *Frontiers in Physiology*

# IMMUNOLOCALIZATION AND QUANTIFICATION OF THE GROWTH HORMONE-RELEASING HORMONE RECEPTOR IN HUMAN KIDNEY

Tracy Nami<sup>1</sup> and Pierrette Gaudreau<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Centre and department of medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

## \*Correspondance:

Pierrette Gaudreau, PhD, FCAHS pierrette.gaudreau@umontreal.ca

**Keywords:** growth hormone-releasing hormone; GHRH; growth hormone-releasing hormone receptor; GHRHR; human kidney; renal cortex; renal medulla; immunofluorescence.

## Abstract

The growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) is known to be expressed in the anterior pituitary somatotrophs. The receptor neuroendocrine function is associated to growth hormone (GH) secretion, synthesis, and cell proliferation. The GHRHR is also expressed in extra-pituitary tissues such as the kidney. Up to now, its specific localization in the human kidney is unknown. Here we report the first localization and quantification of GHRHR immunofluorescence (IF) in the different renal structures of a healthy man. The results show that the renal GHRHR IF is present in the proximal convoluted and straight tubules (PCT, PST) and in the cortical and medullary thick ascending limb of Henle's loop (cTAL, mTAL). The quantitative analysis shows that the cortex had a 2.2 time higher IF than the medulla ( $P=0.0079$ ) while the number of GHRHR immunofluorescent cells is not different in the two structures. These results offer the possibility to study the regulation of the renal GHRHR in different physio-pathological contexts, where tissue biopsy is part of the surgery protocol such as kidney transplant and allograft rejection.

## Introduction

The rat and human growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) were originally cloned by K.E. Mayo in 1992. The deduced receptor proteins belong to the family of G protein-coupled receptors (Mayo, 1992). Upon hypothalamic GHRH binding to the anterior pituitary

somatotrophs, the GHRHR is activated, leading to growth hormone (GH) secretion and synthesis, and GH cell proliferation (Mayo et al., 2006). The GHRHR is also expressed in extra pituitary tissues. The rat renal medulla and pelvis were reported to contain the highest levels of GHRHR mRNA (Matsubara et al., 1995). Our results have shown that the rat renal medulla is enriched in GHRHR mRNA, particularly in the Henle's loop (HL) and that low levels are present in the cortex and pelvis (Boisvert et al., 2002). Moreover, we have reported that desensitization to GHRH involves internalization of the GHRHR and down regulation of GHRHR mRNA levels (Boisvert et al., 2002). Finally, regulation of renal GHRHR mRNA levels in healthy rats, using a high-NaCl diet known to generate oxidative stress, suggests a potential role of the GHRHR in HL cells in association with maintenance of the kidney functional integrity (Boisvert, 2003).

In contrast to the rat, human GHRHR mRNA levels are similar in both the renal cortex and medulla suggesting multiple roles (Gaudreau et al., 2011). Up to now, no data exist on the precise localization and level of the GHRHR in the human kidney. Therefore, the aim of the present study was to identify, using immunofluorescence (IF), the cell types expressing the GHRHR protein throughout the renal tubular system and to quantify the immunoreactive levels of GHRHR in the different cell populations.

## **Materials and Methods**

### **Human Sample and Tissue Preparation**

Formalin-fixed paraffin-embedded tissues blocks were obtained from normal renal cortex and medulla specimens, following tumour resection in a 72-year-old man participating in the Montreal Renal Transplantation Biobank. Four micrometres-thick sections were mounted on glass slides. Deparaffinization and antigen retrieval steps were performed using a Ventana BenchMark XT system (Ventata Medical Systems Inc., Arizona, United States).

### **Immunofluorescence Experiments**

The tissue sections were incubated with a series of fluorescent primary antibodies, known to identify specific cell populations and segments of the nephron to localize GHRHR IF. The rabbit anti-Tamm-Horsfall protein (THP) polyclonal antibody was obtained labelled with Alexa Fluor 488

(Bioss Antibodies, Woburn, Massachusetts, USA), dilution 1:75. THP is present in the Henle's loop (HL) cortical thick ascending limb (cTAL) and medullary TAL (mTAL) (Bachmann et al., 1990). The rabbit anti-chloride channel-a and -b (ClC-Ka/b) polyclonal antibody (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) was conjugated in our laboratory using Alexa Fluor 488 according to the manufacturer's recommendations (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), dilution 1:50. The ClC-Ka protein is found in the thin ascending limb (tAL) and the ClC-Kb protein in TAL of HL (Andrini et al., 2015). The rabbit anti-aquaporin-1 (AQP1) polyclonal antibody was obtained labelled with Alexa Fluor 647 (Bioss Antibodies, Woburn, Massachusetts, USA), dilution 1:75. AQP1 is present in the proximal convoluted (PCT) and straight tubules (PST) and in the thin descending limb (tDL) of HL (Hara-Chikuma and Verkman, 2006). The rabbit anti-GHRHR was obtained labelled with Alexa Fluor 594 (Bioss Antibodies, Woburn, Massachusetts, USA), dilution 1:50, and was used to colocalize the receptor of interest with the various proteins described above and to quantify its IF intensity in the cortex and in the renal medulla.

The various antibodies were incubated on glass slide-mounted sections for 18 h at 4 ° C, washed 3 times for 10 min in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4, at room temperature (RT), incubated with nuclear fluorescent dye (4,6-diamidino-2-phenylindole [DAPI]), rewashed in PBS once for 5 min at RT, and mounted using the ProLong Gold Antifade reagent (Molecular Probes, Waltham, Massachusetts, USA). The PBS (Gibco, Waltham, Massachusetts, USA) was exempt of calcium, magnesium, and phenol red. The immunofluorescence experiments were performed in the absence of direct light.

## **Image Visualization**

Each slide-mounted tissue section was scanned on the Olympus VS-120 slide scanner using the Olympus VS-ASW software (version 2.9) (Olympus Life Science, Waltham, Massachusetts, USA) with a magnification of 20X. Image acquisition was performed at the CRCHUM molecular pathology platform. Visual adjustments of the scanned slides were made with OlyVIA version 3.3 image viewer software (Olympus Life Science, Waltham, Massachusetts, USA). The filters used to visualize antibodies coupled to Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594 and Alexa Fluor 647 were FITC,

TRITC and Cy5, respectively. Colocalization of GHRHR immunofluorescence with that of other fluorescent markers was made possible by overlapping the image obtained with different filters.

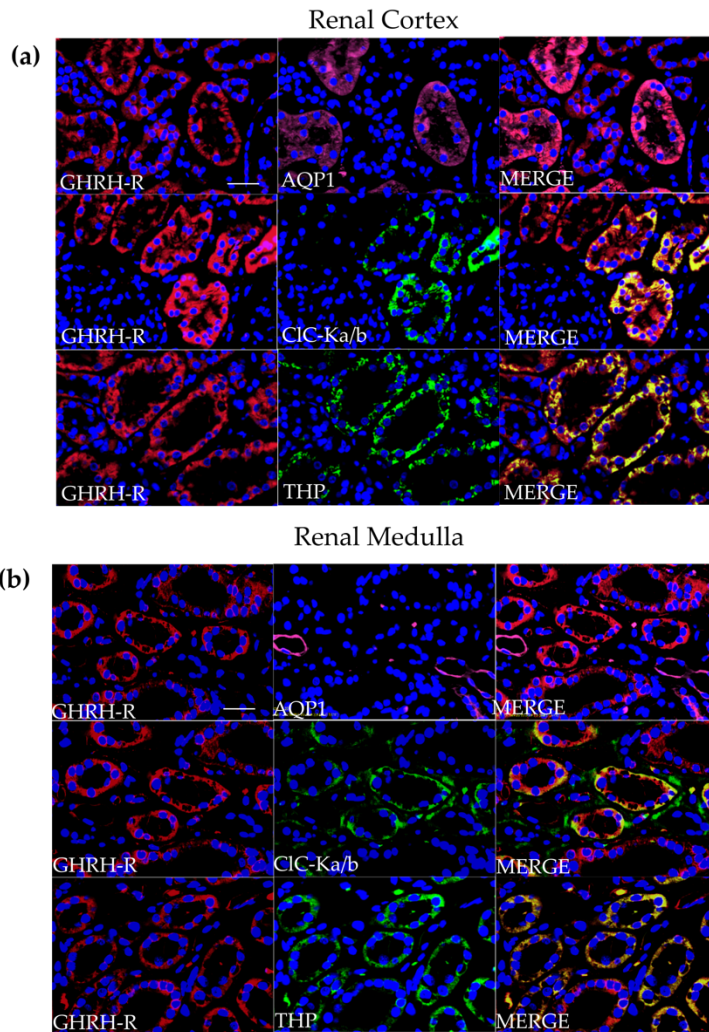
### **Immunofluorescence Quantification and Statistical Analysis**

The fluorescence intensity of the various immunolabeled cell populations was measured using the Visiopharm Image Analytical System software (version 5) (Visiopharm A/S, Hørsholm, Denmark). The analysis was carried out in four steps. First, three random regions of interest (ROI) of 136 000  $\mu\text{m}^2$  in both the renal cortex and medulla sections were selected and identified. Second, to obtain specific immunofluorescence, background subtraction was achieved using the mean fluorescence intensity (MFI) of a blank slide for each filter used (Lazarus et al., 2019). Third, the specific fluorescent structures were manually delimited using ROI delimitation. Lastly, the MFI and the number of stained cells in each selected ROI was determined. Each antibody was analyzed in ten slides of both cortex and medulla. Data are expressed as mean MFI  $\pm$  standard error (SEM). A Mann-Whitney U test was performed to compare the MFI in the renal cortex and medulla. GraphPad Prism software, version 9.0 (San Diego, California, USA), was used for statistical analysis. The P values were two-sided and  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### **Localization of the GHRHR in human renal cortex and medulla**

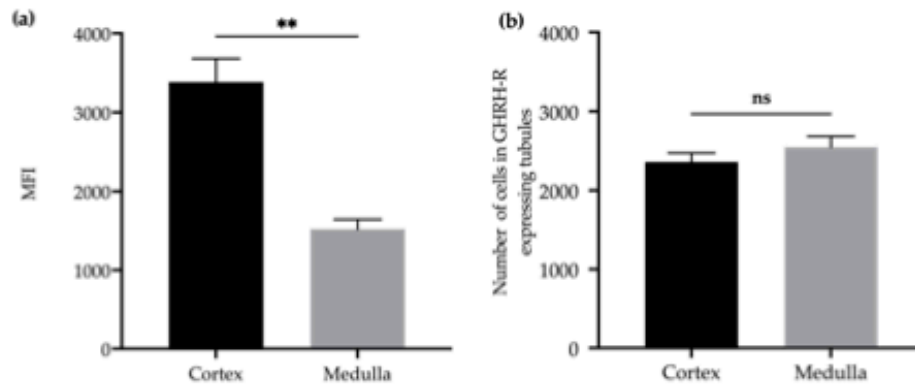
Co-immunolabeling of the GHRHR with other proteins known to have important functions in various segments of the nephron, allowed us to determine in which renal structures and cells the GHRHR is expressed. Figure 1 (a) shows that in the cortex, the GHRHR IF is colocalized with that of AQP1 (top panel), suggesting a tubular colocalization in PCT and PST. The GHRHR IF also colocalized with that of CIC-Ka/b (middle panel) and THP (bottom panel) indicating its presence in cTAL. Figure 1 (b) shows that in the medulla, the GHRHR IF is not colocalized with that of AQP1 tDL (top panel). However, the results show a colocalization of GHRHR IF with that of CIC-Ka/b (middle panel) and THP (bottom panel), indicating its presence in mTAL.



