



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Efecto del ácido retinoico en la morfología y función de  
las células mesoteliales de pacientes en diálisis  
peritoneal**

**T E S I S**

Que presenta

**MARÍA DEL CARMEN RETANA CONTRERAS**

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

**Director de Tesis: DR. JOSÉ LUIS REYES SÁNCHEZ**

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional en el Departamento de Farmacología y en el Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias bajo la tutoría del Dr. José Luis Reyes Sánchez, con apoyo del CONACYT a la M. en C. María del Carmen Retana Contreras, a través de la beca con No. de registro: 176602.

## **DEDICATORIAS**

A ti Dios que me diste la oportunidad de vivir y de regalarme una familia maravillosa.

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento

### **A MIS PADRES**

**José Ascención** Retana Morales y **María del Carmen** Contreras Santillán

### **A MIS HERMANOS**

Daniel, Eduardo y Montserrat

## AGRADECIMIENTOS

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por haberme favorecido con una beca, que me sirvió de apoyo durante la realización de este proyecto de doctorado, un gran agradecimiento.

**Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional** por concederme la oportunidad de estudiar en su programa de postgrado, un gran agradecimiento.

**Al Dr. José Luis Reyes Sánchez** por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo durante todos estos años tanto en lo profesional como en lo personal, por su dirección en el trabajo científico, por su paciencia, por su amistad y por la confianza que me brindo, por el gusto de trabajar con usted, por su colaboración, sus conocimientos, su enseñanza y por guiarme en la formación como investigador. Por todo lo que ahora me llevó para continuar una nueva etapa, con todo mi afecto le doy muchas gracias doctor.

**A mis sinodales la Dra. María Estela Meléndez Camargo, la Dra. María Eugenia Mendoza Garrido, la Dra. Liliana Favari Perozzi y el Dr. Benjamín Florán Garduño** por todo su apoyo, su comprensión, su paciencia y sus valiosos consejos para la realización de esta tesis. A todos ustedes con afecto les doy las gracias.

**Al Dr. Víctor Manuel Pérez** por todo su apoyo como profesor y como persona durante la maestría y parte del doctorado, con mucho cariño gracias.

**A los auxiliares de investigación Elsa Sánchez, Dolores Martín, María del Carmen Namorado y Rafael Rodríguez** por enseñarme el manejo y cuidado de los cultivos celulares, por la enseñanza y el apoyo en las técnicas de inmunofluorescencia y de Western blot, por enseñarme el manejo de los equipos, pero sobre todo por sus consejos, su cariño, su paciencia, su apoyo moral y su compromiso con el trabajo, pero sobre todo por su amistad y por haberme dado una estancia feliz en el laboratorio y por haber contribuido en mi formación, por eso muchas gracias a todos ustedes.

**A los Doctores Alejandro Pérez y Manolo Ramos** por su valiosa amistad, por sus conocimientos, sus consejos, su aportación en las muestras del peritoneo y de las bolsas de diálisis y por su participación en la realización de este proyecto mil gracias.

**A mis compañeros y amigos del laboratorio Laura Arreola, Julieta Ortiz, Lizette Aura Portillo, Avendaño Mitzi, Luz Elba, Josué Arturo Velázquez, Eduardo Molina, Yazmín Debray, Ruth Rincón, Pablo Bautista, Brenda Abigail, Brenda Ivonne, Marisol, Arturo Vinicio, Armando Sandoval, Gerardo Sierra, Mayte, Fabiola, Luz del Carmen, Mirella Mosqueda, Marlene y Alejandra** por su amistad, por las risas, por los momentos graciosos, por sus consejos y enseñanzas, por su apoyo moral y técnico, por las palabras de aliento, por su confianza, por su compañía, por escucharme, por su ayuda, por su cariño y por haber hecho mi estancia en el laboratorio una experiencia maravillosa, a todos ustedes de corazón les doy muchas gracias.

**A mis amigos de generación Evelin Robles, Marina Galicia, Ana Cruz, Refugio Cruz, Carla Angulo, Germán González, Neida Mita y Ricardo Hernández** gracias por su amistad y por formar parte de esta experiencia.

**A mis amigas(os) Sandra Venegas, Luz Reséndiz, Dalia Vázquez, Berenice Yenicet, Virginia Gómez, Ana Maya, Mario Pérez, Genaro Velásquez y Mary Chuy Dimas** por su amistad y apoyo moral durante todos estos años.

**A Rosy y Esther Vargas** por su valiosa amistad, sus consejos, las palabras de aliento y por su apoyo en la impresión de la tesis y en los trámites administrativos, sinceramente muchas gracias.

**Al grupo de laboratorios centrales Sirenia González, Lourdes y José** por su apoyo en la microscopía electrónica de barrido, por su amistad, por su paciencia, por sus consejos y por hacerme sentir como en mi propio laboratorio muchas gracias.

**A las enfermeras Juana Cortes, Concepción García, María Escudero y Yolanda Calva** por su participación en la selección de los pacientes y en la obtención de las bolsas de diálisis, por ser unas personas comprometidas con su trabajo, por haberme brindado su apoyo, su amistad y cariño, mil gracias a todas ustedes.

**A los Doctores Nicolás Corona, Armando Cruz, Socorro Vital, Carmen Cruz, Jesús Lagunas, Dora Aguilar, Verónica Sánchez y Karina Georgina Mendoza** por su apoyo en la obtención de las muestras de diálisis y de las muestras del peritoneo, por facilitarnos los datos clínicos de los pacientes y por compartir su experiencia y conocimientos en el área clínica, a todos ustedes gracias.

**A todos los que no he mencionado** muchas gracias.

## RESUMEN

La diálisis peritoneal es una alternativa terapéutica para pacientes con insuficiencia renal, los cuales de acuerdo a sus características de permeabilidad del peritoneo se clasifican en: transportador bajo (TB, tienen baja permeabilidad a solutos) o transportador alto (TA, tienen alta permeabilidad a solutos). Los factores que determinan el tipo de transporte peritoneal de un paciente dado son diversos y poco estudiados. El peritoneo está constituido por una monocapa de células mesoteliales que participa en el transporte de solutos y de agua durante la diálisis peritoneal. La exposición crónica de las células mesoteliales a las soluciones de diálisis, causa alteraciones morfológicas y daño en sus uniones intercelulares, alterando sus propiedades de transporte de agua y de solutos. El ácido todo *trans* retinoico (ATTR), es un metabolito de la vitamina A, el cual juega un papel importante en la formación de la unión estrecha (UE) en células epiteliales y en la adquisición de un fenotipo epitelial en células mesoteliales. Por lo tanto, se estudiaron las características morfológicas y la distribución y función de las proteínas de la UE, en los cultivos de las células mesoteliales del peritoneo humano (CMPH) de pacientes con TB o TA, y su respuesta al ATTR.

Las células control se aislaron de las biopsias del peritoneo de pacientes no urémicos a los que se les practicó una cirugía abdominal. Las células de los TB y de los TA se obtuvieron del efluente de diálisis de pacientes dializados con soluciones al 1.5 o al 2.5% de glucosa. Los experimentos se realizaron con cultivos en pase 3, los cuales se cultivaron con medio D-MEM/F12 más ATTR (0, 50, 100 ó 200 nM) hasta alcanzar confluencia. Una vez confluentes las células, se estudiaron los cilios y las microvellosidades por microscopía electrónica de barrido; los marcadores de tipo epitelial (la citoqueratina-18) y mesenquimal (la vimentina y la  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -AML)) por inmunofluorescencia y por Western blot; la expresión del factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (FCT- $\beta$ 1) por Western blot; la permeabilidad de las monocapas celulares por medio de la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET); la distribución y la expresión de las proteínas de la UE (las claudinas -1, -2 y -8, la ocludina y la ZO-1) por inmunofluorescencia y por Western blot, y el flujo de dextran-FITC aniónico de 10 y 70 kDa.

Los cultivos de los TB y de los TA exhibieron células hipertróficas, con desorganización en sus filamentos intermedios de citoqueratina-18 y de vimentina, y marca positiva para la  $\alpha$ -AML. La expresión de la vimentina, la  $\alpha$ -AML y del FCT- $\beta$ 1 estuvieron significativamente aumentadas, en los TB. Los cultivos de los TB y los TA mostraron una reducción en el número de las células ciliadas. Las células de los TA exhibieron una reducción importante en el número y tamaño de sus microvellosidades. El tratamiento con ATTR redujo la presencia de células hipertróficas en el TB, mejoró la organización de los filamentos de citoqueratina-18 y vimentina en el TB y en el TA, disminuyó la expresión de la vimentina, la  $\alpha$ -AML y del FCT- $\beta$ 1 en el TB, aumentó el número de células ciliadas en el TB y en el TA, y aumentó el tamaño del cilio en el TA. La RET de las monocapas de los TA fue baja con respecto a la RET del grupo control y del TB. Las monocapas de los TB y de los TA fueron menos permeables a los dextrans-FITC de 10 y de 70 kDa, comparados con el grupo control. En el TB y TA, la fluorescencia para la claudina-1, la ocludina y la ZO-1, fue débil y discontinua a lo largo del borde celular, y la expresión de estas proteínas estuvo disminuida. Por primera vez se evaluó la expresión de la claudina-2 y -8 en CMPH. La claudina-2 en todos los grupos se localizó en el núcleo, mientras que la claudina-8 se observó en el borde celular y en el núcleo. En los cultivos de TB y TA, la marca para la claudina-8 fue débil y discontinua. El tratamiento con ATTR ayudó a la relocalización de las proteínas de la UE en el borde celular, en el TB y en el TA; aumentó la expresión de las proteínas de la UE, en el TA; disminuyó la RET del grupo control y del TA, mientras que en el TB no tuvo efecto, y disminuyó la permeabilidad para aniones, en el TA.

Las células mesoteliales de los pacientes con TB o TA tienen alteraciones morfológicas y funcionales, que podrían estar asociadas con el tipo de transporte peritoneal. En adición, las células de los TB y de los TA tuvieron una respuesta diferencial al tratamiento con ATTR. Este retinoide puede ser una alternativa terapéutica para mantener la integridad del mesotelio en pacientes en diálisis peritoneal, ya que ayudó a preservar la morfología epitelial; disminuyó la expresión de marcadores mesenquimales; disminuyó la expresión del FCT- $\beta$ 1; indujo ciliogénesis y mejoró la localización de las proteínas de la UE en el borde

celular. Todos estos efectos están a favor de prolongar la función mesotelial y por lo tanto, la integridad del peritoneo.

## **ABSTRACT**

Peritoneal dialysis is a therapeutic alternative for patients with renal insufficiency in terminal stage, whom according to the characteristics of peritoneum permeability are classified as low transporter (LT, low solute permeability) or high transporter (HT, high solute permeability). Factors that determine the differences in permeability between them have not been fully disclosed. Peritoneum is lined by a monolayer of mesothelial cells which participates in fluid and solute transport during peritoneal dialysis. Chronic exposure to dialysis solutions causes changes in the morphology and the tight junction (TJ) proteins of the peritoneal mesothelial cells, altering their properties of water and solute transport. All trans retinoic acid (ATRA) is a metabolite of vitamin A that plays an important role in the formation of TJ in epithelial cells and in the acquisition of an epithelial phenotype in mesothelial cells. We studied the morphological features and the distribution and function of the TJ proteins in human peritoneal mesothelial cells (HPMCs) cultures from LT or HT and their response to ATRA.

Control cells were isolated from peritoneal biopsies from non-uremic patients, undergoing abdominal surgery. LT and HT cells were obtained from dialysis effluent from continuous ambulatory peritoneal dialysis patients, receiving glucose-based dialysis solutions at 1.5 or 2.5 %. Cells in passage 3 were cultured in media containing ATRA (0, 50, 100 or 200 nM). We studied microvilli and cilia by scanning electron microscopy; epithelial (cytokeratin-18) and mesenchymal (vimentin and  $\alpha$ -smooth muscle actin) transition markers by immunofluorescence and Western blot; transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) expression by Western blot; the permeability by measuring the transepithelial electrical resistance (TER); the TJ proteins (claudin-1,-2 y -8, occludin and ZO-1) distribution and expression by immunofluorescence and Western blot; and the permeability to anionic dextran-FITC (10 and 70 kDa).



LT and HT exhibited hypertrophic cells, cytokeratin-18 and vimentin disorganization and positive  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) label. Vimentin,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$ 1 were overexpressed in LT. Ciliated cells were reduced in LT and HT. Microvilli number and length were severely diminished in HT. ATRA reduced hypertrophic cells number in LT. It also improved cytokeratin-18 and vimentin organization, reduced vimentin and  $\alpha$ -SMA expression. In LT, ATRA reduced TGF- $\beta$ 1 expression, and augmented the percentage of ciliated cells in LT and HT. It also augmented cilia length in HT. HT exhibited lower TER than control and LT monolayers. Both LT and HT were less permeable to anionic dextran-FITC compared to control. Immunofluorescence for TJ (claudin 1, occludin and ZO-1) was weak and discontinuous along the cell contour, in LT and HT. Furthermore, claudin- 1, occludin and ZO-1 expressions were decreased. For the first time claudin-2 and -8 were studied in HPMC. Claudin-2 was observed at nucleus in all groups while claudin-8 was located at the cell border and at nuclei. In both LT and HT, claudin-8 label at the cell contour was weak and discontinuous. ATRA improved TJ proteins distribution and their expression in HT. ATRA decreased TER in HT, but had no effect in LT, and it diminished the permeability to anions in HT.

