



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Efecto de metilgloxal y de 5-hidroximetil-furfural en la producción del
factor de crecimiento endotelial vascular en células peritoneales de
pacientes en diálisis**

T E S I S

Que presenta

MARLENNE TERÁN MALDONADO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de tesis:

DR. JOSÉ LUIS REYES SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2016

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT)
por el apoyo económico recibido durante el desarrollo de esta tesis.**

Resumen

La diálisis peritoneal es la terapia de reemplazo renal de mayor uso para tratar la insuficiencia renal crónica en México. El procedimiento consiste en infundir líquidos de diálisis (LD), que contienen altas concentraciones de glucosa, bajo pH, alta osmolaridad y productos de degradación de glucosa (PDG) a la cavidad peritoneal. Los PDG se forman cuando los líquidos de diálisis se esterilizan de manera convencional, es decir, por calor, e inducen la síntesis de citocinas y de factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que promueve angiogénesis en el submesotelio del peritoneo, por lo que se pierde con mayor rapidez el gradiente osmótico de la cavidad peritoneal, y por lo tanto, hay menor difusión de solutos y baja ultrafiltración; esto hace necesario exponer de manera más continua el peritoneo a los LD para que la terapia de DP sea eficaz, sin embargo, la constante exposición a los LD provoca cambios morfológicos en el peritoneo que llevan a falla en la filtración y pérdida de la función del peritoneal.

En este proyecto se describe la expresión de VEGF en células mesoteliales del peritoneo humano (CMPH). Los resultados obtenidos por inmunofluorescencia muestran que el PDG metilglioxal (MGO) en conjunto con la diabetes, promueven la expresión de VEGF. También se analizaron los marcadores de la transición mesotelio-mesénquima (TMM), en donde se observó que el PDG 5-hidroximetil-furfural (5-HMF) promueve la expresión de estos marcadores al igual que MGO.

Estos resultados sugieren que, que los cambios en las células mesoteliales del peritoneo humano de pacientes en DP pueden estar asociados con el aumento en la expresión de VEGF.

Abstract

Peritoneal dialysis (DP) is the most widely used therapy for the treatment of chronic renal failure in Mexico. This process is to infuse dialysis fluids (LD) containing high glucose concentration, low pH, high osmolarity and glucose degradation products (PDG) in the peritoneal cavity. The PDG are formed during heat sterilization of dialysis fluid, and induce synthesis of cytokines and growth factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), which promotes angiogenesis in the peritoneal submesothelium, so that lower faster osmotic gradient into peritoneal cavity, leading to lower diffusion of solutes and low ultrafiltration; this necessitates continually expose more the peritoneum to LD for DP therapy to be more effective, nevertheless, constant exposure to LD causes morphologic changes in the peritoneum which produces filtration failure and loss of peritoneal function.

In this study the expression of VEGF was described in human peritoneum mesothelial cells (CMPH). Immunofluorescence results show that PDG methylglyoxal (MGO) and diabetes, promotes the expression of VEGF. Also markers of mesothelial to mesenchymal transition (TMM) expression was analyzed, we found that the PDG 5-hydroxymethyl-furaldehyde (5-HMF) and MGO promotes the expression of this markers.

These results suggest that, the changes in the human peritoneum mesothelial cells of patients in DP may be associated with increase of VEGF expression.

Abreviaturas

AGEs	Productos de glicación avanzada
5-HMF	5-hidroximetil-furfural
α -SMA	Alfa actina de músculo liso
CM	Células mesoteliales
CMPH	Células mesoteliales del peritoneo humano
DM	Diabetes mellitus
DP	Diálisis peritoneal
DPCA	Diálisis peritoneal continua ambulatoria
FSP-1	Proteína específica de fibroblastos 1
ICR	Insuficiencia renal crónica
LD	Líquido de diálisis
MGO	Metilglioxal
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
PDG	Productos de degradación de la glucosa
PET	Prueba de equilibrio peritoneal
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
TER	Resistencia eléctrica transepitelial
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TMM	Transición mesotelio-mesénquima
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
WB	Western Blot
ZO-1	Zonula occludens 1

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1 EL SISTEMA RENAL	2
2.2 FUNCIONES DEL RIÑÓN	2
2.3 LA DIABETES	3
2.4 INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA (ICR)	4
2.5 TERAPIAS DE REEMPLAZO RENAL	5
2.6 DIÁLISIS PERITONEAL (DP)	6
2.6.1 <i>Productos de degradación de glucosa (PDG)</i>	8
2.7 EL PERITONEO	8
2.7.1 <i>Funciones de las CMPH</i>	10
2.7.2 <i>Interacciones célula-célula</i>	13
2.7.2.1 <i>Unión estrecha</i>	14
2.7.3 <i>Transición mesotelio-mesénquima</i>	15
2.7.4 <i>Modificaciones funcionales y estructurales del peritoneo</i>	17
2.7.4.1 <i>Por diálisis peritoneal (DP)</i>	17
2.7.4.2 <i>Por diabetes</i>	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	21
5.1 OBJETIVO GENERAL	21
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1 MATERIALES	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
6.2 REACTIVOS	22
6.2.1 <i>Cultivo celular</i>	22
6.2.2 <i>Cuantificación de proteínas por método de Lowry</i>	23
6.2.3 <i>Anticuerpos primarios</i>	23
6.2.4 <i>Anticuerpos secundarios</i>	24
7. METODOLOGÍA	24
7.1 AISLAMIENTO DE CÉLULAS MESOTELIALES	24
7.1.1 <i>Bolsa de diálisis</i>	24
7.1.2 <i>Biopsias</i>	25
7.2 CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MESOTELIALES	25
7.3 CURVAS CONCENTRACIÓN-EFECTO	25
7.4 INMUNOFLUORESCENCIA	26
7.5 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS MESOTELIALES	26

7.6	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY.....	27
7.7	WESTERN BLOT	27
7.8	ANÁLISIS DE DATOS	28
8.	RESULTADOS.....	29
8.1	CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.....	29
8.2	CARACTERIZACIÓN DE LAS CMPH.....	30
8.3	CURVAS CONCENTRACIÓN-EFECTO	30
8.3.1	<i>CMPH de pacientes urémicos, no diabéticos</i>	31
8.3.2	<i>CMPH de pacientes urémicos, diabéticos</i>	32
8.3.3	<i>CMPH de pacientes urémicos, diabéticos con catéter recién puesto</i>	33
8.4	EXPRESIÓN DE VEGF EN CMPH	34
8.5	EXPRESIÓN DE LA CITOQUERATINA 8-18 EN CMPH.....	36
8.6	EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE LA TMM EN CMPH.....	38
8.6.1	<i>Expresión de α-SMA</i>	38
8.6.2	<i>Expresión de vimentina</i>	40
8.6.3	<i>Expresión de FSP-1</i>	41
8.7	EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE LA UNIÓN ESTRECHA EN CMPH.....	42
8.7.1	<i>Expresión de claudina-1</i>	42
8.7.2	<i>Expresión de ZO-1</i>	44
9.	DISCUSIÓN	46
10.	CONCLUSIONES	49
11.	PERSPECTIVAS	50
12.	BIBLIOGRAFÍA	51

Índice de figuras

Figura 1.	Esquema de la técnica de diálisis peritoneal	7
Figura 2.	Esquema de la difusión de solutos y agua a través del peritoneo	7
Figura 3.	Microscopía electrónica de transmisión del peritoneo	9
Figura 4.	Morfología del cilio en CM de transportadores bajos (LT) y transportadores altos (HT) por microscopía de barrido	10
Figura 5.	Funciones de las células mesoteliales	12
Figura 6.	Interacciones célula-célula	13
Figura 7.	Unión estrecha	15
Figura 8.	Ilustración esquemática de los eventos clave durante la TMM	16
Figura 9.	Modificaciones estructurales del peritoneo por DP	17
Figura 10.	Representación esquemática de VEGF y sus receptores	19
Figura 11.	Caracterización de las células mesoteliales	30
Figura 12.	Expresión de VEGF en CMPH	35
Figura 13.	Análisis de la expresión de VEGF por WB en lisados totales	36
Figura 14.	Expresión de citoqueratina 8-18 en CMPH	37

Figura 15.	Expresión de α -SMA en CMPH	39
Figura 16.	Expresión de vimentina en CMPH	40
Figura 17.	Expresión de FSP-1 en CMPH	41
Figura 18.	Expresión de claudina-1 en CMPH	43
Figura 19.	Expresión de ZO-1 en CMPH	45

Índice de gráficas

Gráfica 1.	Curvas concentración-efecto en CMPH de pacientes urémicos no diabéticos	31
Gráfica 2.	Curvas concentración-efecto en CMPH de pacientes urémicos diabéticos	32
Gráfica 3.	Curvas concentración-efecto en CMPH de pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto	33

1. Introducción

La insuficiencia renal crónica (IRC) es la pérdida total de la capacidad renal para mantener la homeóstasis y se da de manera lenta y progresiva. Actualmente es un problema de salud pública en nuestro país, en conjunto con la Diabetes mellitus (DM), ya que esta última es la principal causa de la IRC. En 2011 de cada 100 egresos hospitalarios por alguna complicación de DM, 24 fueron de tipo renal, mientras que para el 2014 la DM fue la causa primaria de IRC con un 54% en hospitales de segundo nivel del IMSS. La Federación Internacional de la Diabetes (IDF) estima que aproximadamente 371 millones de personas a nivel mundial padecen DM y esta cifra va en aumento en todos los países.

La diálisis peritoneal (DP) es la terapia de reemplazo renal de mayor uso para tratar la IRC en México. Consiste en depurar la sangre del paciente mediante el uso de una membrana natural llamada peritoneo, el cual recubre la cavidad abdominal (peritoneo parietal) y la superficie de los órganos (peritoneo visceral). Sin embargo, los líquidos que se usan para esta terapia contienen compuestos nocivos para las células mesoteliales del peritoneo humano (CMPH), llamados productos de degradación de glucosa (PDG) que provocan cambios morfológicos y denudación de la monocapa de células, inducen la síntesis de citocinas y de factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), que promueve angiogénesis, lo que lleva rápidamente a la falla de ultrafiltración y a la pérdida de la función peritoneal, por lo que es necesario cambiar al paciente al tratamiento con hemodiálisis, que es un procedimiento más invasivo y más costoso.

Por todo lo anterior es importante realizar estudios que nos den información sobre el daño que estos PDG puedan provocar en los pacientes en DP.

2. Marco teórico

2.1 El sistema renal

El sistema renal representa un eje importante y fundamental para el organismo. Está formado por órganos denominados riñones, localizados en la cavidad intraperitoneal, los cuales están en comunicación con la vejiga mediante estructuras conocidas como uréteres. La formación de orina tiene lugar en las nefronas, que son las unidades funcionales del riñón, a través del proceso de filtración, absorción y secreción que suceden en las distintas regiones de su anatomía¹.

2.2 Funciones del riñón

Dentro de las funciones más importantes que lleva a cabo el sistema renal se encuentran el mantenimiento del equilibrio entre el volumen del líquido extracelular y la osmolaridad existente en los diversos compartimientos fisiológicos. También tiene otras funciones como: la regulación del pH, el mantenimiento del balance de iones (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}), la excreción de sustancias de desecho (creatinina, urea, ácido úrico, fármacos, sustancias tóxicas, entre otros), así también, la producción y secreción hormonal (renina y eritropoyetina). Cuando los riñones no son capaces de realizar sus funciones y extraer las sustancias tóxicas del organismo, se llega a la insuficiencia renal que puede ser crónica o aguda². En la insuficiencia renal aguda se logra restablecer la función renal parcial o totalmente, ya que el período de tiempo en el que se cursa dicha insuficiencia es corto (menos de tres meses a partir del diagnóstico médico). El caso contrario es la IRC en donde la función renal se pierde totalmente y tiene una duración de más de tres meses a partir del diagnóstico médico.

2.3 La diabetes

Existen diferentes patologías que afectan a los riñones, una de ellas es la diabetes. La diabetes es un trastorno metabólico que se caracteriza por altas concentraciones de glucosa en sangre. Existen diversos tipos de diabetes:

- Diabetes tipo 1: conocida comúnmente como diabetes infantil, juvenil o insulino dependiente, donde existe una producción deficiente de insulina.
- Diabetes tipo 2 (DM II): conocida como diabetes no insulino dependiente o de la edad adulta, donde la insulina actúa ineficazmente.
- Diabetes gestacional: que es un estado hiperglucémico durante el embarazo. Es debida a la resistencia a la insulina que provocan algunas hormonas durante el embarazo.
- Diabetes específicas por otras causas: Se incluyen a diabetes secundaria a daño pancreático severo, diabetes tipo MODY, es decir, secundaria a alteraciones genéticas, fibrosis quística y la inducida por medicamentos³.

Se conoce que la diabetes incrementa el riesgo de padecer cardiopatías, accidente vascular cerebral, retinopatía, neuropatía de extremidades inferiores e insuficiencia renal crónica (IRC).

La diabetes mellitus (DM), es la principal causa de la IRC en nuestro país, en el año 2011, 24 de cada 100 egresos hospitalarios por alguna complicación de DM son de tipo renal. La Federación Internacional de la Diabetes (IDF) estima que aproximadamente 371 millones de personas a nivel mundial padecen DM y esta cifra va en aumento en todos los países⁴. En México, en el año 2014 la DM ya era la causa principal de IRC con un 54% en hospitales de segundo nivel del IMSS⁵.

2.4 Insuficiencia renal crónica (IRC)

La IRC se define como la pérdida gradual y total de la capacidad renal para mantener la homeostasis y se da de manera lenta y progresiva, ya que hay daño a las estructuras del riñón, por lo tanto, hay una reducción de la tasa del filtrado glomerular. En el humano se considera IRC cuando hay una tasa de filtrado glomerular por debajo de 60 ml/min/1.73 m², y se considera crónica cuando permanecen estos valores durante tres meses o más.

La insuficiencia renal crónica tiene varias clasificaciones, aunque todas coinciden en establecer los estadios según el deterioro de la función renal. Las más actuales son las publicadas por la organización internacional Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) en el año 2012 (**Tabla 1**).

Categorías del filtrado de glomerular		
Estadio	Descripción	Filtrado glomerular (ml/min/1,73 m ²)
G1	FGe normal o elevado	≥ 90
G2	Ligero deterioro del FGe	89-60
G3a	Disminución ligera a moderada del FGe	45-59
G3b	Disminución moderada a grave del FGe	30-44
G4	Disminución grave del FGe	15-29
G5	Fallo renal	< 15 o necesidad de TRS
Categorías de albuminuria		
Estadio	Descripción	Cociente albúmina/creatinina (mg/g)
A1	Normal o ligeramente elevada	< 30
A2	Moderadamente elevada	30-300
A3	Muy elevada	> 300

FGe: filtrado glomerular estimado; TRS: terapia renal sustitutiva.

Tabla 1. Estadios de la IRC basados en recomendaciones KDIGO.

Entre los factores iniciadores ya conocidos de la IRC se encuentran: edad, historia familiar de IRC (tanto como iniciadora de nefropatías hereditarias como de IRC), etnia (afro-caribeños e indo-asiáticos), género (hombre), diabetes mellitus, síndrome metabólico, estados que condicionen hiperfiltración tales como obesidad, hipertensión arterial (HTA), anemia, alta ingesta de proteínas o disminución de la masa nefronal; albuminuria, dislipidemia, uso de nefrotóxicos como antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), algunos

antibióticos (por ejemplo, gentamicina), contrastes yodados, cadenas ligeras, la presencia de una IRC primaria, trastornos urológicos o enfermedad cardiovascular⁶.