**Figure 1.** Immunofluorescent localization of the GHRHR (red) in the renal cortex (Fig. 1 (a)) and medulla (Fig. 1 (b)); magnification 20X, scale bar – 50  $\mu\text{m}$ . (a) Top panel : co-immunolabelling of GHRHR and AQP1 (see Merge, bright neon pink). White arrows in renal cortex are PCT & PST. (a and b) Middle panel: co-immunolabelling of GHRHR and CIC-Ka/b (see Merge, yellow). White arrows in renal cortex and medulla are cTAL and mTAL respectively. (a and b) Bottom panel: co-immunolabelling of GHRHR and THP (see Merge, yellow). White arrows in renal cortex and medulla are cTAL and mTAL respectively. Nuclear counterstaining using DAPI (blue.)

## Quantification of the GHRH receptor in the renal cortex and medulla

According to Shihan et al., the relative quantification of bound fluorescent antibodies can be achieved by measuring the mean fluorescence intensity (MFI) and the number of live cells that are positive across a region of interest (Shihan et al., 2021). As shown in Figure 2 (a), the specific MFI of the cortex was 2.27 times higher than that of the medulla ( $P = 0.0079$ ). However, the number of live cells was not significantly different in the two structures (Figure 2 (b)). These results could suggest that there be a greater expression of the GHRHR receptor in the cortex.



**Figure 2.** Quantification of the GHRHR. (a) Mean fluorescence intensity (MFI) of the fluorescent GHRHR antibody within the renal cortex and medulla. (b) Number of cells in the GHRH receptor that express tubules within the renal cortex and renal medulla. Data are presented as mean  $\pm$  SEM., \*\*:  $P < 0.01$ ; ns: non-significant.

## Discussion

In this study, we investigated the localization and quantification of the human renal GHRHR. The specific immunolocalization of the GHRHR was explored by direct IF in both the renal cortex and medulla of a human kidney. The GHRHR was restricted to PST, PCT, cTAL, and mTAL cells. Interestingly, the PST and mTAL tubules are located at the level of the outer medulla.

In several mammalian species, including humans, this region of the kidney is considered the most susceptible to ischemic damage (Brezis and Rosen, 1995; Ray et al., 2019). The main causes are the high metabolic demands for oxygen and the vascular structure of the region. In fact, PST and mTAL tubules require oxygen for the production of adenosine triphosphate to support the tubular transport of sodium and chlorine. Any sufficiently large reduction in oxygen supply caused by ischemic conditions combined with persistent tubular transport will lead to ischemic damage such as apoptosis and necrosis in the renal medulla (Vallon, 2016). Regarding the vascular structure, the vasa recta is the capillary network responsible for supplying oxygen to the renal medulla. However, oxygen in this region diffuses into the renal interstitium, leaving the outer medulla deficient in oxygen and forced to continue tubular transport in a near hypoxic state (Heyman et al., 2008). This is an unfavorable situation given the high metabolic demands of the area (Vallon, 2016).



The expression of the GHRHR in vulnerable areas of the kidney might be an indication of a potential role different from its well-established neuroendocrine role in regulating GH synthesis and secretion. Some studies have investigated the expression and potential role of the GHRH receptor in other extra-pituitary tissues. For example, in the heart, GHRH-induced GHRHR is linked to cardiac cell protection by enhancing GHRHR receptor adenylyl cyclase-cAMP-protein kinase A signaling and promoting cardiac myocyte survival (Granata et al., 2009). Such as the kidney, the heart is an organ sensitive to ischemia because it can affect the muscle and reduce its ability to pump blood efficiently (Ahmed, 2019).

According to previous animal studies, the renal medulla is the region of the kidney that holds the highest concentration of GHRHR (Boisvert et al., 2002). We therefore expected similar results in the human kidney. In contrast, our data revealed a superior MFI in the renal cortex compared to the medulla. In the human genomic literature, the highest levels of GHRHR mRNA levels are found in the cortical region (Uhlén et al., 2015;Liao et al., 2020). Using a single cell RNA approach, the expression of GHRHR mRNA was more pronounced throughout the proximal tubule cells and more moderate in the ascending limbs of Henle's loop (Hansson et al., 2014;Karlsson et al., 2021). Furthermore, the structural organization of the proximal tubule allows the longest part to lie in the renal cortex (PCT) and the short part in the renal medulla (PST). By combining the cell expression and structural aspects of the proximal tubule mentioned in literature, this would explain our unexpected MFI values (Chevalier, 2016). It is also known in literature that we can observe a divergence between mRNA and protein expression results (Wegler et al., 2020).

The strength of this study lies in the fact that it is the first studies to explore the GHRH protein expression in the human kidney. With the exception of studies reporting the presence of the GHRHR mRNA levels in rodent kidneys, there are no findings in literature showing specific expression of the GHRH receptor immunoreactive protein across the different cell populations of the human kidney.

The study has, however, some limitations. First, as no specific CIC-Ka and CIC-Kb antibodies are available, a combined CIC-Ka/b antibody was used. This did not allow differentiating the thin from the thick ascending limb of Henle's loop in the renal medulla. Second, although a number of independent experiments were performed on serial sections of renal medulla and cortex, they were from a single person. Nonetheless, it allowed developing a reliable method of localization and quantification of the GHRHR in human kidney. This information is sufficiently important, in our view, to be accessible rapidly to the scientific community.

## **Conclusion**

In human kidney, GHRHR immunoreactivity was located in a specific region of the nephron. Its restricted presence in PST and mTAL, mainly found in the outer medulla, suggests a potential physiological role considering their sensitivity to hypoxic injuries.

According to our findings, the majority of GHRH receptor immunoreactivity (calculated MFI) is located in the cortex. The renal cortex is known to be the region of the kidney that adapts and recovers well to insults like ischemia and better than the medulla. This is mainly because the cortex uses nearly 90% of the kidney blood supply and is not in a constant state of near hypoxia due to the high oxygen supply and demand (Munshi et al., 2011). Therefore, the role of the GHRH receptor in the cortex may be related to maintaining the tissue integrity and not rescuing the kidney from damages such as we are suspecting in the medulla.

Clinically, it is known that ischemia-reperfusion injury is unavoidable in kidney transplantation. This type of insult exposes the graft to a multiple of outcomes such as delayed allograft function, chronic graft dysfunction or graft rejection (Salvadori et al., 2015). The mechanisms behind those outcomes caused by the ischemia-reperfusion injury are yet to be fully understood. Our results showed significant levels of GHRHR in regions of the kidney sensitive to ischemia/reperfusion injuries. Knowing the role of GHRHR in cell proliferation upon activation, further studies of the effect of GHRHR stimulation in ischemic kidneys should be explored. This would help determining the potential beneficial role of the receptor in graft survival following kidney transplantation.

## **Conflict of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## **Author Contributions**

PG and TN designed the research project. TN performed the experiments. TN analyzed the data and wrote the manuscript. PG reviewed and edited the manuscript. The authors approved the submitted version.

## **Funding**

This research was funded by a competitive grant from the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Center. T. Nami was the recipient of a studentship from the Biomedical Sciences, MSc, program, Faculty of Medicine, Université de Montréal.

## **Institutional Review Board Statement**

Ethical review and approval of this study were granted by the Research Ethics Committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Center (protocol number CM18026PGr).

## **Data Availability Statement**

The data presented in this study can be made available upon request to the corresponding author.

## **Acknowledgments**

The authors thank Dr. Jean-Baptiste Lattouf, urologist at the CHUM Research Center, for providing the human specimens and the technical assistance of the Molecular pathology platform of the CHUM Research Center.

## **Reference**

Ahmed N. Myocardial ischemia. *Pathophysiology of Ischemia Reperfusion Injury and Use of Fingolimod in Cardioprotection*. Published online 2019:41-56. doi:10.1016/b978-0-12-818023-5.00002-9

Andrini O, Keck M, Briones R, Lourdel S, Vargas-Poussou R, Teulon J. ClC-K chloride channels: emerging pathophysiology of Bartter syndrome type 3. *Am J. Physiol Renal Physiol.* 2015;308(12):F1324-F1334. doi:10.1152/ajprenal.00004.2015

Bachmann S., Metzger R., Bunnemann B. Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney. *Histochemistry.* 1990;94(5):517-523. doi:10.1007/BF00272616

Boisvert C. Localisation, régulation et fonction du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat. Thèse de doctorat, Université de Montréal; 2003 : 1-294

Boisvert C, Paré C, Veyrat-Durebex C, et al. Localization and regulation of a functional GHRH receptor in the rat renal medulla. *Endocrinology.* 2002;143(4):1475-1484. doi:10.1210/endo.143.4.8746

Brezis M., Rosen S. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N. Engl J. Med.* 1995;332(10):647-655. doi:10.1056/NEJM199503093321006

Chevalier RL. The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction. *Am J. Physiol Renal Physiol.* 2016;311(1):F145-F161. doi:10.1152/ajprenal.00164.2016

US Patent Application for Renoprotection by growth hormone-releasing hormone and agonists Patent Application (Application #20110021429 issued January 27, 2011) - Justia Patents Search. Justia.com. Published October 2008. Accessed March 28, 2023. <https://patents.justia.com/patent/20110021429>

Granata R., Trovato L., Gallo MP, et al. Growth hormone-releasing hormone promotes survival of cardiac myocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Cardiovasc Res.* 2009;83(2):303-312. doi:10.1093/cvr/cvp090.

Hansson J, Hultenby K, Cramnert C, et al. Evidence for a morphologically distinct and functionally robust cell type in the proximal tubules of human kidney. *Hum Pathol.* 2014;45(2):382-393. doi:10.1016/j.humpath.2013.10.003

Hara-Chikuma M., Verkman AS. Aquaporin-1 facilitates epithelial cell migration in kidney proximal tubule. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(1):39-45. doi:10.1681/ASN.2005080846

Heyman S.N., Khamaisi M., Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia response and the progression of chronic kidney disease. *Am J. Nephrol.* 2008;28(6):998-1006. doi:10.1159/000146075

Karlsson M, Zhang C, Méar L, et al. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv.* 2021;7(31):eabh2169. Published 2021 Jul 28. doi:10.1126/sciadv.abh2169

Lazarus J, Akiska Y, Perusina Lanfranca M, et al. Optimization, Design and Avoiding Pitfalls in Manual Multiplex Fluorescent Immunohistochemistry. *J. Vis Exp.* 2019;(149):10.3791/59915. Published 2019 Jul 26. doi:10.3791/59915

Liao J., Yu Z, Chen Y., et al. Single-cell RNA sequencing of human kidney. *Sci Data.* 2020;7(1):4. Published 2020 Jan 2. doi:10.1038/s41597-019-0351-8

Matsubara S., Sato M., Mizobuchi M., Niimi M., Takahara J. Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology.* 1995;136(9):4147-4150. doi:10.1210/endo.136.9.7649123

Mayo KE. Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol.* 1992;6(10):1734-1744. doi:10.1210/mend.6.10.1333056

Mayo KE, Miller TL, DeAlmeida V, Zheng J., Godfrey PA. The growth-hormone-releasing hormone receptor: signal transduction, gene expression, and physiological function in growth regulation. *Ann N. Y. Acad Sci.* 1996;805:184-203. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb17483.x

Munshi R., Hsu C., Himmelfarb J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury. *BMC Med.* 2011;9:11. Published 2011 Feb 2. doi:10.1186/1741-7015-9-11

Ray SC, Mason J., O'Connor PM. Ischemic Renal Injury: Can Renal Anatomy and Associated Vascular Congestion Explain Why the Medulla and Not the Cortex Is Where the Trouble Starts?. *Semin Nephrol.* 2019;39(6):520-529. doi:10.1016/j.semnephrol.2019.10.002

Salvadori M., Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant.* 2015;5(2):52-67. doi:10.5500/wjt.v5.i2.52