HPMCs from LT and HT exhibited morphological and structural alterations that might be associated with differences in the transport of solutes and water in these patients. They also depicted a differential response to ATRA treatment. ATRA might be a therapeutic alternative to maintain the mesothelial integrity in dialysis patients, since ATRA improved morphology, decreased the expression of mesenchymal markers, decreased TGF- $\beta$ 1 expression, induced ciliogenesis and improved TJ localization at the cell border. All these effects are in favor of prolonging an adequate mesothelial function. Therefore ATRA might have a beneficial effect on the peritoneal integrity.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Membrana peritoneal. ....	22
Figura 2. Uniones intercelulares.....	27
Figura 3. Representación esquemática de la organización de los componentes de la UE .....	28
Figura 4. Subunidades estructurales de la molécula del ATTR.....	41
Figura 5. Morfología de las células mesoteliales en cultivo de pacientes con TB o TA tratados con el ATTR. ....	58
Figura 6. Disminución del número de células hipertróficas en los cultivos de TB tratados con el ATTR .....	59
Figura 7. Cuantificación del número de células en los cultivos de los TB y los TA a diferentes días de cultivo.....	60
Figura 8. Expresión del FCT- $\beta$ 1 en células mesoteliales de TB y de TA.....	61
Figura 9. Expresión del FCT- $\beta$ 1 en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con el ATTR .....	62
Figura 10. Distribución de los filamentos de citoqueratina-18 en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con ATTR.....	63
Figura 11. Expresión de la citoqueratina-18 en cultivos de células mesoteliales de TB y TA tratados con ATTR. ....	64
Figura 12. Organización de los filamentos de vimentina en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con ATTR.....	65
Figura 13. Expresión de vimentina en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con ATTR.....	66
Figura 14. Análisis por inmunofluorescencia de $\alpha$ -AML en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratadas con ATTR.....	67
Figura 15. Expresión de la $\alpha$ -AML en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con ATTR.....	68
Figura 16. Morfología del cilio en células mesoteliales de pacientes en diálisis con TB o TA .....	69
Figura 17. Alteraciones en la morfología del cilio en células mesoteliales de TA. ....	70
Figura 18. MEB del cilio de células mesoteliales control, TB y TA tratadas con el ATTR.....	71

Figura 19. Tamaño del cilio en cultivos de células mesoteliales de TB o TA tratados con el ATTR .....	72
Figura 20. Inmunofluorescencia para $\alpha$ -tubulina acetilada en células mesoteliales de TB y de TA tratadas con el ATTR.....	73
Figura 21. Porcentaje de células ciliadas en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con ATTR.....	74
Figura 22. Morfología de las microvellosidades en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA .....	75
Figura 23. Tamaño y número de microvellosidades en células mesoteliales de TB y TA.....	76
Figura 24. El ATTR aumentó el número de microvellosidades en las células control. ....	77
Figura 25. El ATTR aumentó el tamaño de las microvellosidades en las células de los TB. ....	77
Figura 26. Efecto del ATTR en el número de microvellosidades en células mesoteliales de TA y TB .....	78
Figura 27. Efecto del ATTR en el tamaño de las microvellosidades en células mesoteliales de TB y TA .....	79
Figura 28. Distribución de la claudina-1 en células mesoteliales de TB y de TA tratadas con ATTR .....	80
Figura 29. Expresión de la claudina-1 en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con ATTR.....	81
Figura 30. Distribución de la ocludina en células mesoteliales de TB y TA tratadas con ATTR. ....	83
Figura 31. Expresión de la ocludina en células mesoteliales de TB y TA tratadas con ATTR. ....	84
Figura 32. Distribución de la ZO-1 en cultivos de células mesoteliales de TB y TA tratados con ATTR .....	85
Figura 33. Expresión de la ZO-1 en cultivos de células mesoteliales de TB o de TA tratados con ATTR. ....	86
Figura 34. Localización de la claudina-2 en cultivos de células mesoteliales de TB y tratados con ATTR.. ....	87
Figura 35. Expresión de la claudina-2 en cultivos de células mesoteliales de TB y TA tratados con ATTR.....	88

Figura 36. Distribución de la claudina-8 en cultivos de células mesoteliales tratadas con ATTR.....	89
Figura 37. Expresión de la claudina-8 en cultivos de células mesoteliales de TB y TA tratados con ATTR.....	90
Figura 38. Resistencia eléctrica transepitelial de monocapas de células mesoteliales de control, TB y TA.....	91
Figura 39. Resistencia eléctrica transepitelial en monocapas de células mesoteliales control, TB y TA tratadas con ATTR.....	92
Figura 40. Comparación del coeficiente de permeabilidad del soluto (CPS) entre células control, TB y TA.....	93
Figura 41. Coeficiente de permeabilidad del soluto (CPS) en células control, TB y TA tratadas con ATTR.....	94

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características clínicas de los transportadores bajos y de los Transportadores altos .....	56
---	----

## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>-AML</b>	$\alpha$ -actina del músculo liso
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATTR</b>	Ácido todo trans retinoico
<b>Caco-2</b>	Línea celular de cáncer de colon
<b>CMPH</b>	Células mesoteliales del peritoneo humano
<b>CPS</b>	Coeficiente de permeabilidad del soluto
<b>CRABP</b>	Proteína fijadora del ácido retinoico
<b>CRBP</b>	Proteína fijadora del retinol celular tipo II
<b>CYP</b>	Citocromo P450
<b>DPA</b>	Diálisis peritoneal automatizada
<b>DPAC</b>	Diálisis peritoneal ambulatoria continua
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FABP</b>	Proteína fijadora de ácidos grasos
<b>FCT-<math>\beta</math>1</b>	Factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1
<b>HEPES</b>	Ácido 4 - (2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante
<b>IgGs</b>	Inmunoglobulinas
<b>IMSS</b>	Instituto Mexicano del Seguro Social
<b>ISSSTE</b>	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
<b>MAPK</b>	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
<b>MBL</b>	Amortiguador de lisis para la fracción citosólica
<b>MDCK</b>	Madin Darby canine Kidney, línea celular de epitelio de riñón canino Madin-Darby
<b>MEB</b>	Microscopia electrónica de barrido
<b>MCF-7</b>	Línea celular de adenocarcinoma de mama humano
<b>MMP</b>	Metaloproteinasas
<b>NF-KB</b>	Factor nuclear kappa-beta
<b>NTCP</b>	Cotransportador sodio/ ácido biliar
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos
<b>PKC</b>	Proteína cinasa C
<b>PMSF</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PPAR</b>	Receptor nuclear activado por el proliferador de peroxisomas
<b>PVDF</b>	Membranas de fluoruro de polivinilideno
<b>RADH</b>	Retinaldehído deshidrogenasa
<b>RAR</b>	Receptores para ácido retinoico
<b>RARE</b>	Elementos de respuesta para el ácido retinoico
<b>RBP</b>	Proteína fijadora del retinol

<b>RDH</b>	Retinol deshidrogenasa
<b>RET</b>	Resistencia eléctrica transepitelial
<b>RIPA</b>	Ensayo de radio inmuno precipitación para la fracción membranal
<b>RXR</b>	Receptores para retinoides X
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>TA</b>	Transportador alto
<b>TB</b>	Transportador bajo
<b>TEM</b>	Transición epitelio-mesénquima
<b>UE</b>	Unión estrecha
<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana

## ÍNDICE GENERAL

### RESUMEN

### ABSTRACT

### ÍNDICE DE FIGURAS

### ÍNDICE DE TABLAS

### ABREVIATURAS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1 Diálisis peritoneal</b> .....	<b>19</b>
1.1.1 Diálisis peritoneal ambulatoria continua (DPAC). .....	19
1.1.2 Diálisis peritoneal automatizada (DPA).....	19
<b>1.2 Mecanismo de transporte de solutos y de agua en la diálisis peritoneal</b>	<b>19</b>
1.2.1 Difusión:.....	20
1.2.2 Convección: .....	20
1.2.3 Ultrafiltración .....	20
<b>1.3 Clasificación de los pacientes en la diálisis peritoneal</b> .....	<b>20</b>
1.3.1 Transportador alto (TA).....	20
1.3.2 Transportador bajo (TB).....	21
1.3.3 Promedio alto y bajo .....	21
<b>1.4 Peritoneo</b> .....	<b>21</b>
<b>1.5 Células mesoteliales</b> .....	<b>22</b>
<b>1.6 Transición epitelio-mesénquima (TEM)</b> .....	<b>24</b>
<b>1.7 Función de las células mesoteliales</b> .....	<b>25</b>
<b>1.8 Transporte transepitelial</b> .....	<b>26</b>
<b>1.9 Proteínas de la UE</b> .....	<b>27</b>
1.9.1 Claudinas .....	28
1.9.2 Ocludina.....	30
1.9.3 ZO-1, ZO-2 y ZO-3.....	31
1.9.4 Claudina-2 .....	31
1.9.5 Claudina 8.....	32
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>34</b>
<b>2.1 Efectos de la diálisis peritoneal en las CMPH</b> .....	<b>34</b>
<b>2.2 Vitamina A (retinol)</b> .....	<b>36</b>

<b>2.3 Metabolismo de los retinoides .....</b>	<b>36</b>
2.3.1 Metabolismo hepático de los retinoides .....	37
2.3.2 Retinoides y tejidos blanco .....	38
<b>2.4 Vía de señalización del ácido retinoico .....</b>	<b>39</b>
2.4.1 Vías de señalización no genómicas de los retinoides.....	40
<b>2.5 Ácido todo trans retinoico (ATTR).....</b>	<b>41</b>
2.5.1 Estructura molecular .....	41
2.5.2 El ATTR como un agente protector de las CMPH .....	41
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>44</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>45</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
5.1 Objetivos generales .....	45
5.2 Objetivos particulares.....	46
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
6.1 Material biológico.....	47
6.2 Reactivos .....	47
6.3 Anticuerpos .....	47
6.4 Equipo .....	48
6.5 Aislamiento y cultivo de las células .....	48
6.5.1 Obtención de las células a partir de la biopsia.....	48
6.5.2 Obtención de células a partir del efluente de diálisis .....	49
6.6 Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	49
6.6.1 Evaluación de las imágenes por MEB .....	50
6.7 Determinación de la proliferación celular .....	50
6.8 Inmunofluorescencia .....	51
6.8.1 Cuantificación de las células ciliadas por inmunofluorescencia .....	51
6.9 Western blot.....	52
6.9.1 Western blot para cuantificar la expresión de los marcadores de TEM y del FCT- $\beta$ 1 .....	52
6.9.2 Western blot para cuantificar las proteínas de la UE .....	52
6.10 Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET).....	53
6.11 Flujo de dextran-FITC.....	53
<b>7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>55</b>
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>



8.1 Disminución del número de células hipertróficas en los cultivos de células mesoteliales de TB debido al ATTR.....	57
8.2 Proliferación celular en los cultivos de los TB y de los TA .....	60
8.3 Disminución de la expresión del FCT- $\beta$ 1 en los cultivos de TB debido al ATTR.....	61
8.4 Mejoramiento de la organización de los filamentos de citoqueratina-18 en cultivos de TB y TA debido al ATTR.....	63
8.5 Expresión de la citoqueratina-18 en los cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con el ATTR .....	64
8.6 Mejoramiento en la distribución de los filamentos de vimentina en las células de los TB y los TA debido al ATTR.....	65
8.7 Disminución en la expresión de vimentina en cultivos de TB y de TA por el ATTR.....	66
8.8 Disminución de la marca para la $\alpha$ -AML en cultivos de los TB y de los TA debido al ATTR .....	67
8.9 Disminución de la expresión de la $\alpha$ -AML en cultivos de los TB y de los TA debido al ATTR .....	68
8.10 La morfología del cilio se encuentra alterada en las células de los TA	69
8.11 Aumento del tamaño del cilio en células mesoteliales control y de TA por medio del ATTR .....	71
8.12 Aumento del número de células ciliadas en los cultivos de TB y de TA mediado por el ATTR .....	72
8.13 La morfología de las microvellosidades se encuentra alterada en las células de los TA.....	74
8.14 Reducción significativa en el número y tamaño de las microvellosidades de las células mesoteliales de los TA .....	75
8.15 Aumento en el número y en el tamaño de las microvellosidades de células mesoteliales control y de TB por medio del ATTR.....	76
8.16 Mejoramiento de la organización de la claudina-1 en el borde celular en el TB y en el TA por medio del ATTR.....	79
8.17 Aumento de la expresión de la claudina-1 en los cultivos de TA debido al ATTR.....	81
8.18 Mejoramiento de la organización de la ocludina en el borde celular de células mesoteliales de TB y TA mediado por el ATTR .....	82