2.5 Terapias de reemplazo renal

Existen tres terapias de reemplazo renal para tratar la IRC:

Trasplante renal: es la opción de terapia renal sustitutiva con mejor supervivencia global. Consiste en una operación realizada por un cirujano de trasplantes, en la cual, el riñón sano de otra persona (donador) se coloca en el cuerpo del paciente (donante) para reemplazar los riñones no funcionales. Los riñones trasplantados vienen de dos fuentes:

- Donador vivo - pueden ser familiares o no
- Donador cadavérico - personas que deciden donar sus órganos al morir

Es importante señalar que no todos los pacientes con IRC son candidatos para el trasplante renal⁷.

Hemodiálisis: Es una técnica que consiste en depurar la sangre mediante el uso de una máquina de hemodiálisis. Se realiza normalmente 3 veces por semana durante un tiempo de 3.5 a 4 horas. Para extraer la sangre del paciente con un flujo adecuado se precisa de un acceso vascular. Una vez extraída la sangre, ésta circula a través de capilares dentro de un filtro semipermeable rodeado de líquido de diálisis (líquido con concentraciones ideales que contiene sodio, bicarbonato, calcio, cloro y baja concentración de potasio), por lo que se produce un paso de sustancias por gradiente de concentración de la sangre hacia el líquido de diálisis, después la sangre es devuelta al organismo. De esta forma, la sangre se “limpia” de las sustancias tóxicas y exceso de líquido.

En general, la hemodiálisis se realiza en un centro hospitalario, aunque en determinadas ocasiones se puede realizar en el domicilio si previamente el paciente y un acompañante han sido entrenados y se dispone de espacio en la vivienda y del equipo necesario.

Diálisis peritoneal (DP): Consiste en la infusión de diferentes cantidades de líquido (1,5 a 2 litros) en el peritoneo a través de un catéter y permitiendo que se produzca libre intercambio de sustancias haciendo uso de la membrana peritoneal que es semipermeable. Es una técnica domiciliaria y exige cierto compromiso con el paciente y sus familiares, con el fin de lograr un correcto funcionamiento y evitar complicaciones de tipo infeccioso. Sin embargo, los pacientes pueden conciliar su vida laboral y personal más fácilmente con esta técnica⁶.

2.6 Diálisis peritoneal (DP)

La diálisis peritoneal es la terapia de reemplazo renal de mayor uso para tratar la insuficiencia renal crónica en México. Consiste en depurar la sangre del paciente mediante el uso de una membrana natural llamada peritoneo, el cual recubre la cavidad abdominal (peritoneo parietal) y la superficie de los órganos (peritoneo visceral).

El procedimiento consiste en infundir un líquido de diálisis (LD), que contiene altas concentraciones de glucosa, bajo pH, alta osmolaridad y productos de degradación de glucosa (PDG) a la cavidad peritoneal (**Figura 1**). Dicha solución se mantiene en la cavidad por un periodo de tiempo variable, para que debido a un gradiente osmótico las toxinas del torrente sanguíneo pasen al LD⁸ (**Figura 2**).

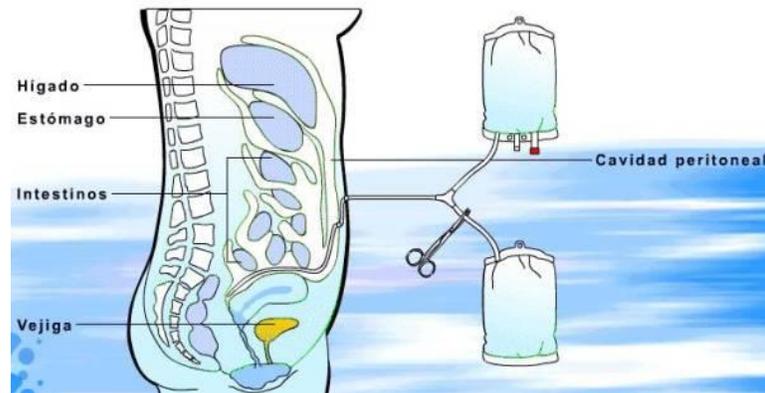


Figura 1. Esquema de la técnica de diálisis peritoneal. Se muestra la ubicación de la cavidad peritoneal en el paciente, así como el catéter por el cual se infunden los líquidos de diálisis.

Las sustancias que difunden a través del peritoneo o membrana peritoneal son de pequeño peso molecular, como urea, potasio, cloro, calcio, creatinina, ácido úrico, etc. 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 ésta⁹.

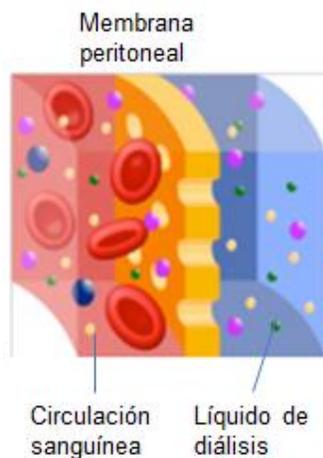


Figura 2. Esquema de la difusión de solutos y agua a través del peritoneo. Debido a la alta osmolaridad de los líquidos de diálisis es que se lleva a cabo el transporte de agua y solutos desde la circulación sanguínea hacia la cavidad peritoneal a través del peritoneo.

Este método proporciona al paciente una tasa de sobrevivencia equivalente a la hemodiálisis y preserva la función renal residual¹⁰. Sin embargo, la constante exposición del peritoneo a estas condiciones provoca en él cambios morfológicos lo que lleva a una falla en la filtración y pérdida de la función del peritoneo.

2.6.1 Productos de degradación de glucosa (PDG)

Los PDG que se han identificado en la bolsa de diálisis son: acetaldehído, formaldehído, metilglioxal (MGO), glioxal, 2-furaldehído (Fura), 3,4-dideoxiglucosona-3-ene (3,4-DGE), 3-deoxiglucosona (3-DG), 5-hidroximetilfurfural (5-HMF)¹¹.

Existen varios reportes acerca del papel patológico de los PDG¹². Se originan en el proceso de esterilización convencional por calor de los LD^{13,14,15}, una parte de la glucosa se descompone en diferentes compuestos, que son tóxicos para las CMPH de los pacientes en DP, ya que inducen la síntesis de citocinas y de factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que promueve angiogénesis, lo que lleva rápidamente a la falla de filtración y a la pérdida de la función peritoneal¹⁶.

La toxicidad de cada uno de los PDG es variable. Algunos son fuertemente citotóxicos, mientras que otros modifican proteínas de la unión estrecha entre las células de la monocapa mesotelial¹⁷. También se sabe que los PDG promueven la formación de productos finales de glicación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés), e incluso algunos PDG son considerados como AGEs¹⁸.

2.7 El Peritoneo

El peritoneo es una membrana serosa, continua, brillante y transparente. Se divide en:

- Peritoneo visceral: Reviste las vísceras (órganos) como el bazo y el estómago.
- Peritoneo parietal: Reviste la parte interna de la pared abdominal.

La cavidad peritoneal es el espacio que está entre el peritoneo parietal y el visceral, es importante señalar que no hay vísceras en la cavidad peritoneal.

El peritoneo está formado por una monocapa de células polarizadas que se llaman células mesoteliales (CM) y un submesotelio que contiene matriz extracelular, fibroblastos residentes y vasos sanguíneos¹⁹.

Las CM presentan una morfología singular en cultivo, tienen apariencia de empedrado cuando se ven al microscopio (**Figura 3**), en la imagen de microscopía electrónica de transmisión del peritoneo se observa que las células mesoteliales presentan un citoplasma extendido (**Figura 3-A, flecha grande**) y una superficie de microvellosidades (**Figura 3-A, flecha mediana**), sobre una membrana basal (**Figura 3-A, flecha pequeña**). También se pueden observar células alargadas semejantes a fibroblastos (**Figura 3-A, letra F**) por debajo del mesotelio, rodeados por colágeno formando tejido conectivo. De igual manera se observa la cara luminal del mesotelio cubierto con microvellosidades (**Figura 3-B**), así como la apariencia de empedrado con los bordes celulares bien definidos de las CM (**Figura 3-C**)²⁰.

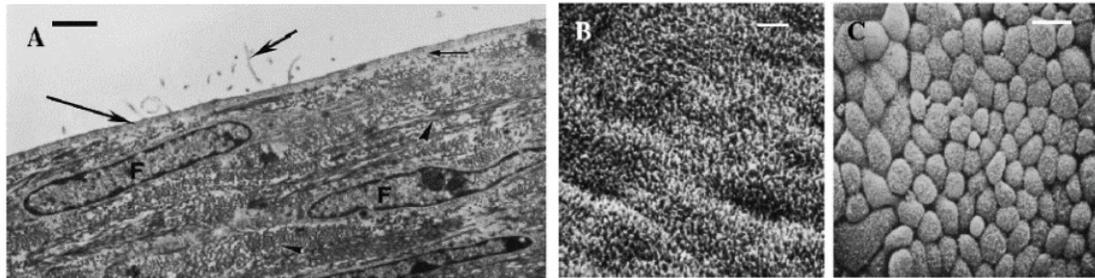


Figura 3. Microscopía electrónica de transmisión del peritoneo. (A) Se observa el citoplasma extendido de las CM (flecha grande), así como sus microvellosidades (flecha mediana) que descansan sobre la membrana basal (flecha pequeña). También se observan células alargadas parecidas a fibroblastos (F). **(B)** Cara luminal del mesotelio cubierta de microvellosidades. **(C)** CM con su característica apariencia de empedrado con los bordes celulares bien definidos. Tomado de *Mutsaers, 2004*.

Las microvellosidades y cilios de las CM tienen funciones específicas, las microvellosidades aumentan el área de la superficie peritoneal para el transporte de solutos y para proteger al mesotelio de una lesión por fricción debida al atrapamiento de agua y la secreción de exudados serosos, mientras que los cilios regulan la secreción de surfactantes. También sirven como sensores para que las CM respondan a su microambiente.

Variaciones en el número y longitud de estas estructuras en las CM tiene un efecto adverso sobre la función y el transporte peritoneal²¹(**Figura 4**), ya que se tiene la hipótesis de que las microvellosidades aumentan el área de contacto del peritoneo y una reducción de esta al perderse las microvellosidades impacta fuertemente en el transporte.

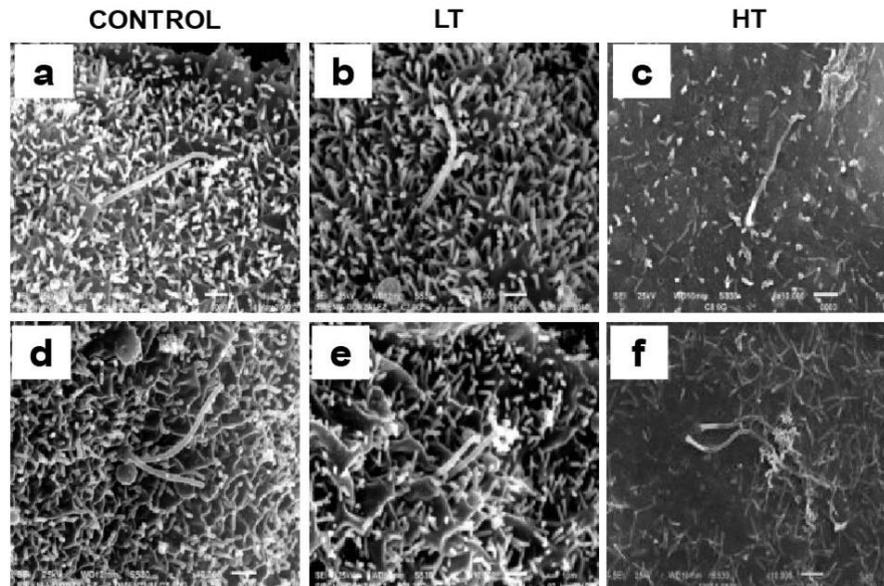


Figura 4. Morfología del cilio en CM de transportadores bajos (LT) y transportadores altos (HT) por microscopía electrónica de barrido. (a, d) Células con uno o dos cilios se observan en CM obtenidas de omentum. (b, e) CM de LT obtenidas de líquidos de diálisis. (c, f) CM de HT obtenidas de líquidos de diálisis. Los cilios en el control (a) y LT (b) están regulares y continuos, mientras que los cilios en las CM de HT se observan adelgazados desde la base hasta la punta (c, flecha). Tomado de *Retana et al, 2013*.

2.7.1 Funciones de las CMPH

Las células mesoteliales (CM) tienen como función principal mantener la homeostasis del peritoneo en respuesta a cualquier daño, inflamación e inmunoregulación. Sintetizan y secretan lubricantes para prevenir la fricción y adhesiones entre las superficies parietal y visceral del peritoneo. Además, también tienen otros roles fundamentales relacionados con el transporte de fluidos y células a través de las cavidades serosas, presentación de antígenos, inflamación y reparación de tejidos, coagulación, fibrinólisis y la adhesión de células tumorales, que a continuación se detallan:

Transporte de fluidos y solutos: El transporte en las cavidades serosas es a través del peritoneo, mediante la formación de vesículas pinocíticas, uniones intercelulares y estomas.

Los estomas son cavidades de unos 3-12 μm 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.

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 T²⁰.

Coagulación y fibrinólisis: Las CM son importantes reguladores de los niveles de fibrina en las cavidades serosas después de un daño, ya que, el depósito de fibrina es uno de los primeros pasos en el proceso de cierre de las heridas, pero si este depósito persiste, puede llevar a fibrosis o a la formación de adhesiones post-operatorias. La denudación del mesotelio causa la desregulación de la actividad fibrinolítica de las CM y la acumulación de fibrina, favoreciendo así, al proceso fibrótico. La regulación del depósito de fibrina por las CM es mediante la secreción de procoagulantes y enzimas fibrinolíticas **(Figura 5)**.

Regulación de la inflamación y reparación de tejidos: Las CM tienen un papel muy importante en la regulación de la inflamación del peritoneo; esto, mediante su habilidad de sintetizar citocinas/quimiocinas, factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular y moléculas de adhesión celular, así como su capacidad para presentar antígenos. Las CM regulan la inflamación mediante la síntesis local de hialuronano, que secuestra a los radicales libres e inicia la respuesta de reparación.

En el peritoneo, la inducción de estas citocinas inflamatorias por la exposición a largo plazo de los LD promueve el desarrollo de inflamación crónica peritoneal, llevando a daño peritoneal e induciendo el proceso fibrótico. Sin embargo, las CM controlan la inflamación en el tejido produciendo ciclooxigenasas y liberando ácido araquidónico para la producción de prostaglandinas y prostaciclina²².