Shihan MH, Novo SG, Le Marchand SJ, Wang Y, Duncan MK. A simple method for quantitating confocal fluorescent images. *Biochem Biophys Rep.* 2021;25:100916. Published 2021 Feb 1. doi:10.1016/j.bbrep.2021.100916

Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M., et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220):1260419. doi:10.1126/science.1260419

Vallon V. Tubular Transport in Acute Kidney Injury: Relevance for Diagnosis, Prognosis and Intervention. *Nephron.* 2016;134(3):160-166. doi:10.1159/000446448

Wegler C, Ölander M, Wiśniewski JR, et al. Global variability analysis of mRNA and protein concentrations across and within human tissues. *NAR Genom Bioinform.* 2019;2(1):lqz010. Published 2019 Oct 30. doi:10.1093/nargab/lqz010

## **11. ARTICLE III : MINI-REVIEW**

STATUT DE PUBLICATION : Soumission prochaine à la revue *Frontiers in Physiology*

## OXIDATIVE STRESS IN THE RENAL MEDULLA FOLLOWING ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY

Tracy Nami<sup>1</sup> and Pierrette Gaudreau<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Neuroendocrinology of Aging, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Centre and department of medicine, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

\* **Correspondance:** Pierrette Gaudreau PhD, FCAHS, pierrette.gaudreau@umontreal.ca

**Keywords:** renal medulla, renal cortex, ischemia-reperfusion injury, acute kidney injury, oxidative stress

### Abstract

Ischemia-reperfusion injury (IRI) is known to play a key role in the pathogenesis of acute kidney injury (AKI). It is associated to an increase of oxidative stress (OS) and overproduction of reactive oxygen species (ROS). In addition, it is involved in the progression of chronic kidney disease by decreasing the organ antioxidant defences. The renal medulla has been reported to be the most affected by OS because of its susceptibility to ischemia-induced hypoxia. However, the present state of knowledge makes it difficult to establish the role and impact that OS has in the renal medulla following IRI. The objective of the present mini review is to outline our current understanding of OS mechanisms and biomarkers involved in renal IRI, in the renal medulla from the perspectives of both preclinical models and human studies.

### Introduction

Among the many functions of the kidney, the maintenance of the internal balance of salt, water, acid-base and excretion of waste products and toxins are crucial (Tarloff and Lash 2005). Moreover, the kidney is particularly vulnerable to injury due to the large quantity of blood filtered. Acute kidney injury (AKI) is a common clinical condition that occurs in the organ. It may have permanent consequences, such as chronic kidney disease (Chatauret, Badet et al. 2014). Interestingly, 41% of patients hospitalized with AKI showed a lack of recovery of their renal function before hospital discharge (Shiva, Sharma et al. 2020).



There are several causes related to AKI (e.g., sepsis, drug nephrotoxicity), however, the major cause to AKI is due to ischemia-reperfusion injury (IRI) (Abdelkader, Ho et al. 2014). Renal IRI can appear in the course of cardiopulmonary surgery, renal transplantation or partial nephrectomy (Parekh, Weinberg et al. 2013, Abdelkader, Ho et al. 2014). IRI affects many regulatory systems at the cell level such as changes in mitochondrial activity and cell membrane permeability and initiates apoptosis and necrosis (Salvadori, Rosso et al. 2015). The damage that occurs during IRI enhances the levels of oxidative stress in the organ. Interestingly, the processes behind the rapid progression of renal injury, such AKI following IRI and the sensitivity of certain renal cell types to injury is still not fully understood.

AKI studies using warm ischemia-reperfusion (WIR) animal models have shown that the tubular segments who are the most affected by renal IRI were in the renal medulla (Heyman, Gorelik et al. 2019). Recently, Evans et al. in 2020 have reported multiple reasons why the renal medulla is particularly sensitive to IRI hypoxia. The first reason is the diffusing oxygen shunting between the arteries and veins in the cortex and the vasa recta in the medulla. The second is the physiological need for low medullary blood flow, which facilitates urinary concentration. The last is related to the topography of the outer medulla, which limits oxygen delivery to the thick ascending limb of Henle's loop (TAL) (Evans, Smith et al. 2020).

Despite our understanding of the renal medulla in deleterious conditions, it is difficult to establish a clear relationship between the impact of renal IRI, the rise of OS levels and the biomarkers used to understand the dynamics of events. The aim of this mini review is therefore to outline our current understanding of the structural and cell mechanisms of IRI in the renal medulla and how it affects the regulation of known biomarkers in both animal models and human.

## **Renal Ischemia-Reperfusion Injury**

Renal IRI is a phenomenon taking place in two phases. First, the ischemia phase when the kidney blood flow is temporarily occluded. As a result, the supply of oxygen and nutrients to the organ is significantly reduced and the renal tissue becomes hypoxic. The renal ischemic time is a crucial component of IRI. The severity of the injury is directly related with the duration of ischemia (Kalogeris, Baines et al. 2012). It has a major impact on the renal functions, survival rate and long-

time effects of kidney diseases after IRI (Wang, Varner et al. 2012). In human kidney studies, a reduced risk of graft failure or rejection is observed 20-30 min after warm ischemia and at up to 24 h after cold ischemia. In the case of animal studies, minimal consequences were reported 30 min after warm ischemia and 27 h cold ischemia (Wang, Varner et al. 2012, Kamińska, Kościelska-Kasprzak et al. 2016). During ischemia, the kidney is the site of various cell injury mechanisms such as cell structure destabilization, inflammation, mitochondrial injury, OS, and loss of antioxidant defences (Chatauret, Badet et al. 2014). Second, the reperfusion phase when the blood flow returns to the kidney as well as oxygen and nutrients (Ow, Ngo et al. 2018). This last phase is known to exacerbate the initial cell injury mechanisms triggered by ischemia. The consequences of reperfusion include microvascular dysfunction, mitochondrial injury, DNA and protein damages and cell death (Chatauret, Badet et al. 2014). Upon reperfusion, the renal medulla appears to remain hypoperfused. Factors contributing to this are capillary obstruction resulting from an immune response, vasoconstriction, and loss of endothelial integrity (Bonventre and Yang 2011). Damage of the thick ascending limb and the proximal tubule in the outer medulla are mostly affected by the phenomenon (Ow, Ngo et al. 2018). Experiments using blood oxygen-dependent IRI have shown that 24 h after the return on blood flow, no evidence of hypoxia in the renal cortex and inner medulla were observed while signs of hypoxia were noticed in the outer medulla after only one hour of reperfusion. However, a study assessing renal tissue hypoxia at the cellular level using pimonidazole (i.e., nitroimidazole with hypoxic selectivity) has shown occasionally positive staining in renal cortex and consistent staining in the tubules located in the inner stripe of the outer medulla and the thin limbs of the Henle's loop in the inner medulla (Abdelkader, Ho et al. 2014).

## **Oxidative Stress**

Oxidative damage is one of the cell injury mechanisms that occur in the kidney during IRI. It is considered to have significant effects on ischemic tissues (McGarry, Binińska et al. 2018). Experimental models of IRI have shown that OS damage to the renal parenchyma is caused by reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species and the loss of antioxidant defence (Aragno, Cutrin et al. 2003, Huang, Zhang et al. 2021). ROS overproduction leads to the deregulation of the oxidant-antioxidant balance and affects the antioxidant defence mechanism.

The constant presence of ROS prolongs the state of OS in the kidney. An extended period in such a state has a multidimensional impact on tissue and organ functionality (Pavlakou, Dounousi et al. 2018). From a systemic perspective, high concentrations of ROS have been reported in cancer, neurodegenerative diseases, and chronic inflammation disorders (Brieger, Schiavone et al. 2012).

During an IRI, cessation of the arterial blood flow in the kidney will first shift the aerobic metabolism to an anaerobic metabolism which can only generate a minimal amount of energy (adenosine triphosphate (ATP)) to the highly demanding organ (Kosieradzki and Rowiński 2008). This is where OS starts. First, ATP production through lactate metabolism will lead to intracellular acidosis. In an attempt to correct the decreasing intracellular pH, the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger will pump protons out of the cell. As a result, Na<sup>+</sup> will accumulate inside the cell. Then, the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> antiporter will change direction and promote the entry of calcium in the cell and try to reach an equilibrium. However, the increasing levels of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> in the cell will provoke a mitochondrial calcium overload which is directly linked to mitochondrial ROS production (Chatauret, Badet et al. 2014). In a healthy kidney, the ROS production can easily be normalized with the help of the superoxidase dismutase (SOD), an enzyme eliminating free radicals. However, in deleterious condition, its activity and production are heavily disturbed (Kim, Seok et al. 2009, Fontecha-Barriuso, Lopez-Diaz et al. 2022). Even though ischemia triggers the ROS production, it is relatively small compared to the ROS production during reperfusion. The re-entry of oxygenated blood into ischemic tissue causes a burst of ROS generation while at the same time lowering the organ's antioxidant defence. Ultimately, we can observe a rise of DNA protein damage and as well as cell death (Nesovic Ostojic, Ivanov et al. 2021, Zou, Zhou et al. 2021). OS affects particularly the renal medulla and its tubules. It has been proposed that its inhibition could protect the kidney (Andrades, Ritter et al. 2011, Han, Jang et al. 2017).

## **Oxidative Damage of the Renal Medulla: Preclinical and Clinical Observations**

A characteristic of the kidney is the heterogeneity in terms of oxygenation. The renal parenchymal oxygenation is the highest in the cortex, moderate in the outer medulla and the lowest in the inner medulla and papilla (Kalogeris, Baines et al. 2012). Indeed, different oxygenation levels are

required for different tasks. For example, low oxygenation levels are needed in the inner medulla in order to maintain a high osmolarity gradient and concentrate urine (Chou, Porush et al. 1990). As for oxygenation, in deleterious kidney conditions, the renal response can also be heterogenous. All kidney cells respond to hypoxic conditions, but are not equally sensitive (Kalogeris, Baines et al. 2012). It was reported that the epithelial cells of the outer medulla are the most susceptible to ischemia as they operate on the verge of anoxia under normal conditions and have a high metabolic rate in order to fulfill their reabsorption functions. These characteristics make the outer medulla a prime target for IRI (Brezis and Rosen 1995). Despite the differences observed in the different regions of the kidney, in deleterious condition, all renal cells will ultimately face one of three distinct fates after IRI: recovery, apoptosis, necrosis. A number of factors are required for the recovery to happen such as growth factors, cell cycle regulators and mesenchymal stem cells (El Sabbahy and Vaidya 2011). Necrosis and apoptosis are also happening during abnormal tissue repair (Bonventre and Yang 2011).

## **Oxidative Stress Impact in the Outer Medulla**

Two segments of the nephron are present in the outer medulla: the proximal straight tubule (PST) and the medullary thick ascending limbs (mTAL) of Henle's loop. The main function of the renal medulla is to regulate the concentration of the urine (Song and Yosypiv 2012). Thus, it requires high oxygen delivery to maintain the oxidative ATP production needed for tubular transport (Ray, Mason et al. 2019). Although parts of PST and mTAL are present in the cortex, the initial injury observed in IRI is much more evident in the medulla, where extensive tubular necrosis can be found (Bonventre and Yang 2011, Heyman, Gorelik et al. 2019). Studies have shown that the outer medulla is an important structure in the pathogenesis of IRI (Brezis and Rosen 1995, Evans, Smith et al. 2020).

### **Proximal Tubule**

The proximal tubule is a major component of the nephron and is responsible for the reabsorption of most of the glomerular ultrafiltrate and for the secretory and reabsorption transport of many solutes that regulate fluid balance and acid-base regulation (Nakhoul and Batuman 2011). They are also one of the main sites of ROS production due to high mitochondrial density and the high

energy demands required to support their reabsorption of important solute (Mandel 1985). Consequently, it makes the proximal tubule cells susceptible to OS damage and cell death, contributing to the kidney disease progression. The accumulation of injured proximal tubule cells has consequence on tubular regeneration, and which further contributes to the renal dysfunctions after IRI (Khan, Wang et al. 2020, Schaub, Venkatachalam et al. 2021).