8.19 Aumento de la expresión de la ocludina en células mesoteliales de TA tratadas con ATTR .....	83
8.20 Mejoramiento de la distribución de la ZO-1 en el borde celular de células mesoteliales de TB y TA por medio del ATTR .....	84
8.21 Aumento de la expresión de la ZO-1 en cultivos de células mesoteliales de TB y TA por el ATTR .....	86
8.22 Localización de la claudina-2 en cultivos de células mesoteliales control, TB y TA tratados con ATTR.....	87
8.23 Expresión de la claudina-2 en cultivos de células mesoteliales control, TB y TA tratados con ATTR.....	88
8.24 Mejoramiento de la distribución de la claudina-8 en el borde celular de células mesoteliales de TB y TA debido al ATTR.....	89
8.25 Expresión de la claudina-8 en cultivos de células mesoteliales control, TB y TA en presencia de ATTR .....	90
8.26 Resistencia eléctrica transepitelial de monocapas de células mesoteliales de pacientes con TB y TA .....	91
8.27 Disminución de la resistencia eléctrica transepitelial en monocapas de células mesoteliales control y de TB debido al ATTR .....	92
8.28 Determinación de la permeabilidad a aniones en monocapas de células mesoteliales control, TB y TA .....	93
8.29 Disminución de la permeabilidad de las monocapas al dextran, en el TA por el tratamiento con ATTR .....	94
9. DISCUSIÓN .....	95
10. CONCLUSIONES .....	118
11. CONCLUSIÓN GENERAL.....	119
12. PERSPECTIVAS.....	120
ANEXOS .....	135

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Diálisis peritoneal

La diálisis peritoneal es un tratamiento de reemplazo de la función renal. En este tratamiento, la membrana peritoneal funciona como un “dializador”. La diálisis peritoneal consiste en infundir una solución de diálisis dentro de la cavidad abdominal, la cual se deja un tiempo de permanencia y posteriormente se drena. Durante el tiempo de permanencia, se lleva a cabo el transporte de agua y solutos (urea, creatinina, potasio, sodio y glucosa, entre otros) desde los capilares peritoneales hacia el líquido de diálisis (que contiene sodio, cloro, lactato y una alta concentración de glucosa) a través del peritoneo estableciéndose un equilibrio entre el plasma y el líquido de diálisis (1). Según su forma de practicarse la diálisis se clasifica en aguda o crónica, la diálisis peritoneal aguda se realiza en el hospital de forma manual e intermitente, mientras que en la diálisis peritoneal crónica se realiza con alguno de los siguientes esquemas:

**1.1.1 Diálisis peritoneal ambulatoria continua (DPAC):** como su nombre lo indica, se realiza de forma ambulatoria en casa del paciente, y el abdomen permanece lleno durante las 24 horas del día. La DPAC es el tipo de diálisis peritoneal más utilizado, debido a su simplicidad. Es una técnica totalmente manual que no requiere del uso de una máquina. El tratamiento se realiza de forma continua efectuando cuatro cambios diarios de 1.5 a 3 L, con un tiempo de permanencia en la cavidad peritoneal de 5 h aproximadamente durante el día y de 9 h durante la noche (2,3).

**1.1.2 Diálisis peritoneal automatizada (DPA):** este tratamiento es realizado con la ayuda de una máquina que efectúa los cambios de líquido peritoneal de forma automática, y generalmente por la noche (2).

### 1.2 Mecanismo de transporte de solutos y de agua en la diálisis peritoneal

El transporte de solutos y de agua a través de la membrana peritoneal se lleva a cabo por tres mecanismos que son: difusión, convección y ultrafiltración.

**1.2.1 Difusión:** es el principal mecanismo por el que la diálisis peritoneal promueve la salida de solutos urémicos. Es un proceso espontáneo por el cual, dos soluciones separadas por una membrana semipermeable, tienden a alcanzar una concentración uniforme. En la diálisis peritoneal, las dos soluciones serían, la sangre de los capilares peritoneales y la solución de diálisis introducida en la cavidad peritoneal, haciendo de membrana semipermeable el propio peritoneo (1).

**1.2.2 Convección:** es el arrastre pasivo de solutos a través de la membrana peritoneal por el movimiento del agua y depende del coeficiente de permeabilidad de cada soluto (1).

**1.2.3 Ultrafiltración:** es el mecanismo por el cual la diálisis peritoneal retira agua y ocurre como resultado del gradiente osmótico que se genera entre la hipertonicidad de la solución de diálisis y la hipotonicidad de la sangre capilar. El agente osmótico más usado es la glucosa que se usa en soluciones al 1.5, 2.5 ó 4.5 %. La ultrafiltración es mayor al inicio del intercambio y menor conforme se igualan las concentraciones debido a la difusión de la glucosa contenida en la solución de diálisis hacia la sangre (1).

### **1.3 Clasificación de los pacientes en la diálisis peritoneal**

La prueba de equilibrio peritoneal es una herramienta simple y confiable, que permite determinar la velocidad con la cual, un paciente específico transporta solutos y agua, ya sea para remover moléculas indeseadas de la circulación (creatinina y urea), o para la absorción de glucosa (componente de la solución de diálisis, responsable de mantener el gradiente osmótico) desde la solución de diálisis hacia la sangre. Esta prueba permite clasificar a los pacientes en cuatro categorías: transportador alto, promedio alto, promedio bajo y transportador bajo (4,5).

**1.3.1 Transportador alto (TA):** en los TA, el transporte de toxinas urémicas y de solutos, desde el torrente sanguíneo hacia la solución de diálisis es rápido. Esto hace que estos pacientes tengan una depuración de solutos eficiente. Sin

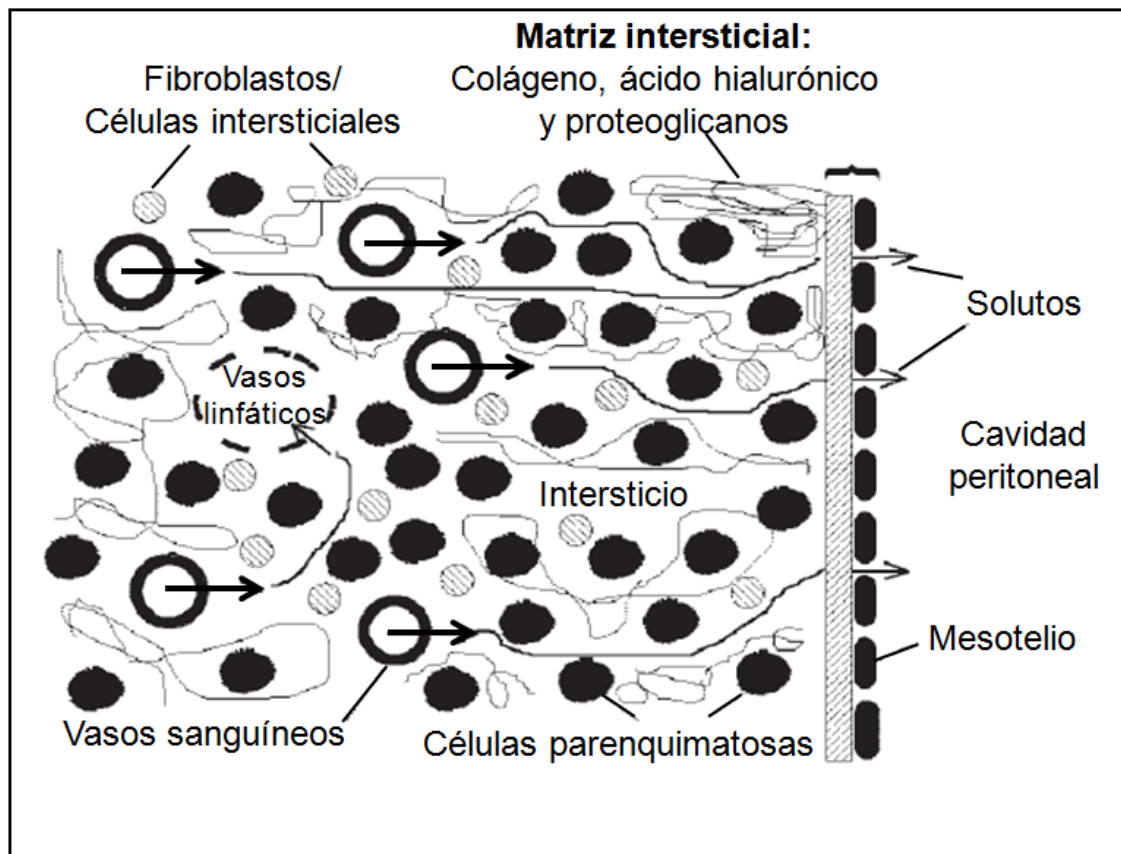
embargo, esta misma velocidad de transporte causa una rápida absorción de la glucosa, una pérdida temprana del gradiente osmótico y una mayor pérdida de proteínas en el dializado, lo cual resulta en una baja ultrafiltración, en una sobrecarga de fluidos y en valores bajos de albúmina sérica (1,5)

**1.3.2 Transportador bajo (TB):** en los TB, el transporte de solutos es bajo reflejando una baja permeabilidad de la membrana, por lo tanto, la depuración de solutos es baja. Sin embargo, esta baja capacidad de transporte permite mantener el gradiente osmótico por más tiempo, lo cual resulta en una ultrafiltración más eficiente y sostenida. En estos pacientes, la pérdida de proteínas es baja, resultando en una albúmina sérica elevada (1,5).

**1.3.3 Promedio alto y bajo:** en estos pacientes la depuración de solutos y la ultrafiltración son adecuadas.

#### **1.4 Peritoneo**

Es una membrana serosa que se divide en: peritoneo visceral y peritoneo parietal (1). El peritoneo visceral es el que recubre a los intestinos y otras vísceras y el peritoneo parietal es el que recubre las paredes de la cavidad abdominal. En el adulto cubre una superficie de aproximadamente 2 m<sup>2</sup> (6). La membrana peritoneal está compuesta por una monocapa de células mesoteliales que residen sobre una membrana basal. Subyacente a la membrana basal se encuentra el submesotelio constituido por tejido conectivo, células (fibroblastos, células parenquimatosas y células intersticiales), vasos sanguíneos y vasos capilares distribuidos dentro de una matriz intersticial rica en colágeno, ácido hialurónico y proteoglicanos (7), figura 1.



**Figura 1.** Membrana peritoneal. Imagen modificada (7).

### 1.5 Células mesoteliales

Las células mesoteliales son células de origen mesodérmico, que se desarrollan entre el octavo y el dieciochoavo días de gestación, dependiendo de la especie. En el humano, esto ocurre alrededor del catorceavo día (8). Las células mesoteliales son predominantemente aplanadas, tienen una apariencia escamosa con el citoplasma levantado en la región donde se encuentra el núcleo, el cual puede tener una forma redonda u oval, y tienen un diámetro de 25  $\mu\text{m}$  (8). Aunque las células mesoteliales se originan del mesodermo poseen características de células epiteliales tales como: un dominio apical y un dominio basolateral, descansan sobre una membrana basal y están unidas entre sí a través de uniones intercelulares (unión estrecha, unión comunicante, unión adherente y desmosomas)(8,9). Sobre su superficie las células mesoteliales poseen numerosas microvellosidades que tienen como función proteger a la célula de la

fricción a través de la captura de agua y exudados serosos que actúan como lubricantes, sensar el ambiente extracelular y capturar bacterias, previniendo así infecciones (6,10). Además de las microvellosidades, las células mesoteliales exhiben cilios sobre su superficie, los cuales son cinco veces más grande que las microvellosidades y están compuestos por microtúbulos que contienen  $\alpha$ -tubulina acetilada y  $\alpha$ -tubulina destirosinada (11). El cilio se encarga de sensar los cambios en la composición del fluido seroso y puede mediar una respuesta celular rápida gracias a su estrecha proximidad con orgánulos biosintéticos como el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi (12). En estados agudos de peritonitis, el cilio inicia la síntesis y la liberación de citocinas inflamatorias, este mecanismo de sensar y de responder es fundamental para la defensa del mesotelio contra infecciones peritoneales (12). El cilio de las células mesoteliales puede responder a la fricción causada por el flujo de fluido o por el contacto con células de otras membranas, provocando la liberación de segundos mensajeros, esta característica es crítica para detectar cambios en la fricción y prevenir daños en la membrana peritoneal a través del ajuste en la secreción de surfactantes (13,14). El cilio transduce la información química y mecánica a través de vías de señalización que dependen de fosforilación y de la liberación de calcio citosólico, estas señales estimulan la actividad biosintética de las células mesoteliales para dar una respuesta rápida (12). Las células mesoteliales expresan filamentos intermedios de vimentina, de desmina y de  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -AML), característicos de su origen mesodérmico (8,9) y también expresan filamentos intermedios de citoqueratina -7, -8, -18 y -19, los cuales son característicos de las células epiteliales (15,16). Los filamentos intermedios son redes continuas que se extienden desde la envoltura nuclear hacia componentes de la membrana plasmática llamados desmosomas y hemidesmosomas. A través de los desmosomas los filamentos intermedios transmiten fuerza mecánica de una célula a otra y a través de los hemidesmosomas, los filamentos intermedios transmiten fuerza mecánica a la matriz extracelular (17). La función de los filamentos intermedios es mantener la arquitectura de la célula y de proveerle soporte mecánico, especialmente para prevenir el estiramiento excesivo de la célula cuando es sometida a fuerzas físicas internas o externas, por ejemplo en las células de la piel y del músculo liso (17) .