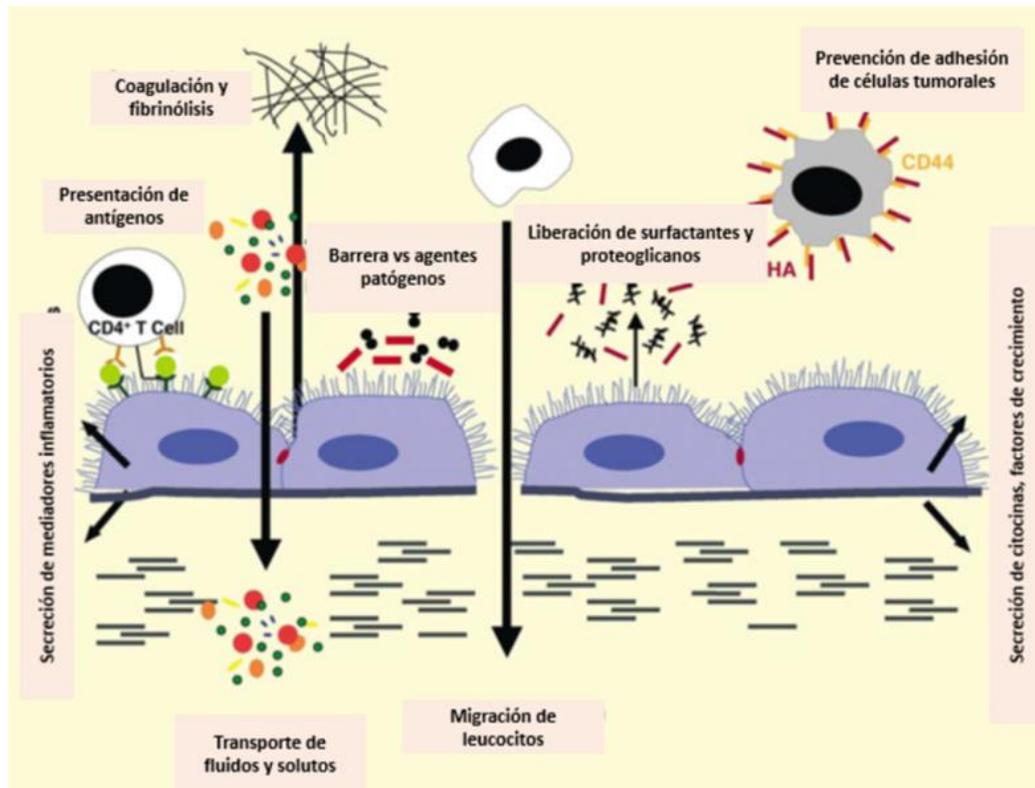


Figura 5. Funciones de las células mesoteliales. La principal función del mesotelio es mantener la integridad y función de la serosa. Las CM proporcionan una barrera protectora contra la abrasión y la invasión de patógenos, secretan surfactantes, proteoglicanos y glicosaminoglicanos para evitar fricción entre los órganos. También facilita el transporte de fluidos y células a través de la cavidad serosa, presenta antígenos a las células T y mediante la secreción de citocinas, factores de crecimiento, elementos de la matriz extracelular, proteasas y otros mediadores inflamatorios participa en la inducción y resolución de la inflamación y reparación de tejidos. Las CM son la mayor fuente del activador del plasminógeno que es muy importante en la fibrinólisis y en la prevención de adhesiones, secretan hialuronano y otros glicosaminoglicanos que previenen la adhesión de células tumorales. Modificado de *Mutsaers, 2004*.

2.7.2 Interacciones célula-célula

Las células mesoteliales tienen interacciones célula-célula como los epitelios, las cuales mantienen unidas y funcionales las células de la monocapa (**Figura 6**).

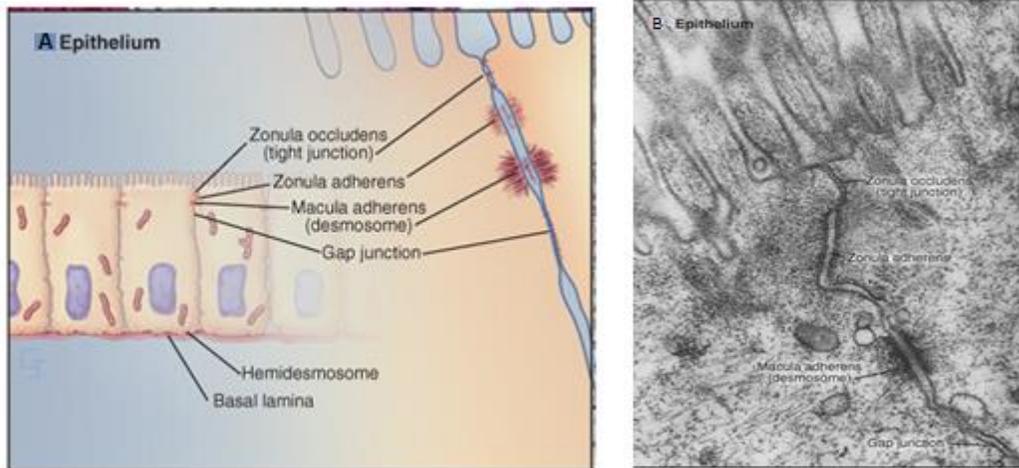


Figura 6. Interacciones célula-célula. (A) Esquema en que se muestra la posición de las uniones en la célula y la localización de la unión comunicante, lámina basal y hemidesmosomas. (B) Microscopía electrónica de una delgada sección del epitelio intestinal, se muestra la compleja unión que existe entre las células que consiste en la unión estrecha, la unión adherente y desmosomas. Tomado de *Pollard, Cell biology, 2ª edición*.

Entre estas interacciones están:

Uniones adherentes: Unen los filamentos de actina de la célula a los filamentos de actina de la célula adyacente. Esta unión está mediada por las caderinas.

Desmosomas: Unen los filamentos intermedios de una célula a los filamentos intermedios de la célula adyacente. La unión está mediada por las caderinas.

Uniones comunicantes: Estas uniones permiten el paso de iones y pequeñas moléculas hidrosolubles. Las conexinas son proteínas que participan en estas uniones.

Adhesiones focales: Unen los filamentos de actina de la célula a la matriz extracelular. En las adhesiones focales participan las integrinas.

Hemidesmosomas: Unen los filamentos intermedios de la célula a la matriz extracelular. También participan las integrinas.

Las uniones estrechas o uniones oclusivas debido a su importancia en este trabajo merecen una mención aparte, sin embargo, también forman parte de las interacciones célula-célula.

2.7.2.1 Unión estrecha

Las uniones estrechas se encuentran en el límite entre la parte basolateral y apical de las células, modulan el paso de agua y de iones. En estas uniones participan proteínas de cuatro pases transmembranales llamadas claudinas, de las cuales se conocen más de 20 tipos diferentes. También participa la ocludina, las moléculas de adhesión de la unión JAMs (por su siglas en inglés) y proteínas de andamiaje llamadas zonula ocludens ZO-1, ZO-2 y ZO-3, que unen los filamentos de actina a las claudinas y ocludina²³ (**Figura 7**).

La importancia de dicho complejo de unión para este trabajo radica en que el transporte peritoneal de solutos se da en un 90% por la vía paracelular y es regulado por las proteínas de la unión estrecha principalmente. También la unión estrecha es la primera de las uniones intercelulares que entran en contacto con los líquidos de diálisis, por lo que son las primeras en dañarse por éstos.

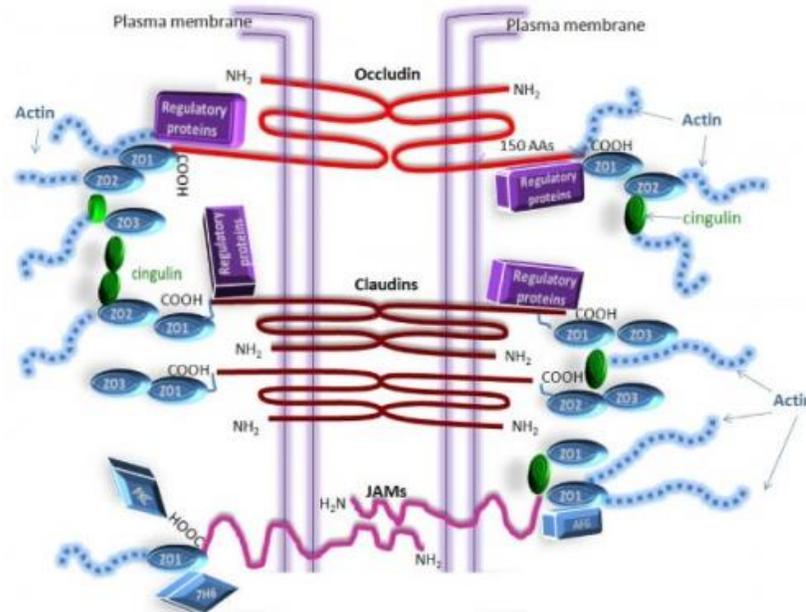


Figura 7. Unión estrecha. Esquema en que se muestran las diferentes proteínas que forman la unión estrecha y su ubicación entre las células. La unión estrecha está formada por ocludina, que es una proteína de cuatro pases transmembranales y se une al citoesqueleto de actina mediante las proteínas de andamiaje ZO-1 y ZO-2. También se encuentran las claudinas, proteínas de cuatro pases transmembranales, se unen al citoesqueleto de actina mediante ZO-1, ZO-2 y ZO-3. Por último, se encuentran las moléculas de adhesión de la unión JAM's (por sus siglas en inglés), estas proteínas son de un solo pase transmembranal y se unen al citoesqueleto de actina mediante ZO-1.

2.7.3 Transición mesotelio-mesénquima

Las células mesoteliales cuando sufren un daño, en este caso, por los PDG que están en los líquidos de diálisis, cambian su morfología típica de empedrado a otra que es parecida a los fibroblastos, el proceso se llama transición mesotelio-mesénquima (TMM). En la TMM se pierde la expresión de proteínas consideradas marcadores mesoteliales en las células y aparecen otras proteínas consideradas marcadores mesenquimales²⁴. También hay desensamble de la unión estrecha, pérdida de microvellosidades, disociación de la unión adherente, pérdida de la polaridad apical-basal, reorganización del citoesqueleto, degradación de la membrana basal, migración e invasión (**Fig. 8**).

La TMM es principalmente inducida por el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), el cual induce también la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Entre los marcadores mesoteliales que desaparecen se encuentran: citoqueratinas, E-caderina, ZO-1, claudinas, etc. Entre los principales marcadores mesoteliales que se expresan están: N-caderina, α -actina de músculo liso (α -SMA), proteína específica de fibroblastos 1 (FSP-1), vimentina, entre otros. Es importante mencionar que las células cuando están en la TMM expresan marcadores mesoteliales y mesenquimales al mismo tiempo²⁵.

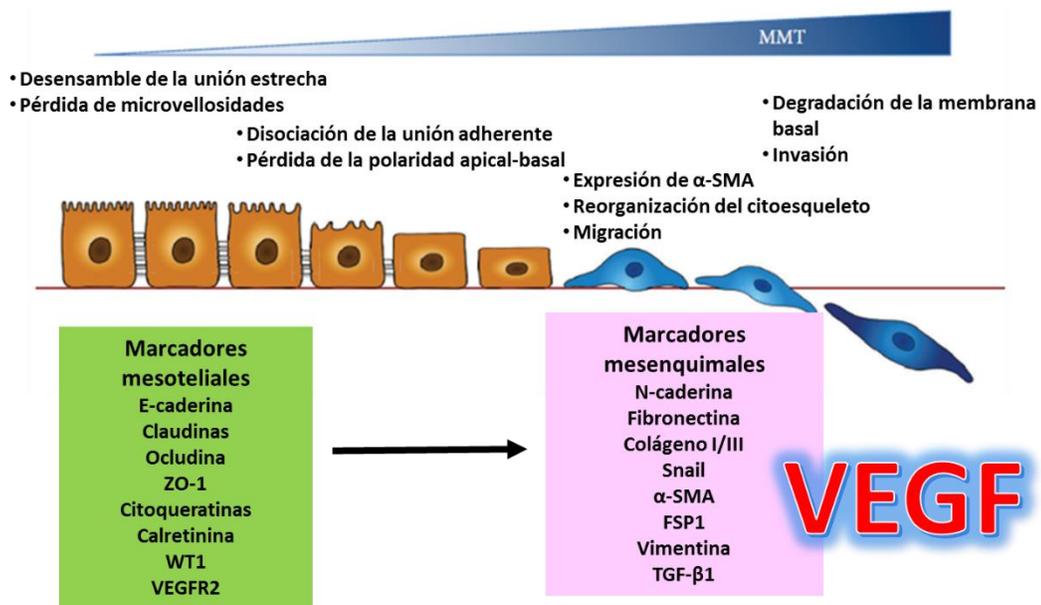


Figura 8. Ilustración esquemática de los eventos clave durante la TMM. La TMM ocurre cuando las células mesoteliales pierden sus características epiteliales, incluyendo la ruptura de las interacciones célula-célula, como la unión estrecha, la unión adherente y desmosomas, así como la pérdida de la polaridad apical-basal, y adquieren un fenotipo mesenquimal, caracterizado por la reorganización de actina y formación de fibras de estrés, migración e invasión. El esquema muestra cuatro pasos clave que son esenciales para una TMM completa, lo que se usa con más frecuencia son los marcadores mesoteliales y mesenquimales, así como las moléculas que inducen o modulan la TMM. Modificado de López-Cabrera, 2014.

2.7.4 Modificaciones funcionales y estructurales del peritoneo

2.7.4.1 Por diálisis peritoneal (DP)

En la terapia de DP, la membrana peritoneal sufre modificaciones. Las más comunes son fibrosis, inflamación y denudación de la monocapa de CM, angiogénesis y vasodilatación, además de cambios morfológicos y estructurales de las CM que lleva a un cambio de fenotipo^{26,27}.

Las CMPH, entran en un proceso de transdiferenciación, expresan marcadores como FSP-1, α -SMA y sobreexpresan VEGF y se pierden marcadores mesoteliales como la citoqueratina 8-18²⁸. La inflamación peritoneal causada por la constante exposición a los LD provoca alteraciones entre las que 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 depósito de tejido conjuntivo mesotelial y engrosamiento de la región del submesotelio, el cual incrementa con el tiempo de DP (**Figura 9**)^{10, 29}.

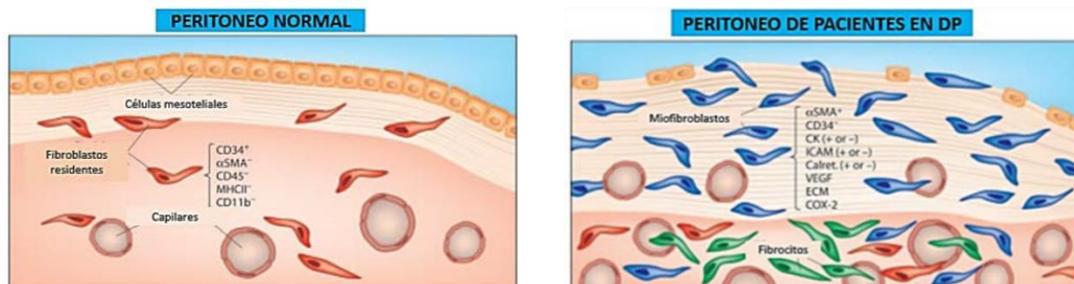


Figura 9. Modificaciones estructurales del peritoneo por DP. (A) Morfología de un peritoneo normal, se observa la monocapa de CM que recubren la región submesotelial que está compuesta por tejido conectivo, pocos fibroblastos y algunos vasos sanguíneos. En el peritoneo normal los miofibroblastos no están presentes, y los fibroblastos residentes muestran una fuerte expresión de CD24. **(B)** En pacientes en DP hay muchos cambios estructurales en la membrana peritoneal, como la pérdida de la monocapa de CM, aumenta el número de fibroblastos y vasos sanguíneos, también se engrosa la matriz extracelular. En contraste con el peritoneo normal, los miofibroblastos son fácilmente detectados en el peritoneo de pacientes en DP. Los miofibroblastos pueden originarse de fibroblastos residentes activados o de la TMM de las CM. Modificado de *Aroeira et al, 2007*.

2.7.4.2 Por diabetes

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 DP, en comparación con pacientes no diabético también en DP³⁰.

La diabetes per se es un factor que afecta el peritoneo de los pacientes. Se ha reportado que en pacientes diabéticos el grosor del tejido conectivo submesotelial es significativamente mayor comparado con tejido de pacientes no diabéticos. Además, el número de capilares también es mayor en el grupo diabético que en el de no diabéticos³¹.

