



CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Evaluación del efecto del ácido retinoico  
sobre la expresión y secreción de VEGF en  
las células mesoteliales del peritoneo de  
pacientes en diálisis”**

TESIS

Que presenta

**Q.F.B. BRENDA ABIGAIL MACIAS RAMÍREZ**

Para obtener el grado de

**MAESTRIA EN CIENCIAS  
EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

Director de la Tesis: Dr. José Luis Reyes Sánchez

México, D.F.

DICIEMBRE 2014

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	1
RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
I. La diabetes.....	6
II. El riñón .....	7
II.1 Insuficiencia Renal Crónica (IRC) .....	8
<i>II.1.1 Terapias de reemplazo</i> .....	8
<i>II.1.1.1 Trasplante renal</i> .....	8
<i>II.1.1.2 Hemodiálisis</i> .....	9
<i>II.1.1.3 Diálisis peritoneal (DP)</i> .....	10
III. Peritoneo.....	14
<i>III.1 Generalidades</i> .....	14
<i>III.2 Funciones</i> .....	16
IV. Modificaciones funcionales y estructurales del peritoneo durante la DP .....	18
<i>IV.1 Efecto de la DM en el deterioro peritoneal</i> .....	19
V. Bioincompatibilidad de los líquidos de diálisis.....	20
<i>V.1 Exposición a los LD</i> .....	20
<i>V.1.1 La Glucosa</i> .....	20
<i>V.1.2 Los productos de la degradación de la glucosa (GDPs) y el pH</i> ....	21
<i>V.1.3 Productos de glicosilación avanzada y su receptor</i> .....	21
VI. Transición epitelio-mesenquimal.....	22
VII. Transición mesotelio-mesenquimal .....	24
VIII. VEGF .....	25
<i>VIII.1 Funciones</i> .....	25
<i>VIII.2 Expresión de VEGF por la DP</i> .....	27
IX. Ácido retinoico .....	28

OBJETIVOS .....	33
Objetivo particular .....	33
Objetivos específicos .....	33
HIPÓTESIS .....	34
MATERIALES Y MÉTODOS .....	35
Declaraciones de ética .....	35
Pacientes.....	35
Anticuerpos y reactivos .....	36
Aislamiento y cultivo de células mesoteliales.....	36
Identificación de células mesoteliales .....	38
Inmunofluorescencia.....	38
Western Blot.....	38
Ensayo de producción de VEGF por las células mesoteliales.....	39
Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) .....	39
Análisis estadístico.....	40
RESULTADOS.....	41
Características de los pacientes .....	41
Características morfológicas de las CMPH .....	41
Los cultivos de CMPH de pacientes en DP expresaron más VEGF .....	42
Las CMPH expresaron citoqueratina 8/18 y no expresaron proteína específica de fibroblastos.....	43
Los cultivos de CMPH de pacientes expresaron Vimentina.....	44
Los cultivos de CMPH de pacientes en DP expresaron alfa actina de músculo liso. ....	45
La expresión de VEGF fue mayor en los pacientes en DP. ....	46
Las CMPH secretan mayoritariamente VEGF hacia la parte apical del cultivo, la cual es revertida por el tratamiento con ácido retinoico <i>all trans</i> . 47	
El tratamiento con ácido retinoico <i>all trans</i> disminuyó la RET en los cultivos de pacientes control y diabéticos. ....	49

El tratamiento con LD redujo la RET, y este efecto fue revertido con el ácido retinoico <i>all trans</i> en los cultivos de CMPH. ....	49
DISCUSIÓN .....	51
CONCLUSIONES .....	57
BIBLIOGRAFÍA .....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo de las funciones del riñón. <i>Fresenius medical care, 2014.</i> .....	7
Figura 2. Difusión de soluto y agua a través de la membrana peritoneal. <i>Baxter Healthcare Corporation Renal Division Education, 2014.</i> .....	11
Figura 3. Procedimiento esquematizado de la DP. <i>Baxter Healthcare Corporation Renal Division Education, 2014</i> .....	12
Figura 4. Prevalencia de diálisis peritoneal en diferentes países de Latinoamérica. <i>Pecoits-Filho et al., 2007.</i> .....	14
Figura 5. Localización y regiones del peritoneo. <i>Adaptado de Nessim et al., 2010.</i> ....	15
Figura 6. Imagen de microscopía de la morfología de las células mesoteliales. <i>Mutsaers, 2004</i> .....	15
Figura 7. Funciones de las células mesoteliales peritoneales. El mesotelio es una membrana dinámica que realiza diversas funciones: barrera de protección y superficie no adherente mediante la secreción de glicosaminoglicanos, transporte de fluidos y solutos, presentación antigénica, prevención de la adhesión y diseminación tumoral, y reparación de tejidos e inflamación. <i>Modificado de Mutsaers, 2004.</i> .....	17
Figura 8. Efecto de la DP en la morfología del peritoneo y en la expresión de marcadores. <i>Aroeira et al., 2007.</i> .....	19
Figura 9. Representación esquemática de una transición epitelio-mesénquima. La figura muestra los 4 pasos esenciales para que se produzca una completa EMT, mostrando los cambios en los marcadores más característicos de las células epiteliales y mesenquimales. $\alpha$ -SMA, alfa actina de músculo liso; ZO-1, zonula occludens-1. <i>Modificado de Aroeira L et al., 2007.</i> .....	24
Figura 10. Peritoneo en condiciones normales y de transición mesotelio-mesénquima. <i>Modificado Pérez-Lozano, et al., 2013.</i> .....	25
Figura 11. Expresión de VEGF y su receptor. Estructura e interacciones de VEGFs, VEGFRs y co-receptores neuropilinas (NRP). Los factores de crecimiento VEGF se unen a sus receptores con diferentes especificidades (indicado por las flechas). La unión de los ligandos diméricos de VEGF estimula la dimerización y la autofosforilación del	

receptor, que conduce al reclutamiento de moléculas de señalización. Los receptores de VEGF pueden dimerizar formando homodímeros o heterodímeros. <i>Modificado Ferrara, 2003.</i> .....	27
Figura 12. Fuente, almacenamiento y procesamiento del ácido retinoico. <i>Modificado Rhee et al., 2012.</i> .....	29
Figura 13. Síntesis del ácido retinoico a partir de retinol. . <i>Modificado Rhee et al., 2012.</i> .....	30
Figura 14. Esquema representativo de los grupos experimentales.....	35
Figura 15. Diseño de los experimentos. AR (ácido retinoico <i>all trans</i> ), LD (líquido de diálisis), ck-8/18 (citoqueratina 8/18), FSP-1 (proteína específica de fibroblastos), $\alpha$ -SMA (alfa actina de músculo liso), ZO-1 (zonula occludens-1) .....	37
Figura 16. Morfología de las CMPH; a) paciente control, b) paciente no diabético, c) paciente diabético.....	42
Figura 17. Expresión de VEGF; a) paciente control, b) paciente no diabético, c) paciente diabético.....	42
Figura 18. Expresión de citoqueratina 8/18 y de proteína específica de fobloblastos (FSP-1); a) paciente control, b) paciente no diabético, c) paciente diabético. ....	44
Figura 19. Expresión de vimentina; a) paciente control, b) paciente no diabético, c) paciente diabético.....	45
Figura 20. Expresión de alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA); a) paciente control, b) paciente no diabético, c) paciente diabético .....	45
Figura 21. La expresión de VEGF está aumentada en los pacinetes en DP y esta expresión disminuyó con el AR. ....	46
Figura 22. Secreción polarizada de VEGF en los cultivos tratados con ácido retinoico <i>all trans</i> y LD. ....	48
Figura 23. CMPH en pasaje 3 expuestas a A) 3 horas y B)12 horas de tratamiento con LD y AR. ....	48
Figura 24. CMPH en pasaje 3 expuestas a A) 3 horas de tratamiento con LD y AR. B) 48 horas de tratamiento con LD y AR.....	48
Figura 25. Efecto del ácido retinoico <i>all trans</i> en el crecientito de las monocapas..	49
Figura 26. Efecto de ácido retinoico <i>all trans</i> en los cultivos tratados con LD. ....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas del trasplante renal. <i>Baxter Healthcare Corporation Renal Division Education, 2014.</i> .....	9
Tabla 2. Ventajas y desventajas de la hemodiálisis. <i>Baxter Healthcare Corporation Renal Division Education, 2014.</i> .....	10

Tabla 3. Ventajas y desventajas de la DP. <i>Baxter Healthcare Corporation Renal Division Education</i> . .....	13
Tabla 4. Receptores para ácido retinoico. <i>Modificado Cambón et al., 1996</i> . .....	31
Tabla 5. Características clínicas de los pacientes del estudio. ....	41

# ABREVIATURAS

	Castellano	Inglés
•	<b>AGEs</b> Productos Finales de Glicosilación Avanzada	Advanced Glycation End Products
•	<b>AGEs</b> Productos Finales de Glicosilación Avanzada	Advanced Glycation End Products
•	<b>CAPD</b> Diálisis Peritoneal Continua Ambulatoria	Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis
•	<b>CMPH</b> Human Peritoneal Mesothelial Cells	Células Mesoteliales Peritoneales Humanas
•	<b>CMs</b> Células mesoteliales	Mesothelial Cells
•	<b>DP</b> Diálisis Peritoneal	Peritoneal Dialysis
•	<b>EGF</b> Factor de Crecimiento Epidermico	Epidermal Growth Factor
•	<b>EMT</b> Transición Epitelio Mesénquima	Epithelial to Mesenchymal Transition
•	<b>G-CSF</b> Factor Estimulante de Colonia de Granulocitos	Granulocyte Colony Stimulating Factor
•	<b>GDPs</b> Productos de Degradación de la Glucosa	Glucose Degradation Products
•	<b>GFR</b> Tasa de Filtración glomerular	Glomerular filtration Rate
•	<b>GRB-2</b> Proteína de Unión al Receptor del Factor de Crecimiento	Growth Factor Receptor-Bound Protein 2
•	<b>ICAM</b> Molécula de Adesión Intercelular	(Intercellular Adhesion Molecule
•	<b>IL-1 <math>\alpha</math></b> Interleucina-1 alfa	Interleukin-1 alpha
•	<b>IL-8</b> Interleucina-8	Interleukin-8
•	<b>IRC</b> Insuficiencia Renal Crónica	Chronic Renal Failure
•	<b>JNK</b> Cinasa c-Jun N-terminal	c-Jun N-terminal kinase
•	<b>LADA</b> Diabetes Autoinmune Latente en	Latent Autoimmune Diabetes

	Adultos	in Adults
• <b>LPS</b>	Lipopolisacárido	Lipopolysaccharide
• <b>MAPK/ERK</b>	Proteína Cinasa Activada por Mitógeno	Mitogen-activated protein kinase/Extracellular Signal Regulated Kinase
• <b>M-CSF</b>	Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos/Monocitos	Macrophage Colony Stimulating Factor
• <b>MMT</b>	Transición Epitelio Mesénquima	Mesothelial to Mesenchymal Transition
• <b>p38</b>	p38 Proteínas Cinasa Activada por Mitógeno	P38 Mitogen Activated Protein Kinase
• <b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3 cinasa	Phosphoinositide 3 kinase
• <b>RAR</b>	Receptor de Ácido Retinoico	Retinoic acid receptor
• <b>ROS</b>	Especies Reactivas de Oxígeno	Reactive Oxygen Species
• <b>RXR</b>	Receptor X retinoide	Retinoid X receptor
• <b>Shc</b>	Proteína que contiene el Dominio SH2	SH2 Domain Containing Protein
• <b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral	Tumor Necrosis Factor
• <b>VCAM</b>	Molécula de Adhesión Vascular	Vascular cell Adhesion Molecule
• <b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Alfa Actina de Músculo Liso	Alpha Smooth Muscle Actin.
• <b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de Crecimiento Transformante Beta	Transforming Growth Factor Beta-
• <b>RAGE</b>	Receptor de los Productos Finales de Glicosilación Avanzada	Advanced Glycation End Products Receptor
• <b>IL-6</b>	Interleucina-6	Interleukin-6
• <b>ZO-1</b>	Zonula Occludens-1	Zonula Occludens-1
• <b>PLGF</b>	Factor de Crecimiento Placentario	Placental Growth Factor
• <b>VEGF</b>	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular	Vascular Endothelial Growth Factor

- **VEGFR** Receptpr del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
- **Nrp** Neurofilina Neupilin

## RESUMEN

La diálisis peritoneal (DP), es la terapia más empleada en México para tratar la insuficiencia renal en estadios finales. Éste tipo de diálisis implica la continua exposición de la membrana peritoneal a líquidos de diálisis (LD) bioincompatibles que, pueden llevar a una falla de la ultrafiltración. En la disfunción peritoneal hay cambios estructurales, tales como la denudación de las células mesoteliales, la inflamación, la fibrosis tisular y la angiogénesis. Los LD empleados en la DP son hiperosmóticos, con alto contenido en glucosa, con un amortiguador de lactato y con pH ácido. Las altas concentraciones de glucosa y la esterilización de ésta dan lugar a la formación de productos de la degradación de la glucosa, que son tóxicos para las células mesoteliales. Asimismo, las glicosilaciones no enzimáticas de proteínas tisulares, dan lugar a la acumulación de productos de glicosilación avanzada. En este trabajo se estudia el efecto que tienen los LD sobre las células mesoteliales, la secreción de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), así como la función peritoneal. Uno de los mecanismos responsables de la fibrosis asociada a la DP es la transición mesotelio-mesenquimal (MMT) que sufren las células cuando son expuestas a los LD. Paralelamente, se producen vasculopatías y angiogénesis. VEGF es uno de los principales factores que participa en los procesos de angiogénesis y de deterioro funcional de la membrana peritoneal. Las células mesoteliales secretan VEGF en respuesta a diversos estímulos, sin embargo, no hay estudios que describan cual es el efecto de la diabetes en la expresión y secreción de VEGF. En el presente trabajo se describe la correlación entre la conversión mesenquimal de las células mesoteliales a través de la expresión de factores epiteliales (citoqueratina (ck 8/18)) y mesenquimales (alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), vimentina y proteína específica de fibroblastos (FSP-1). Además, los niveles de VEGF (en sobrenadantes y proteína total) y la funcionalidad peritoneal (midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (RET)). En este estudio se propone la utilización del ácido retinoco *all trans* (AR) como tratamiento en el deterioro del peritoneo. Considerando esto, se determinó su efecto en la expresión y secreción de VEGF en los cultivos de células mesoteliales de peritoneo humano de pacientes en diálisis peritoneal (CMPH).

## ABSTRACT

Peritoneal dialysis (DP) is the most widely used therapy in Mexico for the treatment of renal failure in advanced stages. However, the DP involves continuous exposure of the peritoneal membrane to bioincompatible dialysis fluids. Ultimately, can lead to failure of ultrafiltration. Peritoneal dysfunction is characterized by structural changes, such as denudation of mesothelial cells, inflammation, fibrosis and angiogenesis. Liquids used in peritoneal dialysis are hyperosmotic, with high glucose content, with acid pH and lactate. The high glucose concentration and its sterilization result in the formation of degradation products of glucose which are also toxic to the mesothelial cells. Also, the accumulation of advanced glycation end products. We study the effect of LD on secretion of VEGF (vascular endothelial growth factor vascular) and its effect on peritoneal function. One of the mechanisms responsible for the fibrosis associated with DP is peritoneal mesothelium-mesenchymal transition (MMT) that cells undergo when exposed to these fluids. According to these findings it is considered that the VEGF is a relevant factor involved in the functional deterioration of the peritoneal membrane. It was known that mesothelial cells secrete VEGF in response to various stimuli, however, there were not studies that describe the effect of diabetes on the expression and secretion of VEGF, in peritoneal human cells. We described the relationship between mesenchymal conversion of mesothelial cells through the expression of epithelial markers (cytokeratin (ck 8/18)) and epithelial-mesenchymal Transition (alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), vimentin and fibroblast specific protein (FSP-1). We also described levels of VEGF (in supernatants and total protein) and the possible relationship with peritoneal functionality, by measuring the transepithelial electrical resistance (TER). In this study the use of all trans retinoic acid (RA) is proposed as a treatment to prevent the deterioration of the peritoneum. Considering this, the effect on VEGF expression and secretion in cultured human peritoneal mesothelial cells in DP patients (CPMH) was determined. It was found that the all trans retinoic acid reduce the VEGF protein in the non diabetic and diab etic patients which were exposed to LD.

# INTRODUCCIÓN

## I. La diabetes

La diabetes es el término empleado para definir un conjunto de alteraciones heterogéneas del metabolismo en donde la principal característica es la hiperglicemia crónica. La causa de esta enfermedad es la falta de secreción de insulina o cuando los receptores para insulina al estar alterados no pueden captarla. La diabetes se clasifica en tres tipos principalmente: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 y diabetes gestacional.

Diabetes tipo 1: se presenta secundaria a la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas. Por lo tanto hay deficiencia de insulina, que usualmente es mediada por mecanismos inmunes y la diabetes autoinmune latente en adultos (LADA, por sus siglas en inglés) también es considerada dentro de esta clasificación.

Diabetes tipo 2: es una enfermedad metabólica caracterizada por altos niveles de glucosa en la sangre. En este tipo de diabetes existe una resistencia relativa a la insulina que se combina con una deficiente secreción de ésta.

La diabetes gestacional cursa con una disminución en la tolerancia a la glucosa, la cual aparece primero o es diagnosticada durante el embarazo, (Kerner et al., 2014).

La Diabetes Mellitus constituye la principal causa de Insuficiencia Renal Crónica (IRC) en adultos en nuestro país, (Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades, Práctica Médica Efectiva Insuficiencia Renal Crónica. (2000) Num. 6).

## II. El riñón

El riñón tiene como función conservar la homeostasis del medio interno con el mantenimiento de: el equilibrio electrolítico y el equilibrio ácido-base, las funciones hormonales y metabólicas, la desintoxicación sanguínea, el volumen sanguíneo y la presión arterial. Los continuos cambios en los solutos iónicos de la sangre (sodio, potasio, cloro, magnesio, calcio, fosfatos) generan cambios en el medio interno, que pueden llevar a la muerte si no son regulados. El riñón está encargado de filtrar y limpiar la sangre del organismo, extrae los productos tóxicos y de desecho (urea). De esa manera varía las concentraciones de solutos en sangre y elimina el exceso de líquido (*figura 1*). La formación de orina tiene lugar en las nefronas (unidades funcionales del riñón), a través de procesos de filtración, absorción y secreción que suceden en las distintas regiones de su anatomía. Cuando los riñones no son capaces de extraer las sustancias tóxicas del organismo, produce insuficiencia renal que puede ser crónica o aguda, (Botella, 2002, Koolman et al., 2004, NIDDK, 2006).