During IRI, the unbalanced production of ROS reduces sodium reabsorption in the proximal tubule. Histological studies have shown that it is due to the loss of important proteins such as Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase and the loss brush border (Gailit, Colflesh et al. 1993, Zuk, Bonventre et al. 1998). A disruption in the cell-to-cell interaction at adherent and tight junctions can also be observed as well as mitochondrial swelling (Molitoris, Dahl et al. 1992, Bonventre 2003, El Sabbahy and Vaidya 2011). However, segments of the nephron downstream from the proximal tubule compensate for the lack of sodium reabsorption.

A number of studies have shown that the proximal tubule is an important site of IRI using specific tissue injury biomarkers. The kidney injury molecule-1 (KIM-1) is a urinary biomarker to detected AKI in both animal models and humans. It is only expressed on the apical surface of the proximal tubules and is up regulated in the injured renal tissue (Han, Bailly et al. 2002, Vaidya, Ozer et al. 2010, Song, Yu et al. 2019). The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) which is up-regulated following IRI is another biomarker used to assess the severity of kidney injury in both animal and human urine (Vaidya, Ferguson et al. 2008). Even though NGAL is produced in the distal nephron and many other organs, it is filtered and reabsorbed in the proximal tubule (Bonventre and Yang 2011). NGAL has been proposed to play an important role in the protection of the proximal tubule. NGAL has inhibitory effects on apoptosis, promotes cell proliferation and provide a protection in murine models of renal IRI (Mishra, Mori et al. 2004, Mori, Lee et al. 2005).

### **Medullary Thick Ascending Limb of the Henle's Loop**

Overall, compared to the mTAL, the PST is more prone to IRI since it has lower capability of producing energy through anaerobic metabolism when mitochondrial function is limited and oxygen availability reduced (Bagnasco, Good et al. 1985, Bonventre 2003). Thus, the mTAL cells are better equipped to adapt to the increased hypoxia that characterizes ischemia. Furthermore,

in the mTAL segment, Na<sup>+</sup> reabsorption is expected to increase during periods of OS because of reduced reabsorption in the proximal tubules. However, this dynamic does not last. A progressive decline in solute reabsorption and inability to concentrate urine, due to morphological changes caused by OS, prolongs ischemia and excessive ROS production and exposure (Ross 1978, Woroniecki, Ferdinand et al. 2003).

Morphological changes in the mTAL include cast formation, mitochondrial swelling, nuclear pyknosis and complete cellular disruption (Brezis, Rosen et al. 1984). Ischemic damage was found the least severe in the most superficial third of the mTAL, near its transition to the cortical TAL, and the most severe and consistent, very close to the inner medulla. Both in animal models and human renal biopsies, the mTAL cells are exposed to casts formation and vascular congesting following IRI (Brezis, Rosen et al. 1984, Owji, Nikeghbal et al. 2018).

The Tamm-Horsfall protein (THP), exclusively expressed in the mTAL, was reported to protect the kidney from inflammation and toll-like receptor 4 expression during ischemic injuries (El-Achkar, Wu et al. 2008). Although the role of THP in kidney ischemic injuries is not fully understood yet, its absence appears to have a possible negative effect, by promoting inflammation and tubular necrosis (El-Achkar, Wu et al. 2008, Belcher and Parikh 2019). It is also used as a non-invasive urinary biomarker to assess kidney injury and damage in clinical settings (Bachmann 2018). In addition to THP protection, the marked increased in ERK pathway activation, the production of antiapoptotic Bcl-2 protein and reparative growth factors in the distal tubular cells, act synergistically to minimize cell death. This might explain the resistance to ischemic injury in the adjacent segment of the distal tubule, the mTAL (di Mari, Davis et al. 1999, Gobé, Zhang et al. 2000, Gobe and Johnson 2007).

## **Oxidative Stress Impact in the Inner Medulla**

The thin descending and ascending limbs (tDL and tAL) of the Henle's loop play different essential roles in the kidney. The tDL is a structure that is very permeable to water and moderately permeable to Na<sup>+</sup> and urea. In contrast, the thin ascending limb has an extremely low permeability to water and an extremely high permeability to Cl<sup>-</sup> (Mejia and Wade 2002). Together, these functions are essential to concentrate urine.

Unfortunately, information on thin limbs and ischemia renal injuries are extremely limited, particularly for tAL. However, a histological study using a rat model of IRI showed the presence of casts and obstruction in both thin limbs of Henle (Mason et al., 1984). Furthermore, tDL cells have demonstrated similar morphological changes to mTAL cells following ischemic injuries (i.e., mitochondrial swelling, cell fragmentation, and impaired transport activity) (Kopolovic, Brezis et al. 1989). In human biopsy studies, no tubular injury was observed in the thin limbs. However, the presence of intratubular casts throughout the inner medulla was observed as well as signs of congestion due to the no-reflow phenomenon (Sutton, Fisher et al. 2002, Basile, Anderson et al. 2012).

Compared to the tubules present in the outer medulla, there's no known effective biomarker used in thin limbs to assess the renal damage following IRI. According to De Oliveira et al. studies, IRI would only target the outer medulla whereas extracellular fluid volume depletion, known to happen in cases of AKI, seems to target predominately in the inner medulla (Desanti De Oliveira, Xu et al. 2019).

## **Clinical Perspective**

In clinical settings, OS is usually measured through plasma or serum, which provides stable environments for evaluating specific biomarkers or medullary health. In addition to blood, other body fluids can be used such as saliva and urine (Gyurászová, Gurecká et al. 2020). Saliva could indicate levels of superoxide dismutase or nitric oxide, while urine provides an indication of medullary health considering its importance in urine concentration ability. Despite the increasing understanding of OS markers, it is still difficult to find a relevance in the establishment of a clinical diagnostic (Frijhoff, Winyard et al. 2015).

Apart from biomarkers, studies are currently undertaken to identify novel molecular targets to better predict the outcome of enhanced levels of OS. It would also be important to explore therapeutic ways to prevent renal medulla function from failure. Potential treatments include scavenging ROS, reducing inflammation, increasing cell regeneration, or ischemia preconditioning, taking advantage of the kidney ability to be preconditioned by a nonlethal period of ischemia (Dirnagl, Simon et al. 2003, Kinsey, Huang et al. 2010).

Indeed, the control of the ROS generation systems such as the NADPH oxidase, nitric oxide synthase and xanthine oxidase systems can be exploited as novel interventions (Wu, Yiang et al. 2018). A recent study has reported that the use of a xanthine oxidase inhibitor would have a beneficial consequence. It would promote ATP recovery and exert renoprotective effects (Fujii, Kubo et al. 2019). Findings from Fan et al. in 2012 have shown that with an ischemia preconditioning plan (i.e., 6 min of warm ischemia followed by 4 min of reperfusion) would significantly reduce the renal adhesion molecule and the serum creatinine in the rodent kidney (Fan, He et al. 2012).

In conclusion, the renal medulla is still a misunderstood microenvironment. Its optimal functioning is crucial for the normal physiology of the entire organ. The renal medulla does not make it easy for the kidney to protect itself from external insults such as IRI. It supports that the renal medulla is a major contributor to the pathogenesis of warm/cold IRI and AKI.

## **Conflict of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## **Authors' Contributions**

PG planned the review. TN and PG reviewed the literature. TN analyzed the data and wrote the manuscript. PG reviewed and edited the manuscript. Both authors contributed to the article and approved the submitted version.

## **Funding and Acknowledgments**

This research was funded by a competitive grant from the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal Research Center. T. Nami was the recipient of a studentship from the Biomedical Sciences, MSc, program, Faculty of Medicine, Université de Montréal.

## **References**

Abdelkader A., Ho J, Ow CP et al. Renal oxygenation in acute renal ischemia-reperfusion injury. *Am J. Physiol Renal Physiol.* 2014;306(9):F1026-F1038. doi:10.1152/ajprenal.00281.2013



Andrades M., Ritter C, de Oliveira MR, Streck EL, Fonseca Moreira JC, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment reverses organ failure in rat model of sepsis: role of antioxidant enzymes imbalance, neutrophil infiltration, and oxidative stress. *J. Surg Res.* 2011;167(2):e307-e313. doi:10.1016/j.jss.2009.08.005

Aragno M, Cutrin JC, Mastrocola R, et al. Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: attenuation by dehydroepiandrosterone. *Kidney Int.* 2003;64(3):836-843. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00152.x

Bachmann S. A novel role for Tamm-Horsfall protein (uromodulin) in the renal tubule. *Kidney Int.* 2018;94(4):652-655. doi:10.1016/j.kint.2018.06.023

Bagnasco S., Good D, Balaban R., Burg M. Lactate production in isolated segments of the rat nephron. *Am J. Physiol.* 1985;248(4 Pt 2):F522-F526. doi:10.1152/ajprenal.1985.248.4.F522

Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol.* 2012;2(2):1303-1353. doi:10.1002/cphy.c110041

Belcher JM, Parikh CR. Acute Kidney Injury Diagnostics and Biomarkers. *Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation.* Published online 2019:713-724.e5. doi:10.1016/b978-0-323-52978-5.00047-1

Bonventre JV. Molecular response to cytotoxic injury: role of inflammation, MAP kinases, and endoplasmic reticulum stress response. *Semin Nephrol.* 2003;23(5):439-448. doi:10.1016/s0270-9295(03)00115-3

Bonventre J.V., Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4210-4221. doi:10.1172/JCI45161

Brezis M., Rosen S. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N. Engl J. Med.* 1995;332(10):647-655. doi:10.1056/NEJM199503093321006

Brezis M., Rosen S, Silva P., Epstein FH. Selective vulnerability of the medullary thick ascending limb to anoxia in the isolated perfused rat kidney. *J. Clin Invest.* 1984;73(1):182-190. doi:10.1172/JCI111189

Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13659. Published 2012 Aug 17. doi:10.4414/smw.2012.13659

Chatauret N, Badet L, Barrou B, Hauet T. Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury. *Prog Urol.* 2014;24 Suppl 1:S4-S12. doi:10.1016/S1166-7087(14)70057-0.