2.8 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

El VEGF es una proteína homodimérica que tiene un peso de 42 kDa. Está implicada en la regulación de la angiogénesis, migración celular y vasodilatación (in vitro). Pertenece a una amplia familia: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-F y factor de crecimiento placentario. El tipo VEGF-A es el más abundante y al que comúnmente se le denomina VEGF. Dentro de esta familia existen 4 isoformas (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) que se generan por splicing alternativo en la maduración del RNAm del gen codificante para esta proteína. VEGF₁₆₅ es la isoforma más abundante y es producido por varios tejidos incluyendo células endoteliales vasculares y del músculo liso, fibroblastos y CM³².

Existen 3 tipos de receptores que son tipo tirosina-cinasa: VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR y VEGFR-3/Flt-4. VEGF realiza su acción uniéndose a los receptores VEGFR-1/Flt-1 y VEGFR-2/KDR, además, también interacciona con la familia de co-receptores de neurofilina. Su actividad es mediada por la vía PI3K/AKT^{33,34} (**Figura 10**).

VEGF está considerado como uno de los más potentes reguladores de angiogénesis, tanto normal como patológica, así como un inductor de permeabilidad vascular. Recientes estudios han demostrado además la presencia de este factor en el tejido peritoneal de pacientes con largos períodos en DP, co-localizado con productos de glicosilación avanzada, tanto en el mesotelio como en el endotelio.

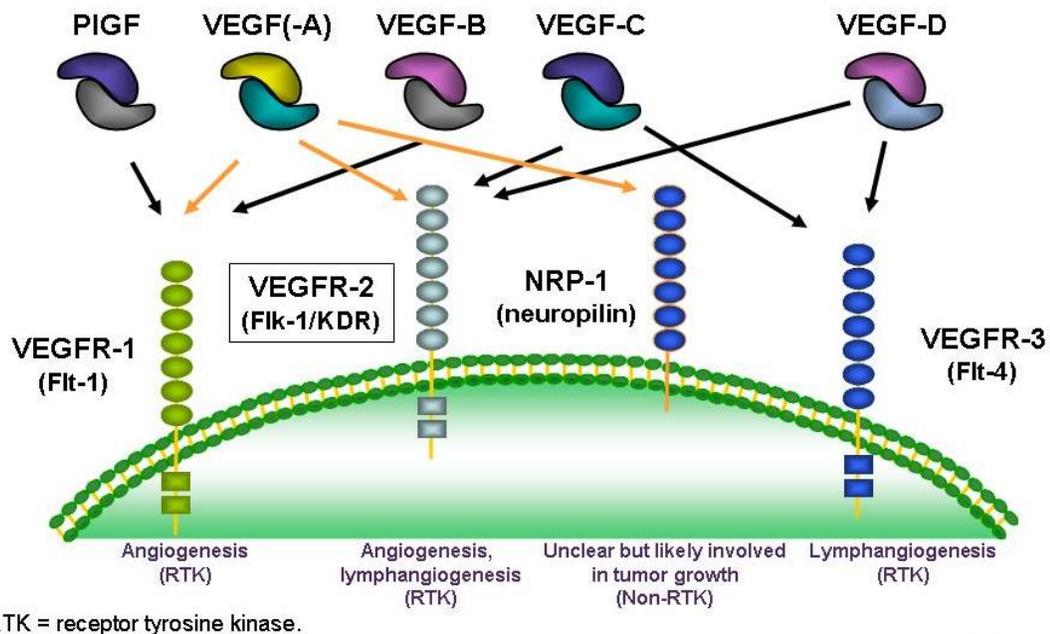


Figura 10. Representación esquemática de VEGF y sus receptores. VEGF-A₁₆₅ es el miembro más conocido y estudiado de la familia de VEGF y es el que ejerce sus efectos en el endotelio vascular. VEGF-A₁₆₅ se une a los receptores tipo 1 y tipo 2, VEGFR-1 y VEGFR-2, respectivamente. Estos receptores son tipo tirosina-cinasas y la vía de transducción de señales que producen llevan al proceso angiogénico y a linfangiogenesis tanto en células endoteliales como en mesoteliales. Tomado de Ferrara et al, 2003.

La sobreexpresión de VEGF está fuertemente asociada a complicaciones por diabetes, en la retinopatía diabética el aumento de VEGF es en la retina³⁵, mientras que en las complicaciones vasculares se da en el endotelio. De manera general la hiperglicemia aumenta la expresión de VEGF a través del aumento de angiotensina II y TGF- α y β ³⁶.

Algunos pacientes en DP crónica desarrollan a largo plazo un fracaso de la capacidad de ultrafiltración peritoneal, que está causado por la proliferación de capilares peritoneales y cambios esclerosantes en el peritoneo. La neoformación vascular al nivel del peritoneo ha sido relacionada con la presencia de VEGF tanto en efluente como en tejido peritoneal, a consecuencia de la propia DP³⁷.

Se ha reportado que en pacientes en diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) la expresión de VEGF es mayor que en sujetos sanos. También se ha reportado que en pacientes en DPCA diabéticos los niveles de VEGF aumentan más en comparación con pacientes en DPCA sin diabetes, así como también hay una caída en la Resistencia Eléctrica Transepitelial (TER) de la monocapa³⁸, lo que sugiere que los PDG presentes en el LD promueven la síntesis de VEGF en las CM.

3. Justificación

Los PDG se forman durante el proceso de esterilización de los líquidos de diálisis.

Se ha descrito que los PDG aumentan la expresión de VEGF en células mesoteliales del peritoneo humano. Sin embargo, no se sabe cómo es la expresión de VEGF en CMPH de pacientes diabéticos y no diabéticos en tratamiento de diálisis peritoneal en respuesta a estos compuestos.

4. Hipótesis

Los PDG metilglioxal y 5-hidroximetil-furfural promueven el aumento en la producción de VEGF en células mesoteliales del peritoneo humano, y este aumento es mayor en las células de pacientes diabéticos que de los no diabéticos.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de productos de degradación de glucosa MGO y 5-MHF en los niveles de VEGF en cultivos primarios de células mesoteliales del peritoneo humano de pacientes diabéticos y no diabéticos.

5.2 Objetivos específicos

- Obtener cultivos primarios de células mesoteliales del peritoneo visceral humano (control) y del LD de pacientes en DPCA diabéticos y no diabéticos.
- Medir las concentraciones de VEGF en cultivos primarios de CM en respuesta a un tratamiento con 5-HMF y MGO.
- Estudiar el efecto de ácido retinoico en los cultivos de CM tratadas con MGO y 5-HMF.

6. Materiales y métodos

6.1 Equipo

- Microscopio confocal Leica DMIRE-2 (Germany).
- Centrifuga G5-GR BECKMANK
- Centrifuga No. Catálogo 541712 Eppendorf
- Fuente de poder para WB Power Pat 200 BIO-RAT
- Potenciómetro No. 41 BECKMANK
- Agitador No. Catálogo 65904 MagMix
- Porta objetos CORNING
- Cubre objetos Científica ULTRALAB
- Incubadora

6.2 Reactivos

6.2.1 Cultivo celular

- Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's: F-12 (1:1) polvo (DMEM/F-12) suplementado con 15% vol/vol de suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 mg/ml), L-glutamina (2 µg/ml), transferrina (5 µg/ml), insulina (5 µg/ml), hidrocortisona (0.4 µg/ml) y selenio de sodio (5 ng/ml)
- Tripsina 0.125% y EDTA 0.1%

6.2.2 Cuantificación de proteínas por método de Lowry

- DC Protein Assay Reagent S No. Catálogo #500-0115 BIO-RAD (México, D.F.)
- DC Protein Assay Reagent A No. Catálogo #500-0113 BIO-RAD (México, D.F.)
- DC Protein Assay Reagent B No. Catálogo #500-0114 BIO-RAD (México, D.F.)

6.2.3 Anticuerpos primarios

- VEGF anti-conejo (147) No. Catálogo sc-507 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
- Citoqueratina 8/18 anti-ratón No. Catálogo 08-0XXX y 18-X001 a 18X200, Zymed (South San Francisco, CA)
- Vimentina anti-ratón No. Catálogo 18-0052, Zymed (South San Francisco, CA)
- α -SMA anti-ratón No. Catálogo 08-X200, Invitrogen Incorporation (Carlsbad, CA, USA)
- FPS-1 anti-ratón No. Catálogo F4771 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)
- Claudina-1 anti-conejo No. Catálogo 51-9000 Zymed (South San Francisco, CA)
- ZO-1 anti-conejo No. Catálogo 61-7300 Zymed (South San Francisco, CA)
- DAPI dihydrochloride No. Catálogo D1306 Invitrogen Incorporation (Carlsbad, CA, USA)
- Actina anti-ratón, proporcionado por el Dr. José Manuel Hernández (Departamento de Biología Celular, CINVESTAV, DF, México)
- TGF- β 1 anti-ratón No. Catálogo T0438 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)

6.2.4 Anticuerpos secundarios

- Alexa Fluo 594 conejo anti-mouse No. Catálogo A-11062 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
- Alexa Fluo 488 mono-anti-conejo No. Catálogo A-11001 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

7. Metodología

7.1 Aislamiento de células mesoteliales

7.1.1 Bolsa de diálisis

Las bolsas de diálisis peritoneal se obtuvieron de pacientes urémicos diabéticos y no diabéticos del Hospital Juárez de México y del Centro Médico Nacional “La Raza”, Nefrología Pediátrica. El procedimiento de cultivos se realizó de acuerdo a lo ya publicado²⁴. En breve:

El contenido de la bolsa de diálisis se vacía en tubos Falcon de 50 ml, después se centrifugan a 1500 rpm por 10 min, se elimina el sobrenadante, se resuspenden las células para concentrarlas en un solo tubo y nuevamente se centrifugan a 1500 rpm por 10 min. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en un ml de medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's F-12 (1:1) polvo (DMEM/F-12) suplementado con 15% vol/vol de suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 mg/ml), L-glutamina (2 µg/ml), transferrina (5 µg/ml), insulina (5 µg/ml), hidrocortisona (0.4 µg/ml) y selenio de sodio (5 ng/ml), para posteriormente sembrarlas en cajas Petri previamente tratadas con colágeno tipo I. Las células se incuban a 37 °C y con atmosfera de 5 % de CO₂ hasta llegar a confluencia³⁹.

Las bolsas de líquido de diálisis se obtuvieron de pacientes que no hayan tenido episodios de peritonitis en los seis meses anteriores a la recolección de la bolsa. Todos los cultivos se estudiaron en pasaje 3.

7.1.2 Biopsias

Las biopsias fueron colectadas en solución de Hanks fría (4 °C), posteriormente fueron incubadas durante 10 minutos en tripsina al 0.125% y EDTA al 0.1%. Las células mesoteliales fueron separadas por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos y se cultivaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's F-12 (1:1) polvo (DMEM/F-12) suplementado con 15% vol/vol de suero fetal bovino, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml), L-glutamina (2 µg/ml), transferrina (5 µg/ml), insulina (5 µg/ml), hidrocortisona (0.4 µg/ml) y selenio de sodio (5 ng/ml), para posteriormente sembrarlas en cajas Petri previamente tratadas con colágeno tipo I. Las células se incuban a 37 °C y con atmosfera de 5 % de CO₂ hasta llegar a confluencia. Todos los cultivos se trabajaron en pasaje 3.

7.2 Caracterización de células mesoteliales

Las células mesoteliales presentes en los cultivos se caracterizaron por su típica morfología de empedrado cuando alcanzan la confluencia. También fueron positivas para citoqueratina 8/18 y vimentina, que son considerados marcadores de células mesoteliales, lo cual confirma su fenotipo.

7.3 Curvas concentración-efecto

Las células fueron cultivadas hasta el pasaje 3 en placas multipozos. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de MGO y 5-HMF por 24 h.

Posteriormente las monocapas fueron lavadas con PBS y se levantaron con tripsina-EDTA al 0.06% e inmediatamente se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Finalmente se realizó el conteo celular en 5 campos de cada concentración de MGO y 5-HMF.

7.4 Inmunofluorescencia

Las células fueron cultivadas hasta pasaje 3, las monocapas fueron expuestas a 30 μ M de MGO y 250 μ M de 5-HMF durante 24 h, luego lavadas con PBS y fijadas con metanol absoluto durante 15 minutos a 0 °C, rehidratadas con PBS, permeabilizadas con tritón al 0.25% por 15 minutos, después se bloquearon con BSA al 0.5% a 4 °C por 30 minutos (Sigma Chemical, St Louis, USA). Posteriormente fueron incubadas toda la noche con el anticuerpo primario a 4 °C. Luego de varios lavados, se incubaron con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron por microscopía confocal con un microscopio Leica DMIRE-2.

7.5 Extracción de proteínas de células mesoteliales

Las células se cultivaron hasta pasaje 3, las monocapas fueron lavadas con PBS y se levantaron con tripsina-EDTA al 0.06% e inmediatamente se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min, después el pellet se disgregó en 100 μ l de RIPA adicionado con PMSF (Sigma, Saint Louis, MO), y Complete (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) con inhibidores de proteasas, dejándose en agitación 40 minutos para posteriormente sonicarse. Las muestras se almacenan a -70 °C hasta su uso.

7.6 Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

En una caja multipozos, se depositaron 10 µl de la muestra obtenida en la extracción de proteínas (dilución 1:50), más 25 µl del reactivo A+S y 200 µl del reactivo B. Para el desarrollo del color, las muestras se incubaron por 15 minutos, al resguardo de la luz. La absorbancia se midió en el equipo Infinite M200 pro (Tecan System, San Jose, CA, USA) a 650-750 nm.

7.7 Western Blot

Los cultivos fueron expuestos previamente a 30 µM de MGO y 250 µM de 5-HMF durante 24 h, realizándose al final de éstas la extracción de proteínas. Dichas muestras fueron preparadas en una dilución de 1:5 en Laemmli 5X con urea (5M). Cada muestra contenía 80 µg de proteína. Las proteínas se colocaron en geles SDS-PAGE al 15% y se corrieron a 60 V por 3 horas. El estándar de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), se corrió en paralelo. Las proteínas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa (BIO-RAD, México, DF). Para bloquear la unión inespecífica de las proteínas, se incubaron las membranas con solución bloqueadora al 6% (BIO-RAD, México, DF) por 30 minutos, a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario VEGF (dilución 1:200), TGF-β1 (dilución 1:500) y actina (dilución 1:500). Las membranas se incubaron con HRP anti-conejo y ratón por 1 h, posteriormente a los lavados se utilizaron los reactivos para la detección de WB ECL (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). La quimioluminiscencia se detectó en el sistema de imagen EC3 (UVP, Bioluminescence Systems, Cambridge, UK). La densidad de las bandas de cada proteína se cuantificó por transmitancia densitométrica (UVP Bioluminescence Systems software, Cambridge, UK).

7.8 Análisis de datos

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Para la comparación de grupos múltiples se empleó el análisis de varianza (ANOVA). Una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa. La prueba de Dunnett se empleó como prueba post-hoc.

Declaración de Ética

El Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) se apeg a la Declaración de Helsinki, a la NOM-012-SSA3-2012, así como al art. 17 de la Ley General de Salud para el protocolo de investigación en humanos, garantizando así los aspectos éticos de la actual investigación. Se obtuvieron los consentimientos informados de los pacientes donadores de las bolsas de diálisis con previa explicación de la utilización de éstas en el estudio por el médico nefrólogo.

También es importante señalar que CINVESTAV no guarda las células obtenidas de ningún paciente con fines de lucro, los resultados obtenidos de las muestras para este protocolo no se usarán para ningún otro estudio y/o colaboración para diseño de fármacos.