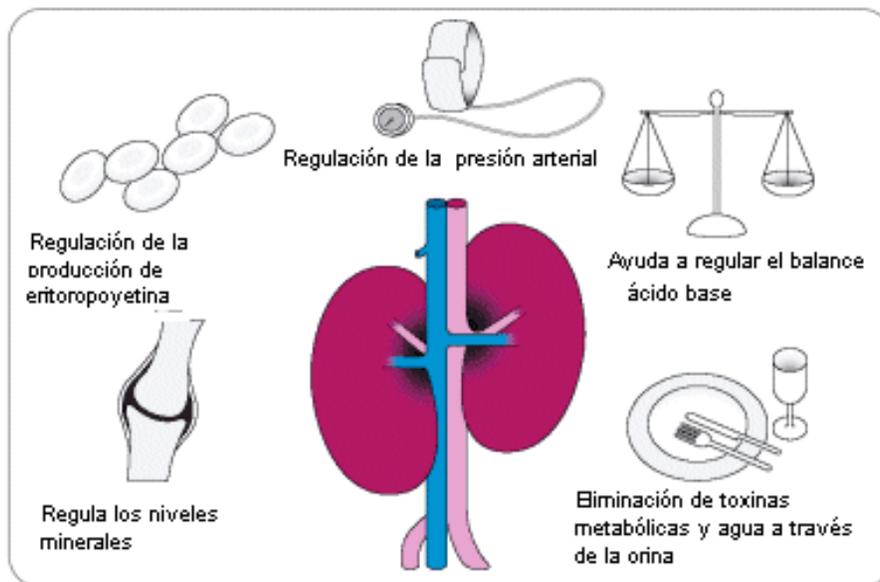


Figura 1. Esquema representativo de las funciones del riñón. *Fresenius medical care, 2014.*

## **II.1 Insuficiencia Renal Crónica (IRC)**

En la insuficiencia renal crónica hay deterioro funcional continuo del riñón que comienza cuando algunas nefronas pierden su función y finaliza cuando las nefronas restantes son incapaces de mantener la vida del paciente. La IRC se define como la pérdida progresiva, generalmente irreversible, de la tasa de filtración glomerular. En la IRC del humano, la reducción de la tasa de filtración glomerular es menor a 60mL/min/1.73 m<sup>2</sup> y se considera crónica cuando permanece durante tres meses o más. La enfermedad y su manejo se clasifican de acuerdo a los estadios de severidad de la enfermedad, los cuales son medidos con la tasa de filtración glomerular, albuminuria y el diagnóstico clínico, (Intiso, 2014).

La enfermedad renal está clasificada en 5 diferentes estadios con base en la GFR (tasa de filtración glomerular, por sus siglas en inglés): más de 90 mL/min por 1.73 m<sup>2</sup> (estadio 1), 60–89 mL/min por 1.73 m<sup>2</sup> (estadio 2), 30–59 mL/min por 1.73 m<sup>2</sup> (estadio 3), 15–29 mL/min por 1.73 m<sup>2</sup> (estadio 4), y menor a 15 mL/min per 1.73 m<sup>2</sup> (estadio 5).

Los factores de riesgo para la insuficiencia renal crónica son la edad, la hipertensión y la diabetes, (Intiso, 2014).

### ***II.1.1 Terapias de reemplazo***

Existen tres terapias de reemplazo para tratar la IRC: trasplante renal, hemodiálisis y diálisis peritoneal, (DP, Davies, 2013).

#### ***II.1.1.1 Trasplante renal***

El trasplante renal es una terapia, en la cual el riñón sano de otra persona (donador) se coloca en el cuerpo del paciente (donante) para reemplazar sus riñones no funcionales. Los riñones trasplantados vienen de dos fuentes: a) donador vivo - pueden ser familiares o no, b) donador cadavérico - personas que deciden donar sus órganos al morir. El trasplante es solo un tratamiento para la enfermedad renal, y no todos los pacientes son candidatos para trasplante renal,

(Baxter Healthcare Corporation, 2014) En la *tabla 1* se muestran las ventajas y desventajas de esta terapia.

Tabla 1. Ventajas y desventajas del trasplante renal. *Baxter Healthcare Corporation Renal Division Education, 2014.*

Trasplante	
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Es lo más parecido a los riñones propios</li> <li>■ No se requieren tratamientos de diálisis una vez que el riñón comienza a funcionar</li> <li>■ Mayor esperanza de vida que con la diálisis</li> <li>■ Menos restricciones de líquidos y dieta</li> <li>■ El paciente se siente más saludable y con más energía</li> <li>■ Trabajo a tiempo completo sin preocuparse del programa de diálisis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Estrés provocado por la espera de un órgano compatible</li> <li>■ Riesgos asociados con la cirugía mayor</li> <li>■ Riesgo de rechazo; el trasplante puede no durar de por vida</li> <li>■ Medicamentos diarios necesarios, lo cual puede causar efectos secundarios</li> <li>■ Propensión a infecciones</li> <li>■ Posibles cambios de apariencia debido a los efectos secundarios de los medicamentos</li> </ul>

### **II.1.1.2 Hemodiálisis**

En esta terapia la sangre del paciente se filtra en una máquina (dializador) que utiliza un flujo de contracorriente, en donde el fluido de diálisis (dializado) fluye en dirección opuesta al flujo sanguíneo, (Evans, 1977). De esta forma, la sangre se limpia de las sustancias tóxicas y exceso de líquido, después de lo cual es devuelta al organismo. Este proceso de eliminación de sustancias tóxicas y líquido se denomina ultrafiltración. La eficacia de la ultrafiltración en la hemodiálisis es muy alta, los tratamientos no son muy continuos y pueden ser realizados intermitentemente. Las máquinas de diálisis monitorizan continuamente un conjunto de parámetros de seguridad críticos, que incluyen las tasas de flujo de la sangre y del fluido de diálisis, la presión sanguínea, el ritmo cardíaco, la conductividad, el pH, etc., (NIDDK, 2006, Baxter Healthcare Corporation, 2014). A continuación, en la *tabla 2* se muestran las ventajas y desventajas de la hemodiálisis.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la hemodiálisis. *Baxter Healthcare Corporation Renal Division Education, 2014.*

Hemodiálisis en el Centro	
<p><b>Ventajas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ El tratamiento lo llevan a cabo enfermeras y técnicos</li> <li>■ Contacto regular con otros pacientes de hemodiálisis y personal</li> <li>■ Normalmente tres tratamientos a la semana; cuatro días libres</li> <li>■ Sin equipos ni implementos en la casa</li> <li>■ La ayuda médica está rápidamente disponible en caso de emergencia</li> </ul>	<p><b>Desventajas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Acudir al centro tres veces a la semana en un programa fijo</li> <li>■ Es necesario un acceso permanente, normalmente en el brazo</li> <li>■ Inserción de dos agujas por cada tratamiento</li> <li>■ Dieta restringida o consumo limitado de líquidos</li> <li>■ Existe riesgo de infección</li> <li>■ Posibles molestias como dolor de cabeza, náuseas, calambres en las piernas, cansancio</li> </ul>
Hemodiálisis en el hogar	
<p><b>Ventajas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Siempre lo ayuda la misma persona</li> <li>■ Más control al momento de dializarse</li> <li>■ No es necesario acudir a una clínica para recibir el tratamiento</li> </ul>	<p><b>Desventajas</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>■ Debe contar con un acompañante capacitado que lo ayude</li> <li>■ La capacitación puede durar cuatro semanas o más</li> <li>■ Necesita espacio para almacenar el equipo y los implementos</li> <li>■ Existe riesgo de infección</li> </ul>

### **II.1.1.3 Diálisis peritoneal (DP)**

La DP es utilizada para tratar un estimado de 250, 000 individuos a nivel mundial. En México se estima que se presentan alrededor de 35 mil casos por año en todo el sistema de salud, (Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades 2000; Davies, 2013).

Es una terapia de remplazo renal para tratar la IRC, (Kurokawa et al., 2002, Lui et al., 2013, Guo et al., 2014). El uso de ésta terapia ha incrementado en la población desde finales de los 1970s. Este método proporciona al paciente una tasa de sobrevivencia equivalente a la hemodiálisis y preserva la función renal residual, (Baroni et al., 2012).

El mesotelio influye en la cinética de la diálisis peritoneal, ya que la membrana peritoneal funciona como una barrera permanente (*figura 2*) a través de la cual se llevan a cabo procesos de ultrafiltración y difusión, (Pérez-Lozano et al., 2013).

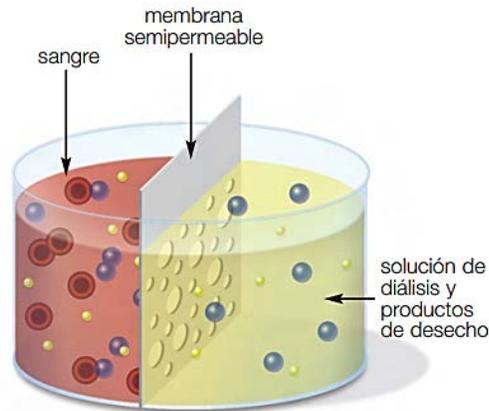


Figura 2. Difusión de soluto y agua a través de la membrana peritoneal. *Baxter Healthcare Corporation Renal Division Education, 2014.*

La DP está basada en que el peritoneo es una membrana natural, vascularizada y semipermeable que, mediante mecanismos de transporte osmótico y difusivo, permite el paso de agua y distintos solutos desde los capilares sanguíneos al líquido dializante introducido en la cavidad peritoneal del paciente. Las sustancias que difunden a través de la membrana peritoneal son de pequeño peso molecular, como urea, potasio, cloro, calcio, creatinina, ácido úrico, etc. Este tipo de diálisis requiere la implantación de un catéter en el abdomen del paciente de forma permanente (*figura 2*). El catéter se conecta a la bolsa de diálisis desde la cual se infunde un líquido dializante hiperosmótico. El líquido dializante permanecerá dentro de la cavidad peritoneal durante un periodo de tiempo establecido, para que se realice lentamente la diálisis. Con ayuda del gradiente osmótico se produce la difusión y ósmosis de tóxicos y electrolitos, de forma que el exceso de líquido y los productos de desecho pasan desde la sangre, a través de la membrana peritoneal, al fluido de diálisis.

El dializado es entonces drenado a una segunda bolsa de deshecho, seguido de la administración de una nueva solución de diálisis. A este cambio periódico se le llama intercambio. La correcta difusión depende de tres factores: el gradiente de concentración a ambos lados de la membrana, la superficie de la membrana y la permeabilidad de ésta. La urea difunde con gran rapidez y la creatinina algo menos, por lo que hacia las dos horas de permanencia del líquido dializante en el

peritoneo casi se completa la difusión, y poco después se alcanza el equilibrio entre el líquido dializante y el plasma. En la *figura 3* se esquematiza el proceso de intercambio de la DP.

#### Intercambio de DP:



Figura 3. Procedimiento esquematizado de la DP. *Baxter Healthcare Corporation Renal Division Education, 2014*

Existen dos tipos de diálisis peritoneal: ambulatoria continua y automatizada.

Diálisis peritoneal ambulatoria continua (CAPD, por sus siglas en inglés): los pacientes necesitan realizar de 3 a 4 intercambios diarios. El tratamiento se puede realizar sin salir de casa, es flexible y puede ajustarse a distintas necesidades y horarios.

Diálisis peritoneal automatizada: se realiza por la noche, mientras se duerme. Una máquina controla el tiempo y efectúa los intercambios durante 8 ó 9 horas.

El procedimiento de DP presenta ventajas y desventajas, las cuales se muestran en la *tabla 3*.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de la DP. *Baxter Healthcare Corporation Renal Division Education.*

Diálisis Peritoneal	
Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Estilo de vida flexible e independencia</li> <li>■ Visitas a la clínica alrededor de una vez al mes</li> <li>■ No utiliza agujas</li> <li>■ Proporciona una terapia continua que se asemeja más a la función natural de los riñones</li> <li>■ No es necesario acudir a la unidad de diálisis para recibir el tratamiento</li> <li>■ Terapia fácil de realizar mientras viaja</li> <li>■ Se puede realizar mientras duerme (DPA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Se deben programar los intercambios en la rutina diaria los siete días de la semana</li> <li>■ Requiere un catéter permanente fuera del cuerpo</li> <li>■ Existe riesgo de infección</li> <li>■ Puede haber aumento de peso o de talla en la cintura</li> <li>■ Las personas muy grandes pueden requerir terapia adicional</li> <li>■ Necesita un espacio en su casa para guardar los implementos</li> <li>■ Necesita un espacio en su habitación para el equipo (DPA)</li> </ul>

### **II.1.1.3.1 Prevalencia**

Según la Sociedad Latinoamericana de Nefrología e Hipertensión (SLANH), la utilización de la terapia de reemplazo renal es de 103 nuevos pacientes por millón de habitantes. En América Latina, la hemodiálisis es la forma predominante de la terapia de sustitución para la enfermedad renal en etapa terminal; Sin embargo, algunos países emplean la DP en el 30% o más de pacientes. En particular, México es el país con la mayor utilización de ésta. Existen cerca de 400 casos por millón en Estados Unidos, Taiwan y México. En la *figura 4* se muestra la prevalencia de diálisis peritoneal en diferentes países de Latinoamérica, lo que se observa es que México ocupa el primer lugar en la utilización de la DP, (Pecoits-Filho, 2007).

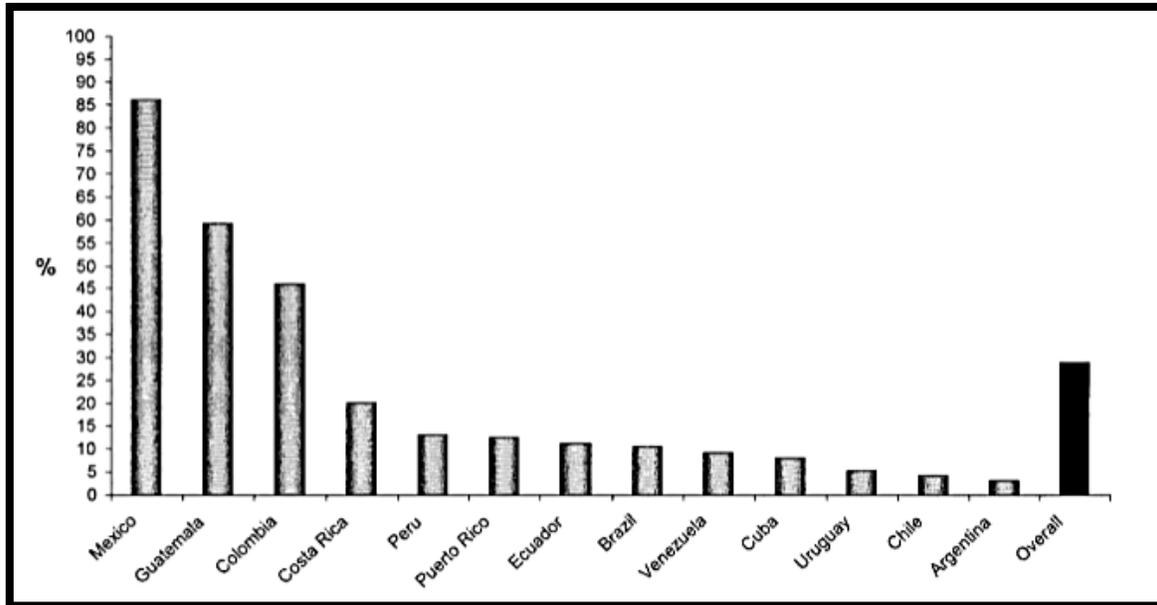


Figura 4. Prevalencia de diálisis peritoneal en diferentes países de Latinoamérica. *Pecoits-Filho et al., 2007.*

### **III. Peritoneo**

#### **III.1 Generalidades**

Embriológicamente, el mesotelio se desarrolla a partir del tejido mesodérmico entre las 8 y 18 días de gestación dependiendo de la especie. En los seres humanos, esto ocurre alrededor del día 14. La membrana peritoneal recubre la cara interna de la pared abdominal dando lugar al peritoneo parietal, y órganos del interior de la cavidad abdominal forman el peritoneo visceral (mesenterio, intestinos, hígado, bazo, etc.). El mesotelio está formado por una monocapa de células polarizadas (*figura 5*); éste comprende un epitelio plano simple. Las células mesoteliales (CMs) tienen 25  $\mu\text{m}$  de diámetro y cubren las superficies viscerales y parietales de las cavidades peritoneal, pleural y pericárdica, (Lanfrancone et al., Książek, 2013).

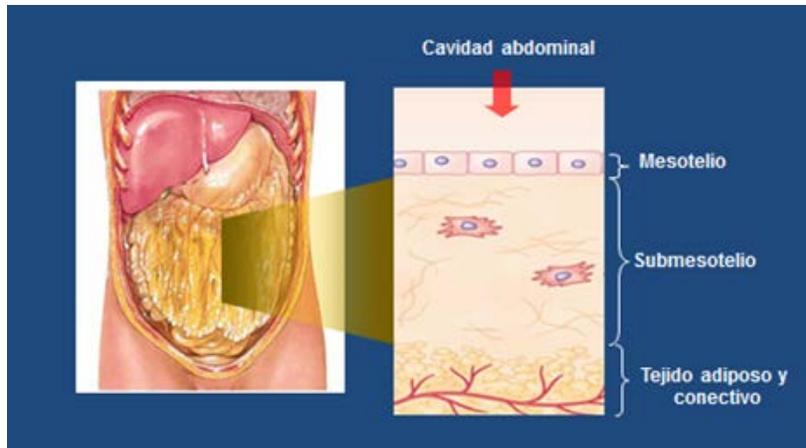


Figura 5. Localización y regiones del peritoneo. *Adaptado de Nessim et al., 2010.*

Las CMs presentan una morfología peculiar, como se presenta en la *figura 6*. En una imagen de micrografía electrónica de transmisión de peritoneo se observó que (A) las células mesoteliales presentan un citoplasma extendido (flecha grande) y una superficie de microvellosidades (flecha mediana), sobre una membrana basal (flecha pequeña). Células semejantes a fibroblastos alargados por debajo de la mesotelio que están rodeadas por colágeno formando el tejido conectivo. (B) Micrografía electrónica de barrido (SEM) de la cara luminal del mesotelio cubierto con una alfombra de microvellosidades. (C) Apariencia de empedrado con los bordes celulares bien definidos de las CMs.