## 1.6 Transición epitelio-mesénquima (TEM)

Las células mesoteliales pueden experimentar la TEM, el cual es un proceso biológico que participa en la reparación de los tejidos cuando hay daño, y en procesos patológicos como son: la fibrosis, la invasión de células tumorales y en la metástasis (18). La TEM es un proceso reversible y complejo, el cual requiere de la alteración de la arquitectura epitelial y de una reprogramación molecular. La TEM inicia con la disociación de las uniones intercelulares, por lo tanto, hay una regulación a la baja de la expresión de las moléculas de adhesión celular como son: claudinas, ocludina, la ZO-1, la E-cadherina y la desmoplaquina. La interrupción de las uniones intercelulares resulta en la pérdida de las microvellosidades y de la polaridad apical-basolateral. Entonces, las células adquieren una morfología elongada, aumentan la expresión de  $\alpha$ -AML y se incrementa su capacidad de migrar. En la última etapa de la TEM, las células adquieren la capacidad para degradar la membrana basal a través de la expresión de metaloproteinasas (MMP) (19). La TEM se acompaña de cambios moleculares como: la baja expresión de las citoqueratinas, la sobreexpresión de la vimentina, la N-cadherina, y el factor transcripcional *snail* (un inhibidor de la expresión de la E-cadherina), y un aumento en la producción de componentes de la matriz extracelular (19). La TEM es regulada por las citocinas, las MMP, los componentes de la matriz extracelular, los productos finales de glicosilación avanzada y por los factores de crecimiento, principalmente por el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (FCT- $\beta$ 1)(18,20). El FCT- $\beta$ 1 es un regulador de la proliferación celular, la diferenciación celular, la morfogénesis, la inflamación y de la formación de la matriz extracelular (21). Su principal efecto es la inhibición de la proliferación celular. Este factor es producido ubicuamente por las células normales y por las células transformadas (21). La familia del FCT- $\beta$ 1 está compuesta por cinco miembros, el FCT- $\beta$ 1, el FCT- $\beta$ 2 y el FCT- $\beta$ 3, los cuales se encuentran en mamíferos, y el FCT- $\beta$ 4 y el FCT- $\beta$ 5, que se encuentran en el pollo y en la rana africana *Xenopus laevis*, respectivamente (21). El FCT- $\beta$ 1 es una proteína que pesa 25 kDa y se encuentra expresada en todos los tejidos. Normalmente este factor se sintetiza y se secreta en su forma latente, en la cual, el FCT- $\beta$ 1 se encuentra unido electrostáticamente a un péptido llamado proteína asociada a latencia. En su forma latente, el FCT- $\beta$ 1 es incapaz de interactuar con



su receptor (21). La forma activa del FCT- $\beta$ 1 se genera cuando el FCT- $\beta$ 1 se libera del péptido asociado a latencia por una ruptura proteolítica mediada por la trombospondina, la plasmina, la catepsina D, la furina o por las glicosidasas cuando son expuestas a un pH ácido, por ejemplo en los líquidos de diálisis (22). En la diálisis peritoneal, la síntesis del FCT- $\beta$ 1 puede ser inducida por la glucosa, por las infecciones a través de la síntesis de interleucina-1 y de otras citocinas proinflamatorias, por el pH ácido de las soluciones de diálisis, por los productos de degradación de la glucosa y por los productos avanzados de glicosilación (22). El FCT- $\beta$ 1 es un agente profibrótico en varios tejidos y órganos (23). El FCT- $\beta$ 1 activa varias vías de señalización que participan en la TEM, estas vías incluyen: la vía de las Smads, la vía de la RhoA-p160ROCK, la vía H-Ras/Raf/ERK y la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos p38 (p38MAP cinasa) (22). La activación de estas vías de señalización resultan en: la sobreexpresión de snail (24), la expresión de la MMP-9, la cual aumenta la producción de componentes de la matriz extracelular (colágeno I, III y IV, y fibronectina) (25) y la adquisición de un fenotipo elongado, lo cual le permite a la célula migrar hacia el área submesotelial (22).

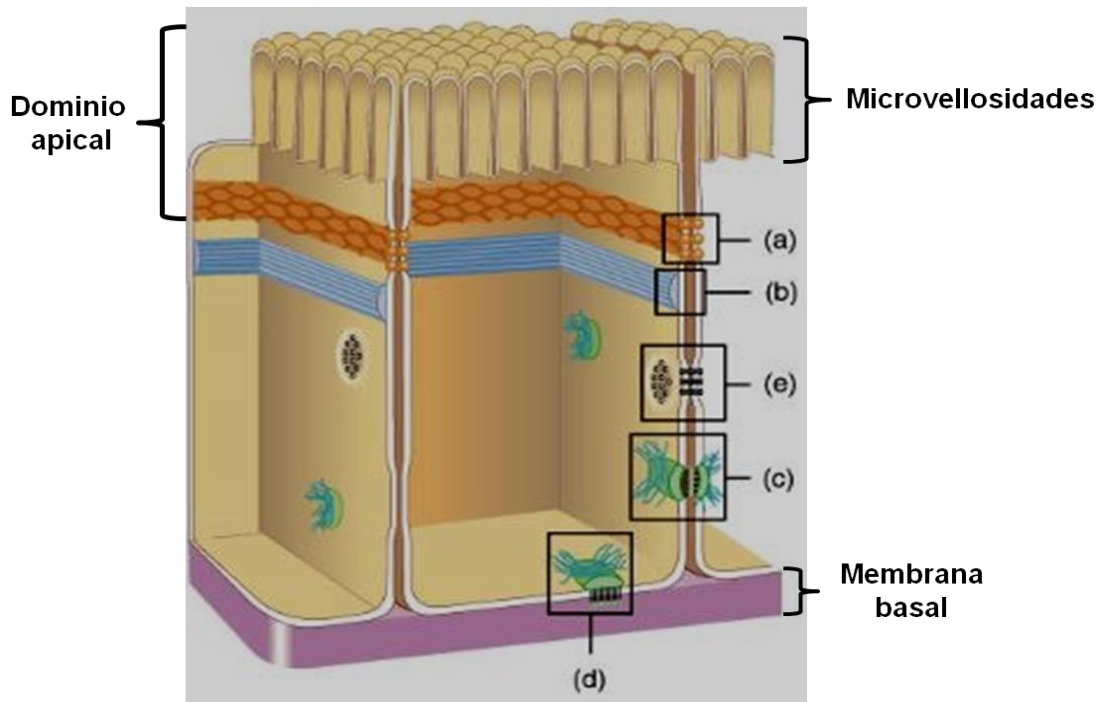
### **1.7 Función de las células mesoteliales**

La principal función de las células mesoteliales es preservar la homeostasis del peritoneo. Bajo condiciones fisiológicas, las células mesoteliales secretan glucosaminoglicanos (ácido hialurónico), proteoglicanos (decorina y perlecano) y fosfolípidos, como fosfatidilcolina, que constituyen un glicocálix alrededor de las células, el cual provee una barrera protectora contra la abrasión y una superficie no adhesiva para el movimiento intracelómico (10). Las células mesoteliales además, participan en la inducción y en la resolución de la inflamación peritoneal a través de su habilidad para sintetizar una plétora de citocinas (interferón  $\gamma$ , interleucina-1 $\beta$ , -6 y -15), quimiocinas (interleucina-8 y RANTES, del inglés regulated on activation normal T cell expressed and secreted), y factores de crecimiento (el FCT- $\beta$ 1, el factor de crecimiento básico de fibroblastos, el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento de hepatocitos) que son secretados dentro de la cavidad peritoneal (10). Las células mesoteliales sintetizan proteínas de la matriz extracelular como: colágeno I, III, IV y V,

fibronectina, laminina, ácido hialurónico y proteoglicanos, que son depositadas dentro de la lámina basal, proporcionando el soporte estructural y el mantenimiento de la arquitectura de la membrana peritoneal. Otra función de las células mesoteliales es facilitar el transporte de solutos y de fluidos a través de la membrana peritoneal (10). El mesotelio como barrera biológica opone poca resistencia al paso de moléculas, sin embargo, la presencia de abundantes sitios aniónicos y de uniones intercelulares le permiten al mesotelio actuar como una barrera selectiva para el paso de solutos y de moléculas (6,10).

### **1.8 Transporte transepitelial**

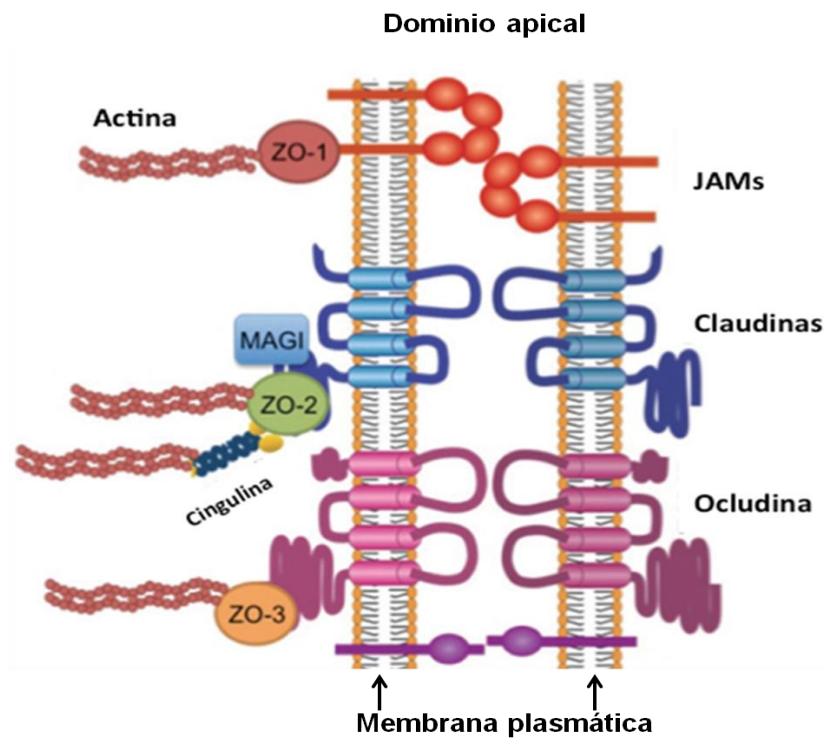
El transporte transepitelial ocurre a través de dos vías que son: la transcelular y la paracelular. El transporte transcelular se da a través de la célula y depende de la presencia de bombas, canales iónicos y acarreadores transmembranales localizados en la membrana apical y basolateral de la célula. En tanto, que el transporte paracelular, sucede en el espacio entre célula y célula, y está regulado por la unión estrecha (UE)(26). La UE tiene tres funciones: la primera es actuar como una barrera semipermeable que regula el paso de iones, de solutos, de agua y de células a través de la ruta paracelular, la segunda es funcionar como una cerca que divide al dominio apical y al dominio basolateral de las membranas plasmáticas y la tercera es coordinar las vías de señalización y el tráfico de moléculas que participan en la regulación de la diferenciación celular, en la proliferación celular y en la polaridad celular (27). La UE se sitúa en el extremo apical de las células (Fig. 2). La UE se puede observar en varios tipos celulares, por ejemplo en células epiteliales, en células endoteliales, en células de Schwann, en células de Sertoli, en los oligodendrocitos y también en células mesoteliales (27,28).



**Figura 2.** Uniones intercelulares. (a) La UE, (b) la unión adherente, (e) la unión comunicante, (c) los desmosomas y (d) los hemidesmosomas. Imagen modificada (29).

### 1.9 Proteínas de la UE

La UE es un complejo multiproteico formado por proteínas transmembranales (claudinas, ocludina, tricelulina y las moléculas de adhesión JAMs, del inglés *junctional adhesion molecules*), por proteínas adaptadoras y de andamiaje (ZO-1, -2 y -3, cingulina, MUPP1 y MAGI) que anclan a las proteínas transmembranales con el citoesqueleto de actina (Fig. 3), y por proteínas citosólicas (factores transcripcionales, cinasas y fosfatasas) con funciones de señalización (15,28,30,31).