8. Resultados

8.1 Características de los pacientes

Se recolectaron biopsias y bolsas con líquidos de diálisis peritoneal de pacientes en el momento en que se colocaba el primer catéter para la terapia de DP, estos pacientes son urémicos y se dividieron en grupos diabéticos (DM II) y no diabéticos. También se recolectaron bolsas de líquidos de diálisis de pacientes que ya estaban en el programa de DPCA, de las cuales se obtuvieron las CMPH, estos pacientes son urémicos y se dividieron en grupos diabéticos (DM II) y no diabéticos. Las características de dichos pacientes se muestran en la **Tabla 2**.

	PERITONEO (CATÉTER RECIÉN PUESTO)		EFLUENTE DE DIÁLISIS	
	Diabético n=1	No diabético	Diabético n=2	No diabético n=6
EDAD (AÑOS)	54	-	45	10-35
MUJER/HOMBRE	0/1	-	1/1	4/2
TIEMPO EN DIÁLISIS (MESES)	-	-	18	25
NO. DE CATÉTERES	1	-	1	1-3
EPISODIOS DE PERITONITIS	-	-	0-1	0-1

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes de los que se obtuvieron las muestras de líquidos de diálisis y peritoneo parietal.

8.2 Caracterización de las CMPH

Se realizaron cultivos primarios como se describió previamente, de pacientes urémicos diabéticos y no diabéticos. Los cultivos presentan las características ya reportadas de las CM, es decir, formar monocapas y tener apariencia de empedrado cuando están confluentes. En las imágenes se puede observar que en las CMPH de pacientes diabéticos hay una mezcla de células hipertróficas (*) y células alargadas tipo fibroblastos (flecha), en comparación con las CMPH de pacientes no diabéticos (**Figura 11**).

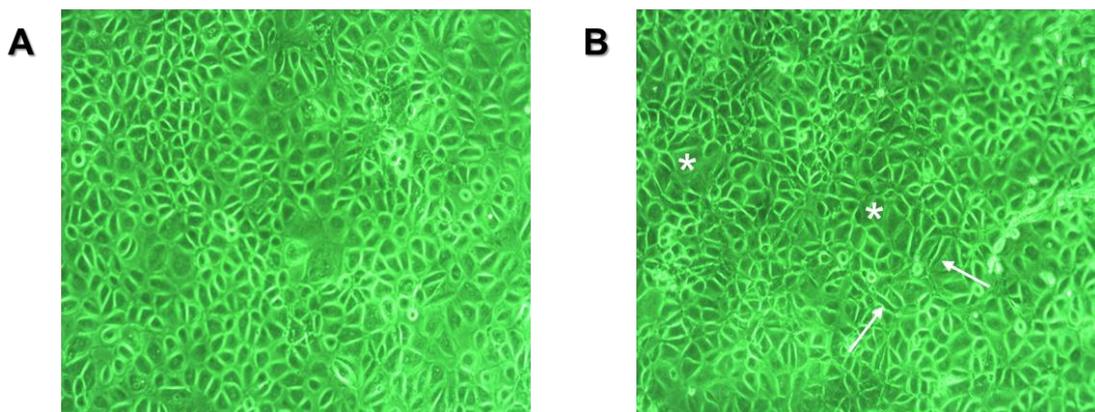


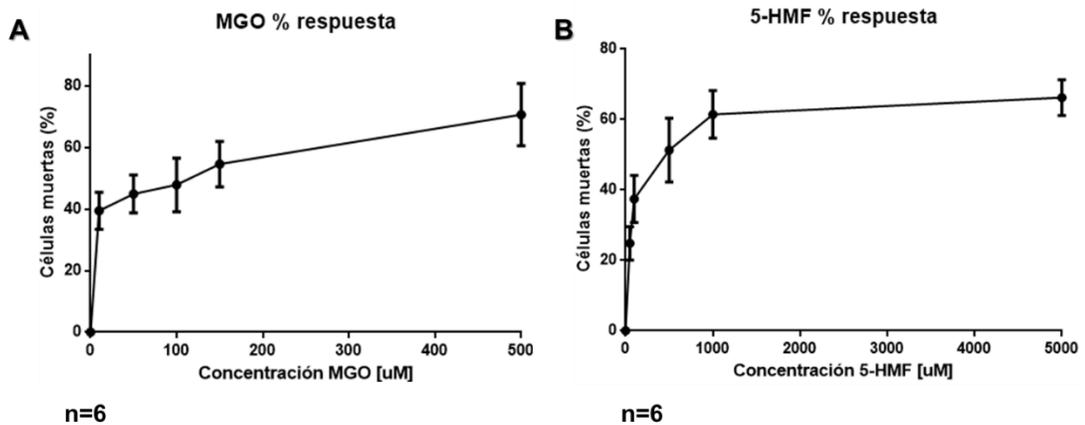
Figura 11. Caracterización de las células mesoteliales. (A) Cultivo de CM obtenidas de líquidos de diálisis de pacientes urémicos no diabéticos, en el que se observa la apariencia típica de empedrado. **(B)** Cultivo de CM obtenidas de líquidos de diálisis de pacientes urémicos diabéticos, en el que se observan células hipertróficas (*) y células alargadas tipo fibroblastos (flechas).

8.3 Curvas concentración-efecto

Se realizaron curvas concentración-efecto para MGO y 5-HMF, con el objetivo de conocer la concentración letal 50 (CL₅₀) para ambos compuestos en los diferentes grupos, urémicos no diabéticos, urémicos diabéticos y urémicos diabéticos con catéter recién puesto. Una vez obtenida la CL₅₀ se determinó la concentración con la que se realizarían los experimentos posteriores.

8.3.1 CMPH de pacientes urémicos, no diabéticos

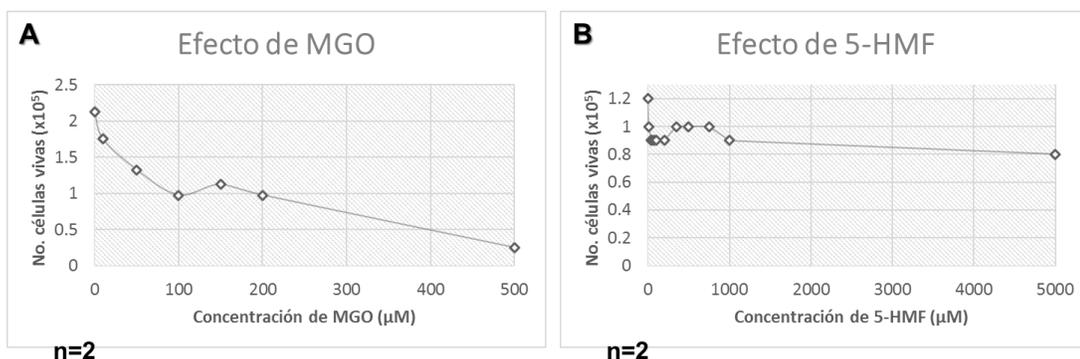
Las curvas concentración-efecto para el grupo urémico no diabético se realizaron por sextuplicado en CMPH, en donde la CL_{50} para MGO es $6.984 \mu\text{M} \pm \text{SEM}$ (**Gráfica 1-A**) y para 5-HMF es $82.42 \mu\text{M} \pm \text{SEM}$ (**Gráfica 1-B**), lo que nos da información que de MGO es más tóxico que 5-HMF para las CM.



Gráfica 1. Curvas concentración-efecto en CMPH de pacientes urémicos no diabéticos. (A) Curva concentración-efecto para MGO. (B) Curva concentración-efecto para 5-HMF. Se observa que el MGO es más citotóxico que 5-HMF.

8.3.2 CMPH de pacientes urémicos, diabéticos

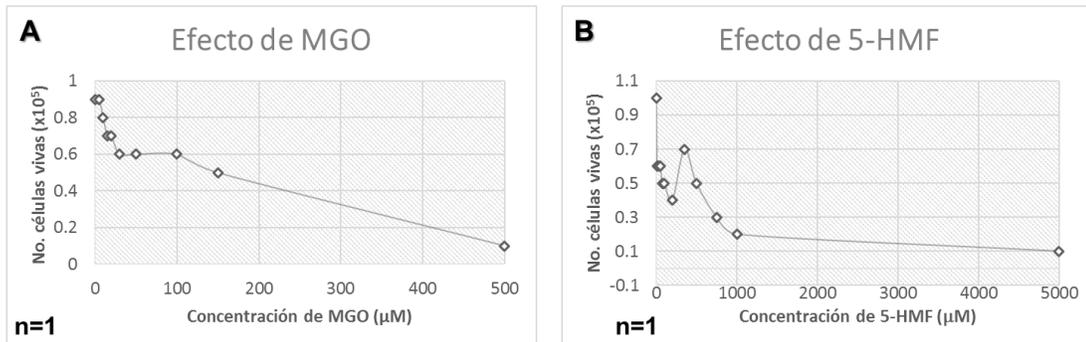
Las curvas concentración-efecto para el grupo urémico diabético se realizaron por duplicado solamente, por lo que la CL_{50} es aproximada. El valor obtenido para MGO es de 100 μM (**Gráfica 2-A**) y para 5-MHF de 200 μM (**Gráfica 2-B**), es decir, se observa que la CL_{50} para ambos PDG es una concentración mayor que en el grupo de líquido de diálisis urémico no diabético.



Gráfica 2. Curvas concentración-efecto en CMPH de pacientes urémicos diabéticos. (A) Curva concentración-efecto para MGO. **(B)** Curva concentración-efecto para 5-HMF. Se observa que el MGO es más citotóxico que 5-HMF como en el grupo no diabético, sin embargo, las CMPH de pacientes urémicos diabéticos son más resistentes a las CMPH de pacientes urémicos no diabéticos.

8.3.3 CMPH de pacientes urémicos, diabéticos con catéter recién puesto

Las curvas concentración-efecto para el grupo urémico diabético con catéter recién puesto se realizaron en CMPH de un paciente, por lo que la CL_{50} es aproximada y sujeta a cambios cuando se realicen repeticiones. El valor obtenido para MGO es de 30 μM (**Gráfica 3-A**) y para 5-HMF de 200 μM (**Gráfica 3-B**), también se observa que la CL_{50} para ambos PDG es una concentración mayor que en el grupo de líquido de diálisis urémico no diabético. En comparación con el grupo de líquido de diálisis diabético se observa que la CL_{50} de MGO es menor, mientras que la de 5-HMF no cambia. Lo que sugiere que las CMPH obtenidas de líquido de diálisis de pacientes urémicos diabéticos son más resistentes a MGO y 5-HMF que las células obtenidas de líquido de diálisis de pacientes urémicos no diabéticos y de pacientes urémicos diabéticos de catéter recién puesto.



Gráfica 3. Curvas concentración-efecto en CMPH de pacientes urémicos, diabéticos con catéter recién puesto. (A) Curva concentración-efecto para MGO. **(B)** Curva concentración-efecto para 5-HMF. Se observa que el MGO es más citotóxico que 5-HMF como en los grupos anteriores, sin embargo, las CMPH de pacientes urémicos, diabéticos con catéter recién puesto son más resistentes a las CMPH de pacientes urémicos, no diabéticos, pero menos resistentes que las CMPH de pacientes urémicos, diabéticos.

8.4 Expresión de VEGF en CMPH

Se evaluó la expresión de VEGF mediante inmunofluorescencia en CMPH de pacientes urémicos no diabéticos, de pacientes urémicos diabéticos y de pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto.

Hay mayor expresión de VEGF cuando las CMPH son expuestas al MGO en el grupo de pacientes urémicos no diabéticos (**Figura 12-A**), este mismo fenómeno se observa en las CMPH de pacientes urémicos diabéticos (**Figura 12-B**). En contraste las CMPH de pacientes urémicos diabéticos de catéter recién puesto que expresan menor cantidad de VEGF y esta expresión no varía cuando las CMPH se exponen a MGO y 5-HMF (**Figura 12-C**). También se observó que CMPH de pacientes urémicos diabéticos expresan más VEGF que las CMPH de pacientes urémicos no diabéticos. Estos datos sugieren que los PDG promueven la expresión de VEGF.

Para corroborar lo observado en la inmunofluorescencia se analizó la expresión de VEGF por western blot en lisados totales (**Figura 13**). Hay mayor expresión de VEGF en el grupo urémico no diabético cuando las CMPH son expuestas a MGO, mientras que no hay cambio cuando se exponen a 5-HMF (**Figura 13-A**).

En el grupo urémico diabético no se realizó estadística debido a que el número de muestras es pequeño, sin embargo, se observa la misma tendencia que en el grupo urémico no diabético (**Figura 13-B**).

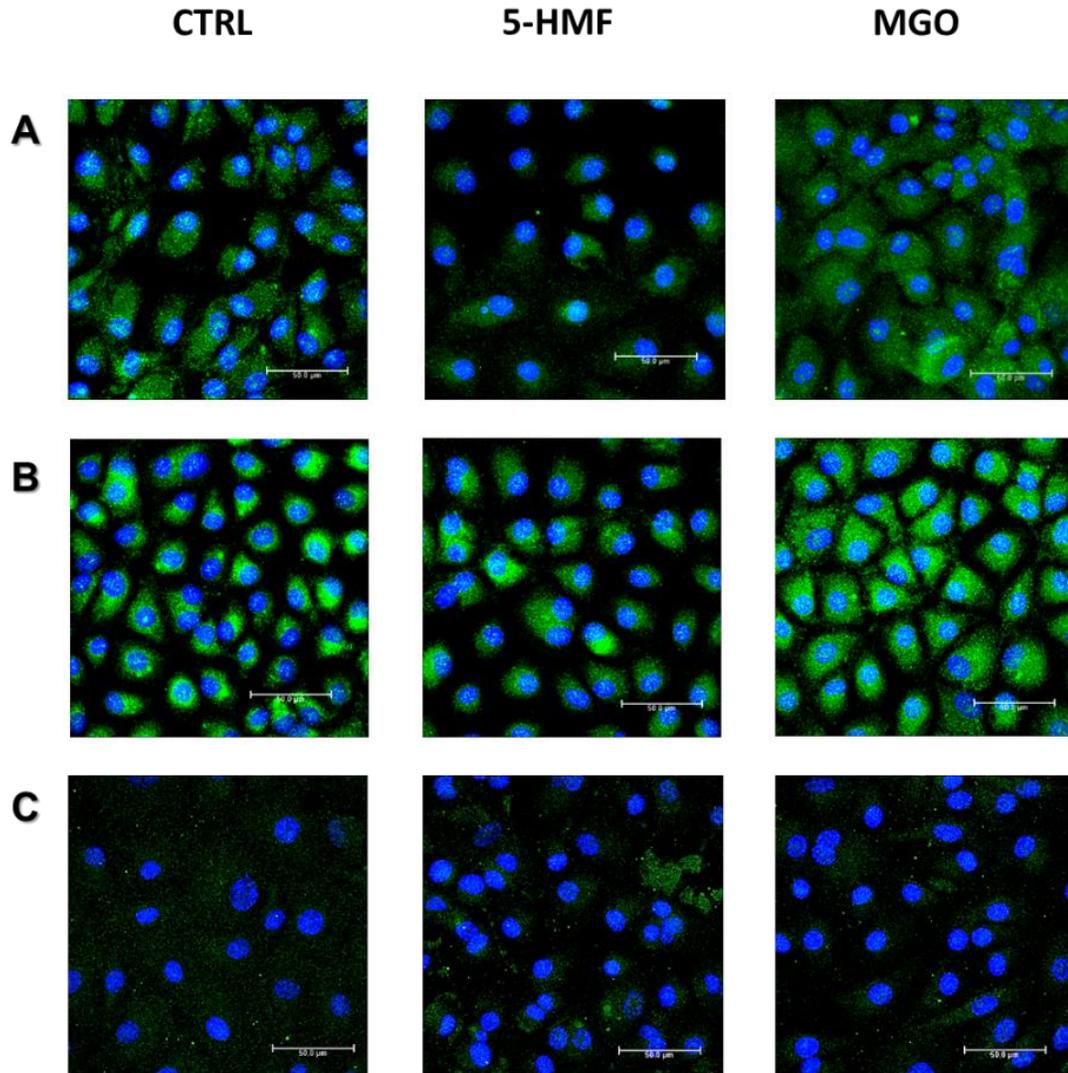


Figura 12. Expresión de VEGF en CMPH. (A) CMPH de pacientes urémicos, no diabéticos. Se observa mayor expresión de VEGF (verde) cuando las células se exponen a MGO. **(B)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos. De manera general hay mayor expresión de VEGF y con el tratamiento de MGO se favorece aún más la expresión de VEGF. **(C)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos con catéter recién puesto. El grupo control es el control del cultivo sin tratamiento. Barra 50 µm.