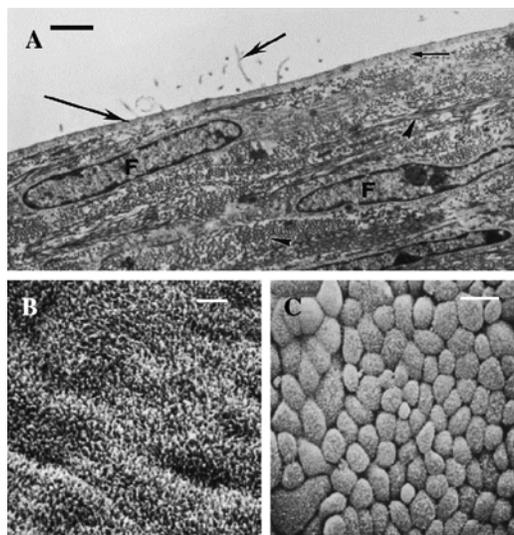


Figura 6. Imagen de microscopía de la morfología de las células mesoteliales. *Mutsaers, 2004*

Se ha observado la presencia de proteínas integrales de membrana (ICAM y VCAM-I) en la superficie del mesotelio, las cuales son moléculas de adhesión que participan en la unión y movimiento de neutrófilos a través del mesotelio, (Hjelle et al., 1995).

### **III.2 Funciones**

La función principal de esta capa de células, denominada mesotelio, es proporcionar una superficie resbaladiza, no adhesiva y protectora. El mesotelio se ha caracterizado como una membrana celular dinámica responsable de diversas funciones, incluyendo la producción de moléculas de la matriz extracelular (ECM), proteasas, citocinas y factores de crecimiento, (Herricka et al., 2004). Sin embargo, las CMs desempeñan otros papeles fundamentales relacionados con el transporte de fluidos y células a través de las cavidades serosas, la presentación de antígenos, la inflamación y la reparación de tejidos, la coagulación, la fibrinólisis y la adhesión de células tumorales, (Mutsaers et al., 2003). En la *figura 7* se esquematizan las funciones de las células mesoteliales que se detallan a continuación:

1. Barrera de protección y superficie no adherente. Las CMs están estrechamente unidas mediante uniones intercelulares. En su superficie secretan glicosaminoglicanos, predominantemente ácido hialurónico, que protege a las células de posibles agentes abrasivos y de agentes infecciosos. Además, las CMs secretan fosfatidilcolina, el componente principal de las lamelas y surfactantes, actuando como lubricante para reducir la fricción entre superficies serosas.

2. Transporte de fluidos y solutos sucede a través de las cavidades serosas del peritoneo, mediante la formación de vesículas pinocíticas, uniones intercelulares y estomas. Los estomas son cavidades de unos 3-12  $\mu\text{m}$  de diámetro que se forman entre la unión de dos o más células. Estas aberturas proveen un acceso directo al sistema linfático submesotelial, permitiendo un rápido movimiento de fluidos y de células, hacia y desde las cavidades serosas, (Lanfrancone et al., 1992, Mutsaers, 2004).

3. Presentación de antígenos. Se realiza mediante la síntesis y secreción de una gran diversidad de mediadores en respuesta a señales externas, se reclutan células hacia las cavidades serosas y se presentan antígenos a las células T.

4. Adhesión y diseminación tumoral. La producción de ácido hialurónico, así como la producción de glicosaminoglicanos y surfactantes, interviene en la prevención de la adhesión, diseminación y crecimiento de tumores.

5. Reparación de tejidos e inflamación. Las CMs juegan un papel importante en la inflamación y reparación de tejidos, mediante la secreción de factores de crecimiento, citoquinas, prostaglandinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y de moléculas de la matriz extracelular, (Lanfrancone et al., 1992, Mutsaers, 2004).

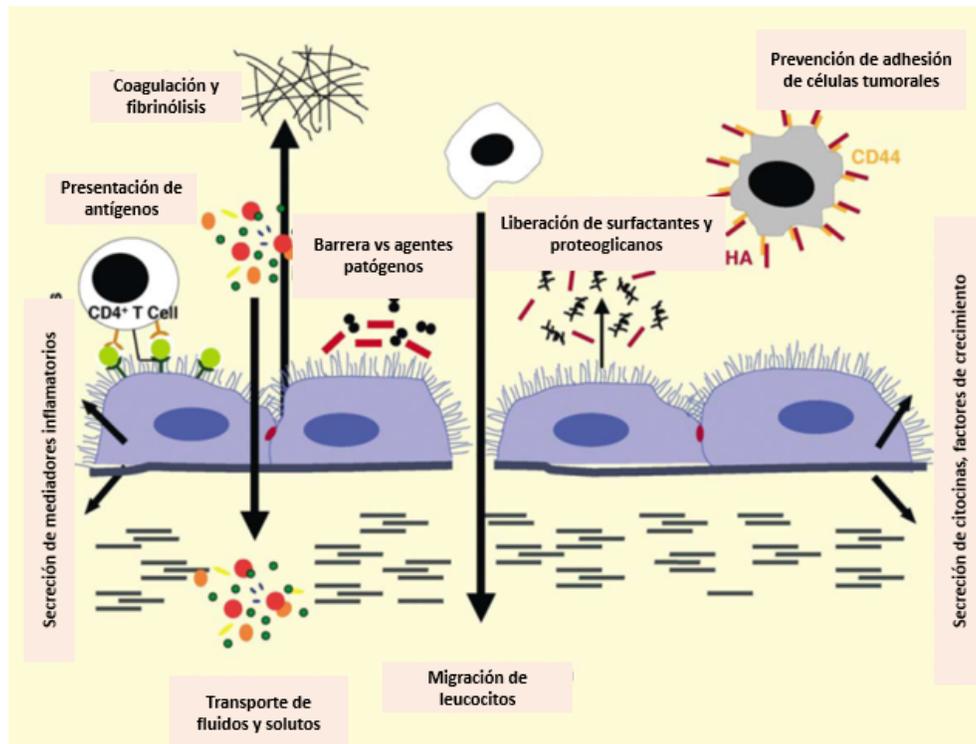


Figura 7. Funciones de las células mesoteliales peritoneales. El mesotelio es una membrana dinámica que realiza diversas funciones: barrera de protección y superficie no adherente mediante la secreción de glicosaminoglicanos, transporte de fluidos y solutos, presentación antigénica, prevención de la adhesión y diseminación tumoral, y reparación de tejidos e inflamación. *Modificado de Mutsaers, 2004.*

Se ha observado que las células mesoteliales peritoneales humanas (CMPH) producen factores de crecimiento hematopoyéticos, ya sea constitutivamente (factor estimulante de colonias de macrófagos y monocitos (M-CSF) y la interleucina-8 (IL-8); o en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico (EGF); otros factores como lipopolisacáridos (LPS), factor de necrosis tumoral (TNF), (Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), e interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ). Estos hallazgos sugieren que las CMPH están involucradas en la regulación de hematopoyesis, así como en la inflamación, la cicatrización, y los procesos de regeneración de tejidos, (Lanfrancone et al., 1992)

#### **IV. Modificaciones funcionales y estructurales del peritoneo durante la DP**

En la terapia de DP, la membrana peritoneal sufre modificaciones. Las más comunes son fibrosis, (Williams et al., 2002; Margetts y Bonniaud , 2003; Kaneko et al., 2007), inflamación y denudación de la monocapa de CMs, (Baroni et al., 2012), angiogénesis y vasodilatación, además de cambios morfológicos y estructurales de las CMs pasando de un fenotipo epitelial a un fenotipo fibroblástico mediante un proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés “epithelial-to-mesenchymal transition”), (Yáñez-Mo et al., 2003; Aroeira et al., 2007).

Las CMPH, entran en un proceso de transdiferenciación de células mesoteliales a miofibroblastos, expresando marcadores como proteína específica de fibroblastos,  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA, por sus siglas en inglés) y sobreexpresan VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y se pierden marcadores epiteliales como citoqueratina, tal y como se esquematiza en la *figura 8*, (Aroeira et al., 2007). Entre las alteraciones se pueden encontrar depósitos de fibrina, formación de cápsulas fibrosas, sangrado perivascular, fibrosis intersticial, y la presencia de granulación del tejido con proliferación vascular. Además, hay deposición de tejido conjuntivo mesotelial y engrosamiento de la región del submesotelio, el cual incrementa con el tiempo de DP, (Baroni, 2012, Williams et al., 2002).

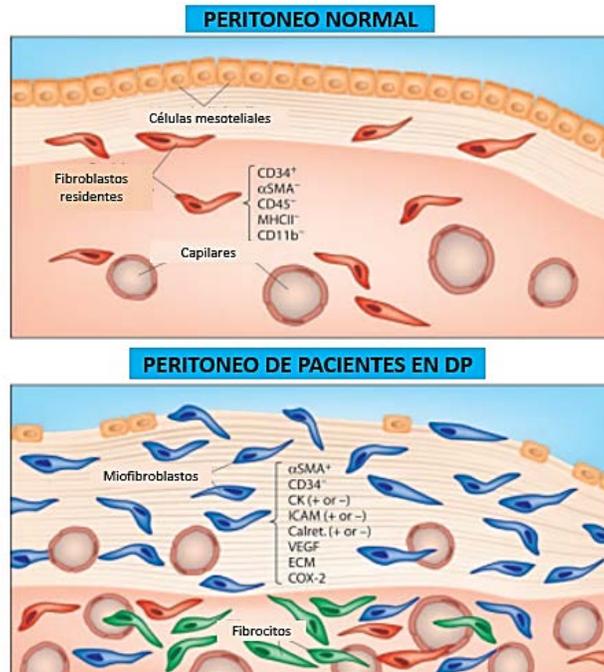


Figura 8. Efecto de la DP en la morfología del peritoneo y en la expresión de marcadores. *Aroeira et al., 2007.*

#### ***IV.1 Efecto de la DM en el deterioro peritoneal***

El número de pacientes con diabetes mellitus que sufren IRC se ha incrementado dramáticamente en los últimos años y, en muchos países, la diabetes se ha convertido en la causa más importante de enfermedad renal terminal en los pacientes ingresados para dializarse. Por otra parte, en comparación con los pacientes no diabéticos, los pacientes diabéticos presentan mayores complicaciones, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, calidad de vida deficiente, así como altas tasas de morbilidad y mortalidad después del inicio de la diálisis, (Yao et al., 2005).

La diabetes *per se* es un factor que afecta el peritoneo de los pacientes. En un estudio realizado con pacientes en DP, diabéticos y no diabéticos, se encontró que el grosor del tejido conectivo submesotelial fue significativamente mayor en los pacientes diabéticos comparado con los pacientes no diabéticos. Además, el número de capilares también fue mayor en el grupo diabético, (Mizumasa et al., 2013).

## **V. Bioincompatibilidad de los líquidos de diálisis**

Las soluciones de diálisis estériles universalmente aplicadas son de baja biocompatibilidad, y pueden causar inflamación del submesotelio. El proceso de inflamación puede generar fibrosis y angiogénesis, y eventualmente falla la ultrafiltración, (Lui et al., 2013, Ito et al., 2008).

### ***V.1 Exposición a los LD***

Durante largos periodos de tratamiento de DP, la membrana peritoneal presenta disminución en su funcionalidad (aumento en la tasa de transporte de solutos pequeños). Así como alteraciones en su estructura, las cuales pueden ser consecuencia de muchos factores incluyendo episodios repetidos de peritonitis, la baja bio-compatibilidad de las soluciones de diálisis, particularmente altas concentraciones de glucosa, hiperosmolaridad, contenido de lactato, bajo pH, productos de degradación de la glucosa (GDPs, por sus siglas en inglés) y productos finales de glicosilación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés). Como consecuencia a la exposición a los líquidos de diálisis muchos pacientes tienen complicaciones como son hiperlipidemias, alteraciones cardíacas, un incremento en la presión sanguínea, congestión pulmonar y daño en la función cardíaca, además se ha reportado que una gran parte de los pacientes en DP sufren alteraciones sistémicas como diabetes, (Guo et al., 2014, Ito et al., 2003, Ito et al., 2008, Pecoits-Filho, 2002).

#### ***V.1.1 La Glucosa***

Las soluciones de diálisis estándar contienen glucosa como gradiente osmótico. Se ha demostrado que la glucosa es segura, efectiva, fácilmente metabolizada, y barata, pero no es el agente osmótico ideal. La concentración de glucosa en la cavidad peritoneal durante DP es de 15-40 veces más alta que los niveles normales en plasma, por lo que la glucosa en altas concentraciones es tóxica para el peritoneo. Como respuesta a esta exposición, las CMs sintetizan factores y proteínas implicados en la fibrosis, tales como TGF- $\beta$ , fibronectina y MCP-1 (Proteína quimioatrayente de monocito-1), (Wong et al., 2003, Ito et al., 2008).

### ***V.1.2 Los productos de la degradación de la glucosa (GDPs) y el pH***

Existen varios reportes acerca del papel fisiológico y patológico de los GDP y del pH ácido en las soluciones de diálisis. Los GDPs, tales como el glioxal, metilglioxal y 3-deoxiglucosona, se originan en el proceso de esterilización convencional por calor de los líquidos, dando lugar a la “caramelización” de la glucosa, (Witowsky et al., 2000 Ito, 2003). Para reducir la caramelización de la glucosa, se suelen emplear pH ácidos y una solución tampón de lactato (Erixon et al., 2006). Sin embargo, las altas concentraciones de glucosa, los GDPs, el lactato y el pH ácido son tóxicos para las CMs. Pues generan un proceso inflamatorio que puede verse exacerbado por un tratamiento continuo, que produce alteraciones en las funciones del peritoneo, como fibrosis, angiogénesis, aumento de la permeabilidad vascular y, finalmente, fallo de la membrana peritoneal, (Witowsky, 2000; Davies et al., 2001, Ito, 2008, Nakamoto et al., 2014).

Los GDPs también producen alteraciones como: aumento de la secreción de factores de crecimiento (VEGF y TGF- $\beta$ 1), aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8), aumento de la expresión de VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular), inhibición del crecimiento, denudación celular e inducción de apoptosis, (Ito, 2008). El uso del polímero de glucosa (icodextrina) como agente osmótico, en lugar de glucosa, favorece un aumento de la ultrafiltración y reduce el deterioro de la función de la membrana peritoneal, (Cho et al., 2013).

### ***V.1.3 Productos de glicosilación avanzada y su receptor***

Los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés “advanced glycation end products”) provienen de glicosilaciones no enzimáticas que sufren las proteínas de larga vida que son modificadas por las etapas avanzadas de la reacción de Maillard, bajo condiciones de alta concentración de glucosa, (Ito et al., 2008). La glicosilación de proteínas solubles y estructurales en el peritoneo y su posterior acumulación, puede ocurrir como resultado de las altas concentraciones de glucosa que se encuentran en el líquido de diálisis, y por

tanto, está implicada en el fracaso de la ultrafiltración en la diálisis peritoneal. Se ha encontrado una acumulación de AGEs en tejido conectivo, mesotelio, y en las paredes vasculares de pacientes que llevan periodos largos de DP, (Ito et al., (2008). Interesantemente, los GDPs son los mayores inductores de la formación de AGEs, lo que aumenta el daño peritoneal, (Williams et al., 2004, Boulanger et al., 2006).

Se ha demostrado que esta acumulación de AGEs provoca una reducción en la viabilidad de las CMs humanas de manera dependiente de la concentración. Esta disminución en la viabilidad de la membrana peritoneal causa cambios en el tejido peritoneal, y fibrosis progresiva que genera una disfunción peritoneal. Los AGEs ejercen su efecto sobre las CMs humanas uniéndose a su receptor RAGE (receptor de AGEs) localizado en la superficie celular. Este receptor se expresa en una amplia variedad de células tales como macrófagos, células endoteliales, células de músculo liso, CMs del peritoneo y células renales tubulares (Boulanger et al., 2002, Ito et al., 2008). La unión de los AGEs a estos receptores desencadena varios procesos, entre los cuales se encuentran la generación de radicales libres de oxígeno, la inducción de la expresión de TGF- $\beta$  y VEGF, la expresión de citoquinas implicadas en procesos inflamatorios y en la conversión mesenquimal de las CMs, el aumento de la permeabilidad vascular, la inducción de fibrosis, (Boulanger et al., 2002, Boulanger et al., 2007).

En conclusión, la glucosa, los GDPs y los AGEs tienen efectos tóxicos sinérgicos en las CMs humanas reduciendo la proliferación celular e induciendo apoptosis, (Boulanger et al., 2006).

## **VI. Transición epitelio-mesenquimal**

Si se somete a los pacientes a un periodo largo de diálisis peritoneal, las células mesoteliales sufren una pérdida progresiva del fenotipo epitelial y adquieren características similares a miofibroblastos que son propias de un proceso de transición epitelio-mesénquima (TEM), (Pérez-Lozano et al., 2013). En la *figura 9* se esquematiza este proceso. La TEM se produce de manera natural durante el desarrollo embrionario o en la reparación de heridas, pero también se asocia a

enfermedades inflamatorias crónicas y fibrogénicas y a la progresión tumoral, durante este proceso se producen cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales (Kalluri y Weinberg, 2009). Sin embargo, como respuesta al daño celular ocasionado por factores de diversa naturaleza, se genera una respuesta inflamatoria que es un proceso reparativo. Su activación es responsable de varias de las anomalías de la membrana peritoneal, incluyendo la pérdida de la monocapa de células mesoteliales, fibrosis submesotelial, angiogénesis y vasculopatía hialinizante. Estas alteraciones son consideradas la mayor causa de la falla en la ultrafiltración y de la pérdida de la capacidad dializante del peritoneo. Durante la inflamación peritoneal, se producen gran cantidad de citocinas y factores de crecimiento que pueden causar daño a la membrana peritoneal como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la interleucina-6 (IL-6), (Pérez-Lozano et al., 2013, Pecoits-Filho et al., 2002).