**Figura 3.** Representación esquemática de la organización de los componentes de la UE. Imagen modificada (32).

### 1.9.1 Claudinas

Las claudinas son una familia de proteínas formadas por aproximadamente 24 miembros en el humano y en el ratón, cuyo peso molecular se encuentra entre los 20 y los 27 kDa (15,33). Las claudinas (Fig. 3) tienen cuatro dominios transmembranales, poseen un dominio amino terminal citoplasmático (relativamente corto de aproximadamente 7aa), dos asas extracelulares donde la primera asa (aproximadamente 52 aa) es más larga que la segunda (aproximadamente de 16 a 33 aa) y un dominio carboxilo terminal citoplasmático. Las dos asas extracelulares muestran variabilidad en la distribución y en el número de residuos cargados. La primera asa contiene residuos cargados que son los responsables de la selectividad iónica para el transporte a través de la vía paracelular. Todas las claudinas en su primera asa expresan dos cisteínas, las cuales forman un puente disulfuro intramolecular que sirve para estabilizar la conformación de la proteína (15). A diferencia de la primera asa, la segunda asa

contiene residuos aromáticos e hidrofílicos, los cuales son críticos para la interacción con otras claudinas (28,34). Una claudina puede interaccionar con otra claudina formando adhesiones homofílicas o heterofílicas, esta interacción puede ocurrir de dos maneras, ya sea entre claudinas de la misma membrana celular (interacción de lado a lado) o entre claudinas de membranas celulares opuestas (interacción cabeza con cabeza) (15). La manera en que ocurre la interacción de las segundas asas entre dos claudinas aún se desconoce, sin embargo estudios de modelaje molecular sugieren que la segunda asa se pliega en un motivo formando así dímeros con las claudinas de la membrana celular opuesta a través de interacciones hidrofóbicas entre los residuos aromáticos (15). La segunda asa de algunas claudinas puede actuar como receptores patógenos, por ejemplo la claudina-3 y la claudina-4 son receptores de la enterotoxina *Clostridium perfringens* y las claudinas-1, -6 y -9 actúan como correceptores para la entrada del virus de la hepatitis C a la célula (15,27). En su carboxilo terminal citoplasmático las claudinas tienen un motivo PDZ, este motivo les permite a las claudinas unirse directamente con proteínas periféricas de membrana que contengan un dominio PDZ como son: ZO-1, ZO-2, ZO-3, PATJ y MUPPI (15,27,33). La interacción de las claudinas con proteínas citoplasmáticas de andamiaje como ZO-1, les permite unirse indirectamente con el citoesqueleto de actina y así estabilizar a la UE (15). La función y la distribución de las claudinas están reguladas por la fosforilación en residuos de serina, treonina y tirosina localizados en el carboxilo citoplasmático o por modificaciones postraduccionales como la palmitoilación, la cual es requerida en el caso de claudina-14 para orientarla a la membrana plasmática y aumentar su inserción dentro de la UE (15). La fosforilación en algunos casos aumenta la función de barrera y en otros casos tiene el efecto contrario, por ejemplo en una línea celular de cáncer de ovario la fosforilación de la claudina-3 por la proteína cinasa A (PKA, del inglés *protein kinase A*) fue asociada con una disminución de la resistencia eléctrica transepitelial (RET), mientras que en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, la fosforilación de la claudina-5 por la PKA aumenta la RET. Otras cinasas que fosforilan a las claudinas son: la PKC, las cinasas de serina/treonina WNK1 y WNK4 (WNK, del inglés *with no lysine K*), las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK del inglés *Mitogen-activated protein kinases*), la Rho cinasa y la EphA2 cinasa (15,27).

### 1.9.2 Ocludina

La ocludina es el primer componente de la UE que fue identificado, es una proteína de aproximadamente 65 kDa, tiene cuatro dominios transmembranales, dos asas extracelulares, y un carboxilo (muy largo) y un amino terminal citoplasmáticos (Fig. 3). La primera asa extracelular es rica en residuos de tirosina y de glicina, los cuales constituyen cerca del 60 % del total de los aa, y contiene muy pocos aminoácidos cargados (27,33,35). Las asas extracelulares de la ocludina interactúan con las asas de otra ocludina localizada en la célula adyacente para formar la UE (35). El dominio carboxilo terminal citoplasmático de la ocludina interactúa con ZO-1, ZO-2 y ZO3, esta interacción es requerida para el ensamblaje de la ocludina dentro de la UE (33,35). En adición, la unión del carboxilo terminal con ZO-1, le permite a la ocludina interactuar indirectamente con el citoesqueleto de actina (27). En el dominio carboxilo terminal se encuentran múltiples residuos de serina y treonina, estos residuos al ser fosforilados concentran a la ocludina dentro de la UE y viceversa, cuando son desfosforilados la ocludina se desensambla de la UE (33). La desfosforilación de los residuos de serina y treonina ocurre durante la ruptura de la UE, la cual puede ser inducida por diversos factores como una baja concentración de calcio en el medio de cultivo (36). La fosforilación de la ocludina en los residuos de serina y treonina es dinámicamente regulada por la proteína cinasa atípica C (PKC), principalmente por las isoformas PKC $\zeta$  y PKC $\lambda$ /I, y por las fosfatasas PP2A y PP1 (35). La ocludina además posee residuos de tirosina, aunque en bajos niveles, los cuales a diferencia de los residuos de serina y treonina, sufren fosforilación durante la ruptura de la UE (36). Hasta el momento no se conoce mucho sobre las cinasas de tirosina que participan en la fosforilación de la ocludina, sin embargo se ha sugerido que la proteína cinasa c-Src puede jugar un papel importante, ya que al tratar monocapas de células de cáncer de colon (Caco-2) con peróxido de hidrógeno (un agente que causa ruptura de la UE por estrés oxidativo) se presenta una activación rápida de la cinasa c-Src y el uso de inhibidores de la cinasa c-Src atenúan el daño en la UE inducido por el peróxido de hidrógeno (37). El papel de la fosforilación de los residuos de tirosina de la ocludina en la ruptura de la UE no es muy claro, pero se sugiere que la fosforilación de los residuos de

tirosina atenúa la interacción entre la ocludina y ZO-1 dentro de la UE, conduciendo a la ruptura de la UE (35).

### **1.9.3 ZO-1, ZO-2 y ZO-3**

Las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3 son proteínas citoplasmáticas (Fig. 3) que interactúan directamente con proteínas transmembranales como las claudinas, la ocludina, la tricelulina y las JAMs (específicamente con JAM-A)(33). Todas las proteínas de la ZO pertenecen a la familia de las proteínas cinasas asociadas a la membrana (MAGUK, del inglés *membrane-associated guanylate kinase*) y poseen tres dominios PDZ, un dominio SH3 y un dominio guanilato cinasa (GUK) en su amino terminal (33). El primer dominio PDZ sirve para que las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3 se unan con el carboxilo terminal de las claudinas. Además de interactuar con las claudinas, la proteína ZO-1 puede interactuar con la ocludina y con la JAM-A, y también con proteínas citoplasmáticas como cingulina y ZONAB. En adición, las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3 también interactúan con los filamentos de actina citoplasmáticos (33). De entre las proteínas de la UE, las claudinas y las proteínas ZO-1 y ZO-2, son las que están directamente involucradas en la formación de la UE en las células epiteliales.

En las CMPH, las proteínas de la UE que han sido identificadas son: la claudina-1, la ocludina y la ZO-1 (38-40). En este trabajo se estudió por primera vez, la expresión de las claudinas -2 y -8, en estas células.

### **1.9.4 Claudina-2**

La claudina-2 es típicamente expresada en epitelios muy permeables o “de fuga” como el túbulo proximal de riñón, las criptas intestinales y el plexo coroideo (41-43). La claudina-2 forma un canal paracelular selectivo para cationes pequeños y es casi impermeable para aniones, aún siendo de tamaño pequeño, y para solutos no cargados de cualquier tamaño (44). La claudina-2 puede convertir una UE impermeable en una UE muy permeable, por ejemplo la expresión de claudina-2 en monocapas de células Madin Darby canine Kidney-C7 (MDCK-C7)

células representativas de un epitelio impermeable, que carecen de claudina-2, produce un aumento en la permeabilidad paracelular de cationes (45). Es importante mencionar que aunque la claudina-2 es considerada una claudina exclusiva de epitelios donde la UE es muy permeable, también existen casos como en las células de cáncer de colon (Caco-2) donde la UE es muy permeable pero carece de la claudina-2 (46). Las células Caco-2 expresan ocludina abundantemente y las claudinas -1 y -3, aunque en menor proporción, siendo la claudina-1 la proteína menos abundante (46). En este caso, la baja permeabilidad de la UE de las células Caco-2, se debe a la baja expresión de las claudinas que hacen la UE más apretada, como es el caso de la claudina-1. Se ha reportado que las monocapas de las CMPH tienen una RET muy baja (de 20 a 32  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) (39,40,47), a pesar de expresar la claudina-1, lo cual sugiere que la baja RET puede deberse a la presencia de claudinas, como la claudina-2, que hacen la UE más permeable. Por lo tanto, en este trabajo se estudió la expresión y la distribución de la claudina-2 en las CMPH.

### **1.9.5 Claudina 8**

La claudina-8 se encuentra expresada en el intestino delgado y en el grueso, en la próstata y en la nefrona (46,48,49). En la nefrona, la claudina-8 se expresa en el túbulo distal que es un segmento con baja permeabilidad a cationes monovalentes. Consistente con esto, se ha reportado que la inducción en la expresión de la claudina-8 en las células MDCK II (altamente selectivas a cationes) disminuye la permeabilidad a cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$  y  $\text{K}^+$ ) y a cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ), sin modificar la permeabilidad a aniones o solutos neutros (46,50). El cambio en la permeabilidad a cationes inducido por la claudina-8 en las células MDCK II, resulta del reemplazamiento de la claudina-2 (que forma canales permeables a cationes), que es expresada endógenamente por las células MDCK II, por la claudina-8 (que forma barrera contra cationes), la cual se inserta dentro de la UE ocupando el sitio donde se encontraba la claudina-2 (49). En adición, la expresión de la claudina-8 produce una disminución en la expresión del gen de la claudina-2 (49), aunque el mecanismo se desconoce aún. Además de funcionar como una barrera para cationes, la claudina-8 modula la permeabilidad paracelular para los iones ácidos y los básicos. Angelow y col.,



(2006) utilizando las células MDCK II, que son altamente permeables a los protones, el amonio y el bicarbonato, demostraron que la expresión de la claudina-8 en estas células reduce la permeabilidad a estos iones ácidos y básicos (51). El balance ácido-base del riñón implica dos pasos; el primero es la reabsorción del bicarbonato filtrado en el túbulo proximal y en el asa de Henle, y el segundo paso es la secreción de protones y de amonio en el túbulo colector (51). Estos procesos de transporte transcelular generan grandes gradientes de concentración transtubular, que se mantienen gracias a la baja permeabilidad del túbulo colector (51). La claudina-8 también es expresada por el túbulo colector (52). Considerando los hallazgos de Angelow y col., (2006), es probable que la claudina-8 esté participando o se encargue de mantener los gradientes de concentración en el túbulo colector a través de evitar la fuga de iones, pero aún no hay evidencia que lo corrobore. Lo que sí se ha demostrado es que en el túbulo colector, la claudina-8 es necesaria para el reclutamiento de la claudina-4 dentro de la UE (53). La claudina-4 forma un canal paracelular de  $\text{Cl}^-$ , para la reabsorción de  $\text{Cl}^-$  en el túbulo colector (53). La claudina-4 interacciona con la claudina-8, esta interacción es importante para la función de la claudina-4, ya que la inhibición de la expresión de la claudina-8 en el túbulo colector, resulta en la pérdida de la conductancia paracelular de  $\text{Cl}^-$  debido a que la claudina-4 no se encuentra en la UE (53). En general, los estudios realizados sobre la claudina-8 indican que esta proteína tiene el prototipo de una claudina formadora de barrera. Hasta el momento, la claudina-1 ha sido la única claudina explorada en el mesotelio. La claudina-1 forma una barrera para iones y se encuentra presente en epitelios poco permeables como el túbulo colector, y ausente en epitelios muy permeables como el túbulo proximal (54). Sin embargo, la presencia de la claudina-1 en el mesotelio, que es muy permeable, indica que su expresión no es exclusiva de epitelios de alta resistencia. Con el fin de conocer más sobre el perfil de las claudinas expresadas en el mesotelio, se exploró la expresión de claudina-8, que al igual que la claudina-1 es una proteína formadora de barrera.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Efectos de la diálisis peritoneal en las CMPH

El reto más importante en la diálisis peritoneal es la preservación de la integridad del peritoneo. El principal problema durante la diálisis peritoneal a largo plazo es la pérdida progresiva de la eficacia en la diálisis y ha sido atribuido a la directa y continua exposición del peritoneo a los líquidos de diálisis. Los líquidos de diálisis contienen glucosa como agente osmótico, tienen un pH que sirve para prevenir la caramelización de la glucosa durante el proceso de esterilización por calor, tienen productos de la degradación de la glucosa que se generan durante el proceso de esterilización y contiene lactato para prevenir la acidosis metabólica. Todos estos elementos causan daño morfológico a las células mesoteliales del peritoneo humano (CMPH) (55). El primer sitio de daño de las CMPH son las microvellosidades, las cuales sufren un acortamiento a los 20 días después de iniciada la diálisis peritoneal, seguido de una reducción en su número a los 10 meses, hasta su total desaparición a los 15 meses y finalmente después de varios meses en diálisis (1 a 2 años) las células mesoteliales se desprenden de la membrana basal (56). Además, se ha demostrado en estudios *in vivo* y *ex vivo* que las CMPH experimentan el proceso de TEM cuando son sometidas a diálisis peritoneal (57). Tan pronto es iniciada la diálisis peritoneal, las CMPH experimentan la transición de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal con la pérdida progresiva de la morfología epitelial y una disminución en la expresión de la citoqueratina y de la E-cadherina, esta última a través de la inducción del factor transcripcional *snail* (57). Cuando se cultivan las CMPH obtenidas del efluente de pacientes en diálisis se pueden observar varias morfologías que van desde una morfología de empedrado a una morfología fibroblástica o mezcla de poblaciones (6,57,58). La prevalencia de CMPH con una morfología fibroblástica en los cultivos del efluente parece estar relacionada con el tiempo en diálisis peritoneal de cada paciente y también con la incidencia de hemorragias peritoneales o de peritonitis (57). Cuando hay una hemorragia o infiltrado linfocítico en el efluente de diálisis, las células mesoteliales adquieren esporádicamente una morfología fibroblástica, la cual desaparece o se revierte parcialmente después de que la hemorragia o el episodio de peritonitis ha sido resuelto (57). Por otra parte,