Chou SY, Porush JG, Faubert PF. Renal medullary circulation: hormonal control. *Kidney Int.* 1990;37(1):1-13. doi:10.1038/ki.1990.1

Desanti De Oliveira B, Xu K, Shen TH, et al. Molecular nephrology: types of acute tubular injury. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(10):599-612. doi:10.1038/s41581-019-0184-x

di Mari JF, Davis R., Safirstein RL. MAPK activation determines renal epithelial cell survival during oxidative injury. *Am J. Physiol.* 1999;277(2):F195-F203. doi:10.1152/ajprenal.1999.277.2.F195

Dirnagl U., Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 2003;26(5):248-254. doi:10.1016/S0166-2236(03)00071-7

El Sabbahy M., Vaidya VS. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2011;3(5):606-618. doi:10.1002/wsbm.133

El-Achkar TM, Wu XR, Rauchman M., McCracken R, Kiefer S., Dagher PC. Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TLR4 expression. *Am J. Physiol Renal Physiol.* 2008;295(2):F534-F544. doi:10.1152/ajprenal.00083.2008

Evans RG, Smith DW, Lee CJ, Ngo JP, Gardiner BS. What Makes the Kidney Susceptible to Hypoxia?. *Anat Rec (Hoboken).* 2020;303(10):2544-2552. doi:10.1002/ar.24260

Fan LH, He L, Cao ZQ, Xiang B, Liu L. Effect of ischemia preconditioning on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Int Braz J Urol.* 2012;38(6):842-854. doi:10.1590/1677-553820133806842

Fontecha-Barriuso M, Lopez-Diaz AM, Guerrero-Mauvecin J, et al. Tubular Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Progression of Chronic Kidney Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(7):1356. Published Jul 12, 2022. doi:10.3390/antiox11071356

Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(14):1144-1170. doi:10.1089/ars.2015.6317

Fujii K, Kubo A, Miyashita K, et al. Xanthine oxidase inhibitor ameliorates postischemic renal injury in mice by promoting resynthesis of adenine nucleotides. *JCI Insight*. 2019;4(22):e124816. Published Nov 14, 2019. doi:10.1172/jci.insight.124816

Gailit J, Colflesh D, Rabiner I, Simone J, Goligorsky MS. Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress. *Am J Physiol*. 1993;264(1 Pt 2):F149-F157. doi:10.1152/ajprenal.1993.264.1.F149

Gobé G, Zhang XJ, Willgoss DA, Schoch E, Hogg NA, Endre ZH. Relationship between expression of Bcl-2 genes and growth factors in ischemic acute renal failure in the rat. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(3):454-467. doi:10.1681/ASN.V113454

Gobe GC, Johnson DW. Distal tubular epithelial cells of the kidney: Potential support for proximal tubular cell survival after renal injury. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(9):1551-1561. doi:10.1016/j.biocel.2007.04.025

Gyurászová M, Gurecká R, Bábíčková J, Tóthová L. Oxidative Stress in the Pathophysiology of Kidney Disease: Implications for Noninvasive Monitoring and Identification of Biomarkers. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:5478708. Published Jan 23, 2020. doi:10.1155/2020/5478708

Han SJ, Jang H.S., Noh MR, et al. Mitochondrial NADP<sup>+</sup>-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Deficiency Exacerbates Mitochondrial and Cell Damage after Kidney Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(4):1200-1215. doi:10.1681/ASN.2016030349

Han WK, Bailly V., Abichandani R., Thadhani R., Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*. 2002;62(1):237-244. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x

Heyman SN, Gorelik Y, Zorbavel D, et al. Near-drowning: new perspectives for human hypoxic acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2020;35(2):206-212. doi:10.1093/ndt/gfz016

Huang R., Zhang C., Wang X, Hu H. PPAR $\gamma$  in Ischemia-Reperfusion Injury: Overview of the Biology and Therapy. *Front Pharmacol*. 2021;12:600618. Published Apr 28, 2021. doi:10.3389/fphar.2021.600618

Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229-317. doi:10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7

Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, Chudoba P, et al. The influence of warm ischemia elimination on kidney injury during transplantation - clinical and molecular study. *Sci Rep*. 2016;6:36118. Published Nov 3, 2016. doi:10.1038/srep36118.

Khan MA, Wang X, Giuliani K.T.K., et al. Underlying Histopathology Determines Response to Oxidative Stress in Cultured Human Primary Proximal Tubular Epithelial Cells. *Int J. Mol Sci*. 2020;21(2):560. Published 2020 Jan 15. doi:10.3390/ijms21020560

Kim J., Seok Y.M., Jung K.J., Park KM. Reactive oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice. *Am J. Physiol Renal Physiol*. 2009;297(2):F461-F470. doi:10.1152/ajprenal.90735.2008

Kinsey GR, Huang L, Vergis AL, Li L, Okusa MD. Regulatory T cells contribute to the protective effect of ischemic preconditioning in the kidney. *Kidney Int*. 2010;77(9):771-780. doi:10.1038/ki.2010.12

Koplovic J, Brezis M, Spokes K, Silva P, Epstein F, Rosen S. The vulnerability of the thin descending limbs of Henle's loop in the isolated perfused rat kidney. *Am J Kidney Dis*. 1989;14(1):25-30. doi:10.1016/s0272-6386(89)80089-7

Kosieradzki M, Rowiński W. Ischemia/reperfusion injury in kidney transplantation: mechanisms and prevention. *Transplant Proc*. 2008;40(10):3279-3288. doi:10.1016/j.transproceed.2008.10.004

Mandel LJ. Metabolic substrates, cellular energy production, and the regulation of proximal tubular transport. *Annu Rev Physiol.* 1985;47:85-101. doi:10.1146/annurev.ph.47.030185.000505

Mason J., Torhorst J., Welsch J. Role of the medullary perfusion defect in the pathogenesis of ischemic renal failure. *Kidney Int.* 1984;26(3):283-293. doi:10.1038/ki.1984.171

McGarry T, Biniiecka M., Veale DJ, Fearon U. Hypoxia, oxidative stress and inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2018;125:15-24. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.042

Mejia R., Wade JB. Immunomorphometric study of rat renal inner medulla. *Am J. Physiol Renal Physiol.* 2002;282(3):F553-F557. doi:10.1152/ajprenal.00340.2000

Mishra J, Mori K, Ma Q, et al. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(12):3073-3082. doi:10.1097/01.ASN.0000145013.44578.45

Molitoris BA, Dahl R., Geerdes A. Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase during ischemia. *Am J Physiol.* 1992;263(3 Pt 2):F488-F495. doi:10.1152/ajprenal.1992.263.3.F488

Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J. Clin Invest.* 2005;115(3):610-621. doi:10.1172/JCI23056

Nakhoul N., Batuman V. Role of proximal tubules in the pathogenesis of kidney disease. *Contrib Nephrol.* 2011;169:37-50. doi:10.1159/000313944

Nesovic Ostojic J, Ivanov M, Mihailovic-Stanojevic N, et al. Hyperbaric Oxygen Preconditioning Upregulates Heme OxyGenase-1 and Anti-Apoptotic Bcl-2 Protein Expression in Spontaneously Hypertensive Rats with Induced Postischemic Acute Kidney Injury. *Int J. Mol Sci.* 2021;22(3):1382. Published 2021 Jan 30. doi:10.3390/ijms22031382

Ow CPC, Ngo JP, Ullah MM, Hilliard LM, Evans RG. Renal hypoxia in kidney disease: Cause or consequence?. *Acta Physiol (Oxf).* 2018;222(4):e12999. doi:10.1111/apha.12999

Owji S.M., Nikeghbal E., Moosavi SM. Comparison of ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury by clamping renal arteries, veins or pedicles in anaesthetized rats. *Exp Physiol.* 2018;103(10):1390-1402. doi:10.1113/EP087140

Parekh DJ, Weinberg JM, Ercole B, et al. Tolerance of the human kidney to isolated controlled ischemia. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(3):506-517. doi:10.1681/ASN.2012080786

Pavlaou P., Dounousi E., Roumeliotis S., Eleftheriadis T., Liakopoulos V. Oxidative Stress and the Kidney in the Space Environment. *Int J. Mol Sci.* 2018;19(10):3176. Published 2018 Oct 15. doi:10.3390/ijms19103176

Ray SC, Mason J., O'Connor PM. Ischemic Renal Injury: Can Renal Anatomy and Associated Vascular Congestion Explain Why the Medulla and Not the Cortex Is Where the Trouble Starts?. *Semin Nephrol.* 2019;39(6):520-529. doi:10.1016/j.semnephrol.2019.10.002

Ross BD. The isolated perfused rat kidney. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1978;55(6):513-521. doi:10.1042/cs0550513

Salvadori M., Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant.* 2015;5(2):52-67. doi:10.5500/wjt.v5.i2.52

Schaub JA, Venkatachalam MA, Weinberg JM. Proximal Tubular Oxidative Metabolism in Acute Kidney Injury and the Transition to CKD. *Kidney360.* 2020;2(2):355-364. Published 2020 Dec 22. doi:10.34067/KID.0004772020

Shiva N, Sharma N, Kulkarni YA, Mulay SR, Gaikwad AB. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models. *Life Sci.* 2020;256:117860. doi:10.1016/j.lfs.2020.117860

Song J, Yu J, Prayogo GW, et al. Understanding kidney injury molecule 1: a novel immune factor in kidney pathophysiology. *Am J. Transl Res.* 2019;11(3):1219-1229. Published 2019 Mar 15.

Song R, Yosypiv IV. Development of the kidney medulla. *Organogenesis.* 2012;8(1):10-17. doi:10.4161/org.19308

Sutton TA, Fisher CJ, Molitoris BA. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2002;62(5):1539-1549. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00631.x

Rodriguez F., Cohen F., Ober C.K., Archer L. Toxicology of the Kidney. Tarloff J.B., Lash LH, eds. Published online December 28, 2004. doi:10.1201/9780203646991

Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:463-493. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094615

Vaidya VS, Ozer JS, Dieterle F, et al. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol.* 2010;28(5):478-485. doi:10.1038/nbt.1623

Wang HJ, Varner A., AbouShwareb T, Atala A., Yoo JJ. Ischemia/reperfusion-induced renal failure in rats as a model for evaluating cell therapies. *Ren Fail.* 2012;34(10):1324-1332. doi:10.3109/0886022X.2012.725292

Woroniecki R., Ferdinand JR., Morrow JS, Devarajan P. Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia. *Am J. Physiol Renal Physiol.* 2003;284(2):F358-F364. doi:10.1152/ajprenal.00100.2002

Wu MY, Yiang GT, Liao W.T., et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46(4):1650-1667. doi:10.1159/000489241

Zou G., Zhou Z, Xi X., Huang R., Hu H. Pioglitazone Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury via Inhibition of NF- $\kappa$ B Activation and Inflammation in Rats. *Front Physiol.* 2021;12:707344. Published 2021 Jul 19. doi:10.3389/fphys.2021.707344

Zuk A., Bonventre J.V., Brown D., Matlin KS. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. *Am J. Physiol.* 1998;275(3):C711-C731. doi:10.1152/ajpcell.1998.275.3.C711

## **12. DISCUSSION**



Les résultats de ce projet de recherche ont permis d'atteindre les trois objectifs de départ, à savoir : 1) localiser et quantifier le *GHRHR* rénal, ainsi que des marqueurs de dommages oxydatifs, chez le rat jeune en bonne santé ou soumis à une IR chaude, 2) localiser et quantifier les populations cellulaires rénales exprimant le *GHRHR* dans le tissu humain sain post-mortem (cortex, médulla) et 3) analyser l'état actuel des connaissances et de la compréhension de la relation entre les mécanismes cellulaires de l'IR dans la médulla rénale et la régulation de biomarqueurs connus chez l'homme et dans des modèles animaux.

Chez le rat, l'étude de colocalisation de l'immunofluorescence du *GHRHR* avec celle de l'aquaporine-1 indiquent que le *GHRHR* est exprimé au niveau des trois segments du tubule proximal (S1, S2 et S3). Ensuite, l'étude de colocalisation de l'immunofluorescence du *GHRHR* avec celle de la protéine Tamm Horsfall et celle du canal chlore, ont mis en évidence que le *GHRHR* est exprimé spécifiquement dans le tubule proximal et le tubule de l'anse de Henlé ascendante mince et épaisse. De plus, l'analyse de l'intensité moyenne de l'immunofluorescence a permis de déterminer que la région rénale possédant le plus haut niveau de détection de *GHRHR* est la BEME. Dans cette région, nous retrouvons le tubule proximal droit (le segment S3) et l'anse de Henlé ascendante épaisse, deux tubules exprimant le *GHRHR*.

Chez l'humain, l'étude de colocalisation de l'immunofluorescence du *GHRHR* suggère que le *GHRHR* est exprimé au niveau du TPC, TPD, *cTAL* et *mTAL* uniquement. Contrairement aux résultats obtenus chez le rat, l'analyse de l'intensité moyenne de fluorescence révèle que le cortex rénal renferme des niveaux de *GHRHR* supérieurs à ceux de la médulla. Il est possible que le niveau d'expression du *GHRHR* rénal humain soit plus élevé au niveau du tubule proximal contourné comparativement à celui du rein de rat. Considérant que les deux tiers du tubule proximal se trouvent dans le cortex rénal, il est plausible que le niveau d'expression du *GHRHR* par cellule y soit supérieur.