El TGF- $\beta$  es una citocina profibrótica considerada como la principal molécula en la génesis de la fibrosis peritoneal (Liu et al., 2013). La fibrosis no es la única alteración que sufre la membrana peritoneal durante la diálisis peritoneal, el VEGF produce vasculopatías por la formación de vasos sanguíneos de *novo* que participan en el fallo de la membrana peritoneal, (Zweers et al., 1999, Pecoits-Filho et al., 2002). Se ha demostrado que los efluentes derivados de las células mesoteliales libera VEGF de manera espontánea y que la TEM de las células mesoteliales está asociada con una sobreexpresión de VEGF. Además, se ha observado que la producción de altos niveles de VEGF por los efluentes de las células mesoteliales, se correlaciona con niveles de transporte alto en pacientes en diálisis peritoneal, (Aroeira L et al., 2005, Selgas R et al., 2008, Liu J et al., 2013).

La IL-6 es una citosina presente en las reacciones inflamatorias en fase aguda, se produce intraperitonealmente y se ha utilizado como un predictor de un proceso inflamatorio en los pacientes en diálisis peritoneal, (Pecoits-Filho, 2002).

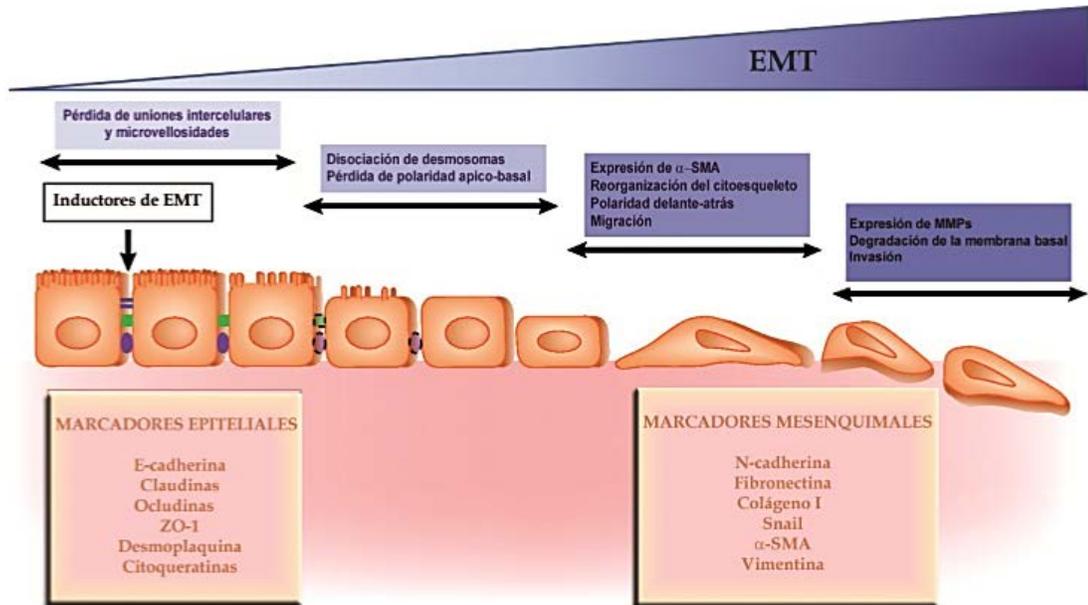


Figura 9. Representación esquemática de una transición epitelio-mesénquima. La figura muestra los 4 pasos esenciales para que se produzca una completa EMT, mostrando los cambios en los marcadores más característicos de las células epiteliales y mesenquimales.  $\alpha$ -SMA, alfa actina de músculo liso; ZO-1, zonula ocludens-1. *Modificado de Aroeira L et al., 2007.*

## VII. Transición mesotelio-mesenquimal

Las células mesoteliales sufren una transición mesenquimal como consecuencia de los prolongados tratamientos de diálisis peritoneal, (Yáñez-Mo et al., 2003; Aroeira et al., 2007). Normalmente las CMs tienen similitudes morfológicas con las células epiteliales, así como en la expresión de determinados marcadores, como son e-cadherina y abundante ezrina. Sin embargo, son consideradas más bien como un tipo celular mixto, entre epitelial y mesenquimal, debido a su origen mesodérmico. Además, también comparten características con las células endoteliales, como la expresión y secreción de moléculas, tales como ICAM-1, VCAM, VEGF, VEGFR-1,2 (receptor de VEGF-1,2) y neurofilinas. Dado que las células mesoteliales comparten características tanto con células epiteliales como con células endoteliales, la conversión de éstas no constituye una TEM en sí misma, ni una transición endotelio-mesénquima, sino que sería más correctamente denominada, una transición mesotelio-mesénquima (MMT, del inglés "mesothelial- to- mesenchymal transition"), (Yáñez-Mo et al., 2003). Aroeira

y cols., en el 2007 describieron la expresión de marcadores de este proceso de transición de las células mesoteliales (*figura 10*).

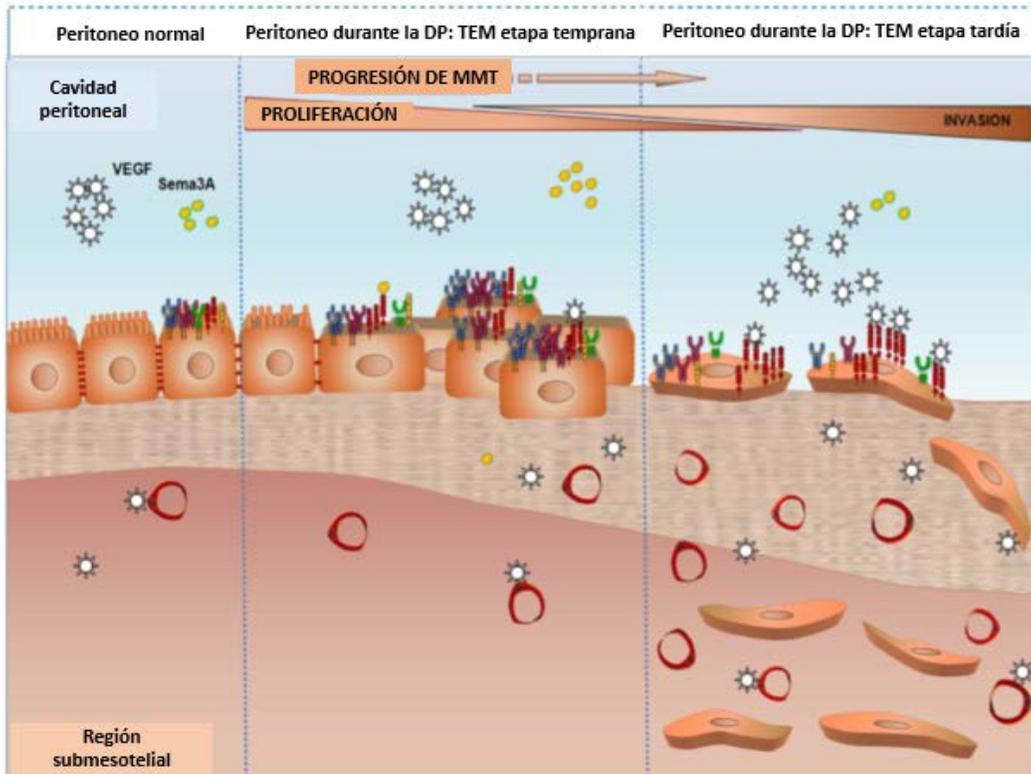


Figura 10. Peritoneo en condiciones normales y de transición mesotelio-mesénquima. *Modificado Pérez-Lozano, et al., 2013.*

## **VIII. VEGF**

El factor de crecimiento endotelial es una glicoproteína homodimérica altamente conservada compuesta por dos moléculas unidas por puentes disulfuro, formando una cadena molecular de 24kDa.

### ***VIII.1 Funciones***

VEFG tiene funciones biológicas importantes y está implicado en la permeabilidad vascular, la proliferación y la angiogénesis de células endoteliales vasculares, (Guo et al., 2014). Este factor pertenece a una familia de proteínas que incluye VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y el factor de crecimiento placentario (PLGF). VEGF-A es la forma más abundante y es denominada

también VEGF-165. De ella existen diferentes isoformas que se generan a partir del «splicing» alternativo del exón 5-8 dando lugar a las diferentes isoformas de VEGF en el exón 6 que corresponden a las proteínas de 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos (Ferrara, 1999). VEGF-A está implicado fundamentalmente en la angiogénesis, la migración y la vasodilatación. También se ha encontrado que actúa en las células endoteliales vasculares y promueve la formación de vasos sanguíneos en condiciones fisiológicas y patológicas, (Guo et al., 2014). VEGF-B participa en la angiogénesis embrionaria y en la regulación de la degradación de la matriz extracelular; VEGF-C y VEGF-D están relacionados con la angiogénesis linfática. VEGF-E se encuentra codificado en un porxvirus de la familia Orf (Lyttle et al., 1994); y VEGF-F se ha encontrado en venenos de serpientes, (Yamazaki et al., 2005).

El efecto biológico de VEGF es mediado por tres receptores (VEGFRs): VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR y VEGFR-3/Flt-4. La actividad de VEGF es también regulada por neurofilinas (Nrps), una familia de moléculas de superficie compuestas por glicoproteínas con dos miembros Nrp-1 y Nrp-2. Los dos primeros se encuentran en el endotelio vascular y el último se expresa exclusivamente en vasos linfáticos. Estos receptores se expresan en diferentes tipos celulares como son células tumorales, células endoteliales, monocitos, células hematopoyéticas y células mesoteliales (*figura 11*), (Pérez-Lozano et al., 2013, Ferrara et al., 2003). La estructura general de los tres receptores está constituida por un dominio extracelular, formado por 7 dominios similares a inmunoglobulinas, una región transmembranal sencilla y una cola citoplásmica con dominios cinasa. Cuando VEGF se une a sus receptores, se produce una dimerización de los mismos y una activación secuencial de su actividad tirosina cinasa, lo que activa sitios de unión para moléculas de señalización como proteínas adaptadoras (Grb-2, Shc), lo cual promueve la activación de varias moléculas de transducción de señales como PI3K, ERK-1/2, JNK y p38 MAPK, (Ferrara et al, 2003; Ferrari et al., 2006).

Cuando VEGF se une a VEGFR2, éste último se fosforila intracelularmente desencadenando múltiples respuestas celulares incluyendo proliferación,

migración y modificación transcripcional a través de diversas vías de señalización como PI3K, Src y PLC $\gamma$ , (Olsson et al., 2006).

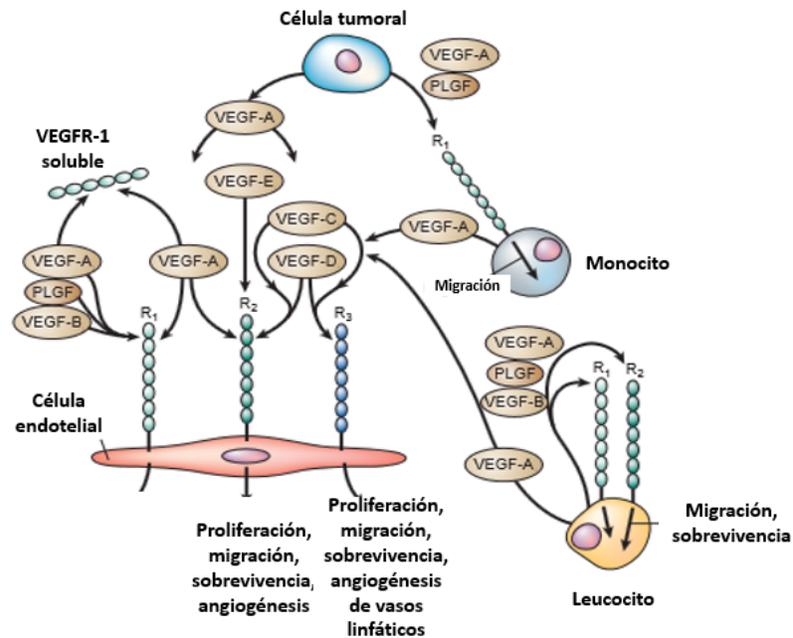


Figura 11. Expresión de VEGF y su receptor. Estructura e interacciones de VEGFs, VEGFRs y co-receptores neuropilinas (NRP). Los factores de crecimiento VEGF se unen a sus receptores con diferentes especificidades (indicado por las flechas). La unión de los ligandos diméricos de VEGF estimula la dimerización y la autofosforilación del receptor, que conduce al reclutamiento de moléculas de señalización. Los receptores de VEGF pueden dimerizar formando homodímeros o heterodímeros. *Modificado Ferrara, 2003.*

### VIII.2 Expresión de VEGF por la DP

Durante la DP se secreta VEGF al efluente, y se ha propuesto que esta producción local e intraperitoneal de VEGF es importante en el proceso que conduce al aumento de la permeabilidad vascular, la vasodilatación y la angiogénesis (Zweers et al., 1999, Pecoits-Filho et al., 2002).

Durante la DP se ha observado que hay un aumento en la formación de microvasos como consecuencia de un aumento en la expresión de VEGF, (Guo et al., 2014). En un estudio realizado por Pérez-Lozano y cols; en el 2013, se mostró que no sólo los niveles de expresión de VEGF, sino también los VEGF/VEGFRs/co-receptores están asociados con un transporte peritoneal alto.

La producción local de VEGF por las células mesoteliales, durante la diálisis peritoneal, puede ejercer efectos parácrinos en las células endoteliales para inducir angiogénesis peritoneal y disminución del transporte peritoneal.

## **IX. Ácido retinoico**

El ácido retinoico, el metabolito activo de la vitamina A (retinol) es esencial para el control del crecimiento celular epitelial y la diferenciación celular. El ácido retinoico inhibe el crecimiento de algunas células malignas que no pudieron ser reducidas totalmente con retinol. La proteína que se une al ácido retinoico es homóloga de los receptores para hormonas esteroideas, hormonas tiroideas y vitamina D, (Petkovich et al., 1987). El retinoide natural circulante en el cuerpo es el retinol; que está presente a concentraciones micromolares y se deriva del carotenoide  $\beta$ -caroteno (provitamina A) y retinil éster. El retinol es almacenado primeramente en el hígado como retinal palmitato. El retinol y los retinil ésteres son precursores de las isoformas activas de los retinoides: all-trans, 11-cis, 13-cis, 9,13-di-cis y 11,13-di-cis; de las cuales la isoforma all-trans es la predominante. El retinol se une en la circulación a la proteína de unión al retinol (RBP) y sus niveles plasmáticos son homeostáticamente regulados. El ácido retinoico all-trans es una molécula pequeña lipofílica (300 Da) que circula en el plasma y se une a albúmina a una concentración de 1 a 10 nmol/L. Se han identificado dos isómeros de esta molécula in vivo: 9-cis RA y 13-cis RA (*figura 12*) La función de 13-cis RA es desconocida. Según estudios *in vitro*, el retinoide 9-cis RA se une al receptor para retinoides X (RXR) con alta afinidad, (Rhee et al., 2012).

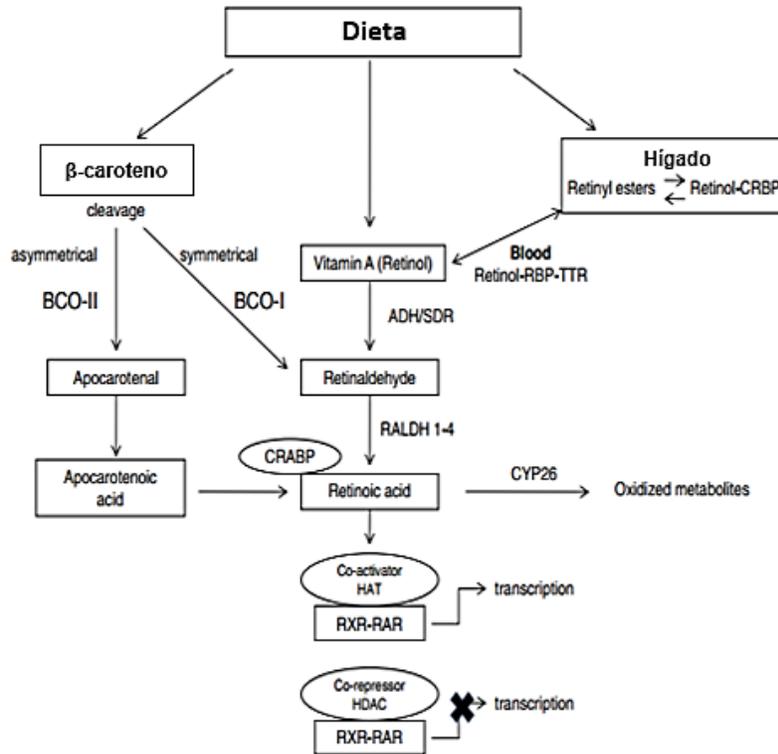


Figura 12. Fuente, almacenamiento y procesamiento del ácido retinoico. Modificado Rhee et al., 2012.

El ácido retinoico *all trans* es sintetizado por el retinol *all-trans* en dos etapas consecutivas de oxidación: oxidación de retinol a retinaldehído y posteriormente a ácido retinoico. Estas etapas de oxidación son mediadas por las retinol deshidrogenasas y retinaldehído deshidrogenasas, tal y como se muestra en la figura 13, (Rhee et al., 2012). El ácido retinoico es degradado por las enzimas del citocromo P450 (CYP) (Cyp26A1, B1 y C1), (Cho et al., 2012).