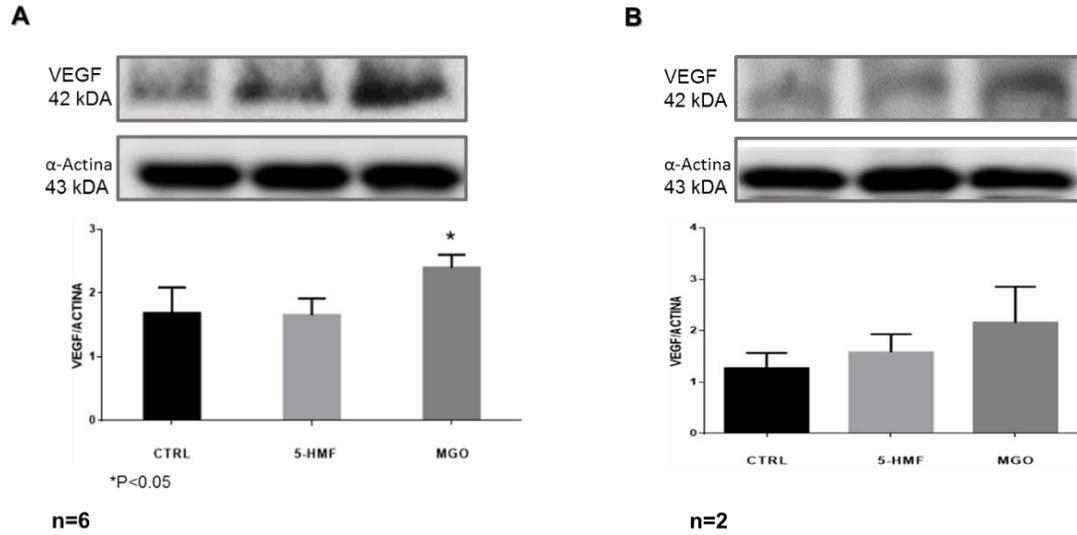


Figura 13. Análisis de la expresión de VEGF por WB en lisados totales. (A) Imagen representativa de WB y densitometría de VEGF en CMPH de pacientes urémicos, no diabéticos. **(B)** Imagen representativa de WB y densitometría de VEGF en CMPH de pacientes urémicos, diabéticos. n=6 y n=2 respectivamente, *p<0.05.

8.5 Expresión de la citoqueratina 8-18 en CMPH

Se evaluó la expresión de la citoqueratina 8-18 por inmunofluorescencia en las CMPH de los diferentes grupos, para corroborar el fenotipo mesotelial observado mediante microscopía de luz. Se observó que en las CMPH de pacientes urémicos no diabéticos hay menor expresión de citoqueratina 8-18 cuando son expuestas a MGO y 5-HMF, así como agregados perinucleares (**Figura 14-A**), lo que sugiere que MGO y 5.HMF promueven la TMM.

En contraste con las CMPH de pacientes urémicos diabéticos (**Figura 14-B**) y urémicos diabéticos con catéter recién puesto (**Figura 14-C**), en donde se observa una mayor expresión y reorganización de la citoqueratina 8-18 cuando son expuestas a MGO y 5-HMF.

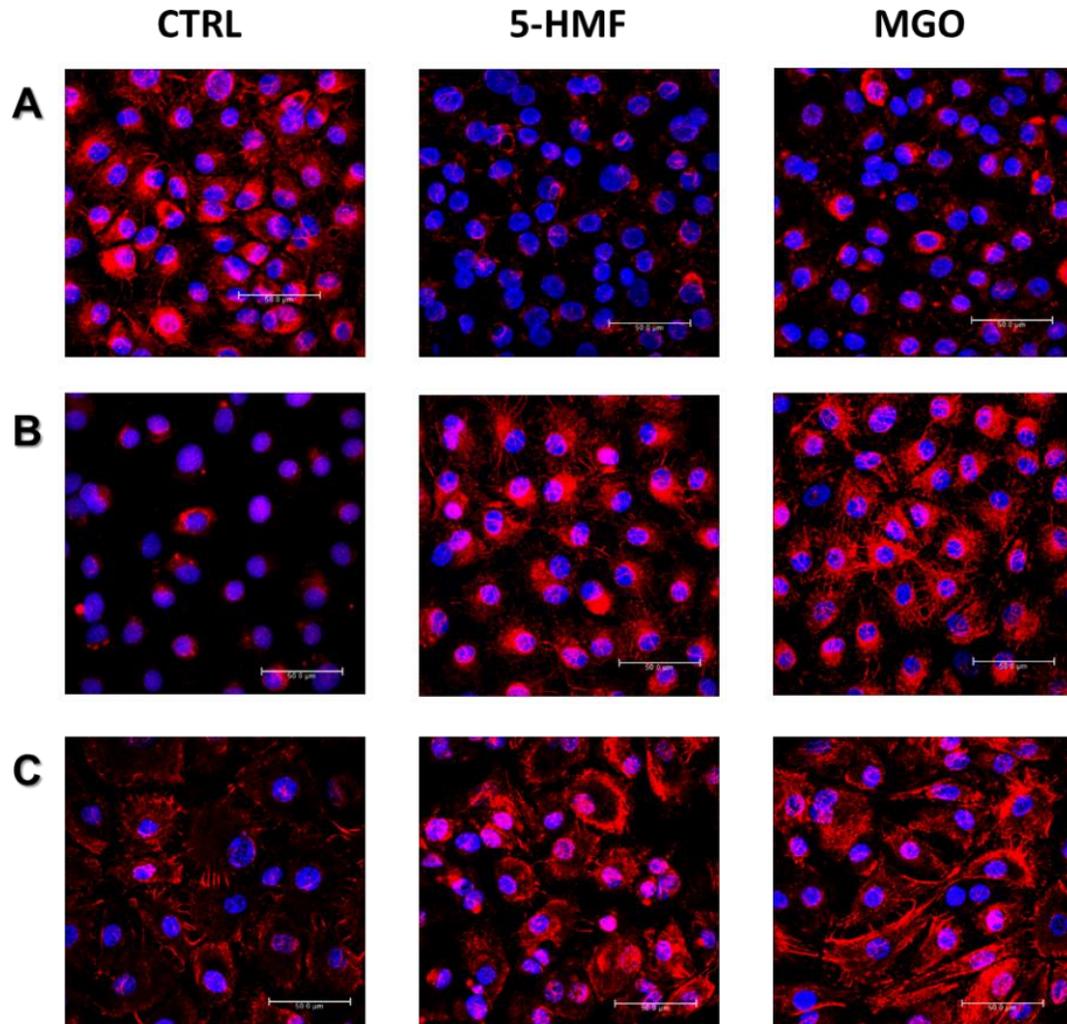


Figura 14. Expresión de citoqueratina 8-18 en CMPH. (A) CMPH de pacientes urémicos, no diabéticos. Se observa menor expresión de citoqueratina 8-18 cuando las células son expuestas a MGO y 5-HMF. **(B)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos. **(C)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos con catéter recién puesto. En las CMPH provenientes de pacientes diabéticos, se observa mayor expresión de la citoqueratina 8-18. El grupo control es el control del cultivo sin tratamiento. Barra 50 μm .

8.6 Expresión de los marcadores de la TMM en CMPH

También se evaluaron los marcadores de la TMM mediante inmunofluorescencia para cada grupo con el objetivo de conocer el daño celular.

8.6.1 Expresión de α -SMA

La α -SMA es una proteína que se expresa en miofibroblastos, es decir, en células que tienen la capacidad de migrar y es un marcador característico de la TMM. Se observó en CMPH de pacientes urémicos no diabéticos (**Figura 15-A**) y urémicos diabéticos con catéter recién puesto (**Figura 15-C**) la expresión de α -SMA cuando las células son expuestas a MGO y 5-HMF. En contraste, con las CMPH de pacientes urémicos diabéticos (**Figura 15-B**) en donde α -SMA se expresa en el control y no hay cambio cuando las células son expuestas a MGO y 5-HMF, lo que demuestra el daño provocado por la DM.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que MGO y 5-HMF promueven la TMM.

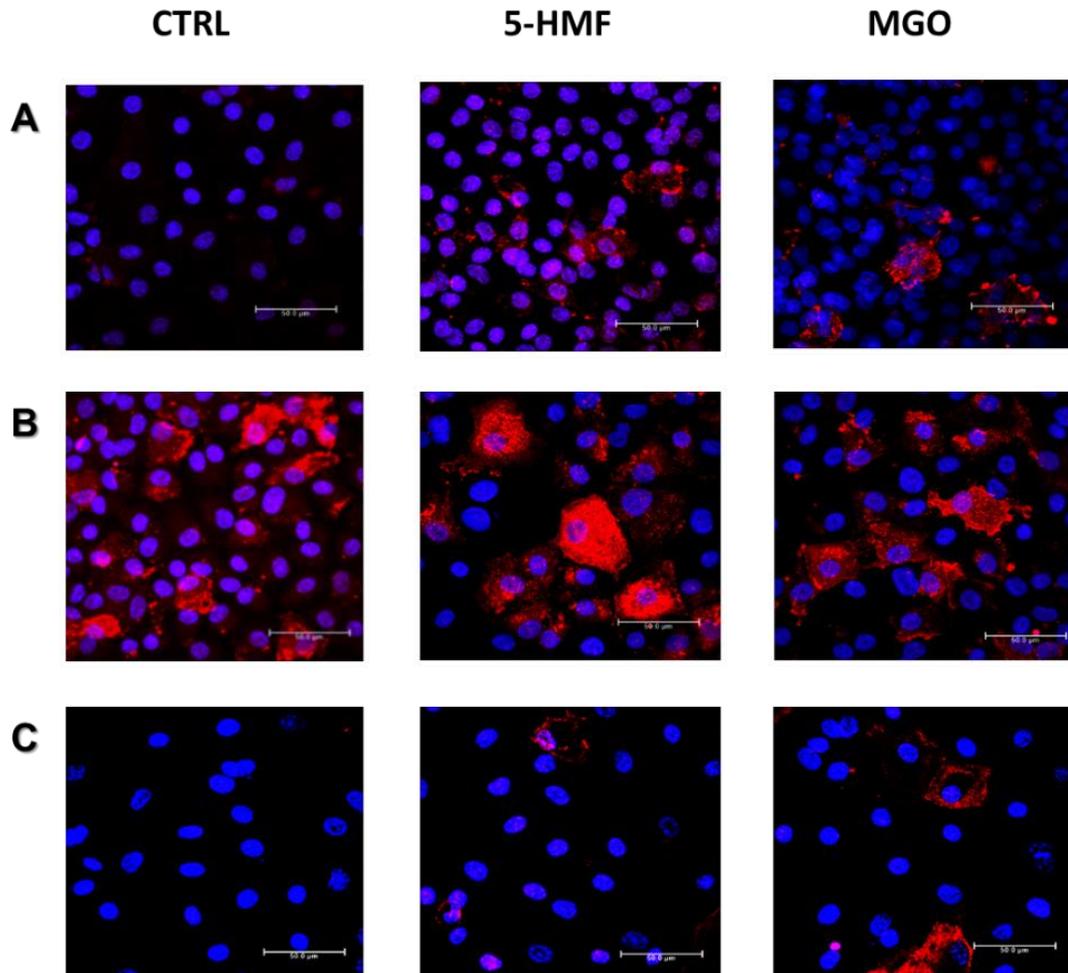


Figura 15. Expresión de α -SMA en CMPH. (A) CMPH de pacientes urémicos, no diabéticos. **(B)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos. **(C)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos con catéter recién puesto. Se observa mayor expresión de α -SMA en todos los grupos, cuando las células son expuestas a MGO y 5-HMF. El grupo control es el control del cultivo sin tratamiento. Barra 50 μ m.

8.6.2 Expresión de vimentina

Vimentina es una proteína que se sobreexpresa cuando hay un daño en las células mesoteliales y estas entran en la TMM. Se observó que en CMPH de pacientes urémicos no diabéticos (**Figura 16-A**), de pacientes urémicos diabéticos (**Figura 16-B**) y de pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto (**Figura 16-C**) hay mayor expresión de vimentina cuando se exponen a MGO. También se observa el daño producido por la DM en las CMPH de pacientes urémicos diabéticos, ya que hay mayor expresión de vimentina en el control en comparación con el control de pacientes urémicos no diabéticos. Estos resultados sugieren que MGO causa un daño más severo que 5-HMF.

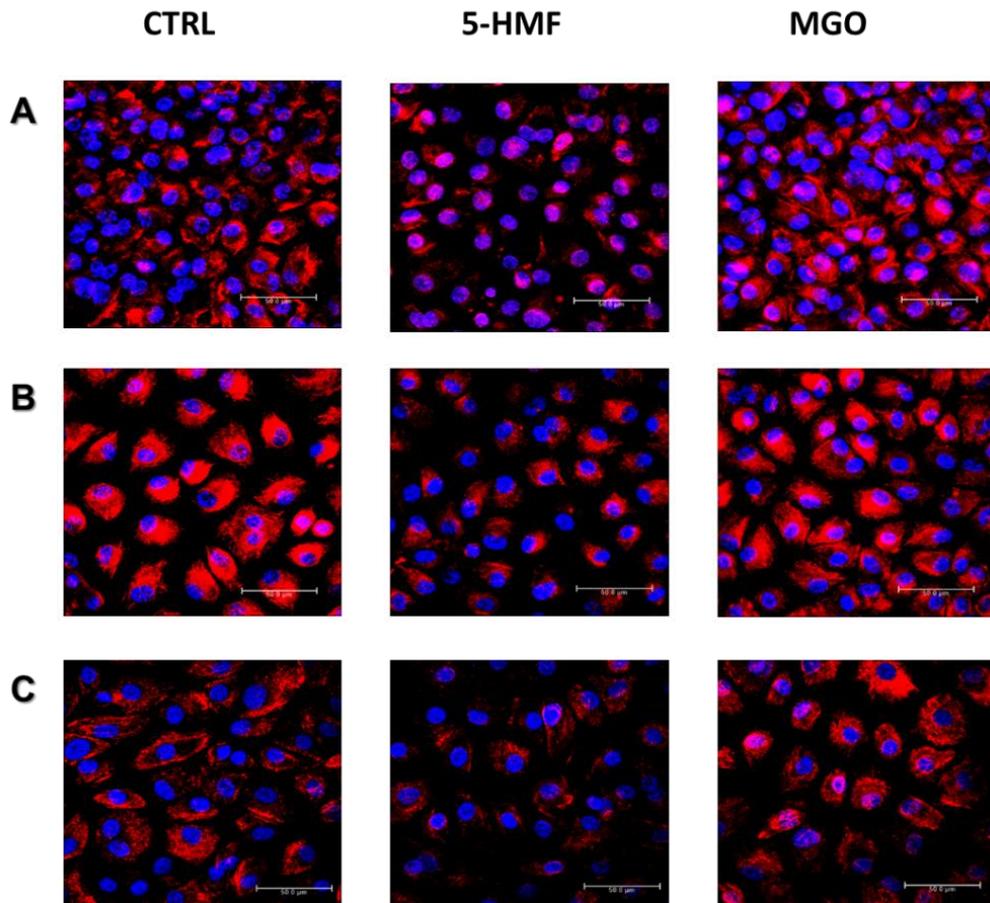


Figura 16. Expresión de vimentina en CMPH. (A) CMPH de pacientes urémicos, no diabéticos. **(B)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos. **(C)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos con catéter recién puesto. Se observa mayor expresión de vimentina, cuando las células son expuestas a MGO. El grupo control es el control del cultivo sin tratamiento. Barra 50 μm.