Il convient de mentionner la différence qui réside entre les présents niveaux d'immunofluorescences du *GHRHR* et ceux d'ARNm déjà publiés (4, 9). Tout d'abord, par RT-PCR, les résultats d'expressions géniques de Matsubara et collaborateurs (1995) indiquent que les niveaux d'ARNm du *GHRHR* seraient les plus élevés dans la médulla et le bassinet (4). Ensuite, par

essai de protection à la ribonucléase, les résultats de Boisvert et collaborateurs (2002) montrent que c'est au niveau des cellules de l'anse de Henlé, dans la zone médullaire, que l'on retrouve les niveaux d'ARNm du GHRHR les plus élevés (9). Le cortex et le bassinot exprimant des niveaux faibles et très faibles de transcrits du *GHRHR*, respectivement (9). Il en est de même des niveaux de transcrits du *GHRHR* dans les vaisseaux sanguins et du tube collecteur médullaire (87).

Toutefois, selon nos résultats, même si le *GHRHR* est exprimé de manière régio-spécifique et importante dans la médulla rénale, les analyses quantitatives mettent en évidence que c'est dans le cortex que les niveaux d'immunoréactivité du *GHRHR* sont les plus élevés. Ce phénomène est observé chez le rat et l'humain.

La différence entre les niveaux d'ARNm et de protéine immunoréactive du GHRHR n'est pas synonyme de la non-validité des présents résultats ou de ceux déjà publiés. La technique de la RT-PCR, ou de protection à la ribonucléase, mesure la quantité d'ARNm alors que l'immunofluorescence identifie le niveau de protéine du GHRHR. Dans la littérature, il est rapporté qu'une discordance peut exister entre les résultats d'immunofluorescence et ceux de RT-PCR (94). À titre d'exemple, une étude a comparé les résultats d'immunofluorescence et de RT-PCR chez des patients atteints de cancer du poumon. Une absence de corrélation entre les niveaux d'ARNm et de protéine pour différents gènes/protéines dont le *Breast cancer type 1 susceptibility protein* (BRCA1) a été démontrée. En effet, la technique d'immunofluorescence serait plus efficace puisqu'elle posséderait des capacités discriminantes supérieures à la RT-PCR (95).

À l'opposé, une étude du niveau de sensibilité de détection du virus du papillome humain dans le carcinome oral à cellules squameuses propose que ce soit la RT-PCR qui possède la meilleure sensibilité pour la détection et le diagnostic comparativement à l'immunofluorescence (96). Ainsi, la sensibilité des différents outils de détections de l'ARNm d'une protéine par opposition à ceux de la protéine elle-même, de même que le type et la taille des cellules étudiées, pourraient donner lieu à des discordances.

Chez les mammifères, la médulla externe est connue pour être particulièrement sensible à toute insulte aboutissant en une hypoxie (97). En effet, ces segments du système tubulaire sont soumis

à des niveaux d'oxygénation très bas, causés par une forte activité de transport actif et des demandes métaboliques élevées. Cependant, une différence importante entre ces deux tubules est le fait que l'anse de Henlé ascendante épaisse est beaucoup plus résistante en situation hypoxique comparativement au segment S3 du tubule proximal (TPD). Sa meilleure résistance à l'hypoxie provient de sa meilleure capacité à produire de l'énergie par métabolisme anaérobie (98). En effet, lorsque les apports en oxygène diminuent d'une manière importante, il y a suspension du métabolisme aérobie. Ce tubule peut s'adapter en produisant l'énergie dont il a besoin par la glycolyse, qui ne requiert pas d'oxygène. Les conséquences de l'utilisation de ce mécanisme sont la production importante d'acide lactique qui contribue à la baisse de pH dans le système tubulaire et à une augmentation des effets négatifs dans le cas d'une insulte rénale aiguë causée par l'IR (99). Dans une étude animale de Shanley et collaborateurs, l'étude des conséquences de l'hypoxie dans les différents segments du tubule proximal permet de constater que le segment S3, exclusivement présent dans la BEME, est le plus sensible aux différents dommages cellulaires (100).

Chez le rat, l'expression du biomarqueur *KIM-1*, détectant les dommages cellulaires dans le tubule proximal, est supérieure dans le tubule proximal se retrouvant dans la BEME (TPD) comparativement au tubule proximal se retrouvant dans le cortex (TPC). De plus, la fluorescence des fragments d'ADN (*Click-iT Plus TUNEL*) se retrouve au même endroit. La détection de *KIM-1* et de fragments d'ADN permet d'évaluer l'étendue des dommages causés par une insulte rénale telle que l'IR. Ainsi, le *GHRHR* rénal serait exprimé à plus hauts niveaux dans la région du rein qui est considérée comme étant la plus sensible aux insultes rénales et à l'hypoxie.

Suite à une IR, une perte significative des niveaux de *GHRHR* immunoréactif est observée dans le parenchyme rénal. Cette diminution se manifeste au niveau du nombre de cellules immunoréactives et au niveau de l'intensité de fluorescence observée (MFI). Elle peut s'expliquer par l'étendue de dommages dans le système tubulaire, causée par l'IR. Des études histopathologiques du rein de rat ont montré une dégénération du cytoplasme, de l'inflammation, une dilation et atrophie des tubules, la formation de précipité protéique et de la nécrose (101). Ce sont des phénomènes cellulaires qui mènent à la destruction et à la diminution des cellules viables dans le rein qui peuvent exprimer le *GHRHR*. Au-delà de la perte de signal

immunofluorescent du *GHRHR*, durant une IR, il est possible de tirer certains constats en utilisant des marqueurs d'apoptose, soit la caspase-3 active, une caspase exécutive, et la caspase-9 active, une caspase initiateur. Selon nos résultats, l'intensité moyenne d'immunofluorescence de la caspase-3 active dans les cellules du système tubulaire est élevée dans les régions rénales où se retrouvent le tubule proximal et l'anse de Henlé ascendante épaisse. Dans une étude de Wichipoon et collaborateurs, une surexpression de la caspase-3 active, à la suite d'une insulte rénale aiguë chez le rat, se produit dans les cellules du tubule distal, proximal et collecteur (102). Nos études de localisation du *GHRHR* dans le rein de rat ont permis d'observer une perte importante dans le tubule proximal, l'une des régions où la caspase-3 active apparaît être surexprimée en conditions délétères.

En ce qui concerne la caspase-9 active, le niveau de ce marqueur est plus abondant dans les cellules de la médulla rénale. Doke et collaborateurs ont mis en évidence une augmentation d'expression de l'ARNm de la caspase-9 dans le tubule proximal de souris et d'humain, en situation physiopathologique comme l'IR rénale (103). Dans notre étude, les niveaux immunoréactifs des caspase-3 et caspase-9 actives se retrouvent dans les mêmes tubules rénaux que ceux du *GHRHR*. Ainsi, suite à une IR, nous pouvons postuler que la diminution de *GHRHR* immunoréactif est vraisemblablement causée en partie par l'augmentation de mécanismes cellulaires liés à l'apoptose.

Suite à une ischémie chaude de 50 min, suivie d'une reperfusion de 24 h, l'initiation des dommages apoptotiques semble débiter au niveau du cortex et progresser jusqu'à la MI. La poursuite du processus apoptotique semble se produire au niveau du cortex et de la médulla externe, plus précisément la BEME où se retrouve le tubule proximal. Avec les marqueurs utilisés pour la détermination de la localisation du *GHRHR* immunoréactif, il est possible d'observer, avec les résultats d'IF, qu'il y a aussi une modulation négative de l'expression de ces marqueurs suite à une IR puisqu'ils sont colocalisés dans les mêmes régions. La diminution des niveaux de détection semble affecter toutes les structures où tous les marqueurs sont exprimés. Cependant, la plus grande diminution apparaît toujours affecter le cortex et la médulla externe. En revanche, dans l'ensemble, il n'est pas possible de savoir si la modulation des niveaux de *GHRHR* immunoréactifs se produit au même moment que les marqueurs cellulaires (*AQP-1*, *THP* et *CIC-*

K1/2) que nous avons utilisés dans l'étude. Comme l'étude a été faite uniquement à 24 h post-reperfusion, il n'est pas possible de statuer définitivement sur la dynamique des événements cellulaires. Une évaluation des niveaux de détection de tous les marqueurs étudiés dans cette étude, incluant le *GHRHR*, devra être réalisée à des temps plus courts, soit 2 et 12 h, pour déterminer si le phénotype *GHRHR* est perdu avant celui d'autres protéines connues pour leur rôle important dans l'homéostasie rénale.

Même si l'expression du *GHRHR* rénal est régulée négativement suite à l'IR, sa stimulation de façon précoce par l'administration de GHRH exogène, c'est-à-dire avant que les cellules rénales soient trop endommagées, pourrait avoir un effet protecteur dans le rein. Dans une étude chez des rats jeunes et en bonne santé, soumis à une diète riche en NaCl causant un stress oxydant, Gaudreau et collaborateurs ont montré que l'activation quotidienne du *GHRHR* rénal, provoquée par une administration sous-cutanée quotidienne de GHRH pourrait avoir un effet protecteur (10). En effet, dans les cellules de l'anse de Henlé, une augmentation de contenu en ADN nucléaire et mitochondrial a été observée (87). Ces résultats étaient différents de ceux de groupes témoins non traités au *GHRH* qui ont subi les conséquences connues d'un contexte physiopathologique menant à une augmentation de stress oxydant, de dommages aux macromolécules essentielles ( e.g. protéines, lipides, ADN) et d'apoptose (104). Un effet cardioprotecteur a également été mis en évidence *in vitro* dans des cardiomyocytes de rats, suite à un traitement au *GHRH*, et *in vivo* suite à une administration exogène de GHRH à des rats ayant subi un infarctus du myocarde (105, 106).

Lors de transplantation rénale ou de néphrectomie totale ou partielle, les dommages rénaux sont inévitables. Les IR chaudes et froides avec transplantation ont toutes deux des effets délétères sur les fonctions rénales et les risques de rejet du greffon (107). Il sera donc important d'établir si l'activation du *GHRHR* rénal peut jouer un rôle protecteur dans ces situations délétères. Une stimulation et une activation du *GHRHR* rénal avant ou au moment de l'ischémie chaude ou froide pourraient avoir les mêmes effets bénéfiques que ceux rapportés ci-dessus. Elles pourraient potentiellement protéger ou rescaper certaines populations cellulaires rénales et aider le rein à maintenir son intégrité fonctionnelle (105).

Une autre étude a mis en évidence qu'une administration d'un superagoniste du GHRH permettait une amélioration significative de certains indicateurs de fonction rénale, comme les niveaux sanguins de créatinine et d'urée chez des porcs Yorkshire femelles, atteintes d'une insuffisance rénale chronique (108). L'activation du GHRHR rénal par le GHRH ou un agoniste pourrait donc avoir un effet bénéfique dans des conditions délétères tel que la transplantation rénale.

La mini-revue de la littérature incluse dans ce mémoire a permis d'obtenir une meilleure compréhension des dommages que l'augmentation des niveaux de stress oxydant peut provoquer dans une zone sensible aux altérations comme la médulla rénale, plus précisément, la partie externe. Le stress oxydant est l'élément déclencheur de plusieurs mécanismes cellulaires qui sont souvent nocifs pour un organe comme le rein (109). Selon les présents résultats, l'IR qui augmente le stress oxydant conduit à une dérégulation de différents biomarqueurs comme les caspase-3 et caspase-9 actives, à l'augmentation de la fragmentation de l'ADN et à l'augmentation des niveaux d'apoptose dans les différentes populations cellulaires et micro-environnements rénaux.