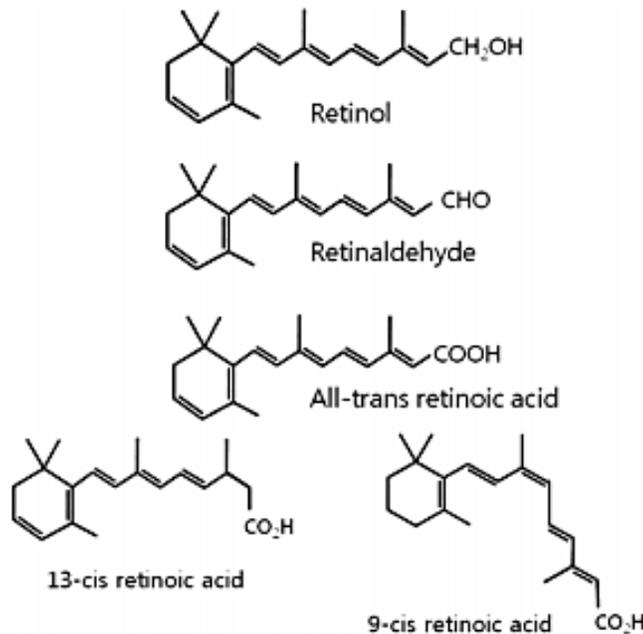


Figura 13. Síntesis del ácido retinoico a partir de retinol. *Modificado Rhee et al., 2012.*

Los retinoides presentan sus efectos biológicos después de la activación de la familia del receptor nuclear de la hormona esteroidea, entre los que se incluyen el receptor del ácido retinoico RAR y el RXR. En un estudio se encontró a los RAR expresados en humanos y en ratones. Los dominios de unión de estos receptores están altamente conservados (>75% de identidad de aminoácidos, (Margelsdorf et al., 1990). Los receptores RAR tienen afinidad específica, RARs  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  se unen tanto al ácido retinoico *all trans* y como a 9-cis RA con gran afinidad; mientras RXR  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  sólo se unen a 9-cis RA (tabla 4), (Chambon, 1996, Rhee et al., 2012). En ausencia de ligando, los RXR forman homotetrámeros que son transcripcionalmente inactivos, pero que se disocian fácilmente en presencia de su ligando formando dímeros. La vitamina A se obtiene de los alimentos ricos en vitamina A, pero también puede obtenerse de alimentos con el carotenoide  $\beta$ -caroteno, precursor de la vitamina A, ya que está compuesto por dos moléculas de retinol, (Rhee et al., 2012).

Tabla 4. Receptores para ácido retinoico. *Modificado Cambón et al., 1996.*

Gen	Isoformas predominantes	Localización cromosomal		Ligando
		Humano	Ratón	
RAR $\alpha$	$\alpha 1, \alpha 2$	17q21.1	11D	} <i>all-trans</i> and <i>9-cis RA</i>
RAR $\beta$	$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4$	3p24	14	
RAR $\gamma$	$\gamma 1, \gamma 2$	12q13	15	
RXR $\alpha$	$\alpha 1, \alpha 2$	9q34.3	2	} <i>9-cis RA</i>
RXR $\beta$	$\beta 1, \beta 2$	6p21.3	17	
RXR $\gamma$	$\gamma 1, \gamma 2$	1q22-q23	1	

Los receptores del ácido retinoico (RAR), que están implicados en la transducción de señales del ácido retinoico, son esenciales para el mantenimiento de los tejidos epiteliales diferenciados. Se ha demostrado que el ácido retinoico regula procesos celulares que incluyen la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis de una manera similar a las hormonas, y por lo tanto, juega un papel importante en el desarrollo embrionario y por consiguiente en el mantenimiento del tejido. Evidencia clínica y molecular, implican a los esteroides en arterioesclerosis y otros desórdenes vasculoproliferativos, así como en re-estenosis. Los retinoides presentan efectos complejos en procesos de proliferación, crecimiento, diferenciación y migración de células del músculo liso vascular, incluyendo respuestas al daño por arterioesclerosis. Estudios recientes sugieren que pueden participar en la calcificación vascular y en la función endotelial, por ejemplo modulando las vías del óxido nítrico. Además se demostró que el ácido retinoico *all trans* inhibió la proliferación, la re-endotelización e incrementa la migración de las células del músculo liso en el sitio de daño vascular. Una de las áreas de interés es el metabolismo de los retinoides y el rol de los receptores activados por retinoides en la regulación transcripcional, lo cual es relevante en los desórdenes vasculares. Los retinoides también participan en procesos biológicos como visión,

crecimiento, reproducción y resistencia a infecciones. También se encontró que la privación de la vitamina A en la dieta, ocasiona un el retraso del crecimiento, ceguera, esterilidad y eventualmente muerte. Otros estudios dietéticos mostraron que la vitamina A también se requiere durante el desarrollo. Un déficit de esta vitamina produjo malformaciones congénitas en fetos, (Rhee et al., 2012).

Por otro lado, el exceso de ácido retinoico induce defectos de desarrollo específicos, que van a depender de la etapa de desarrollo en la que se dé la exposición (Lohnes et al., 1995).

Recientemente Retana y cols. (2013) realizaron cultivos de células mesoteliales obtenidas a partir de efluentes de diálisis y probaron el efecto del ácido retinoico, sobre estos cultivos. Concluyeron que el tratamiento con ácido retinoico mejoró la morfología y revirtió la TEM de los cultivos de células mesoteliales de pacientes en DP, (Retana et al., 2013). Recientemente este mismo grupo de investigación encontró que el ácido retinoico *all trans* mantiene la integridad de las CMs de pacientes en DP y la localización membranal y expresión de proteínas de la unión estrecha como claudina-1, claudina-2, claudina-8, ocludina, y ZO-1, (Retana et al., 2013).

# **OBJETIVOS**

## **Objetivo particular**

Determinar la expresión de VEGF y el efecto del ácido retinoico en las células mesoteliales de pacientes en diálisis peritoneal.

## **Objetivos específicos**

1. Obtener cultivos de células mesoteliales de muestras humanas de omentum de pacientes no urémicos (CONTROLES).
2. Obtener cultivos de células mesoteliales humanas a partir de efluentes de diálisis (URÉMICOS NO DIABÉTICOS Y URÉMICOS DIABÉTICOS).
3. Medir el nivel de expresión de VEGF en cultivos celulares, en presencia y ausencia de líquidos de diálisis.
4. Determinar si la secreción de VEGF está polarizada en la monocapa
5. Estudiar el efecto del ácido retinoico sobre la expresión y secreción de VEGF en células mesoteliales de pacientes en diálisis.

## **HIPÓTESIS**

El ácido retinoico disminuirá la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular en las células mesoteliales humanas de pacientes en diálisis peritoneal.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Declaraciones de ética

La investigación fue realizada considerando las Guías de Buenas Prácticas Clínicas, regulaciones aplicables así como principios éticos originados en la declaración de Helsinki. El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Gineco/obstetricia No. 3 y Hospital de Nefrología Pediátrica Centro Médico Nacional la Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social, además del Departamento de Nefrología del Hospital Juárez de México. Se obtuvieron los consentimientos informados de los donadores de omentum y los consentimientos verbales de los pacientes donadores de las bolsas de diálisis con previa explicación de la utilización de las bolsas en el estudio por el Médico Nefrólogo.

## Pacientes

Las biopsias de peritoneo fueron obtenidas de pacientes femeninas no urémicas, a través de una cirugía abdominal, después del consentimiento informado (grupo control). Los cultivos de células mesoteliales fueron obtenidos a partir de los efluentes de diálisis de pacientes en DP incluyendo pacientes no diabéticos y diabéticos (*figura 14*).

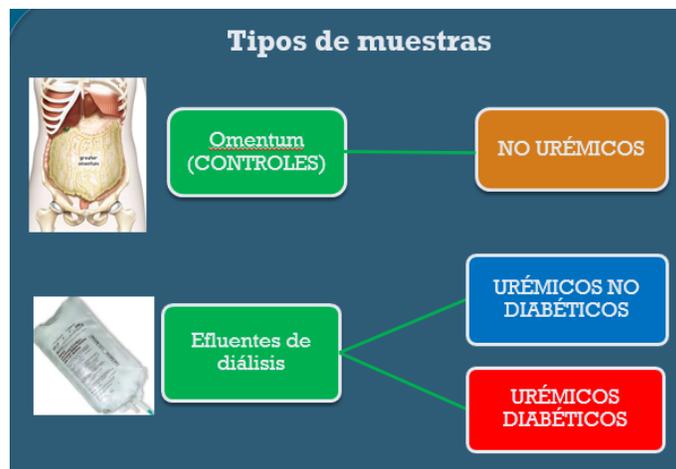


Figura 14. Esquema representativo de los grupos experimentales.

## **Anticuerpos y reactivos**

Ácido retinoico *all trans* (Cat. No. R/2625) Sigma Aldrich (Saint Louis, MO)

Anticuerpo ratón anti-citoqueratina 8/18 (Cat. No. 08-0XXX y 18-X001 a 18-X200)  
Zymed (South San Francisco, CA)

Anticuerpo conejo Anti-ZO-1 (Cat. No.61-7300) Zymed (South San Francisco, CA)

Anticuerpo ratón Anti-vimentina (Cat. No.18-0052) Zymed (South San Francisco, CA)

Anticuerpo ratón Anti-actina (músculo liso) (Cat. No. 08-X200) Invitogen Incorporation; Carlsbad, CA, USA)

Anticuerpo conejo Anti-VEGF (147): sc-507 Santa Cruz Biotechnology, Inc

Anticuerpo conejo Anti-Pan-cadherina (Cat. No. 71-7100) Invitogen Incorporation; Carlsbad, CA, USA)

DAPI dihydrochloride (Cat. No. D1306) Invitogen Incorporation; Carlsbad, CA, USA)

Anticuerpo alexa Fluo 488 goat anti-mouse (Cat. No. A-11001)

Anticuerpo alexa Fluo 594 rabbit anti-mouse (Cat. No. A-11062)

## **Aislamiento y cultivo de células mesoteliales**

Las biopsias fueron colectadas en solución Hanks fría y fueron incubadas durante 10 minutos en tripsina al 0.25% y EDTA al 0.1%. Las células mesoteliales fueron separadas por centrifugación a 1000 rpm por 10 minutos y fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco's (DMEM), mezcla de nutrientes Ham-F-12(1:1) suplementado con 15% vol/vol con suero fetal bovino, HEPES (15µg/mL), bicarbonato de sodio 1.2 g/L, penicilina (100U/mL), estreptomycin (100 mg/mL), L-glutamina (2µg/mL), transferrina (5µg/mL), insulina (5µg/mL), hidrocortisona (0.4µg/mL) y selenio de sodio (5ng/mL).

El aislamiento de las células mesoteliales a partir de los efluentes de diálisis se realizó de acuerdo a la metodología empleada por Stylianos et al., 1990 y Castro et al., 2000). Se obtuvieron las células, una vez que las células llegaron al pasaje 3, éstas fueron crecidas hasta confluencia. Las células fueron tratadas con ácido retinoico y/o con líquido de diálisis tal y como se muestra en la *figura 15*. Las células fueron sembradas en cubreobjetos (inmunofluorescencia), cajas Petri de 1000 mm x 20 mm (cuantificación de proteínas por Western Blot) y en insertos cubiertos con colágeno Transwell®-COL de 6.5 mm de diámetro y 3.0µm de tamaño de poro marca Corning Incorporated costar® (producción de proteínas en sobrenadantes).

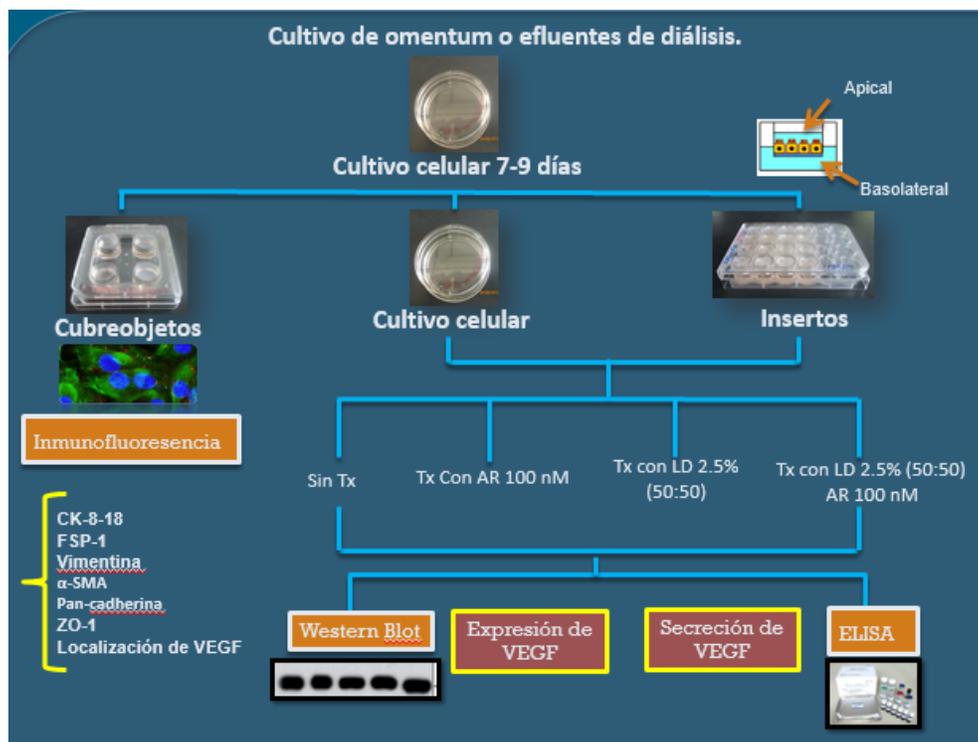


Figura 15. Diseño de los experimentos. AR (ácido retinoico all trans), LD (líquido de diálisis), ck-8/18 (citoqueratina 8/18), FSP-1 (proteína específica de fibroblastos), α-SMA (alfa actina de músculo liso), ZO-1 (zonula occludens-1)

## **Identificación de células mesoteliales**

Las células cultivadas fueron identificadas por su apariencia característica de empedrado cuando alcanzan la confluencia. Las células fueron positivas para citoqueratina y vimentina, mientras la proteína específica de fibroblastos no se detectó.

## **Inmunofluorescencia**

Las células fueron cultivadas hasta pasaje 3 y una vez que llegaron a confluencia, las monocapas fueron lavadas con PBS, fueron fijadas con metanol frío durante 10 minutos a 4°C, rehidratadas en PBS, permeabilizadas con 0.25% de Trirón X100 por 15 minutos y después fueron bloqueadas con BSA al 0.5% a 4°C durante 30 minutos (Sigma Chemical, St Louis, USA). Posteriormente, fueron incubadas toda la noche con el anticuerpo primario, a 4°C, seguido de lavados con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente. Las muestras fueron analizadas por microscopía confocal con un microscopio Leica DMIRE-2 (Germany).

## **Western Blot**

Las células fueron cultivadas hasta el pasaje 3 en cajas Petri de 100 mm x 20 mm hasta que llegaron a la confluencia. Los cultivos se expusieron a tratamiento con AR + LD por un periodo de 48 horas y posteriormente se realizó la extracción de las proteínas como se describe a continuación: las monocapas fueron lavadas con PBS, se extrajo la fracción soluble (citósolica) e insoluble (membranal) con RIPA (200 µL) adicionada con PMSF (Sigma, Saint Louis, MO), Complete (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) y con inhibidores de proteasas. Se realizó la cuantificación de proteína total usando el método de Lowry (Bio Rad laboratorios, CA). Las muestras fueron desnaturalizadas por ebullición durante 12 minutos y posteriormente diluidas en una concentración 1:5 en Laemmli (Bio Rad laboratories, CA), buffer de urea (0.5 M) y 2-mercaptoetanol (Bio Rad laboratories, CA). Las proteínas de las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 12 % (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). Luego fueron transferidas a una membrana adsorbente de PVDF

(polifluoruro de vinilideno) y posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos incubándolos con leche al 10% en PBS 1X adicionado con 0.5% de Tween 20 durante una hora a temperatura ambiente. Se identificaron las bandas específicas utilizando los anticuerpos correspondientes y quimioluminiscencia, la cual fue detectada con un sistema de imágenes EC3 (UVO, Bioluminescence Systems, Cambridge, UK). La densidad de banda de las proteínas fue cuantificada utilizando el software de densitometría de transmitancia EC3 (UVO, Bioluminescence Systems, Cambridge, UK).

### **Ensayo de producción de VEGF por las células mesoteliales**

Una vez que las células sembradas en insertos llegaron a confluencia (pasaje 3), se dieron los tratamientos (*figura 18*) durante 3 horas. Se colectaron los sobrenadantes de la parte apical y basolateral. Se determinó la concentración de VEGF en los sobrenadantes de los cultivos utilizando el “Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas” (Human VEGF Quantikine ELISA Kit Cat. No. DVE00). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

### **Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET)**

Las células en suspensión de pacientes controles y de pacientes no diabéticos y diabéticos en DP fueron sembradas en insertos cubiertos con colágeno Transwell®-COL de 6.5 mm de diámetro y 3.0µm de tamaño de poro marca Corning Incorporated costar®. La parte apical y basolateral de los insertos fueron llenadas con 0.2 mL y 1 mL de medio de cultivo adicionado con 100 nM de AR, respectivamente. El medio de cultivo fue remplazado cada tercer día. Se midió la RET cada tercer día cuando se realizó el cambio de medio usando un voltímetro Millicell-ERS (Millipore Corporation Bedford, MA). La RET fue expresada en  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ . Se restó el valor de los filtros sin células ( $30.3 \pm 1.3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) del valor total de RET.

## **Análisis estadístico**

Los resultados fueron expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar del promedio (SEM). Se evaluaron las diferencias entre grupos utilizando la prueba estadística t-Student. Para comparaciones múltiples entre grupos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y además de una prueba de Tukey para la determinación de significancia estadística.

# RESULTADOS

## Características de los pacientes

Se recolectaron 2 biopsias peritoneales de pacientes femeninas sanas no urémicas que fueron sometidas a cirugía abdominal (CONTROLES). Las CMPH fueron obtenidas de los efluentes de diálisis de 14 pacientes en DP (las cuales se dividieron en pacientes DIABÉTICOS y NO DIABÉTICOS), las características de los pacientes se muestran en la *tabla 5*.

Tabla 5. Características clínicas de los pacientes del estudio.