en biopsias del peritoneo de pacientes con más de 9 meses en diálisis peritoneal, se ha observado que las CMPH pierden sus características epiteliales y que en pacientes con 77 meses en diálisis peritoneal, la monocapa de células ha desaparecido (57). El proceso de TEM en las CMPH es inducido principalmente por el FCT- $\beta$ 1(55). El FCT- $\beta$ 1 ha sido detectado en el efluente de diálisis y se ha reportado que las altas concentraciones de glucosa contenidas en el líquido de diálisis aumentan la expresión del gen del FCT- $\beta$ 1 en las CMPH (59,60). Ocasionalmente, en los cultivos de CMPH del efluente, también se puede observar la presencia de células hipertróficas, las cuales pueden estar solas o acompañadas de células mesoteliales o de tamaño normal (6,58). Ksiazek y col., (2007) mostraron que las CMPH expuestas a altas concentraciones de glucosa presentan hipertrofia y un aumento en la liberación de fibronectina y del FCT- $\beta$ 1(61). La hipertrofia inducida por la alta concentración de glucosa en las CMPH es mediada en parte por el FCT- $\beta$ 1, ya que el uso de un anticuerpo anti-FCT- $\beta$ 1 bloquea parcialmente los efectos de la glucosa (61). Además de inducir hipertrofia, la alta glucosa causa daño a las uniones intercelulares (la claudina-1, la ocludina, la ZO-1, la E-cadherina y la  $\beta$ -catenina) de las CMPH, resultando en un aumento en la permeabilidad de la monocapa (38,62-64). Se ha reportado que el FCT- $\beta$ 1 causa desorganización de las uniones intercelulares en varios tipos celulares incluyendo las CMPH (64-66). En adición al FCT- $\beta$ 1, el estrés oxidativo es otro factor que causa daño en las uniones intercelulares. La mayoría de las especies reactivas (aproximadamente el 90 %) se originan de la cadena respiratoria mitocondrial, especialmente del complejo III (63). Las soluciones de diálisis inhiben la actividad del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, lo cual resulta en un aumento en la generación de las especies reactivas de oxígeno en las CMPH (63). Las especies reactivas de oxígeno deslocalizan a las proteínas de la UE (la claudina-1 y la ocludina) de las CMPH, causando un aumento en la permeabilidad de la monocapa (39,40). El daño en las uniones intercelulares y las alteraciones morfológicas inducidos por los líquidos de diálisis son considerados la principal causa de hiperpermeabilidad peritoneal. El FCT- $\beta$ 1 y el estrés oxidativo juegan un papel importante en la inducción de estas alteraciones, por lo tanto el uso de agentes que inhiban la actividad del FCT- $\beta$ 1 y de antioxidantes podrían revertir o retrasar el daño causado por los líquidos de diálisis.

## 2.2 Vitamina A (retinol)

La vitamina A, es una vitamina liposoluble que se conoce también como retinol, ya que genera los pigmentos necesarios para el funcionamiento de la retina. El retinol es esencial para la formación y el mantenimiento de los tejidos del cuerpo tales como la piel, los huesos y la vasculatura, y para el desarrollo de una buena visión y para el funcionamiento del sistema inmunológico (67). Además, el retinol tiene un papel importante en reproducción y en el crecimiento y desarrollo embrionario (67). El retinol tiene seis isoformas: la todo *trans*, la 11-*cis*, la 13-*cis*, la 9, 13-di-*cis*, la 9-*cis* y la 11,13-di-*cis*, siendo la isoforma todo *trans*, la isoforma más predominante fisiológicamente (67). El retinol es convertido a compuestos más activos como el ácido retinoico, a través del cual ejerce sus múltiples efectos en el desarrollo embrionario y en la organogénesis, en la homeostasis de los tejidos, en la proliferación y en la diferenciación celular, y en la apoptosis (67,68). La deficiencia de retinol produce ceguera y enfermedades infecciosas, mientras que una deficiencia menos severa de retinol retarda el crecimiento e intensifica la anemia por deficiencia de hierro (69). Inversamente, un exceso de retinol en la dieta o hipervitaminosis A puede producir intoxicación en el hígado, en el sistema nervioso central, en el sistema músculo-esquelético, en los órganos internos y en la piel (68,70). La hipervitaminosis A también puede producir una reducción de la densidad mineral ósea, por lo tanto aumentar, el riesgo de fracturas (71), y de malformaciones durante el desarrollo embrionario (70).

## 2.3 Metabolismo de los retinoides

Los retinoides en la mayoría de los animales se obtienen de la dieta, ya que estos compuestos no son sintetizados de *novo*. Las plantas y animales cortan los carotenoides para formar a los retinoides. Los carotenoides son los responsables de darle el color amarillo, rojo, anaranjado o morado a los vegetales, las frutas y las flores. Los carotenoides son absorbidos y almacenados en los tejidos de los animales. Hasta el momento, 600 carotenoides han sido identificados y solo un 10 % son precursores del retinol, siendo el  $\beta$ -caroteno el más potente. Los animales pueden obtener el retinol al comer el tejido de animales que ya convirtieron a los carotenoides en retinoides (67). El retinol se obtiene del hígado de pescado, de

los huevos, de la leche, la mantequilla y las plantas, y se ingiere de la dieta en la forma de ésteres (el palmitato de retinol, el oleato de retinol y el estearato de retinol), siendo el más abundante el palmitato de retinol (67). En la luz intestinal, los ésteres del retinol son hidrolizados a retinol por la enzima retinol-éster hidrolasa y posteriormente el retinol libre es absorbido por los enterocitos. En los enterocitos, el retinol es unido a la proteína fijadora de retinol celular tipo II (CRBP-II, del inglés *celular retinol binding protein II*) para ser esterificado por la enzima lecitina-retinol aciltransferasa. La función de la CRBP-II es solubilizar al retinol y protegerlo de la degradación, así como dirigirlo a la lecitina-retinol aciltransferasa para su conversión a palmitato y otros ésteres del retinol (67). Posteriormente, los retinoides son secretados a la linfa como quilomicrones o como retinol no esterificado. Los quilomicrones están constituidos por agregados de triacilglicerol que se encuentran empacados junto con los carotenoides, los ésteres del retinol, los ésteres del colesterol, con pequeñas cantidades de retinol y algunas apolipoproteínas (68). Los quilomicrones entran a la circulación general, donde son reducidos a quilomicrones remanentes. Posteriormente, los quilomicrones remanentes transportan a los ésteres del retinol hacia los tejidos o a los hepatocitos para su almacenamiento. El 75 % de los quilomicrones remanentes son tomados por los hepatocitos, mientras que una gran cantidad de retinol no esterificado es llevado a las células hepáticas estelares (67).

### **2.3.1 Metabolismo hepático de los retinoides**

En el hígado, los ésteres del retinol son hidrolizados a retinol, el cual posteriormente se une a la proteína fijadora del retinol (RBP del inglés *retinol binding protein*), la cual lo protege de ser metabolizado. Los niveles de retinol-RBP están estrictamente regulados y se mantienen en un estado estable de 2  $\mu\text{M}$  a pesar de las fluctuaciones en el consumo diario de vitamina A. Posteriormente, el complejo retinol-RBP es secretado dentro del plasma para ser llevado al tejido blanco. La mayoría del complejo retinol-RBP está asociado con la transtiretina, una proteína sérica, que previene su eliminación por el riñón. En el torrente circulatorio este complejo representa el 90-95 % del retinol presente en la circulación y de esta forma es transportado a los órganos blanco, entre ellos el ojo, la piel, el tejido adiposo, el riñón, los testículos, la medula ósea y el pulmón

(67,68,72). Cuando hay suficiente vitamina A, los ésteres del retinol que se encuentran en los quilomicrones son convertidos a retinol para después ser almacenados en el hígado. En los vertebrados cerca del 80 % del retinol y de los ésteres de retinol totales están almacenados en el hígado, aunque algunos ésteres del retinol también son almacenados en las células intersticiales y en órganos como los pulmones, los riñones y en el intestino. Los almacenamientos extra-hepáticos son importantes para el suplemento de retinol a tejidos con alta demanda de retinoides (67). Además del retinol y de los ésteres del retinol, otros retinoides se encuentran presentes en el plasma a una concentración de 5-10 nM. Estos retinoides incluyen al ácido todo *trans* retinoico, al ácido 13-*cis* retinoico, al ácido 13-*cis*-4-*oxo* retinoico, al ácido 4-*oxo*-retinoico y el retinol todo *trans*  $\beta$ -glucurónido. Todos estos retinoides, a excepción del retinol todo *trans*  $\beta$ -glucurónido, son transportados en el plasma, unidos a la albúmina y sus niveles plasmáticos fluctúan con el consumo de vitamina A. Después de la ingesta de vitamina A, los niveles plasmáticos de estos retinoide pueden aumentar de 2 a 4 veces (67,68).

### **2.3.2 Retinoides y el tejido blanco**

Una vez que el complejo retinol-RBP-transtiretina llega al tejido blanco, se une al receptor RBP presente en la membrana plasmática de la célula. De esta manera, la célula toma el retinol que se encuentra unido a la RBP. Dentro de la célula, el retinol se une a la CRBP-I o sirve como sustrato para varias enzimas citosólicas y microsomales llamadas retinol deshidrogenasas (RDH) que oxidan al retinol a retinaldehído (también llamado retinal). Seguido de la oxidación del retinol a retinaldehído por la RDH, el siguiente paso es la oxidación irreversible del retinaldehído a ácido retinoico. Esta reacción es realizada por la enzima retinaldehído deshidrogenasa (RADH) (67). Una vez sintetizado, el ácido retinoico se une a la proteína fijadora de ácido retinoico tipo I y II (CRABP-I y -II, del inglés *celular retinoica cid binding protein*) y entonces puede entrar al núcleo para activar la transcripción (autocrina) o puede ser transportado a otra célula (paracrina) (67). El ácido todo *trans* retinoico (ATTR) tiene más afinidad por la CRABP-I que por la CRABP-II, y ambas proteínas tienen más afinidad por el ATTR que por el ácido-9-*cis*-retinoico. Se ha sugerido que la CRABP-II actúa como un facilitador para la

captación y el metabolismo del ácido retinoico, y también como un co-regulador de su vía de señalización. En la ausencia de ligando, CRABP-II se encuentra en el citosol y en presencia de ácido retinoico rápidamente se transloca al núcleo, donde el complejo CRABP-II-ácido retinoico se asocia con los receptores para retinoides, y media la transferencia del ligando a su receptor (67). El ácido retinoico se metaboliza a productos inactivos como: el ácido-4-oxo-retinoico, el ácido-4-hidroxi-retinoico, el ácido-18-hidroxi-retinoico y el ácido 5,8-epoxi-retinoico, por medio de dos citocromos P450 (CYP26A1 y el CYP26B1) y finalmente se excreta (67,68).

## 2.4 Vía de señalización del ácido retinoico

Los efectos de los retinoides son mediados por dos familias de receptores nucleares, los receptores para ácido retinoico (RAR) y los receptores para retinoides X (RXR). Cada familia consiste de tres isoformas (la  $\alpha$ , la  $\beta$  y la  $\gamma$ ) que son codificadas por diferentes genes. Los RAR son activados por el ácido todo *trans* retinoico (ATTR) y por el ácido-9-*cis*-retinoico, mientras que los RXR son activados solamente por el ácido-9-*cis*-retinoico (73). La activación transcripcional depende de la formación del heterodímero RAR/RXR, el cual reconoce una secuencia, en el ADN, llamada elementos de respuesta para el ácido retinoico (RARE del inglés *Retinoica acid response elements*). Estos RARE se encuentran localizados en la región promotora de un gran número de genes (que son blancos para los retinoides) implicados en una gran variedad de funciones (74). Entre estos genes se encuentran: el gen del RAR $\alpha$ , el gen del CYP26, el gen de la CRBP I, el gen de la CRABP II, el gen de la alcohol deshidrogenasa, el gen del transportador de ácidos biliares (NTCP), el gen del factor nuclear de hepatocitos y varios genes *hox*, que son genes implicados en la regulación del desarrollo (morfogénesis)(67,74). El complejo ATTR-RAR/RXR también puede regular la expresión de genes independientemente de un RARE, a través de regular la transactivación de otros factores de transcripción. Por ejemplo, los retinoides exhiben actividades anti-apoptóticas y anti-inflamatorias relacionadas con la transrepresión de la proteína activadora 1 (AP1) y del factor nuclear kappa-beta (NF- $\kappa$ B), respectivamente (67). La transrepresión es un proceso en el que una

proteína reprime o inhibe la actividad de una segunda proteína mediante la interacción proteína-proteína. Además de los RAR y de los RXR, el efecto de los retinoides puede ser mediado por otros receptores, por ejemplo el ácido retinoico es ligando del receptor nuclear activado por el proliferador de peroxisomas  $\beta/\delta$  (PPAR del inglés, *peroxisome proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$* ). El ácido retinoico es llevado hacia el PPAR  $\beta/\delta$  a través de la proteína fijadora de ácidos grasos (FABP5 del inglés *fatty acid binding proteins*), así como la CRBP-II lleva al ácido retinoico hacia el RAR. Debido a que la afinidad del ácido retinoico por la CRBP-II es más alta que por la FABP5, en la mayoría de las células, la vía clásica del RAR es la que se está predominantemente activa. Sin embargo, en las células con un valor de FABP5/CRBP-II alto, la vía del PPAR  $\beta/\delta$  es la que se activa, aboliendo la regulación de los genes mediada por el RAR. A través de la vía del PPAR  $\beta/\delta$ , el ácido retinoico estimula el crecimiento celular y tiene un efecto anti-apoptótico, y por medio de la vía del RAR, el ácido retinoico inhibe el crecimiento celular.