La mini-revue de la littérature a également facilité l'analyse des résultats expérimentaux de ce mémoire et mis en évidence le besoin important de futures études sur le rôle du *GHRHR* rénal, compte tenu du peu de données dans la littérature en contexte de stress oxydant élevé dans la médulla rénale. La mini-revue s'est aussi avérée une source de réflexion et d'explications potentielles concernant les résultats du présent mémoire, qu'ils soient en accord ou en désaccord avec la littérature. Finalement, cette revue a permis de mettre en lumière les limitations du projet de recherche en lien avec certains résultats contradictoires.

Dans son ensemble, les résultats de recherche obtenus dans le cadre du présent mémoire fournissent les premières informations de localisation et de niveau d'expression du *GHRHR* immunoreactif dans le rein de rat et d'humain sain. Ces données constituent une avancée scientifique prometteuse concernant l'élucidation des mécanismes impliqués dans le rôle protecteur du *GHRHR* dans les organes extrahypophysaires en conditions oxydantes délétères.

## **13. CONCLUSION**

Malgré le fait que ce projet de recherche se soit concentré sur un sujet où les études sont très limitées, et en utilisant des méthodes expérimentales et d'analyses robustes, il a permis de mettre en évidence pour la première fois des résultats sur la localisation et les niveaux d'expression du *GHRHR* dans les différentes régions et dans les différentes populations cellulaires rénales. Il a également permis de mettre en évidence qu'en situation pathologique, soit l'IR, que l'expression de ce récepteur d'intérêt est affectée. La quantification des marqueurs de dommages liés au stress oxydant (régulation des caspases 3 et 9 activées, dommage à l'ADN) a permis d'évaluer l'étendue des dommages que l'IR peut causer au tissu rénal et les altérations d'expression du *GHRHR* causées par cette condition délétère.

La poursuite de ce projet devrait prioriser des études de modulation de l'expression du *GHRHR*, et des marqueurs rénaux permettant sa colocalisation, à des temps différents de reperfusion tant en IR chaude qu'en IR froide suivie d'une transplantation. Selon les résultats, des études de traitement au *GHRH* permettraient d'estimer le potentiel de cette approche néoprotectrice dans un contexte préclinique.

Dans le rein humain, les prochaines étapes seraient d'étudier le tissu rénal provenant de rejet de greffon, afin d'évaluer si le type de donneur ou le délai post-mortem influence la régulation de l'expression du *GHRHR*. La localisation et quantification de l'expression du *GHRHR* et d'un panel de marqueurs liés au dommage oxydant, dans ce contexte physiopathologique, permettrait de comparer ces résultats avec ceux obtenus chez le rat ayant subi une IR chaude ou une IR froide suivie d'une greffe. Ces résultats permettraient également de mieux évaluer l'importance de futures études concernant le rôle néoprotecteur potentiel du *GHRHR* dans le rein, suite à une stimulation du récepteur par le *GHRH* ou un peptidomimétique du *GHRH* rénospcifique.



## **14. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Kolakowski LF. GCRDb: a G-protein-coupled receptor database. *Receptors & Channels*. 1994;2(1):1-7.
2. Ishihara T, Nakamura S, Kaziro Y, Takahashi T, Takahashi K, Nagata S. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *The EMBO Journal*. 1991;10(7):1635-41.
3. Harmar AJ. Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biology*. 2001;2(12):3013.1-10.
4. Matsubara S, Sato M, Mizobuchi M, Niimi M, Takahara J. Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology*. 1995;136(9):4147-50.
5. Mayo KE. Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. 1992:1734-44.
6. Castro AVB, Melmed S. Growth Regulation: Clinical Aspects of GHRH. *Encyclopedia of Hormones*: Elsevier; 2003. p. 226-34.
7. Horikawa R, Gaylinn BD, Lyons CE. Molecular Cloning of Ovine and Bovine Growth Hormone-Releasing Hormone Receptors: The Ovine Receptor Is C-Terminally Truncated. *Endocrinology*. 2001;142(6):2660-8.
8. Morel G, Gallego R, Boulanger L, Pintos E. Restricted Presence of the Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor to Somatotropes in Rat and Human Pituitaries. *Neuroendocrinology*. 1999;70:128-36.
9. Boisvert C, Pare C, Veyrat-Durebex C, Robert A, Dubuisson S, Morel GR, et al. Localization and Regulation of a Functional GHRH Receptor in the Rat Renal Medulla. *Endocrinology*. 2002;143(4):1475-84.
10. Gaudreau P, Theriault K, Bedard J, Boisvert C, inventeurs; Pierrette Gaudreau, Karyne Theriault, Julie Bedard, Chantale Boisvert, cessionnaire. Renoprotection by growth hormone-releasing hormone and agonists US20110021429A1. 2011-01-27 2011.
11. Servier. Servier Medical Art (licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License) : 2018 ; . Disponible: [smart.servier.com](http://smart.servier.com)

12. Corazzini V, Salvatori R. Molecular and Clinical Aspects of GHRH Receptor Mutations. Dans: Maghnie M, Loche S, Cappa M, Ghizzoni L, Lorini R, rédacteurs. *Endocrine Development*. Basel: S. KARGER AG; 2013. p. 106-17.
13. DeAlmeida VI, Mayo KE. Identification of binding domains of the growth hormone-releasing hormone receptor by analysis of mutant and chimeric receptor proteins. *Mol Endocrinol*. 1998;12(5):750-65.
14. Martari M, Salvatori R. Chapter 3 Diseases Associated with Growth Hormone - Releasing Hormone Receptor (GHRHR) Mutations. *Progress in Molecular Biology and Translational Science: Academic Press*; 2009. p. 57-84.
15. Cunha SR, Mayo KE. Growth Hormone-Releasing Hormone (GHRH) and the GHRH Receptor. *Encyclopedia of Hormones: Elsevier*; 2003. p. 216-26.
16. Mayo K, Miller T, Dealmeida V, Godfrey P, Zheng J, Cunha S. Regulation of somatotroph cell by GHRH and its receptor. *Recent progress in hormone research*. 2000;55:237-66; discussion 66.
17. Mayo KE, Miller TL, DeALMEIDA V, Zheng J, Godfrey PA. The Growth-Hormone-Releasing Hormone Receptor: Signal Transduction, Gene Expression, and Physiological Function in Growth Regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;805(1):184-202.
18. Rice AM, Rivkees SA. CHAPTER 2 - Receptor Transduction of Hormone Action. Dans: Sperling MA, rédacteur. *Pediatric Endocrinology (Third Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2008. p. 26-73.
19. Kublaoui B, Levine MA. CHAPTER 3 - Receptor transduction pathways mediating hormone action. Dans: Sperling MA, rédacteur. *Pediatric Endocrinology (Fourth Edition)*: W.B. Saunders; 2014. p. 34-89.e2.
20. Murray RA, Maheshwari HG, Russell EJ, Baumann G. Pituitary Hypoplasia in Patients with a Mutation in the Growth hormone-releasing Hormone Receptor Gene. *American Society of Neuroradiology*. 2000;21:685-9.
21. Low MJ. Chapter 7 - Neuroendocrinology. Dans: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, rédacteurs. *Williams Textbook of Endocrinology (Thirteenth Edition)*. Thirteenth Edition<sup>e</sup> éd. Philadelphia: Elsevier; 2016. p. 109-75.

22. Godfrey P, Rahal JO, Beamer WG, Copeland NG, Jenkins NA, Mayo KE. GHRH receptor of little mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nature Genetics*. 1993;4(3):227-32.
23. Billestrup N, Swanson LW, Vale W. Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986;83(18):6854-7.
24. Zhou F, Zhang H, Cong Z, Zhao L-H, Zhou Q, Mao C, et al. Structural basis for activation of the growth hormone-releasing hormone receptor. *Nature Communications*. 2020;11(1):5205.
25. Gaylinn BD. Molecular and cell biology of the growth hormone-releasing hormone receptor. *Growth Hormone & IGF Research*. 1999;9:37-44.
26. Lumpkin MD, McDonald JK. Blockade of Growth Hormone-Releasing Factor (GRF) Activity in the Pituitary and Hypothalamus of the Conscious Rat with a Peptidic GRF Antagonist\*. *Endocrinology*. 1989;124(3):1522-31.
27. Sperling M. *Pediatric Endocrinology*. 3<sup>e</sup> éd: Saunders-Elsevier; 2008.
28. Gurevich E, Segev Y, Landau D. Growth Hormone and IGF1 Actions in Kidney Development and Function. *Cells*. 2021;10(12). Epub 20211130.
29. Averaimo S, Nicol X. Intermingled cAMP, cGMP and calcium spatiotemporal dynamics in developing neuronal circuits. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:376. Epub 20141113.
30. Lin-Su K, Wajnrajch MP. Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) and the GHRH Receptor. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2002;3(4):313-23.
31. Gaylinn BD, von Kap-Herr C, Golden WL, Thorner MO. Assignment of the Human Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor Gene (GHRHR) to 7p14 by in Situ Hybridization. *Genomics*. 1994;19(1):193-5.
32. Wajnrajch MP, Chua SC, Green ED, Leibel RL. Human growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) maps to a YAC at Chromosome 7p15. *Mammalian Genome*. 1994;5(9):595.
33. Miller TL, Godfrey PA, DeAlmeida VI, Mayo KE. The Rat Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor Gene: Structure, Regulation, and Generation of Receptor Isoforms with Different Signaling Properties. *Endocrinology*. 1999;140(9):4152-65.

34. Bédard K, Robinette K, Ferland G, Gaudreau P. Effects of long-term dietary interventions on pituitary growth hormone-releasing hormone receptor in aging rats and potential mechanisms of action. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2010;131(3):169-78.
35. DeAlmeida VI, Mayo KE. The growth hormone-releasing hormone receptor. *Vitamins & Hormones*: Elsevier; 2001. p. 233-76.
36. Mayo KE, Miller T, DeAlmeida V, Godfrey P, Zheng J, Cunha SR. Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. *Recent Progress in Hormone Research*. 2000;55:237-66; discussion 66-67.
37. Miller TL, Mayo KE. Glucocorticoids Regulate Pituitary Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression. 1997;138(6):2456-65.
38. Miller TL, Mayo KE. Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*. 1997;138(6):2458-65.
39. Lam KSL, Lee MF, Tam SP, Srivastava G. Gene Expression of the Receptor for Growth-Hormone-Releasing Hormone Is Physiologically Regulated by Glucocorticoids and Estrogen. *Neuroendocrinology*. 1996;63(6):475-80.
40. Adams JM, Otero-Corchon V, Hammond GL, Veldhuis JD, Qi N, Low MJ. Somatostatin Is Essential for the Sexual Dimorphism of GH Secretion, Corticosteroid-Binding Globulin Production, and Corticosterone Levels in Mice. *Endocrinology*. 2015;156(3):1052-65.
41. Petersenn S, Schulte HM. Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitamins & Hormones*: Elsevier; 2000. p. 35-69.
42. Miki N, Ono M, Murata Y, Ohsaki E, Tamitsu K, Ri T, et al. Thyroid Hormone Regulation of Gene Expression of the Pituitary Growth Hormone-Releasing Factor Receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1995;217(3):1087-93.
43. Korytko AI, Cuttler L. Thyroid hormone and glucocorticoid regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression. *Journal of Endocrinology*. 1997;152(2):R13-R7.
44. Carroll RG. Renal System and Urinary Tract. *Elsevier's Integrated Physiology*: Elsevier; 2007. p. 117-37.