8.6.3 Expresión de FSP-1

FSP-1 es una proteína que se expresa en todos los fibroblastos y es considerada como un marcador de la TMM. En CMPH de pacientes urémicos no diabéticos (**Figura 17-A**) y urémicos diabéticos (**Figura 17-B**) se observó que hay mayor expresión de FSP-1 cuando las células son expuestas a 5-HMF. Lo que sugiere que 5-HMF promueve la TMM.

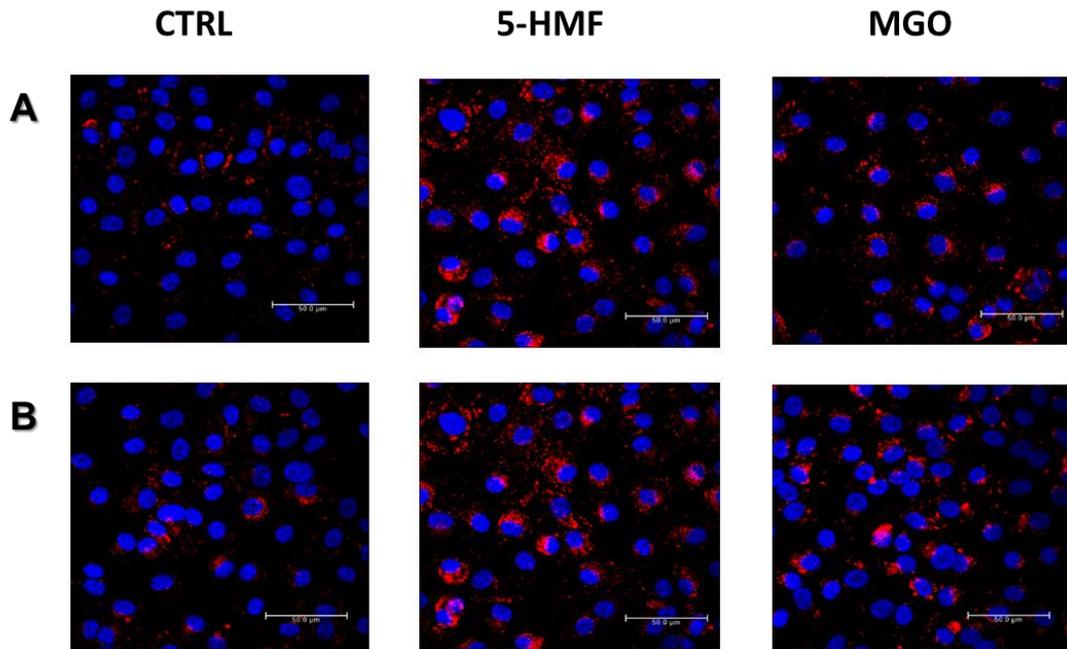


Figura 17. Expresión de FSP-1 en CMPH. (A) CMPH de pacientes urémicos, no diabéticos. Se observa mayor expresión de FSP-1 cuando las células son expuestas a 5-HMF. **(B)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos. Hay mayor expresión de FSP-1 cuando las células son expuestas a MGO y 5-HMF. El grupo control es el control del cultivo sin tratamiento. Barra 50 μm.

8.7 Expresión de las proteínas de la unión estrecha en CMPH

8.7.1 Expresión de claudina-1

Claudina-1 es una proteína que se expresa en los epitelios y mesotelios, forma parte de la unión estrecha, por lo que cuando hay un daño en las células o estas entran en TMM la expresión de claudina-1 se ve alterada. Se observó en CMPH de pacientes urémicos no diabéticos (**Figura 18-A**), de pacientes urémicos diabéticos (**Figura 18-B**) y de pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto (**Figura 18-C**) que se pierde la forma característica de malla de gallinero, hay menor expresión y deslocalización de claudina-1 cuando las células son expuestas a MGO y 5-HMF. En el grupo de CMPH de pacientes no diabéticos (**Figura 18-A**) se observó mayor expresión citoplasmática de claudina-1 en respuesta al tratamiento con 5-HMF. También se observó el daño causado por la DM, ya que en las CMPH de pacientes urémicos diabéticos (**Figura 18-B**) hay poca expresión de claudina-1 en el grupo control, mientras que las CMPH de pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto (**Figura 18-C**) presentan un daño mayor, ya que prácticamente no se observa expresión de claudina-1 en el control.

Estos resultados sugieren que MGO y 5-HMF afectan la integridad de la unión estrecha, promoviendo así la TMM.

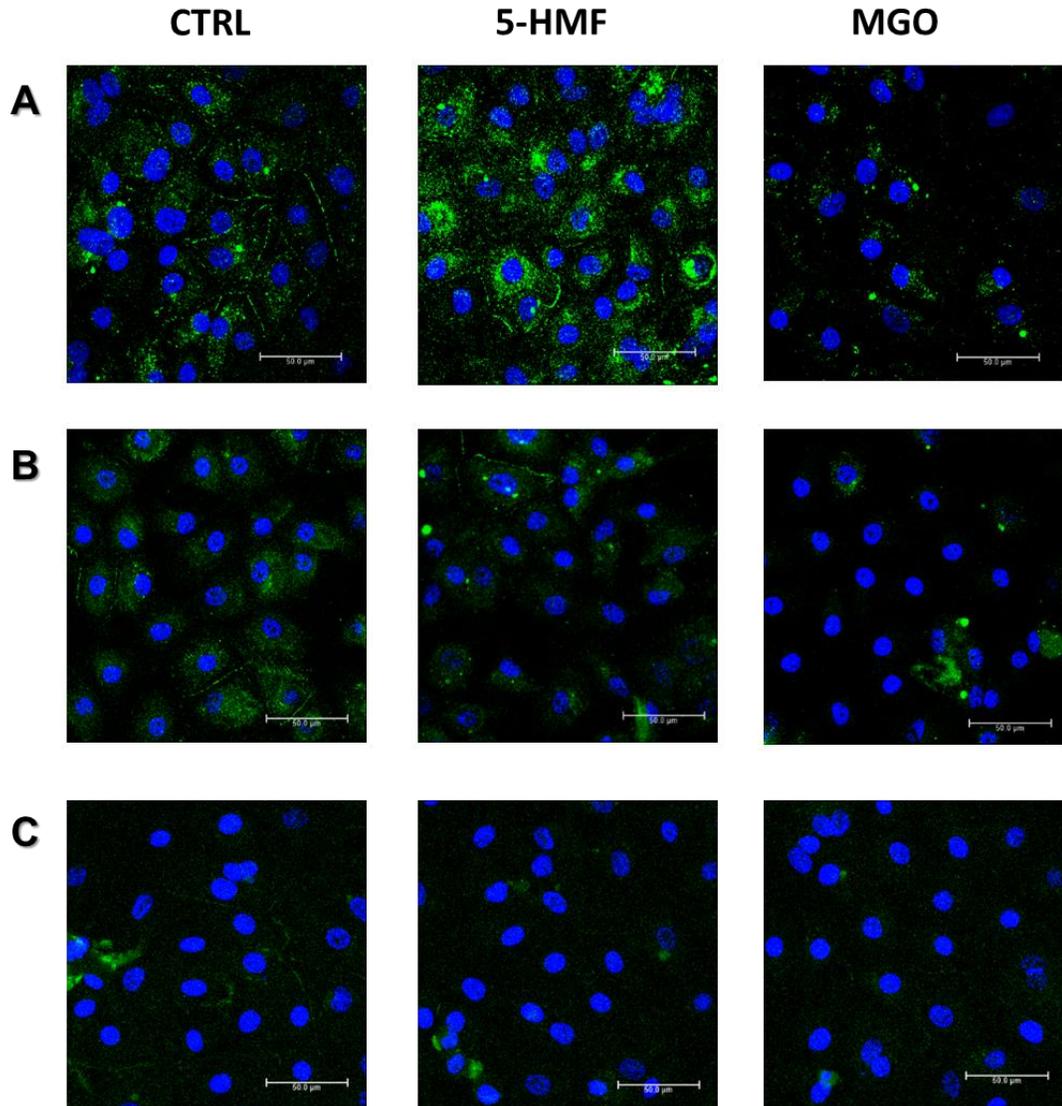


Figura 18. Expresión de claudina-1 en CMPH. (A) CMPH de pacientes urémicos, no diabéticos. Se observa mayor expresión y deslocalización de claudina-1 cuando las células son expuestas a 5-HMF, mientras que con MGO la expresión se pierde totalmente. **(B)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos. **(C)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos con catéter recién puesto. En los grupos diabéticos se observa menor expresión de claudina-1 desde el inicio y cuando las células son expuestas a MGO y 5-HMF dicha expresión es todavía menor. El grupo control es el control del cultivo sin tratamiento. Barra 50 μm.

8.7.2 Expresión de ZO-1

ZO-1 es una proteína de andamiaje que une los filamentos de actina de las células a las proteínas de la unión estrecha, se expresa en células de epitelios y mesotelios. Cuando hay daño en las células la expresión de ZO-1 se ve modificada. Se observó en CMPH de pacientes urémicos no diabéticos (**Figura-19-A**), de pacientes urémicos diabéticos (**Figura 19-B**) y de pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto (**Figura 19.C**) que se pierde la forma característica de malla de gallinero, hay menor expresión y deslocalización de ZO-1 cuando las células son expuestas a MGO y 5-HMF. También se observó el daño causado por la DM y la uremia en las CMPH de pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto (**Figura 19-C**), ya que la expresión de ZO-1 es menor en el control comparada con el control de CMPH de pacientes urémicos diabéticos (**Figura 19-B**).

Estos resultados refuerzan que MGO y 5-HMF afectan la integridad de la unión estrecha, promoviendo así la TMM.

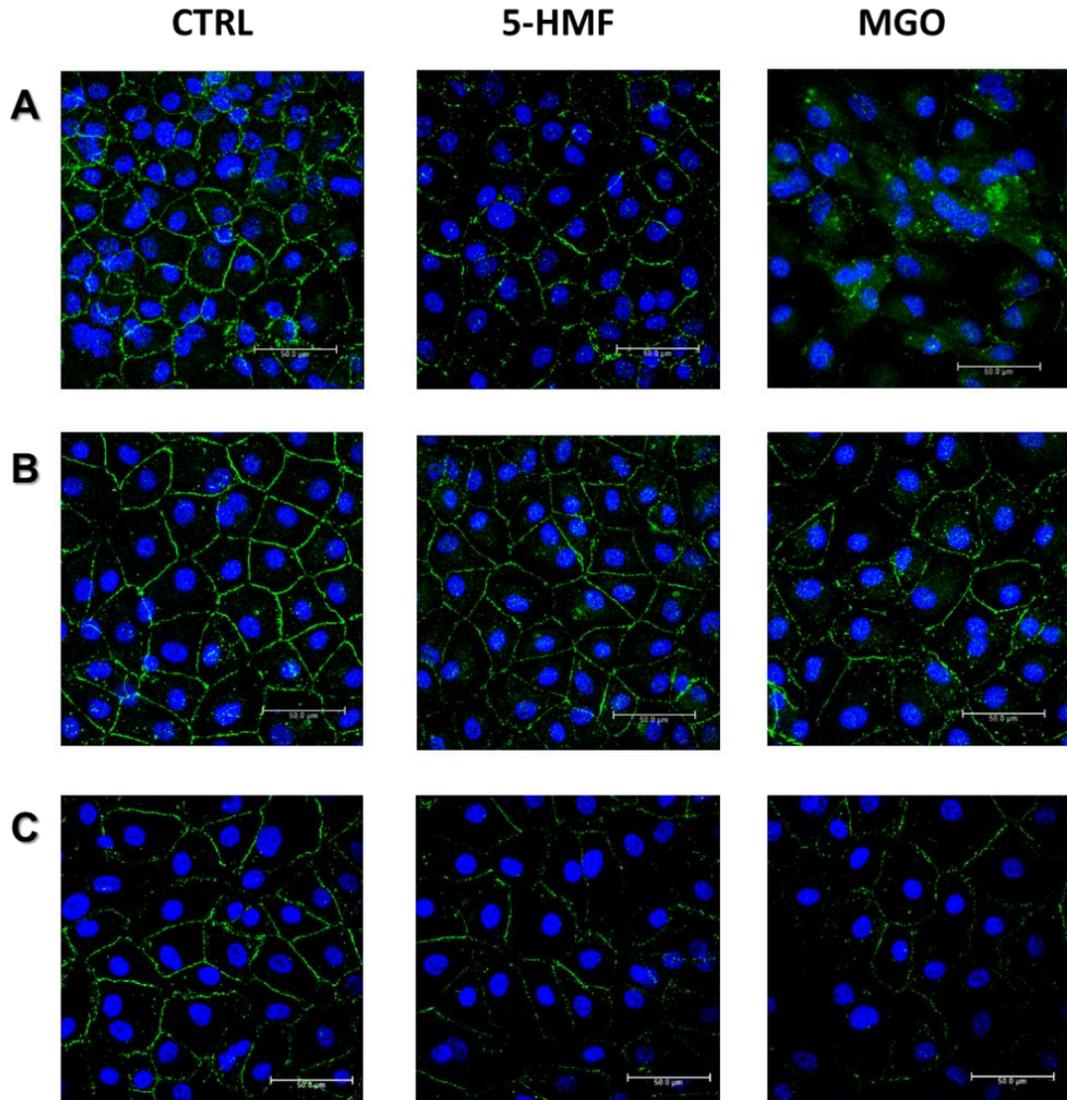


Figura 19. Expresión de ZO-1 en CMPH. (A) CMPH de pacientes urémicos, no diabéticos. **(B)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos. **(C)** CMPH de pacientes urémicos, diabéticos con catéter recién puesto. En general, se observa menor expresión de ZO-1 cuando las células son expuestas a MGO y 5-HMF. En el grupo diabético con catéter recién puesto, se observa menor expresión de ZO-1 desde el grupo control. El grupo control es el control del cultivo sin tratamiento. Barra 50 μ m.

9. Discusión

Se sabe que la DPCA es la terapia más común para tratar la IRC, debido a su bajo costo, sin embargo, los LD que se usan son bioincompatibles, ya que tienen una alta osmolaridad, debida a la gran concentración de glucosa que poseen, un pH bajo y PDG que se forman en el momento en que son esterilizados. MGO y 5-HMF son dos PDG que tienen diferentes efectos en las CMPH, MGO es un fuerte citotóxico, mientras que 5-HMF es un compuesto altamente estable a lo largo del tiempo en los LD¹³. La constante exposición del peritoneo a los LD provoca cambios morfológicos como angiogénesis y posteriormente fibrosis. Por todo esto es que se decidió estudiar los efectos de MGO y 5.HMF sobre la expresión de VEGF en cultivos primarios de CMPH de pacientes urémicos no diabéticos, pacientes urémicos diabéticos y pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto.