#### **2.4.1 Vías de señalización no genómicas de los retinoides**

Las vías de señalización no genómicas de los retinoides, son aquellas vías que no dependen de la transcripción de genes mediada por el heterodímero RAR/RXR o que pueden ocurrir en ausencia de los receptores para retinoides (67,68). Un ejemplo del primer caso es el efecto del ácido retinoico en la regulación de la plasticidad sináptica en las neuronas, un proceso que requiere del RAR $\alpha$  localizado en las dendritas y que es independiente de la transcripción. En ausencia del ácido retinoico, el RAR $\alpha$  es activamente exportado desde el núcleo y una vez en el citoplasma, se asocia con el ARNm de algunas proteínas, como el receptor de glutamato 1, reprimiendo su traducción. En contraste, en presencia del ácido retinoico, el ácido retinoico se une al RAR $\alpha$ , causando una disminución de la asociación entre el RAR $\alpha$  y el ARNm, lo cual permite la traducción del ARNm (67). También se ha demostrado que el ácido retinoico activa vías de señalización como la vía de la fosfatidilinositol-3 cinasa (75) y la vía p38 de las MAP cinasas (76) a través de los RAR $\alpha$ , sin requerir de la transcripción génica. Los efectos no genómicos del ácido retinoico también ocurren en ausencia de los receptores a retinoides, por ejemplo el ATTR disminuye la actividad de la de la

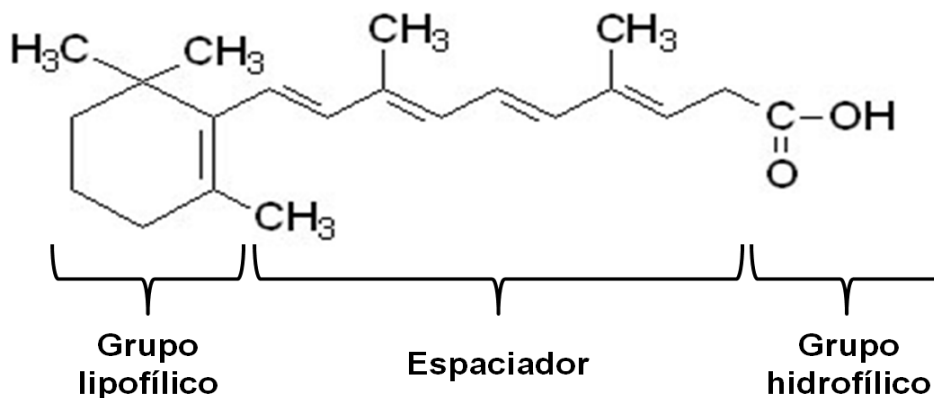


proteína cinasa C (PKC del inglés *protein kinase C*), una proteína que regula funciones celulares como la proliferación y diferenciación celular, la tumorigénesis y la apoptosis, a través de su unión directa con el dominio regulador de esta proteína (68).

## 2.5 Ácido todo trans retinoico (ATTR)

### 2.5.1 Estructura molecular

El ATTR tienen una masa molar de 300.4 g/mol, su molécula consiste de tres secciones principales: una región lipofílica en uno de los extremos, por una cadena poliinsaturada que actúa como un espaciador y por un grupo hidrofílico al otro extremo de la molécula (Fig. 4)(77). Se le denomina todo *trans*, por la disposición *trans* de sus dobles enlaces.



**Figura 4.** Subunidades estructurales de la molécula de ATTR. Imagen modificada (78).

### 2.5.2 El ATTR como un agente protector de las CMPH

El ATTR juega un papel importante en la diferenciación de las células epiteliales (79) y de las células mesoteliales (16). Con respecto a estas últimas, se ha observado que las células mesoteliales adquieren una morfología semejante a la de los fibroblastos, cuando son crecidas en un medio de cultivo libre de ácido retinoico, mientras que la restitución del ácido retinoico en el medio de cultivo

favorece la adquisición de un fenotipo epitelial (16). Además de actuar como un inductor de la diferenciación celular, al ATTR también se le han atribuido propiedades antioxidantes, por ejemplo en un modelo de daño renal agudo en rata inducido por el dicromato de potasio en donde se presenta un aumento en la lipoperoxidación del tejido renal, el pretratamiento con ATTR disminuyó la lipoperoxidación (80). En adición, el ATTR también disminuyó, el aumento en la presencia de células epiteliales vivas y muertas, en el sedimento urinario, inducido por el dicromato de potasio (80). Estos hallazgos sugieren que el ATTR ejerce doble efecto protector contra el daño renal. El primero, es que el ATTR actúa como un antioxidante y previene el daño inducido por el estrés oxidativo, a través de la disminución en la lipoperoxidación y en el número de células necróticas. Apoyando lo último, Kitamura y col., (2002) reportaron que el ATTR inhibe la apoptosis inducida por el peróxido de hidrógeno en células mesangiales, por medio de la supresión de la expresión de c-fos/c-jun y de c-jun N-terminal cinasa (81). El segundo, es que la disminución en el número de células vivas en la orina inducida por el ATTR, sugiere un efecto protector del ATTR sobre los mecanismos relacionados con la unión célula-célula y con la unión célula-membrana basal. Con respecto a esto, se ha reportado que el ATTR induce la expresión de la laminina, una proteína que está relacionada con la adhesión de las células a la membrana basal, y también induce la expresión de las proteínas de la UE en varios tipos celulares (79,82,83), lo que indica que el ATTR tiene un papel importante en la expresión de proteínas que mantienen la integridad epitelial. El ATTR también se ha utilizado para el tratamiento de enfermedades renales como la glomerulonefritis. Esta enfermedad se caracteriza por una acumulación de los componentes de la matriz extracelular, el cual se relaciona con un aumento en la expresión del FCT- $\beta$ 1 (84). El FCT- $\beta$ 1 es una citocina fibrogénica que estimula la transcripción de genes de la matriz extracelular, en células renales (85,86). En un modelo de glomerulonefritis experimental, se reportó que el ATTR atenúa los daños glomerulares al reducir la expresión del FCT- $\beta$ 1 y de su receptor (84). Sumado a esto, Delgadillo y col., (2012) demostraron que el ATTR disminuye la sobreexpresión glomerular del FCT- $\beta$ 1, en un modelo de ratas uninefrectomizadas (87). Los antecedentes mencionados sugieren que el ATTR podría ser un agente, que ayude a atenuar el daño en las CMPH causado por los

líquidos de diálisis, a través de reducir el estrés oxidativo, la expresión del FCT- $\beta$ 1 y/o de inducir la expresión de proteínas de la UE.

### 3. JUSTIFICACIÓN

- Los factores que determinan el transporte peritoneal de un paciente dado son diversos y poco estudiados. Las células mesoteliales constituyen la mayor área de superficie a través de la cual ocurre el transporte de solutos y de agua durante la diálisis. Hasta el momento, se desconocen las características morfológicas y funcionales de las células mesoteliales de los pacientes con TB o TA.
- El ATTR tiene propiedades anti-oxidantes, anti-fibróticas y juega un papel importante en la formación de uniones estrechas y en la adquisición de una morfología epitelial. Por lo tanto, el ATTR puede ser un fármaco que atenúe el daño peritoneal, a través de corregir las alteraciones morfológicas y funcionales de las células mesoteliales de pacientes con TB o TA, provocadas por las soluciones de diálisis.

## **4. HIPÓTESIS**

- El ATTR revertirá el daño causado por el líquido de diálisis en la morfología y en la función de las proteínas de la UE, de células mesoteliales del peritoneo humano provenientes de pacientes con TB o TA.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivos generales**

- Estudiar la morfología y la función de las proteínas de la UE, en cultivos primarios de células mesoteliales del peritoneo humano de pacientes en diálisis peritoneal ambulatoria continua (DPAC), con TB o TA.
- Evaluar el efecto del ATTR en la morfología y en la función de las proteínas de la UE, en cultivos primarios de células mesoteliales del peritoneo humano de pacientes en DPAC, con TB o TA.

## 5.2 Objetivos particulares

Estudiar en los cultivos primarios de células mesoteliales de pacientes en DPAC, con TB o TA:

- La morfología de las células, del cilio y de las microvellosidades en presencia de ATTR (50, 100 o 200 nM), por microscopía electrónica de barrido.
- La expresión y distribución de la citoqueratina-18 (marcador epitelial), la vimentina y el  $\alpha$ -AML (marcadores mesenquimales) en presencia de ATTR (50 y 100 nM), por inmunofluorescencia y Western blot.
- La expresión del FCT- $\beta$ 1 en presencia de ATTR (50 y 100 nM), por Western blot.
- La distribución y la expresión de las claudinas-1, -2 y -8, la ocludina y la ZO-1 en presencia de ATTR (50 y 100 nM), por inmunofluorescencia y por Western blot.
- La distribución y expresión de las proteínas de la UE en presencia de ATTR (50 y 100 nM), por inmunofluorescencia y por Western blot.
- La permeabilidad de las proteínas de la UE en presencia de ATTR (50 y 100 nM), a través de la medición de la resistencia eléctrica transepitelial y por la permeabilidad a Dextran-FITC aniónico de 10 y 70 kDa.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1 Material biológico**

Se trabajó con cultivos primarios de células mesoteliales del peritoneo obtenidas de biopsias de peritoneo de 12 mujeres de  $38.4 \pm 2.0$  años (en un intervalo de 23 a 48 años), no urémicas, a las que se les practicó una cirugía abdominal. Las biopsias del peritoneo fueron proporcionadas por el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Centro Médico Nacional la Raza, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por consentimiento informado.

Las células derivadas del efluente de diálisis se obtuvieron de 24 pacientes en diálisis peritoneal ambulatoria continua, incluyendo 15 transportadores bajo y 9 transportadores alto, dializados con soluciones al 1.5 ó 2.5 % de glucosa. Pacientes diabéticos ó pacientes que hubieran presentado peritonitis dentro de los seis meses previos al estudio fueron excluidos. Las características clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 1. Los líquidos de diálisis fueron proporcionados por el Hospital Regional Ignacio Zaragoza del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, el Hospital General la Raza, el Hospital Juárez de México y el Hospital Regional No.1 del IMSS, por consentimiento informado.

### **6.2 Reactivos**

El ácido todo *trans* retinoico (No. de catálogo R-2625) se obtuvo en Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Los medios y reactivos para la preparación de los medios de cultivo se obtuvieron en GIBCO Invitrogen incorporation (Grand Island, NY, USA). Todos los demás reactivos se obtuvieron en Sigma Chemical (St. Louis, MO).

### **6.3 Anticuerpos**

Se utilizaron anticuerpos anti-claudina-1 (No. de catálogo 51-9000), anti-claudina-2 (No. de catálogo 51-6100), anti-occludina (No. de catálogo 71-1500), anti-ZO-1 (No. de catálogo 61-7300), anti- $\alpha$ -tubulina acetilada (No. de catálogo 32-2700), anti-citoqueratina-18 (No. de catálogo 18-0213) y anti-vimentina (No. de catálogo

18-0052) los cuales se obtuvieron en Zymed (South San Francisco, CA). El anticuerpo anti-claudina-8 (No. de catálogo 40-0700Z) se compró a Invitrogen. El anticuerpo anti-FCT- $\beta$ 1 (No. catálogo T 0438) se adquirió en Sigma Aldrich (St. Louis, MO) y el anti cuerpo anti- $\alpha$ -AML (No. de catálogo BCL171) se obtuvo de Merck Millipore (CA). Los anticuerpos secundarios alexa fluo 488 burro anti-conejo (No. catálogo A-21202), alexa fluo 594 conejo anti-ratón (No. de catálogo A-11062), alexa fluo cabra anti-ratón (No. de catálogo A-11001) y ToPro-3 iodide (No. de catálogo T360) se compraron a Invitrogen. El HRP anti-ratón se compró a Pierce Biotechnology Inc. (USA) y el HRP anti-conejo se adquirió en Zymed (CA). El anticuerpo anti-actina monoclonal de ratón fue gentilmente donado por el Dr. José Manuel Hernández del departamento de Biología Celular del CINVESTAV, México, D.F.

## **6.4 Equipo**

Microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6510LV, secador de punto crítico Sandri-780A (Tousimis), rociador de oro Desk II Gold sputter-etch unit (Denton Vacuum Inc.), microscopio confocal Leica DMIRE-2 (Germany), sistema de imagen EC3 UVP (BioImaging Systems, Cambridge, UK), voltímetro EVOM con electrodos Sistema Millicell<sup>®</sup>-ERS

## **6.5 Aislamiento y cultivo de las células**

### **6.5.1 Obtención de las células a partir de la biopsia**

La biopsia se recibió en PBS frío (4 °C). Posteriormente, se incubó con tripsina (0.25 %) más EDTA (0.1%), a 37 °C por 30 minutos, en agitación. Después, las células se separaron por centrifugación, se sembraron en cajas de Petri (precubiertas con colágeno (1 mg/mL)) con medio de cultivo estándar y se incubaron a 37 °C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. El medio de cultivo se cambió cada tercer día. Los experimentos se realizaron en cultivos en pasaje 3. Una vez en pasaje 3, las células se cultivaron hasta confluencia con medio de cultivo más ATTR (0, 50, 100 ó 200 nM). El medio más ATTR era cambiado cada tercer día.