	<b>N=2</b>	<b>N=8</b>	<b>N=5</b>
<b>Edad</b>	49-50	14-45	20-72
<b>Mujer/hombre</b>	2	4/4	1/4
<b>Tiempo en diálisis</b>	-	2-86	3-30
<b>Glucosa (mg/dL)</b>	-	76-111.8	146-342
<b>Albúmina (g/dL)</b>	-	3.21-3.5	3.2-3.4
<b>Urea (mg/dL)</b>	-	70-107.25	76-92
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	-	5.79-11.10	3.2-7.48

## Características morfológicas de las CMPH

Se realizaron los cultivos de CMPH como se describió previamente, de pacientes CONTROLES, como NO DIABÉTICOS y DIABÉTICOS, los cuales se llevaron hasta pasaje tres (*figura 16*). Los cultivos presentan las características ya reportadas de las CMs, que son formar monocapas y tener apariencia de empedrado. Con las imágenes obtenidas se puede apreciar que entre los cultivos de CMs controles y los cultivos de CMs no diabéticos no muestran diferencia en el tamaño de las células; sin embargo, las CMs de pacientes diabéticos presentaron una mezcla de células hipertróficas de tamaño normal, además de tener un tamaño más grande.

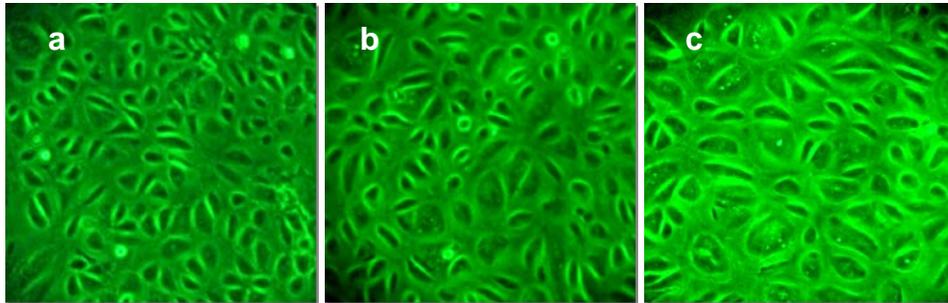


Figura 16. Morfología de las CMPH; a) paciente control, b) paciente no diabético, c) paciente diabético

### **Los cultivos de CMPH de pacientes en DP expresaron más VEGF**

Por inmunofluorescencia, se observó que en las CMPH de pacientes controles hubo menor expresión de VEGF, comparándola con los cultivos de los pacientes en DP; por el contrario, en los cultivos de pacientes no diabéticos hay mayor expresión de VEGF que en los controles y se encontró distribuido en el citoplasma y en algunas células del cultivo en la región perinuclear. La expresión de VEGF fue aún mayor en los cultivos de CMPH de pacientes diabéticos tal y cómo se muestra en la *figura 17*, VEGF se encontró a nivel citoplasmático e incluso en el núcleo. Estos resultados confirmaron los hallazgos encontrados por otros autores, (Combet et al., 2000, Lee et al., 2014), quienes reportaron que la expresión de VEGF por Western Blot es mayor en los pacientes que han sido sometidos a un procedimiento de DP.

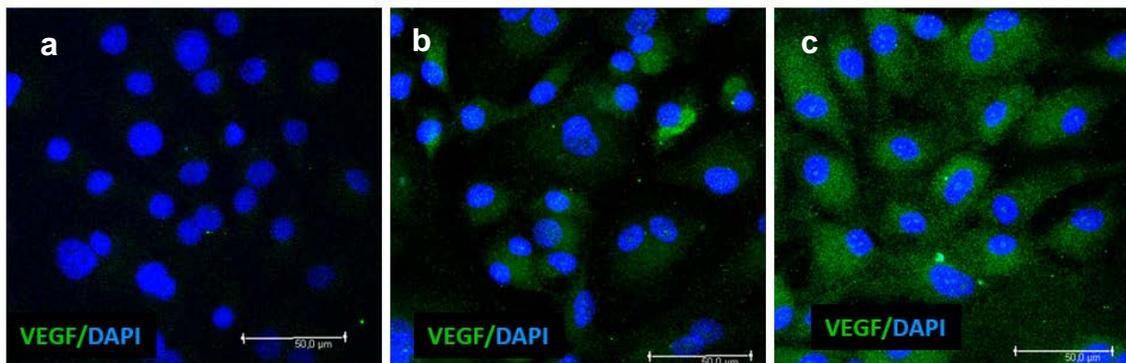


Figura 17. Expresión de VEGF; a) paciente control, b) paciente no diabético, c) paciente diabético.

### **Las CMPH expresaron citoqueratina 8/18 y no expresaron proteína específica de fibroblastos.**

Como se observa en la *figura 18*, las CMPH fueron positivas a la expresión de citoqueratina 8/18 (marcador mesotelial) en todos los grupos experimentales tanto control, como no diabético y diabético; sin embargo, sólo en los controles se pueden apreciar los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular del cultivo y se observó que esta característica se perdió en los cultivos de los pacientes en DP. En el caso del marcador de fibroblastos (proteína específica de fibroblastos), éste no se encontró expresado en los cultivos de los pacientes controles. En los cultivos de los pacientes en DP se encontró expresión parcial, siendo más evidente en los cultivos de pacientes diabéticos. Estos resultados confirman que los cultivos en los que se realizaron los experimentos son de origen mesotelial ya que de acuerdo a las imágenes de microscopía confocal, las células fueron positivas para CK 8/18 pero negativas para la FSP-1 (sólo en los cultivos de pacientes controles). Sin embargo la expresión de FSP-1 en las monocapas de los pacientes en DP revela que las células de estos pacientes están dañadas y probablemente hay presencia de miofibroblastos en el cultivo como respuesta al daño causado por la exposición a los líquidos de diálisis.

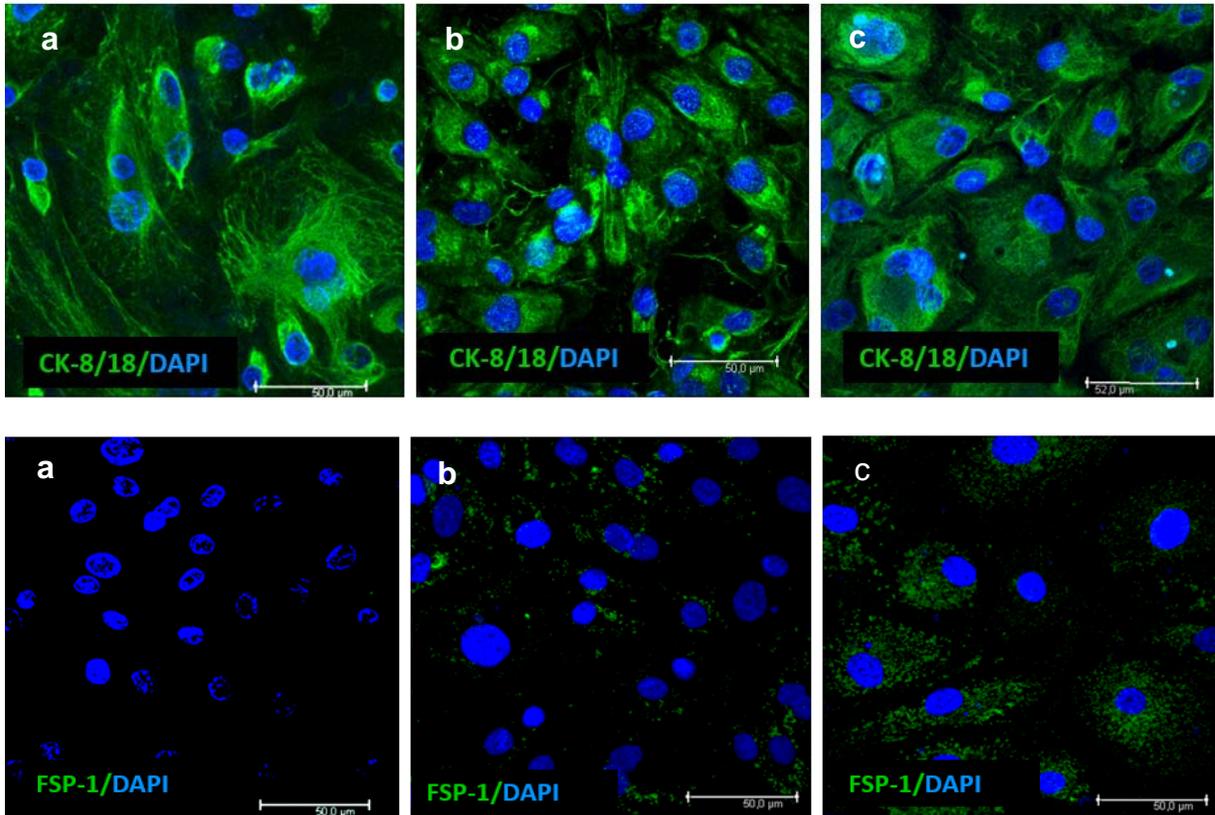


Figura 18. Expresión de citoqueratina 8/18 y de proteína específica de fobloblastos (FSP-1); a) paciente control, b) paciente no diabético, c) paciente diabético.

### **Los cultivos de CMPH de pacientes expresaron Vimentina.**

Los cultivos de CMs de pacientes controles expresaron vimentina en la zona perinuclear y citosólica de la célula, además se identificó la presencia de filamentos intermedios en el citoesqueleto. En los cultivos de pacientes en DP, la marca de vimentina fue positiva en los grupos controles, en los cultivos de pacientes en diálisis no diabéticos se observó la organización de los filamentos intermedios de forma similar que en los cultivos de controles; por el contrario, en los cultivos de pacientes diabéticos en DP hubo una reorganización del citoesqueleto. Además el aumento en la expresión de vimentina fue más evidente que en los de los pacientes no diabéticos (*figura 19*). Con base en estos resultados se observó que los pacientes en DP sufren una TEM, ya que aumenta la expresión de marcadores mesénquimales como vimentina, y que la diabetes *per*

se favorece el proceso de TEM en los pacientes, aún sin ser sometidas las CMs a los líquidos de diálisis.

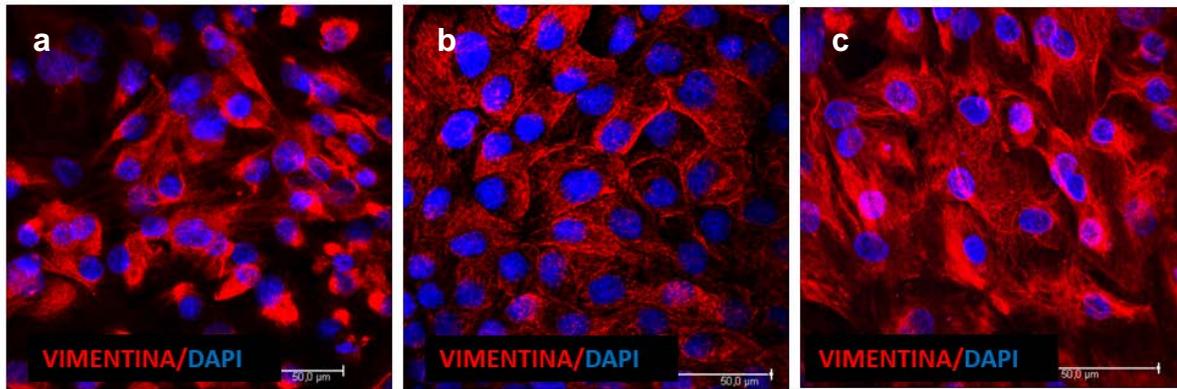


Figura 19. Expresión de vimentina; a) paciente control, b) paciente no diabético, c) paciente diabético.

### **Los cultivos de CMPH de pacientes en DP expresaron alfa actina de músculo liso.**

En los cultivos controles no hubo expresión del marcador mesénquimal  $\alpha$ -SMA. Por el contrario los cultivos de pacientes en DP fueron positivos para  $\alpha$ -SMA, siendo más evidente en las CMs de pacientes diabéticos (figura 20). Lo que sugiere que los pacientes sometidos a terapias de diálisis están sufriendo una TEM y que la diabetes es un factor adicional que está favoreciendo la TEM en estos pacientes.

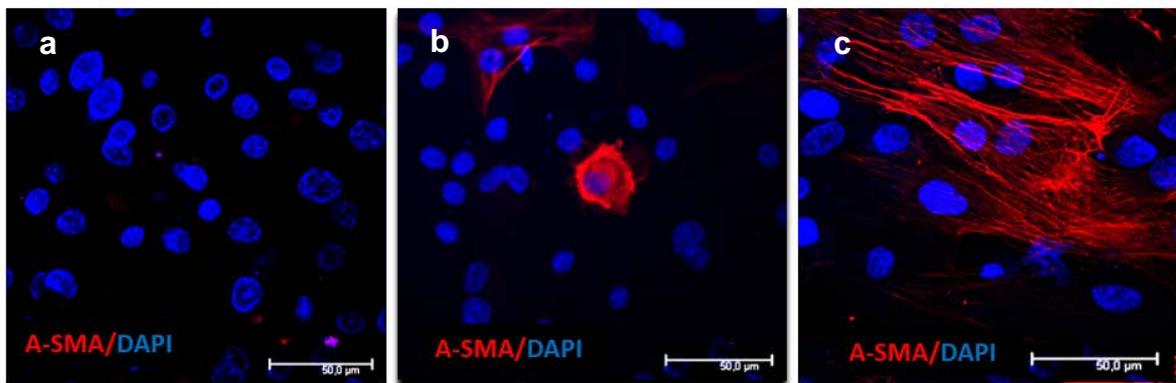


Figura 20. Expresión de alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA); a) paciente control, b) paciente no diabético, c) paciente diabético

## La expresión de VEGF fue mayor en los pacientes en DP.

La expresión de VEGF a nivel de proteína fue mayor en los pacientes en DP, tal y como se observa en la *figura 21*. Los pacientes no diabéticos tuvieron valores de  $140 \pm$ , mientras que los diabéticos presentaron valores de  $170 \pm$ . El tratamiento por 48 horas con ácido retinoico *all trans* no modificó la expresión de VEGF en los diferentes grupos experimentales. Al tratar las células con LD por 48 horas se observó que hubo un aumento en la expresión de VEGF en los grupos control y no diabético. En el caso del grupo diabético no se observó un aumento significativo de VEGF si se compara con el grupo que no recibió tratamiento con LD. Por último, al tratar los cultivos con ácido retinoico *all trans* y LD por 48 horas se encontró que el aumento en la expresión de VEGF fue revertido con el tratamiento con ácido retinoico *all trans* (*figura 21*).

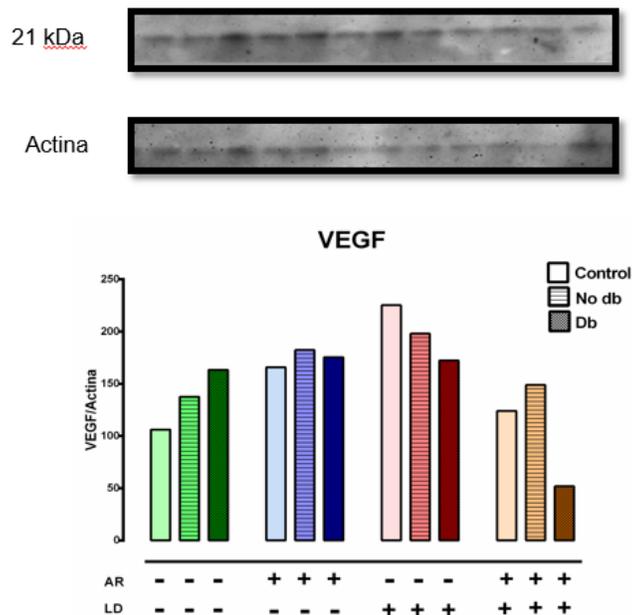


Figura 21. La expresión de VEGF está aumentada en los pacinetes en DP y esta expresión disminuyó con el AR.

**Las CMPH secretan mayoritariamente VEGF hacia la parte apical del cultivo, la cual es revertida por el tratamiento con ácido retinoico *all trans*.**

Para la determinación de la secreción de VEGF, se recuperaron los sobrenadantes de la parte apical y basolateral de los cultivos tratados durante tres horas con ácido retinoico *all trans* y LD. Interesantemente, se encontró que la secreción está polarizada. Ésta fue significativamente mayor hacia la parte apical del cultivo tanto en los pacientes no diabéticos como en los diabéticos. Al comparar los dos grupos experimentales, se observó que en los pacientes diabéticos hubo mayor secreción que en los no diabéticos arrojando valores de  $170 \pm$  (pg/mL) y  $140 \pm$  (pg/mL) de VEGF, respetivamente. En ambos grupos experimentales, el tratamiento con ácido retinoico *all trans* por 3 horas disminuyó la secreción de VEGF tanto en la parte apical como en la basolateral de la monocapa. Además, se encontró que la exposición a los LD por 3 horas aumentó la secreción apical de VEGF en los cultivos de pacientes diabéticos, por el contrario, en los pacientes no diabéticos hubo una reducción en la secreción basal y apical. Finalmente, se observó que los cultivos tratados con la combinación de ácido retinoico *all trans* y LD durante 3 horas mostraron una disminución significativa de la secreción apical y basolateral en ambos grupos de estudio (*Figura 22*).

También se midió la secreción a tiempos más largos de exposición y se observó que la secreción aumentó en el tiempo. La secreción de VEGF fue mayor en el lado apical de la célula, el AR disminuyó la secreción apical y basolateral de VEGF inducida por la exposición durante 12 horas con los LD (*figura 23*). En un experimento en el cual se trató con AR + LD durante 48 horas se observó que la secreción de VEGF fue mayor en el lado apical de la célula, hubo un aumento de la secreción apical y basal de VEGF en los cultivos expuestos a los LD, y que el tratamiento con AR disminuyó este aumento de VEGF (*figura 24*).