Los hallazgos más importantes son:

- Las CMPH de pacientes urémicos diabéticos son más resistentes al MGO y al 5-HMF que las CMPH de pacientes urémicos no diabéticos.
- El MGO promueve la expresión de VEGF en CMPH de pacientes urémicos no diabéticos y diabéticos.
- El MGO y 5-HMF promueven la expresión de los marcadores de la TMM.

También se observó que la DM promueve la expresión de:

- VEGF en CMPH de pacientes urémicos diabéticos.
- Los marcadores de la TMM en CMPH de pacientes urémicos no diabéticos.
- Citoqueratina 8-18 en CMPH de pacientes urémicos diabéticos y pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto.

El VEGF es una proteína que está involucrada en el proceso de angiogénesis, su principal blanco es el endotelio vascular, sin embargo, las CM también expresan VEGF y poseen los receptores para desencadenar la cascada de señalización, por lo que se piensa que de esta forma las CM participan en el deterioro de la membrana peritoneal, cuando la fina regulación de VEGF se ha alterado⁴⁰.

Nosotros observamos que en las CMPH de pacientes urémicos diabéticos hay mayor expresión de VEGF que en las CMPH de pacientes urémicos no diabéticos, y que esta aumenta todavía más cuando las células se exponen a MGO. Lo anterior, nos lleva a pensar que la DM también es causante del aumento de VEGF, sin embargo, una observación interesante es que en las CMPH de pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto la expresión de VEGF es nula, y no se altera cuando las células se exponen a MGO y 5-HMF, poniendo en evidencia que para que la DM promueva la expresión de VEGF las CMPH deben de haber tenido una exposición continua, tanto a las concentraciones altas de glucosa, como a los PDG de los LD. Las concentraciones altas de glucosa y los PDG son considerados estímulos que activan la vía de las MAPK p38 y esto lleva a la sobreexpresión de VEGF⁴¹. Estos datos se correlacionan con lo obtenido con otros autores que han reportado una mayor expresión de VEGF en CMPH de pacientes urémicos diabéticos³⁸.

Otro resultado interesante que encontramos fue que las CMPH de pacientes diabéticos son más resistentes al MGO y 5-HMF, y expresan mayor cantidad de los marcadores de la TMM, como vimentina, FSP-1 y α -SMA, es decir, estas CMPH presentan un fenotipo fibroblastoide. La resistencia de las CMPH de pacientes diabéticos podría correlacionarse con hallazgos encontrados recientemente en células MDCK que están en la TMM en donde el factor de transcripción snail bloquea el ciclo y confiere resistencia a la muerte celular, impidiendo la apoptosis, todo esto en condiciones de alta glucosa⁴².

La citoqueratina 8-18 es una proteína de los filamentos intermedios, específica de células mesoteliales y epiteliales. Nosotros observamos que en las CMPH de pacientes urémicos diabéticos y de pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto, hay mayor expresión y reorganización de citoqueratina 8-18 cuando las células se exponen a MGO y 5-HMF. Estos resultados, aunque van en contra de lo esperado, sugieren que existe una inhibición en la degradación de la citoqueratina 8-18, favoreciendo así su sobreexpresión y reorganización en el citoplasma, esto se correlaciona con lo observado en las células hepáticas en la condición diabética⁴⁴.

También analizamos la expresión de los marcadores de la TMM y observamos que en las CMPH de pacientes urémicos no diabéticos, pacientes urémicos diabéticos y pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto el MGO y 5-HMF promueven la expresión de α -SMA, vimentina y la FSP-1, esto posiblemente mediante la intervención y cascada de señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β , por sus siglas en inglés), ya que dicho factor es el gen maestro de la TMM, además TGF- β induce aumento en la expresión de VEGF, este aumento a su vez induce el aumento en la expresión de TGF- β , haciendo así un círculo vicioso que repercute en la morfología de las CMPH⁴⁵. A todo lo anterior hay que agregar el daño provocado por la DM, ya que, en las CMPH de pacientes urémicos diabéticos, los marcadores de la TMM están presentes sin la exposición de MGO y 5-HMF, lo que concuerda con resultados obtenidos previamente en CM de rata diabética⁴⁶.

Finalmente analizamos la expresión de proteínas de la unión estrecha y observamos que, en las CMPH de pacientes urémicos no diabéticos y pacientes urémicos diabéticos la expresión de claudina-1 y de ZO-1 es casi nula y se encuentra deslocalizada cuando las células se exponen a MGO y 5-HMF, en contraste las CMPH de pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto presentan un daño mayor, ya que aun sin exposición a los compuestos MGO y 5-HMF, la expresión de claudina-1 y ZO-1 es menor, debido al daño producido por la DM y posiblemente también por la uremia. Estos hallazgos sugieren que las CMPH perdieron la polaridad apical-basolateral, que el complejo de la unión estrecha esta desensamblado, así como una deslocalización y degradación de dichas proteínas. La internalización de estas proteínas puede estar mediada por las caveolinas, ya que estas participan en la endocitosis de algunas proteínas de la unión estrecha, esto en células endoteliales de un modelo de rata⁴⁷. Por otro lado, se ha encontrado en un modelo murino, que el gen de caveolina-1 se expresa durante la terapia de la DP⁴⁸.

10. Conclusiones

Se describe la expresión de VEGF y de marcadores mesenquimales en CMPH, en donde se encontró que:

- La DM y MGO aumentaron la expresión de VEGF.
- El 5-HMF y MGO promovieron la expresión de marcadores mesenquimales, indicando transición mesotelio-mesénquima.

Estos hallazgos sugieren que los cambios en las células mesoteliales del peritoneo humano de pacientes en DP pueden estar asociados con el aumento en la expresión de VEGF.

11. Perspectivas

- Evaluar la expresión de VEGF en CMPH de pacientes urémicos diabéticos, para tener un número apropiado para entender mejor el fenómeno.
- Evaluar la expresión de VEGF en CMPH de pacientes urémicos diabéticos con catéter recién puesto.
- Evaluar la expresión de VEGF en CMPH de pacientes urémicos no diabéticos con catéter recién puesto.
- Evaluar la resistencia eléctrica transepitelial de las CMPH de los grupos mencionados anteriormente.
- Determinar los efectos de la vía de señalización de VEGF en CMPH.
- Determinar los efectos de VEGF sobre las proteínas de la unión estrecha.

12. Bibliografía

1. Botella García Julio. *Manual de nefrología clínica*. (2002).
2. Gal Iglesias Beatriz, López Gallardo Meritxell, Martín Velasco Ana Isabel, P. M. J. *Bases de la fisiología renal*. (2007).
3. Cameron, F. Standards of Medical Care in Diabetes - 2016. *Aust. Fam. physician*. **35**, 386–390 (2006).
4. INEGI. Estadística a Propósito del Día Mundial de la Diabetes. *Inst. Nac. Estad. y Geogr.* 18 (2013).
5. Méndez-Durán, A. *et al.* Panorama epidemiológico de la insuficiencia renal crónica en el segundo nivel de atención del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Diálisis y Traspl.* **35**, 148–156 (2014).
6. Quiroga, B., Rodríguez-Palomares, J. R. & De Arriba, G. Insuficiencia renal crónica. *Rev. la Educ. Super.* **11**, 4860–4867 (2015).
7. Baxter Latinoamérica. Baxter México - Pacientes y Cuidadores - Renal - Trasplantes. Available at:
http://www.latinoamerica.baxter.com/mexico/pacientes_cuidadores/terapias/renal/trasplante.html.
8. Hipólito, J. & Cruz, M. Seguridad en el cuidado de enfermería al paciente con tratamiento de diálisis peritoneal. *Rev. Mex. Enferm. Cardiol.* **19**, 99–104 (2011).
9. Baxter Latinoamérica. Baxter México - Pacientes y Cuidadores - Renal - Diálisis Peritoneal. Available at:
http://www.latinoamerica.baxter.com/mexico/pacientes_cuidadores/terapias/renal/dialisis/dialisis_peritoneal.html.

-
-
10. Baroni, G., Schuinski, A., De Moraes, T. P., Meyer, F. & Pecoits-Filho, R. Inflammation and the peritoneal membrane: Causes and impact on structure and function during peritoneal dialysis. *Mediators Inflamm.* **2012**, (2012).
 11. Gensberger, S., Knabner, C., Waibel, R., Huppert, J. & Pischetsrieder, M. Qualitative Profiling of Polyglucose Degradation Products in Peritoneal Dialysis Fluids. *Anal. Chem.* **87**, 6103–6111 (2015).
 12. Witowski, J. *et al.* Effect of glucose degradation products on human peritoneal mesothelial cell function. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 729–739 (2000).
 13. Erixon, M. *et al.* Take care in how you store your PD fluids: Actual temperature determines the balance between reactive and non-reactive GDPs. *Perit. Dial. Int.* **25**, 583–590 (2005).
 14. Kjellstrand, P., Erixon, M., Wieslander, A., Linden, T. & Martinson, E. Temperature : the Single Most Important Factor for. *Perit. Dial. Int.* **24**, 385–391 (2004).
 15. Erixon, M. *et al.* PD fluids contain high concentrations of cytotoxic GDPs directly after sterilization. *Perit. Dial. Int.* **24**, 392–398 (2004).
 16. Hong, F., Bao, J., Hao, J., Yu, Q. & Liu, J. Methylglyoxal and Advanced Glycation End-Products Promote Cytokines Expression in Peritoneal Mesothelial Cells Via MAPK Signaling. *Am. J. Med. Sci.* **349**, 105–109 (2015).
 17. Leung, J. C. K. *et al.* Glucose degradation products downregulate ZO-1 expression in human peritoneal mesothelial cells: the role of VEGF. *Nephrol. Dial. Transplant* **20**, 1336–49 (2005).

-
-
18. Lai, K. N. *et al.* Differential expression of receptors for advanced glycation end-products in peritoneal mesothelial cells exposed to glucose degradation products. *Clin. Exp. Immunol.* **138**, 466–475 (2004).
 19. More, K. L. & Agur, A. M. R. *Fundamentos de anatomía: con orientación clínica - Keith L. Moore, Anne M. R. Agur - Google Books.* (2003).
 20. Mutsaers, S. E. The mesothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 9–16 (2004).
 21. Retana, C. *et al.* Retinoic acid improves morphology of cultured peritoneal mesothelial cells from patients undergoing dialysis. *PLoS One* **8**, 1–13 (2013).
 22. Mutsaers, S. E. *et al.* Mesothelial cells in tissue repair and fibrosis. *Front. Pharmacol.* **6**, 1–12 (2015).
 23. Pollard, T. D. (Thomas D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J. & Johnson, G. T. *Cell biology.* (Saunders/Elsevier, 2008).
 24. Retana, C. *et al.* Alterations of Intercellular Junctions in Peritoneal Mesothelial Cells from Patients Undergoing Dialysis: Effect of Retinoic Acid. *Perit Dial Int* **35**, 275–287 (2014).
 25. López-Cabrera, M. Mesenchymal Conversion of Mesothelial Cells Is a Key Event in the Pathophysiology of the Peritoneum during Peritoneal Dialysis. *Adv. Med.* **2014**, 1–17 (2014).
 26. Țăranu, T. *et al.* Morphological changes of the peritoneal membrane in patients with long-term dialysis. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **55**, 927–932 (2014).

-
-
27. Yanez-Mo, M. *et al.* Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N. Engl. J. Med.* **348**, 403–413 (2003).
 28. Aroeira, L. S. *et al.* Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J. Am. Soc. Nephrol.* **18**, 2004–13 (2007).
 29. Williams, J. D. *et al.* Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 470–479 (2002).
 30. Diaz-Buxo, J. a. Peritoneal dialysis prescriptions for diabetic patients. *Adv. Perit. Dial.* **15**, 91–95 (1999).
 31. Mizumasa, T. *et al.* Diabetes influences peritoneal morphology in uremic patients at the initiation of peritoneal dialysis. *Perit. Dial. Int.* **33**, 175–181 (2013).
 32. Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**, 669–676 (2003).
 33. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* **25**, 581–611 (2004).
 34. Lal, B. K., Varma, S., Pappas, P. J., Hobson, R. W. & Durán, W. N. VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvasc. Res.* **62**, 252–62 (2001).
 35. Moriya, J. & Ferrara, N. Inhibiting the response to VEGF in diabetes. *Sci. Signal.* **7**, pe1 (2014).

-
-
36. Russo, L. M., Del Re, E., Brown, D. & Lin, H. Y. Evidence for a role of transforming growth factor (TGF)- β 1 in the induction of postglomerular albuminuria in diabetic nephropathy: Amelioration by soluble TGF- β type II receptor. *Diabetes* **56**, 380–388 (2007).
 37. Selgas, R., Peso, G., Bajo, M. A., Cirugeda, A. & Álvarez, J. A. S. V. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Su papel en la fisiopatología peritoneal. **XXI**, 423–425 (2015).
 38. Macías Ramírez, B. A. Evaluación del efecto del ácido retinoico sobre la expresión y secreción de VEGF en las células mesoteliales del peritoneo de pacientes en diálisis. (CINVESTAV, 2014).
 39. Stylianou, E., Jenner, L. a, Davies, M., Coles, G. a & Williams, J. D. Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* **37**, 1563–1570 (1990).
 40. Pérez-Lozano, M. L. *et al.* Functional Relevance of the Switch of VEGF Receptors/Co-Receptors during Peritoneal Dialysis-Induced Mesothelial to Mesenchymal Transition. *PLoS One* **8**, (2013).
 41. Signaling, V. M. Methylglyoxal and Advanced Glycation End-Products Promote Cytokines Expression in Peritoneal Mesothelial Cells. **349**, 105–109 (2015).
 42. Vega, S. *et al.* Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. 1131–1143 (2004). doi:10.1101/gad.294104.2002
 43. Schutte, B. *et al.* Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp. Cell Res.* **297**, 11–26 (2004).
 44. Takegoshi, K., Okada, E. & Su, Q. Hepatocellular carcinoma and type 2 diabetes mellitus: cytokeratin 8/18 expression in hepatocellular carcinoma and glycogen-storing hepatocytes. *Hepatoma Res.* **2**, 229 (2016).

45. Selgas, R. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell - Its role in the response of the peritoneum to dialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **21**, 2–7 (2006).
46. Debray-García, Y. *et al.* Diabetes and exposure to peritoneal dialysis solutions alter tight junction proteins and glucose transporters of rat peritoneal mesothelial cells. *Life Sci.* **161**, 78–89 (2016).
47. Li, Y., Liu, L., Ma, T., Wang, P. & Xue, Y. Effect of caveolin-1 on the expression of tight junction-associated proteins in rat glioma-derived microvascular endothelial cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 13067–13074 (2015).
48. González Mateos, G. T. Caracterización y modulación de la inflamación peritoneal para limitar la fibrosis causada por el líquido de diálisis : modelo en ratón. (Universidad Complutense de Madrid, 2011).

El jurado designado por el Departamento de Farmacología, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, aprueba la Tesis de Maestría titulada: “Efecto de metilglioxal y de 5-hidroximetil-furfural en la producción del factor de crecimiento endotelial vascular en células peritoneales de pacientes en diálisis”.

Que presenta la I.B.I. Marlenne Terán Maldonado para su examen final de Maestría en Ciencias en la especialidad de Farmacología, el día 5 de diciembre del 2016.

José Luis Reyes Sánchez

Francisco Javier Camacho Arroyo

María Eugenia Mendoza Garrido