45. Cullen-McEwen L, Sutherland MR, Black MJ. The Human Kidney. *Kidney Development, Disease, Repair and Regeneration*: Elsevier; 2016. p. 27-40.
46. Paediatric Nephrology: Proceedings of the Sixth International Symposium of Paediatric Nephrology Hannover, Federal Republic of Germany, 29th August — 2nd September 1983. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1984 1984.
47. Tarloff JB, Lash LH. *Toxicology of the kidney*. Boca Raton: CRC Press; 2005 2005.
48. Wei G, Rosen S, Dantzer WH, Pannabecker TL. Architecture of the human renal inner medulla and functional implications. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2015;309(7):F627-F37.
49. Wallace MA. Anatomy and Physiology of the Kidney. *AORN Journal*. 1998;68(5):799-820.
50. Kriz W. Structural organization of the renal medulla: comparative and functional aspects. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1981;241(1):R3-R16.
51. Koeppe BM, Stanton BA. *Renal Physiology*. 2013:258.
52. Kaufman DP, Basit H, Knohl SJ. *Physiology, Glomerular Filtration Rate*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

53. Murray I, Paolini MA. *Histology, Kidney and Glomerulus*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

54. Murray I PM. *Histology, Kidney and Glomerulus*. : StatPearls; 2022 ; . Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554544/>
55. Christov M, Alper SL. Tubular transport: core curriculum 2010. *Am J Kidney Dis*. 2010;56(6):1202-17. Epub 20101030.
56. Geering K. FXFD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(2):F241-50.
57. Xie JX, Li X, Xie Z. Regulation of renal function and structure by the signaling Na/K-ATPase. *IUBMB Life*. 2013;65(12):991-8. Epub 20131210.

58. Cui S, Mata L, Maunsbach AB, Christensen EI. Ultrastructure of the Vacuolar Apparatus in the Renal Proximal Tubule Microinfused in vivo with the Cytological Stain Light Green. *Nephron Experimental Nephrology*. 1998;6(4):359-67.
59. Pannabecker TL. Structure and Function of the Thin Limbs of the Loop of Henle. Dans: Terjung R, rédacteur. *Comprehensive Physiology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. p. c110019.
60. Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, Levinsky NG. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among the S1, S2, and S3 segments. *Kidney Int*. 1978;14(1):31-49.
61. Kriz W, Kaissling B. Structural Organization of the Mammalian Kidney. *Seldin and Giebisch's The Kidney*. 2008;1:479-563.
62. Doucet A, Katz AI, Morel F. Determination of Na-K-ATPase activity in single segments of the mammalian nephron. *Am J Physiol*. 1979;237(2):F105-13.
63. El-Achkar TM, Dagher PC. Tubular cross talk in acute kidney injury: a story of sense and sensibility. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;308(12):F1317-23. Epub 20150415.
64. Gordon Betts J, Project BCOT, Bccampus, OpenStax C. *Anatomy & physiology*. Houston Texas ;[Victoria]: OpenStax College Rice University ;BCcampus BC Open Textbook Project; 2013 2013.
65. Curry JN, Yu ASL. Paracellular calcium transport in the proximal tubule and the formation of kidney stones. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2019;316(5):F966-f9. Epub 20190306.
66. Horita S, Nakamura M, Suzuki M, Satoh N, Suzuki A, Homma Y, et al. The role of renal proximal tubule transport in the regulation of blood pressure. *Kidney Res Clin Pract*. 2017;36(1):12-21.
67. Rajkumar P, Pluznick JL. Acid-base regulation in the renal proximal tubules: using novel pH sensors to maintain homeostasis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2018;315(5):F1187-F90.
68. Haas JA, Granger JP, Knox FG. Effect of renal perfusion pressure on sodium reabsorption from proximal tubules of superficial and deep nephrons. *Am J Physiol*. 1986;250(3 Pt 2):F425-9.

69. Chen L, Clark JZ, Nelson JW, Kaissling B, Ellison DH, Knepper MA. Renal-Tubule Epithelial Cell Nomenclature for Single-Cell RNA-Sequencing Studies. *J Am Soc Nephrol*. 2019;30(8):1358-64. Epub 20190628.
70. Pannabecker TL, Abbott DE, Dantzler WH. Three-dimensional functional reconstruction of inner medullary thin limbs of Henle's loop. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2004;286(1):F38-F45.
71. Bankir L, Figueres L, Prot-Bertoye C, Bouby N, Crambert G, Pratt JH, et al. Medullary and cortical thick ascending limb: similarities and differences. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2020;318(2):F422-F42.
72. Greger R, Schlatter E. Properties of the basolateral membrane of the cortical thick ascending limb of Henle's loop of rabbit kidney. A model for secondary active chloride transport. *Pflugers Arch*. 1983;396(4):325-34.
73. Hackenthal E, Paul M, Ganten D, Taugner R. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. *Physiol Rev*. 1990;70(4):1067-116.
74. Brezis M, Rosen S, Silva P, Epstein FH. Transport activity modifies thick ascending limb damage in the isolated perfused kidney. *Kidney International*. 1984;25(1):65-72.
75. Kaissling B, Le Hir M. Distal tubular segments of the rabbit kidney after adaptation to altered Na- and K-intake. I. Structural changes. *Cell Tissue Res*. 1982;224(3):469-92.
76. Piepenhagen PA, Nelson WJ. Differential expression of cell-cell and cell-substratum adhesion proteins along the kidney nephron. *Am J Physiol*. 1995;269(6 Pt 1):C1433-49.
77. Konrad M, Schlingmann KP, Gudermann T. Insights into the molecular nature of magnesium homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(4):F599-605.
78. Lang F, Capasso G, Schwab M, Waldegger S. Renal tubular transport and the genetic basis of hypertensive disease. *Clin Exp Nephrol*. 2005;9(2):91-9.
79. Valaiyapathi B, Ashraf AP. Chapter 18 - Endocrine hypertension in children. Dans: Pappachan JM, Fernandez CJ, rédacteurs. *Endocrine Hypertension*: Academic Press; 2023. p. 277-92.
80. Muto S. Potassium Transport in the Mammalian Collecting Duct. *Physiological Reviews*. 2001;81(1):85-116.



81. Imai M, Yoshitomi K. Electrophysiological study of inner medullary collecting duct of hamsters. *Pflügers Archiv*. 1990;416(1):180-8.
82. Holthöfer H, Schulte BA, Pasternack G, Siegel GJ, Spicer SS. Three distinct cell populations in rat kidney collecting duct. *Am J Physiol*. 1987;253(2 Pt 1):C323-8.
83. Hansell P, Welch WJ, Blantz RC, Palm F. Determinants of kidney oxygen consumption and their relationship to tissue oxygen tension in diabetes and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40(2):123-37.
84. Owji SM, Nikeghbal E, Moosavi SM. Comparison of ischaemia–reperfusion-induced acute kidney injury by clamping renal arteries, veins or pedicles in anaesthetized rats. *Experimental Physiology*. 2018;103(10):1390-402.
85. Molitoris BA. Low-Flow Acute Kidney Injury: The Pathophysiology of Prerenal Azotemia, Abdominal Compartment Syndrome, and Obstructive Uropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2022;17(7):1039-49.
86. Heyman SN, Khamaisi M, Rosen S, Rosenberger C. Renal Parenchymal Hypoxia, Hypoxia Response and the Progression of Chronic Kidney Disease. *American Journal of Nephrology*. 2008;28(6):998-1006.
87. Boisvert C. Localisation, régulation et fonction du récepteur rénal du facteur de libération de l'hormone de croissance chez le rat Montréal: Université de Montréal; 2003 [modifié le January 2003]; [294]. Disponible: <http://hdl.handle.net/1866/14767>
88. Kitiyakara C, Chabrashvili T, Chen Y, Blau J, Karber A, Aslam S, et al. Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(11):2775-82.
89. Grunenwald S, Tack I, Chauveau D, Bennet A, Caron P. Impact of growth hormone hypersecretion on the adult human kidney. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2011;72(6):485-95. Epub 20111117.
90. Kamenický P, Mazziotti G, Lombès M, Giustina A, Chanson P. Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor-1, and the Kidney: Pathophysiological and Clinical Implications. *Endocrine Reviews*. 2014;35(2):234-81.

91. Haffner D, Grund A, Leifheit-Nestler M. Renal effects of growth hormone in health and in kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2021;36(8):2511-30. Epub 20210618.
92. Bach LA, Hale LJ. Insulin-like growth factors and kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2015;65(2):327-36. Epub 20140821.
93. Podkowińska A, Formanowicz D. Chronic Kidney Disease as Oxidative Stress- and Inflammatory-Mediated Cardiovascular Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(8). Epub 20200814.
94. De P, Smith B, leyland-jones B. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing: Where Are We? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28:4289-92.
95. Vilmar A, Garcia-Foncillas J, Huarritz M, Santoni-Rugiu E, Sorensen JB. RT-PCR versus immunohistochemistry for correlation and quantification of ERCC1, BRCA1, TUBB3 and RRM1 in NSCLC. *Lung Cancer*. 2012;75(3):306-12.
96. Awan MS, Irfan B, Zahid I, Mirza Y, Ali SA. Comparison of Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemistry Assays for Analysing Human Papillomavirus Infection in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(6):Xc10-xc3. Epub 20170601.
97. Evans RG, Smith DW, Lee CJ, Ngo JP, Gardiner BS. What Makes the Kidney Susceptible to Hypoxia? *The Anatomical Record*. 2020;303(10):2544-52.
98. Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 1998;275(5):F623-F32.
99. Requião-Moura LR, Durão Junior MdS, Matos ACCd, Pacheco-Silva A. Ischemia and reperfusion injury in renal transplantation: hemodynamic and immunological paradigms. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13:129-35.
100. Shanley PF, Brezis M, Spokes K, Silva P, Epstein FH, Rosen S. Differential responsiveness of proximal tubule segments to metabolic inhibitors in the isolated perfused rat kidney. *Am J Kidney Dis*. 1986;7(1):76-83.
101. Williams P, Lopez H, Britt D, Chan C, Ezrin A, Hottendorf R. Characterization of renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 1997;37(1):1-7.

102. Wichapoon B, Punsawad C, Viriyavejakul P. Expression of cleaved caspase-3 in renal tubular cells in Plasmodium falciparum malaria patients. *Nephrology (Carlton)*. 2017;22(1):79-84.
103. Doke T, Huang S, Qiu C, Sheng X, Seasock M, Liu H, et al. Genome-wide association studies identify the role of caspase-9 in kidney disease. *Sci Adv*. 2021;7(45):eabi8051. Epub 20211105.
104. Banday AA, Muhammad AB, Fazili FR, Lokhandwala M. Mechanisms of Oxidative Stress-Induced Increase in Salt Sensitivity and Development of Hypertension in Sprague-Dawley Rats. *Hypertension*. 2007;49(3):664-71.
105. Granata R, Trovato L, Gallo MP, Destefanis S, Settanni F, Scarlatti F, et al. Growth hormone-releasing hormone promotes survival of cardiac myocytes in vitro and protects against ischaemia-reperfusion injury in rat heart. *Cardiovascular Research*. 2009;83(2):303-12.
106. Kanashiro-Takeuchi RM, Szalontay L, Schally AV, Takeuchi LM, Popovics P, Jaszberenyi M, et al. New therapeutic approach to heart failure due to myocardial infarction based on targeting growth hormone-releasing hormone receptor. *Oncotarget*. 2015;6(12):9728-39.
107. Kamińska D, Kościelska-Kasprzak K, Chudoba P, Hałoń A, Mazanowska O, Gomółkiewicz A, et al. The influence of warm ischemia elimination on kidney injury during transplantation – clinical and molecular study. *Scientific Reports*. 2016;6(1):36118.
108. Rieger AC, Bagno LL, Salerno A, Florea V, Rodriguez J, Rosado M, et al. Growth hormone-releasing hormone agonists ameliorate chronic kidney disease-induced heart failure with preserved ejection fraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021;118(4):e2019835118.
109. Aragno M, Cutrin JC, Mastrocola R, Perrelli M-G, Restivo F, Poli G, et al. Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: Attenuation by dehydroepiandrosterone. *Kidney International*. 2003;64(3):836-43.