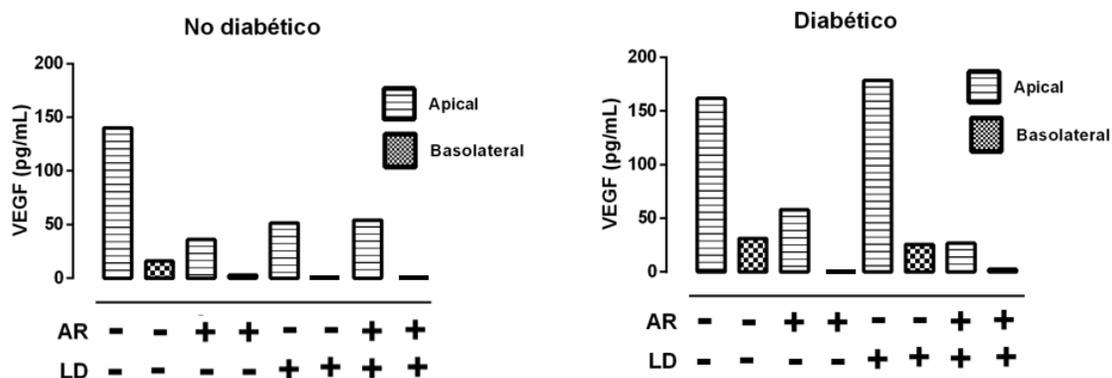


Figura 22. Secreción polarizada de VEGF en los cultivos tratados con ácido retinoico *all trans* y LD.

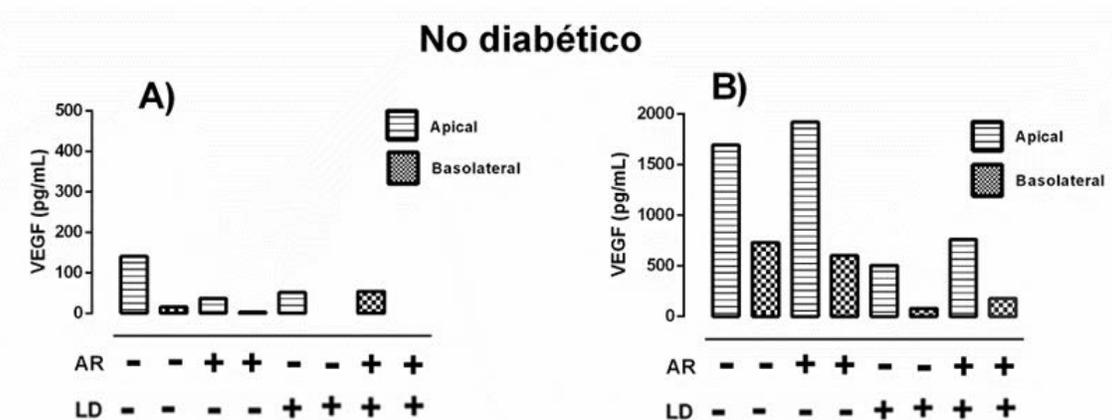


Figura 23. CMPH en pasaje 3 expuestas a A) 3 horas y B) 12 horas de tratamiento con LD y AR.

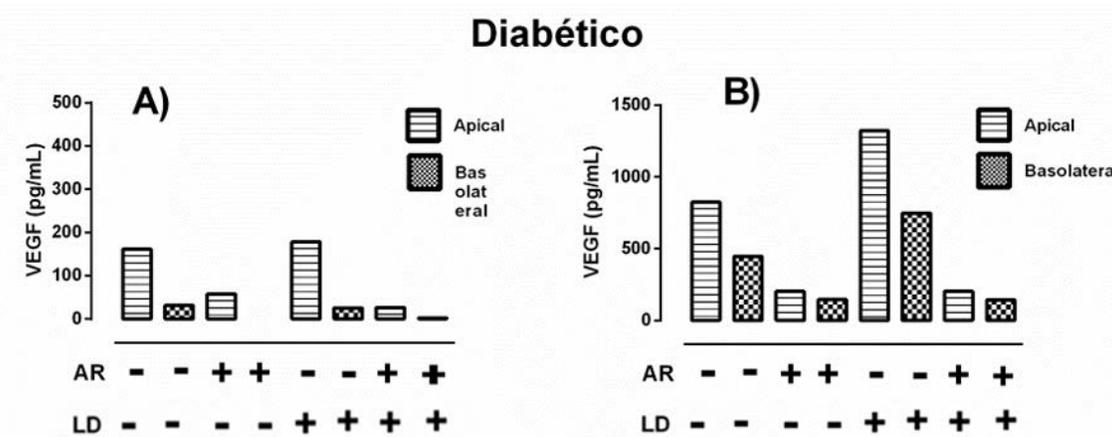


Figura 24. CMPH en pasaje 3 expuestas a A) 3 horas de tratamiento con LD y AR. B) 48 horas de tratamiento con LD y AR

## **El tratamiento con ácido retinoico *all trans* disminuyó la RET en los cultivos de pacientes control y diabéticos.**

Las células se crecieron en pasaje 3 en filtros y se registró la RET de los grupos control, no diabético y diabético. Estos grupos se trataron con y sin ácido retinoico *all trans*. Se encontró que el ácido retinoico disminuyó la RET en los grupos control y diabético; sin embargo, en el grupo no diabético no tuvo efecto (*figura 25*).

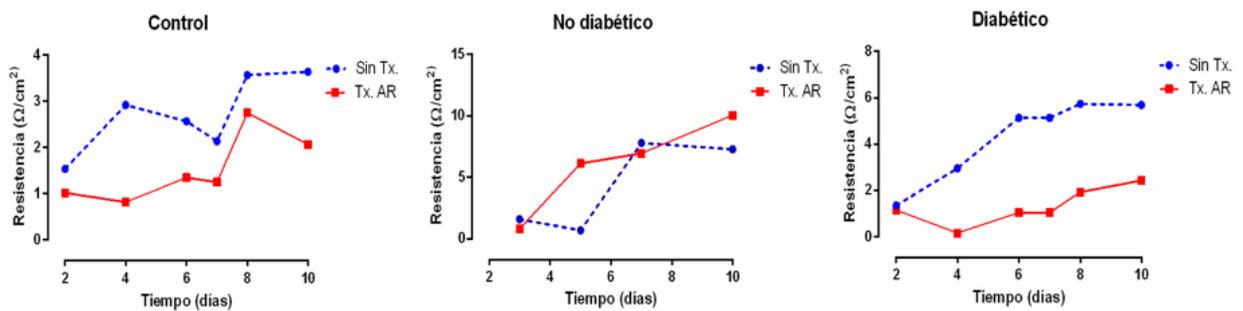


Figura 25. Efecto del ácido retinoico *all trans* en el crecimiento de las monocapas.

## **El tratamiento con LD redujo la RET, y este efecto fue revertido con el ácido retinoico *all trans* en los cultivos de CMPH.**

Los cultivos en pasaje 3 y en confluencia fueron tratados con ácido retinoico *all trans* y LD durante 48 horas. El tratamiento con ácido retinoico *all trans* disminuyó la RET en los cultivos de CMPH de controles y pacientes diabéticos. La exposición a los LD disminuyó la RET en los cultivos de paciente diabético. Interesantemente, el tratamiento con ácido retinoico *all trans* revirtió el efecto de la exposición a los LD en los cultivos (*figura 26*). Lo que sugiere que ácido retinoico *all trans* favorece la integridad de las monocapas, pero sólo en los cultivos más dañados (expuestos a los LD).

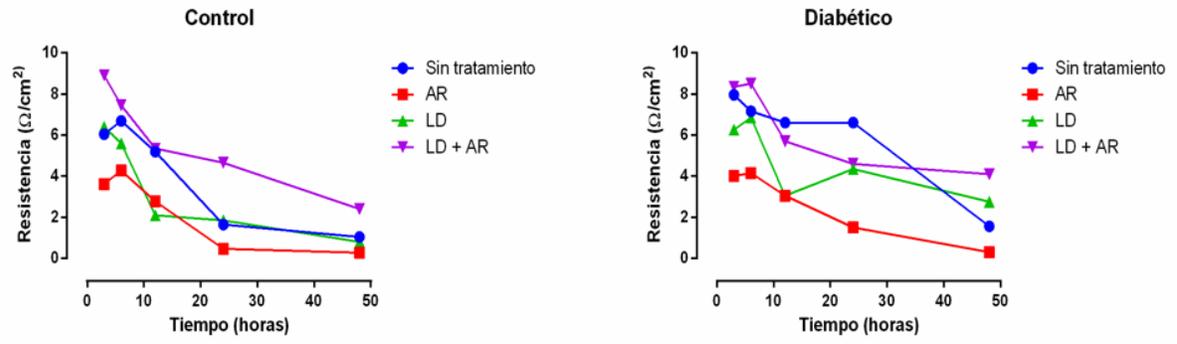


Figura 26. Efecto de ácido retinoico *all trans* en los cultivos tratados con LD.

## DISCUSIÓN

El mesotelio actúa como una barrera permeable que puede reemplazar la función del riñón cuando este pierde su capacidad funcional, (Lanfrancone et al., 1992, Książek, 2013,). El mesotelio regula el paso de agua y solutos desde la región intravascular hacia la cavidad peritoneal, (Mutsaers et al., 2003). Sin embargo, se ha observado que la permeabilidad del peritoneo varía entre los pacientes (Retana et al., 2013). El peritoneo sufre diversas modificaciones estructurales durante el tratamiento de diálisis peritoneal, que inducen disfunción peritoneal progresiva y un fallo de la ultrafiltración. Además presenta una transición mesotelio mesénquima (TMM), en la cual las MCs sintetizan componentes de la matriz extracelular, así como factores pro-inflamatorios y pro-angiogénicos. En el presente estudio se midió la expresión de VEGF, un factor pro-angiogénico que tiene funciones importantes y está implicado en la permeabilidad vascular, la proliferación y la angiogénesis de células peritoneales, (Aroeira et al., 2007, Guo et al., 2014). Se encontró que en condiciones patológicas las células sintetizan VEGF como respuesta al daño. En el peritoneo, se ha reportado que VEGF aumenta con la DP, este aumento está asociado a la formación de nuevos vasos sanguíneos. Este fenómeno de angiogénesis exacerbada provoca que se pierda la ultrafiltración del peritoneo, y por lo tanto su funcionalidad. De acuerdo a los hallazgos encontrados por diversos autores, (Zweers et al., 1999, Selgas et al., 2000, Pecoits Filho et al., 2002, Yañez et al., 2003, Aroeira et al., 2007, Pérez Lozano et al., 2013, Lee et al., 2014, Guo et al., 2014), se sabe que las CMs constituyen una fuente importante de VEGF en pacientes en diálisis peritoneal. En este estudio se analizó por primera vez la expresión de VEGF en células peritoneales en pacientes controles (no urémicos), en pacientes no diabéticos y en pacientes diabéticos. Fue importante considerar que en los cultivos no hubiera factores externos o adicionales que pudieran alterar la secreción de VEGF, ya que esta secreción se mantuvo estable durante el cultivo. Se observó que los cultivos aún en pasaje 3 conservaron su fenotipo mesotelial. Se encontró que las CMs humanas obtenidas a partir de biopsias peritoneales y aquellas obtenidas a partir de los efluentes de diálisis formaron una monocapa y presentaron la morfología

característica reportada por Bird et al (2011). Éstas presentan morfología de empedrado, cuando alcanzan la confluencia. Los pacientes no diabéticos exhibían diferencias morfológicas en comparación con los diabéticos, éstos presentaron células de mayor tamaño. No existen reportes en los cuales se caractericen las diferencias morfológicas entre los pacientes no diabéticos y diabéticos. En un estudio realizado por Retana et al., (2013), se encontró que las CMs humanas de pacientes en DP (transportadores bajos) presentaron células hipertróficas y de mayor tamaño en comparación con las células de pacientes transportadores altos y controles. De acuerdo a nuestros resultados, se puede sugerir que las células de pacientes diabéticos son diferentes a los controles y los no diabéticos, por lo que sería interesante determinar si están hipertróficas. No se encontraron reportes previos en la literatura que describieran las características morfológicas de las CMs de pacientes en DP no diabéticos y diabéticos.

Se identificó por inmunofluorescencia la localización de VEGF en los cultivos celulares de CMs humanas de los grupos experimentales. Se observó que en los cultivos de pacientes controles hubo menor expresión de VEGF en la monocapa, comparándola con los cultivos de los pacientes en DP. En los cultivos de pacientes no diabéticos la expresión de VEGF se localiza en el citoplasma y en algunas células del cultivo en la región perinuclear. Ésta expresión fue aún mayor en los cultivos de CMPH de pacientes diabéticos, el VEGF se encontró también a nivel citoplasmático e incluso en el núcleo, estos resultados corresponden con lo reportado por Perez-Lozano et al., (2013), quienes observaron que cuando las células peritoneales están en un proceso de TMM hay una movilización de VEGF de la membrana plasmática hacia el citoplasma. Éstos autores lo califican como un fenómeno de internalización de VEGF. Existen varios reportes acerca del aumento en la expresión de VEGF en las células peritoneales como respuesta a la exposición a los líquidos de diálisis durante la DP (Combet 2000, Boulanger et al., 2002, Liu et al., 2013). Sin embargo, no se había considerado que efecto tenía la diabetes en la expresión de VEGF. En este estudio se encontró que la expresión de VEGF está aumentada en los pacientes en DP, comparada con los controles y que ésta expresión fue aún mayor en los pacientes diabéticos. Estos resultados

aportan información muy importante ya que se encontró que la diabetes per se está favoreciendo el aumento en la expresión de VEGF, que puede causar un aumento en la angiogénesis. Aunque no se midió la formación de nuevos vasos en este trabajo, existen estudios previos donde se reportó que la diabetes es un factor de riesgo independiente, que modifica las características morfológicas (engrosamiento de la región submesotelial) y funcionales (aumento en el número de capilares) del peritoneo. Estos cambios fueron evidentes desde el inicio de la diálisis peritoneal, (Mizumasa et al., 2013).

Debido a que no hay estudios previos en los cuales se haya evaluado esta característica de los pacientes, el presente estudio es relevante para dilucidar los mecanismos de los cambios morfológicos en el peritoneo causados por la exposición a los líquidos de diálisis en el paciente diabético.

Durante los últimos años, se ha descrito que las células mesoteliales de pacientes en diálisis presentan TMM, como respuesta a los periodos prolongados de DP, (Yáñez-Mo et al., 2013, Aroeira et al., 2005, Aroeira et al., 2007, Pérez-Lozano et al., 2013, Retana et al., 2013, Lee et al., 2014). En este estudio, se identificó por primera vez por inmunofluorescencia la expresión de marcadores epiteliales (citoqueratina) y mesenquimales (proteína específica de fibroblastos, vimentina y alfa actina de músculo liso), en los cultivos celulares de pacientes controles, no diabéticos para determinar la presencia de la TMM. Los pacientes en DP diabéticos exhibieron reorganización del citoesqueleto de vimentina y citoqueratina, además de haber expresión de  $\alpha$ -SMA. Se observó que las células mesoteliales de pacientes diabéticos presentan mayor expresión de marcadores mesenquimales y menor expresión de marcadores epiteliales. Además se encontró que las células mesoteliales de pacientes en diálisis se encuentra en un proceso TEM, pero preservan su fenotipo mesotelial. Estos resultados sugieren que los pacientes diabéticos presentan mayor daño que los no diabéticos y que este daño peritoneal precede al daño inducido por la uremia y por los líquidos de diálisis. Por consiguiente, los posibles tratamientos deberían estar diseñados hacia la prevención de la transición mesotelio mesénquima y/o a disminuir sus

consecuencias como inflamación. También puede enfocarse el tratamiento a disminuir efectos nocivos, tales como la síntesis anormal de componentes de matriz extracelular y/o de la secreción de VEGF. En trabajos recientes se empleó el tratamiento con ácido retinoico *all trans* y se encontró que disminuyó la expresión de marcadores de la TMM, además de mantener la integridad mesotelial, mejorando la localización y expresión de proteínas de la unión estrecha (Retana et al., 2013). Sin embargo, el desarrollo de estrategias frente a la secreción de VEGF no está establecido, y ello requiere un estudio en profundidad, es por ello que en este trabajo se empleó el ácido retinoico como una alternativa terapéutica.

El ácido retinoico es una molécula de señalización la cual es crítica en muchos procesos incluyendo sobrevivencia celular, proliferación y diferenciación de diversas estirpes celulares, y por consiguiente en el mantenimiento del tejido, (Rhee et al., 2012). Esta molécula regula la expresión de genes a través de receptores nucleares, el receptor para ácido retinoico (RAR), el cual está compuesto por tres subtipos ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), (Chambón, 1996, Rhee et al., 2012). En este estudio se describió por primera vez que el ácido retinoico tuvo un efecto diferencial en la expresión de la proteína de VEGF por Western Blot en los cultivos de células peritoneales de controles, no diabéticos y diabéticos. La exposición durante 48 horas a los LD aumentó la expresión de VEGF, y ésta fue revertida con el ácido retinoico *all trans*. Sin embargo, en los grupos no expuestos a los líquidos de diálisis, el ácido retinoico *all trans* no tuvo efecto. Con estos resultados se puede observar que el AR sólo actúa en las células que están más dañadas tal y como fue el caso de aquellas expuestas a los LD.

El estudio comparativo aportó datos interesantes relativos al efecto de los líquidos de diálisis sobre la TEM y, por consiguiente, sobre el VEGF secretado por las CMPH. Una de las metas del estudio incluía medir la secreción de VEGF en los sobrenadantes, se encontró que los niveles de VEGF en los sobrenadantes estaban muy aumentados en el grupo diabético en comparación con el no diabético, acentuándose esa diferencia a lo largo del tiempo. En el 2013, Pérez-Lozano y cols., encontraron que la secreción de VEGF aumentaba en los pacientes en DP, sin embargo no había reportes previos que incluyeran pacientes diabéticos. El siguiente paso a desarrollar fue determinar si la secreción de VEGF era polarizada. Se encontró mayor concentración de VEGF en los sobrenadantes en la parte apical de la monocapa. Este efecto observado sugiere que VEGF podría estar ejerciendo un efecto parácrino sobre las células mesoteliales.

El deterioro de la función peritoneal es una complicación muy severa para la sobrevivencia de los pacientes en DP. Se sugiere que los efectos benéficos del ácido retinoico descritos en este estudio pueden retrasar o disminuir las alteraciones observadas en los pacientes en DP y prolongar el tiempo de diálisis.

El siguiente paso a desarrollar fue el análisis de VEGF como posible marcador de la función peritoneal. Se evaluó la permeabilidad de la vía paracelular a través de la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET). Es muy importante que la integridad de esta membrana se conserve. Las uniones intercelulares se llevan a cabo a través de moléculas de la unión estrecha, donde se transporta agua y solutos en la membrana peritoneal. La determinación del grado de hermeticidad de las uniones se determina midiendo la RET, la cual se sabe aumenta con el grado de hermeticidad de las uniones estrechas y viceversa. La RET refleja la integridad funcional de las uniones intercelulares en varios tipos celulares (Tobika et al., 1998, Zhu et al., 2004, Amasheh et al., 2009). En este trabajo se evaluó el efecto del ácido retinoico *all trans* en la RET, diversos hallazgos observados revelan que el ácido retinoico *all trans* regula la resistencia de la unión estrecha en varios tipos celulares. Tobioka y cols, (1996) reportaron que el ácido retinoico *all trans* aumentó la RET en células mesoteliales de rata. Por el contrario, se encontró que

el tratamiento con ácido retinoico *all trans* redujo la RET en células Caco-2 y CaSki. En este estudio se encontró que el ácido retinoico disminuyó la RET en los cultivos de pacientes control y diabético, y no tuvo efecto en los pacientes no diabéticos. En un estudio realizado por Retana et al., (2014) se midió la RET en cultivos de CMPH tratados con ácido retinoico *all trans* y se encontró que hubo una disminución en la RET en los grupos controles y en los cultivos de pacientes transportadores altos, mientras en los transportadores bajos, el AR no tuvo efecto. Se concluye que es un efecto parecido al observado en esta tesis, donde el ácido retinoico disminuyó la RET sólo en los pacientes controles y diabéticos.

Las respuestas diferenciales encontradas en los pacientes diabéticos y no diabéticos al tratamiento con ácido retinoico, pueden deberse a diferencias en la expresión y función de moléculas involucradas en la vía de señalización del ácido retinoico *all trans* o en la biodisponibilidad de esta molécula. No existen estudios en los cuales se determine la expresión de moléculas de señalización del ácido retinoico *all trans* en las células mesoteliales, sin embargo en un estudio realizado por Starkey et al., (2010) se encontró que el metabolismo del ácido retinoico está significativamente desregulado en riñones de rata diabética. Esta desregulación podría estar sucediendo en los pacientes diabéticos en DP, sin embargo se requiere nuevos estudios para determinar la expresión de la molécula y del receptor del ácido retinoico *all trans*.

El ácido retinoico *all trans* puede ser un tratamiento alternativo para mantener la integridad mesotelial de los pacientes en DP, reduciendo los niveles de expresión y secreción de VEGF en los cultivos de CMPH, además de aumentar los valores de RET en los pacientes tratados con LD.

El aumento de la resistencia eléctrica transepitelial sugiere que el ácido retinoico tuvo un efecto favorable en la principal vía de transporte peritoneal, que es la vía paracelular.

## CONCLUSIONES

En las células mesoteliales de pacientes diabéticos urémicos la expresión de VEGF está aumentada.

En los pacientes urémicos diabéticos está presente  $\alpha$ -SMA, aumentada la vimentina y disminuida la citoqueratina, sugiriendo la tendencia a la transición epitelio-mesénquima.

El ácido retinoico disminuyó la expresión de VEGF en los cultivos de CMPH de pacientes urémicos no diabéticos y diabéticos. Además, redujo la secreción apical y basolateral de VEGF en los cultivos expuestos a los líquidos de diálisis.

Se mantuvo la integridad de la membrana peritoneal de pacientes expuestos a los líquidos de diálisis, ya que el ácido retinoico aumentó el valor de la RET en los pacientes controles, no diabéticos y diabéticos.

## BIBLIOGRAFÍA

Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Markov AG, Günzel D, Amasheh M, Fromm M (2009). **Tight junction proteins as channel formers and barrier builders.** Ann N Y Acad Sci 1165: 211-9.

Aroeira L, Aguilera A, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Pérez-Lozano M (2005). **Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: role of vascular endothelial growth factor.** Am J Kid Dis 46: 938–948.

Aroeira LS, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, del Peso G, Jimenez-Heffernan JA, Selgas R, Lopez-Cabrera M (2007). **Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions.** J Am Soc Nephrol 18: 2004-2013.

Baltes S, Nau H, Lampen A (2004). **All-trans retinoic acid enhances differentiation and influences permeability of intestinal Caco-2 cells under serum-free conditions.** Dev Growth Differ 46(6): 503-14.

Baroni G, Schuinski A, de Moraes TP, Meyer F, Pecoits-Filho R (2012). **Inflammation and the peritoneal membrane: causes and impact on structure and function during peritoneal dialysis.** Mediators Inflamm 2012 (en prensa).

Baxter Healthcare Corporation Renal Division Education CKD información para pacientes. Opciones de tratamientos. Cómo escoger lo que más te conviene, [en línea]. [fecha de consulta: 29 de octubre de 2014]. Disponible en: <[http://www.renalinfo.com/us/resources/files/AL06094SP\\_TreatmentOptions.pdf](http://www.renalinfo.com/us/resources/files/AL06094SP_TreatmentOptions.pdf)>.

Bird SD, Legge M, Walker RJ (2011). **Thiols stabilize cobblestone morphology of cultured mesothelial cells.** Cell Biol Int 35(8): 857-67.

Botella J (2002). **Manual de Nefrología Clínica.** Edit. Masson.

Boulanger E, Grossin N, Wautier MP, Taamma R, Wautier JL (2006). **Mesothelial RAGE activation by AGEs enhances VEGF release and potentiates capillary tube formation.** Kidney Int 71(2): 126-33.

Boulanger, E, Grossin, N, Wautier, MP, Taamma, R, and Wautier, JL (2007). **Mesothelial RAGE activation by AGEs enhances VEGF release and potentiates capillary tube formation.** Kidney Int 71: 126-133.

Boulanger E, Wautier MP, Wautier JL, Boval B, Panis Y, Wernert, N, Danze PM, and Dequiedt P (2002). **AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression.** *Kidney Int* 61: 148-156.

Castro M, Díaz C, Bajo M, Sánchez-Cabezudo M, Fernández de Castro M, del Peso G, Martínez M y Selgas R (2000). **Metodología para evaluar la capacidad de crecimiento ex vivo de las células mesoteliales obtenidas directamente del efluente peritoneal.** *Nefrología* 20(3): 1-7.

Chambon P (1996). **A decade of molecular biology of retinoic acid receptors.** *FASEB J* 10(9): 940-54.

Cho KW, Kwon HJ, Shin JO, Lee JM, Cho SW, Tickle C, Jung HS (2012). **Retinoic acid signaling and the initiation of mammary gland development.** *Dev Biol* 365(1): 259-66.

Cho Y, Johnson DW, Badve S, Craig JC, Strippoli GF, and Wiggins KJ (2013). **Impact of icodextrin on clinical outcomes in peritoneal dialysis: a systematic review of randomized controlled trials.** *Nephrol Dial Transplant* (en prensa).

Combet S, Miyata T, Moulin P, Pouthier D, Goffin E, Devuyst O (2000). **Vascular proliferation and enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase in human peritoneum exposed to long-term peritoneal dialysis.** *J Am Soc Nephrol* 11(4): 717-28.

Davies S (2013). **Peritoneal dialysis--current status and future challenges.** *Nat Rev Nephrol* 9(7): 399-408.

Davies SJ, Phillips L, Naish PF, y Russell, GI (2001). **Peritoneal glucose exposure and changes in membrane solute transport with time on peritoneal dialysis.** *J Am Soc Nephrol* 12: 1046-1051.

Erixon M, Wieslander A, Linden T, Carlsson O, Forsback G, Svensson E, Jonsson JA, Kjellstrand P (2006). **How to avoid glucose degradation products in peritoneal dialysis fluids.** *Perit Dial Int* 26: 490-497.

Evans DB (1977). **Diseases of the urinary system. Management of chronic renal failure by dialysis and transplantation.** *Br Med J* 1: 1585-1588.

Ferrara N (1999). **Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor.** *J Mol Med* 77: 527-543.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003). **The biology of VEGF and its receptors.** *Nat Med* 9: 669-676.

Fresenius medical care, ¿Qué función cumplen los riñones?, [en línea]. [fecha de consulta: 30 de octubre de 2014]. Disponible en: [http://www.fmc-ag.com.ar/que\\_funcion\\_cumplen\\_los\\_riniones.html](http://www.fmc-ag.com.ar/que_funcion_cumplen_los_riniones.html).

Gorodeski GI, Eckert RL, Pal D, Utian WH, Rorke EA (1997). **Retinoids regulate tight junctional resistance of cultured human cervical cells.** Am J Physiol 273(5 Pt1): 1707-13.

Guo J, Xiao J, Gao H, Jin Y, Zhao Z, Jiao W, Liu Z, Zhao Z (2014). **Cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor expressions are involved in ultrafiltration failure.** J Surg Res 188(2): 527-536.

Herrick S y Mutsaers S (2004). **Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering.** Int J Biochem Cell Biol 36(4): 621-42.

Herricka S y Mutsaers S (2004). **Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering.** Int J Biochem & Cell Biol 36: 621–642.

Hjelle JT, Miller-Hjelle MA, Dobbie JW (1995). **The biology of the mesothelium during peritoneal dialysis.** Perit Dial Int 15(7 Suppl): S13-22; discussion S22-3.

Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW (1991). **The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA.** Mol Endocrinol 5: 1806-1814.

Intiso D (2014). **The rehabilitation role in chronic kidney and end stage renal disease.** Kidney Bood Press Res 39: 180-188.

Ito T, Yorioka N (2008). **Peritoneal damage by peritoneal dialysis solutions.** Clin Exp Nephrol 12(4): 243-249.

Ito T, Yorioka N, Kyuden Y, Asakimori Y, Kiribayashi K, Ogawa T, Kohno N (2003). **Effect of glucose polymer on the intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells.** Nephron Clin Pract 93(3): 97-105.

Kalluri R y Weinberg RA (2009). **The basics of epithelial-mesenchymal transition.** J Clin Invest 119: 1420-1428.

Kaneko K, Hamada C, Tomino Y (2007). **Peritoneal fibrosis intervention.** Perit Dial Int 27(Suppl 2): S82-86.

Kerner W y Brückel J (2014). **Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus.** Exp Clin Endocrinol 122(7): 384-386.

Koolman J y Klaus-Heinrich Röhm KH (2004). **Bioquímica: texto y atlas**. Ed. Médica Panamericana.

Książek K (2013). **Mesothelial cell: a multifaceted model of aging**. Ageing Res Rev 2: 595-604.

Kurokawa k, Nangaku M, saito A, Inagi R y Miyata T (2002). **Current issues and future perspectives of chronic renal failure**. J Am Soc Nephrol 13: s3–s6.

Lanfrancone L, Boraschi D, Ghiara P, Falini B, Grignani F, Peri G, Mantovani A, Pelicci PG (1992). **Human peritoneal mesothelial cells produce many cytokines (granulocyte colony-stimulating factor [CSF], granulocyte-monocyte-CSF, macrophage-CSF, interleukin-1 [IL-1], and IL-6) and are activated and stimulated to grow by IL-1**. Blood 80(11): 2835-42.

Lee YC, Tsai YS, Hung SY, Lin TM, Lin SH, Liou HH, Liu HC, Chang MY, Wang HH, Ho LC, Chen YT, Chen HP, Fan HA, Liu KW, Kung YT, Wang HK, Chiou YY (2014). **Shorter daily dwelling time in peritoneal dialysis attenuates the epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells**. BMC Nephrol 20: 15-35.

Lindmark T, Kimura Y, Artursson P (1998). **Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells**. J Pharmacol Exp Ther 284(1): 362-9.

Liu J, Wu X, Liu Y, Xu Y, Huang Y, Xing C, Wang X (2013). **High-glucose-based peritoneal dialysis solution induces the upregulation of VEGF expression in human peritoneal mesothelial cells: The role of pleiotrophin**. Int J Mol Med 32(5): 1150-8.

Lohnes D, Mark M, Mendelsohn C, Dollé P, Decimo D, LeMeur M, Dierich A, Gorry P, Chambon P (1995). **Developmental roles of the retinoic acid receptors**. J Steroid Biochem Mol Biol 53(1-6): 475-86.

Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA y Robinson AJ (1994). **Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus**. J Virol 68: 84-92.

Mangelsdorf DJ, Ong ES, Dyck JA, Evans RM (1990). **Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway**. Nature 345(6272): 224-9.

Margetts PJ y Bonnud P (2003). **Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis**. Perit Dial Int 23: 530-541.

Mizumasa T, Hirakata H, Kuroki Y, Katafuchi R, Yotsueda H, Mitsui K, Nakashima Y, Tsuruya K (2013). **Diabetes influences peritoneal morphology in uremic patients at the initiation of peritoneal dialysis.** Perit Dial Int. 33(2): 175-81.

Mizumasa T, Hirakata H, Kuroki Y, Katafuchi R, Yotsueda H, Mitsui K, Nakashima Y y Tsuruya K (2013). **Diabetes Influences Peritoneal Morphology in Uremic Patients at the Initiation of Peritoneal Dialysis.** Perit Dial Int 33(2): 175–181.

Mutsaers S (2004). **The mesothelial cell.** Int J Biochem Cell Biol 36(1): 9-16.

Nakamoto H, Hamada C, Shimaoka T, Sekiguchi Y, Io H, Kaneko K, Horikoshi S, Tomino Y (2014). **Accumulation of advanced glycation end products and beta 2-microglobulin in fibrotic thickening of the peritoneum in long-term peritoneal dialysis patients.** J Artif Organs 17(1): 60-8.

National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases NIH Publication No. 07–4666 December 2006.

Nessim SJ, Perl J y Bargman JM (2010). **The renin-angiotensin-aldosterone system in peritoneal dialysis: is what is good for the kidney also good for the peritoneum?** Kidney Int 78: 23-28.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006). **VEGF receptor signaling in control of vascular function.** Nat Rev Mol 7: 359-371.

Pecoits-Filho R, Abensur H, Cueto-Manzano A, Dominguez, Divino Filho J, Fernandez-Cean J, Mireya Ortiz A, Moretta G, Ramos A, Sanabria M, Sesso R, Paniagua R. (2007). **Overview of peritoneal dialysis in latin America PDI.** Perit Dial Int 27(3): 316-21.

Pecoits-Filho R, Araujo MR, Lindholm B, Stenvinkel P, Abensur H, Romao JE, Jr. Marcondes M, De Oliveira AH, Noronha IL (2002). **Plasma and dialysate IL-6 and VEGF concentrations are associated with high peritoneal solute transport rate.** Nephrol Dial Transplant 17: 1480-1486.

Pérez-Lozano M, Sandoval P, Rynne-Vidal A, Aguilera A, Jiménez-Heffernan J, Albar-Vizcaíno P, Majano P, Sánchez- Tomero J, Selgas R, López-Cabrera M (2013). **Functional Relevance of the Switch of VEGF Receptors/ Co-Receptors during Peritoneal Dialysis-Induced Mesothelial to Mesenchymal Transition.** Plos One Vol. 8 Issue 4.

Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P (1987). **A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors.** Nature 330(6147): 444-50.

Retana C, Sánchez E, González S, Pérez-López A, Cruz A, Lagunas-Muñoz J, Alfaro-Cruz C, Vital-Flores S, Reyes JL (2013). **Retinoic Acid Improves Morphology of Cultured Peritoneal Mesothelial Cells from Patients Undergoing Dialysis.** Plos One Vol. 8 Issue 11.

Retana C, Sánchez E, Pérez-López A, Cruz A, Lagunas J, Cruz C, Vital S, Reyes JL (2014). **Alterations of intercellular junctions in peritoneal mesothelial cells from patients undergoing dialysis: effect of retinoic acid.** Perit Dial Int (en prensa).

Rhee EJ, Nallamshetty S, Plutzky J (2012). **Retinoid metabolism and its effects on the vasculature.** Biochim Biophys Acta 1821(1): 230-40.

Selgas R, del Peso G, Bajo M, Castro M, Molina S (2000). **Spontaneous VEGF production by cultured peritoneal mesothelial cells from patients on peritoneal dialysis.** Perit Dial Int 20: 798–801.

Stylianou E, Jenner L, Davies L, Coles y Williams J (1990). **Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells.** Kid Int 37: 1563-1570.

Subsecretaría de Prevención y Control de Enfermedades (2000). **Práctica Médica Efectiva Insuficiencia Renal Crónica.** Num. 6.

Tobioka H, Sawada N, Zhong Y, Mori M (1996). **Enhanced paracellular barrier function of rat mesothelial cells partially protects against cancer cell penetration.** Br J Cancer 74(3): 439-45.

Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, Mackenzie RK, Williams GT (2002). **Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease.** J Am Soc Nephrol 13(2): 470-9.

Williams JD, Topley N, Craig KJ, Mackenzie RK, Pischetsrieder M, Lage C, Passlick-Deetjen J (2004). **The Euro-Balance Trial: the effect of a new biocompatible peritoneal dialysis fluid (balance) on the peritoneal membrane.** Kidney Int 66(1): 408-18.

Witowski J y Jorres A (2000). **Glucose degradation products: relationship with cell damage.** Perit Dial Int 20 (Suppl 2): S31-36.

Wong TY, Phillips AO, Witowski J, Topley N (2003). **Glucose-mediated induction of TGF-beta 1 and MCP-1 in mesothelial cells in vitro is osmolality and polyol pathway dependent.** *Kidney Int* 63: 1404-1416.

Yamazaki Y, Tokunaga Y, Takani K, Morita T (2005). **Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165.** *Biochemistry* 44: 8858-8864.

Yañez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, Alvarez V (2003). **Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells.** *N Engl J Med* 348: 403-413.

Yao Q, Lindholm B, Heimbürger O. (2005) **Peritoneal dialysis prescription for diabetic patients.** *Perit Dial Int* 25(Suppl 3): S76-9.

Zweers MM, de Waart DR, Smit W, Struijk DG, Krediet RT (1999). **Growth factors VEGF and TGF-beta1 in peritoneal dialysis.** *J Lab Clin Med* 134.