### **6.5.2 Obtención de células a partir del efluente de diálisis**

El contenido de la bolsa de diálisis fue centrifugado a 327 g, por 20 minutos a una temperatura de 3 °C. La pastilla celular se sembró en cajas de Petri (precubiertas con colágeno (1 mg/mL)) con medio de cultivo estándar y se incubaron a 37 °C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %. El medio de cultivo se cambió cada tercer día. Los cultivos en pasaje 3 fueron sometidos a diferentes procesos experimentales. Una vez en pasaje 3, las células se cultivaron hasta confluencia con medio de cultivo más ATTR (0, 50, 100 ó 200 nM). El medio más ATTR era cambiado cada tercer día.

En todos los ensayos se utilizó medio de cultivo compuesto por una mezcla de las siguientes soluciones: Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM/F12) con 1.8 g de bicarbonato de sodio, 2 mL de HEPES 1 M, 15 mL de suero fetal bovino, 200 µL de antibiótico (penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL), 1 mL de glutamina (2 µg/mL), 100 µL de transferrina (5 µg/mL), 100 µL de insulina (5 µg/mL) y 80 µL de hidrocortisona (0.4 µg/mL). Una vez preparada la solución, se esterilizó por filtración y se guardó a una temperatura de 4 °C.

### **6.6 Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células en cubreobjetos previamente cubiertos con colágeno (1 mg/mL) más medio de cultivo conteniendo ATTR 0, 50, 100 y 200 nM. Una vez que las células llegaron a la confluencia se fijaron con glutaraldehído al 2.5 % en PBS por 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se hicieron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS y se fijaron con tetraóxido de osmio por 1 h a temperatura ambiente. Después se realizaron otros 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS. Posteriormente, se deshidrató con etanol al 50, 60, 70, 80 y 90 %, por 10 minutos cada uno, y con etanol absoluto tres veces por 10 minutos cada uno. Después se realizó el secado a punto crítico y las células fueron cubiertas con oro y se mantuvieron en un desecador, hasta su análisis con el microscopio de barrido.

### **6.6.1 Evaluación de las imágenes por MEB**

De cada cultivo se capturaron dos campos al azar (300X) para cuantificar el número de células totales, células hipertróficas y células aplanadas por campo. El conteo se realizó directamente de las fotografías. Para medir el tamaño del cilio, se tomaron las fotografías de 10 células (10,000X), seleccionadas al azar, de tres cultivos diferentes. De estas imágenes se capturaron dos campos (cerca del cilio y a la orilla de la célula), para medir el número y el tamaño de las microvellosidades. En el TA, las microvellosidades estaban fusionadas, en lugar de ser estructuras individuales como en el control y en el TB. Para contar las microvellosidades en el TA, cada grupo de microvellosidades fusionadas se considero como una microvellosidad.

### **6.7 Determinación de la proliferación celular**

La determinación de la proliferación celular se realizó de la siguiente manera: una vez que se recibía la bolsa de diálisis su contenido se centrifugó a 327 g, durante 20 min a una temperatura de 3°C. Después, se retiró el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 1mL de medio de cultivo para contar el número de células utilizando azul de tripano y la cámara de Neubauer, y enseguida, las células se sembraron en cajas de cuatro pozos (precubiertas con colágeno (1 mg/mL)) con medio de cultivo. Posteriormente, se contó el número de células en cada uno de los pasajes. Los pasajes 1, 2 y 3 se realizaron los días 7, 14 y 21, respectivamente. El día del pasaje 1 se le quito el medio de cultivo a las células, se les hizo 2 lavados con PBS, se les se incubó con tripsina (0.25 %) más EDTA (0.1 %) por 30-60 segundos para despegar las células de la caja, se detuvo la acción de la tripsina con medio de cultivo más suero fetal bovino al 15 % y se centrifugó. Finalmente, se retiró el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo para contar las células. Este procedimiento se siguió para los otros pasajes.

## **6.8 Inmunofluorescencia**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células en cubreobjetos, previamente cubiertos con colágeno (1 mg/mL), más medio de cultivo conteniendo ATTR 0, 50, 100 y 200 nM. Una vez que las células llegaron a la confluencia se lavaron 3 veces con PBS más calcio (1 mM), posteriormente, se fijaron con metanol a 4 °C por 10 minutos. Después las monocapas se lavaron 3 veces con PBS más calcio 1 mM, se permeabilizaron con Tritón X100 al 0.25 % por 15 minutos y se bloquearon por 1 h con albúmina sérica bovina libre de IgGs al 0.5 %. Posteriormente, las células se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario anti-citoqueratina-18 (dilución 1:50) , anti-vimentina (dilución 1:100), anti- $\alpha$ -AML, anti-claudina-1 (dilución 1:25), anti-claudina-2 (dilución 1:80), anti-claudina-8 (dilución 1:100), anti-occludina (dilución 1:100) o anti-ZO-1(dilución 1:25), y se lavaron 3 veces, por 5 minutos cada vez, con PBS más calcio (1 mM). Luego las células se incubaron con el anticuerpo secundario por 1 h a temperatura ambiente, protegiendo de la luz a la preparación. Después se lavaron 3 veces con PBS más calcio 1 mM y 2 veces con agua desionizada, durante 5 minutos cada vez. Una vez terminados los lavados, las preparaciones se montaron en portaobjetos con 2.5  $\mu$ L de Vectashield y los cubreobjetos se sellaron por los lados con barniz. Las preparaciones se guardaron a 4 °C, protegidas de la luz hasta realizar el análisis por microscopía confocal.

### **6.8.1 Cuantificación de las células ciliadas por inmunofluorescencia**

Para cuantificar el número de células ciliadas, los cultivos se procesaron por inmunofluorescencia, siguiendo el procedimiento descrito arriba, utilizando anticuerpos anti- $\alpha$ -tubulina acetilada (dilución 1:100), un componente del cilio, y ToPro-3 yoduro para marcar los núcleos. De las imágenes obtenidas se contaron los núcleos y las células que expresaban cilio para calcular el porcentaje de células ciliadas. Se realizaron 3 experimentos por duplicado de cada grupo experimental.

## **6.9 Western blot**

### **6.9.1 Western blot para cuantificar la expresión de los marcadores de TEM y del FCT- $\beta$ 1**

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células en cajas de Petri de 100 mm x 20 mm con medio de cultivo conteniendo ATTR 0, 50 ó 100 nM. Una vez que las células llegaron a la confluencia se lavaron dos veces con PBS frío (4 °C). La fracción total se extrajo con 100  $\mu$ L de RIPA (ver anexo) más inhibidores de las proteasas (PMSF y Complete). Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry. Posteriormente, se hizo una dilución de las muestras (1:5) con Leammli (ver anexo) conteniendo urea (0.5 mM) y 2- $\beta$ -mercaptoetanol (25 %), y se desnaturalizaron colocándolas en agua, en ebullición, por 15 minutos. Posteriormente, se cargaron 100  $\mu$ g de proteína en geles SDS-PAGE al 10 % y se transfirieron a membranas de PVDF. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche al 5 % por 1 h a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario anti-citoqueratina-18 (dilución 1:500), anti-vimentina (dilución 1:500), anti- $\alpha$ -AML (dilución 1:500) o anti-FCT- $\beta$ 1 (dilución 1:250), durante toda la noche. Después se hicieron 8 lavados de 5 minutos cada uno con PBS más Tween 20 al 0.1 % y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario HRP anti-ratón (dilución 1:10,000). Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia en el foto documentador UVP. Este equipo se utilizó también para el análisis densitométrico.

### **6.9.2 Western blot para cuantificar las proteínas de la UE**

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células en cajas de Petri de 100 mm x 20 mm con medio de cultivo conteniendo ATTR 0, 50 ó 100 nM. Una vez que las células llegaron a la confluencia se lavaron dos veces con PBS frío (4 °C). La fracción soluble (citósólica) y la fracción insoluble (membranal), se extrajeron con 100  $\mu$ L de RIPA y MBL (ver anexo), respectivamente, conteniendo inhibidores de las proteasas (PMSF y Complete, 30  $\mu$ L de cada uno). Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry. Posteriormente, se hizo una dilución de las muestras (1:5) con Laemmli conteniendo urea (0.5 mM) y 2- $\beta$ -mercaptoetanol (25 %) y se desnaturalizaron colocándolas en agua, en ebullición, por 15 minutos.

Posteriormente, se cargaron 100 µg de proteína en geles SDS-PAGE al 10 %, para la ocludina y la ZO-1, o en geles al 12 %, para las claudinas -1, -2 y -8, y se transfirieron a membranas de PVDF. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche al 5 % por 1 h a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario anti-claudina-1 (dilución 1:1000), anti-claudina-2 (1:1000), anti-claudina-8 (1:1000), anti-ZO-1 (dilución 1:1000) o anti-occludina (dilución 1:1000), durante toda la noche a 4 °C. Después se hicieron 8 lavados de 5 minutos cada uno con PBS más Tween 20 al 0.1 % y las membranas se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo HRP biotinilado anti-conejo (dilución 1:20,000). Posteriormente, se hicieron 8 lavados de 5 minutos cada uno con PBS más Tween 20 al 0.1% y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente con HRP estreptavidina (dilución 1:20,000). Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia con el foto documentador UVP. Este equipo fue utilizado también para el análisis densitométrico.

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

La medición de la RET permite estimar la permeabilidad de las uniones intercelulares. Se basa en medir el flujo de iones del lado apical hacia el lado basolateral o viceversa a través de una monocapa que se encuentra sobre una membrana semipermeable. Para medir la RET se utilizaron filtros (Corning) con 0.33 cm<sup>2</sup> de área, con un tamaño de poro de 3 µm y cubiertos con colágeno. Estos filtros cuentan con una cámara interna (compartimento apical) y una externa (compartimento basolateral), las cuales, se llenaron con 0.2 mL y 1 mL, respectivamente, con medio de cultivo más ATTR (0, 50 ó 100 nM). En el compartimento apical se sembraron 1x10<sup>5</sup> células del grupo control, TB o TA. La medición de la RET y el cambio del medio de cultivo se realizaron cada tercer día. La medición de la RET se realizó utilizando un voltímetro Millicell-ERS. La RET se expresó en Ω•cm<sup>2</sup>. La RET del filtro sin células fue restada de la RET total.

### **6.11 Flujo de dextran-FITC**

Para la medición del flujo de dextran se usaron los mismos filtros empleados para la medición de la RET. Se sembraron 1x10<sup>5</sup> células y se cultivaron hasta la

confluencia con medio de cultivo más ATTR (0, 50 ó 100 nM). Una vez que se obtuvo una RET estable, la permeabilidad de las monocapas se determinó por la medición de cambios en la concentración de dextran-FITC (10 ó 70 kDa) entre el compartimento apical y basolateral. Cuando la RET se estabilizó, se le retiró el medio de cultivo a las células y se lavaron con Ringer bicarbonato, hasta retirar todo el medio de cultivo. Posteriormente, se colocaron 100 µL del dextran-FITC (10 ó 70 kDa) en el compartimento apical (donde está la monocapa de células) a una concentración de 1 µg/µL y se colocaron 1000 µL de Ringer bicarbonato en el compartimento basolateral. Después se tomaron 2 µL del compartimento apical y 100 µL del compartimento basolateral a los 0, 1 y 2 h. Los volúmenes se llevaron a 200 µL con Ringer bicarbonato (ver anexo) y posteriormente se leyeron en un espectrofotómetro de fluorescencia a una longitud de onda y de excitación de 492 nm y 520 nm, respectivamente. Posteriormente se calculó el coeficiente de permeabilidad del soluto (CPS), para determinar el flujo de dextran-FITC a través de la monocapa. El CPS se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$K = - \frac{4V}{\Delta t \times A} \ln \frac{Ca_0 - 4 Cb_2}{Ca_0 - 4 Cb_1}$$

Donde:

K= es el coeficiente de permeabilidad del soluto (m/s)

V= El volumen del lado basal (m<sup>3</sup>)

A= El área de la membrana (m<sup>2</sup>)

Δt= Intervalo de tiempo (s)

Ca0= Concentración apical al tiempo 0

Cb1= Concentración basolateral a 1 h

Cb2= Concentración basolateral a 2 h

## 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la diferencia entre dos grupos se utilizó la prueba t de *Student*. Para la evaluación de más de dos grupos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía seguido de una prueba Tukey. Se consideró que existía diferencia significativa si  $p < 0.05$ . Los resultados se muestran como la media  $\pm$  el error estándar de la media

## 8. RESULTADOS

Las características clínicas de los TB y los TA se encuentran resumidas en la tabla 1. No se aplicó criterio de restricción para la edad, género o el tiempo en diálisis. Los pacientes que fueran seropositivos para hepatitis A, B, C o para VIH ó que tuvieran insuficiencia renal secundaria a diabetes no se incluyeron dentro del estudio. También se excluyeron aquellos pacientes que presentaron un episodio de peritonitis en los seis meses previos al estudio.

**Tabla 1. Características clínicas de los transportadores bajos y de los Transportadores altos**

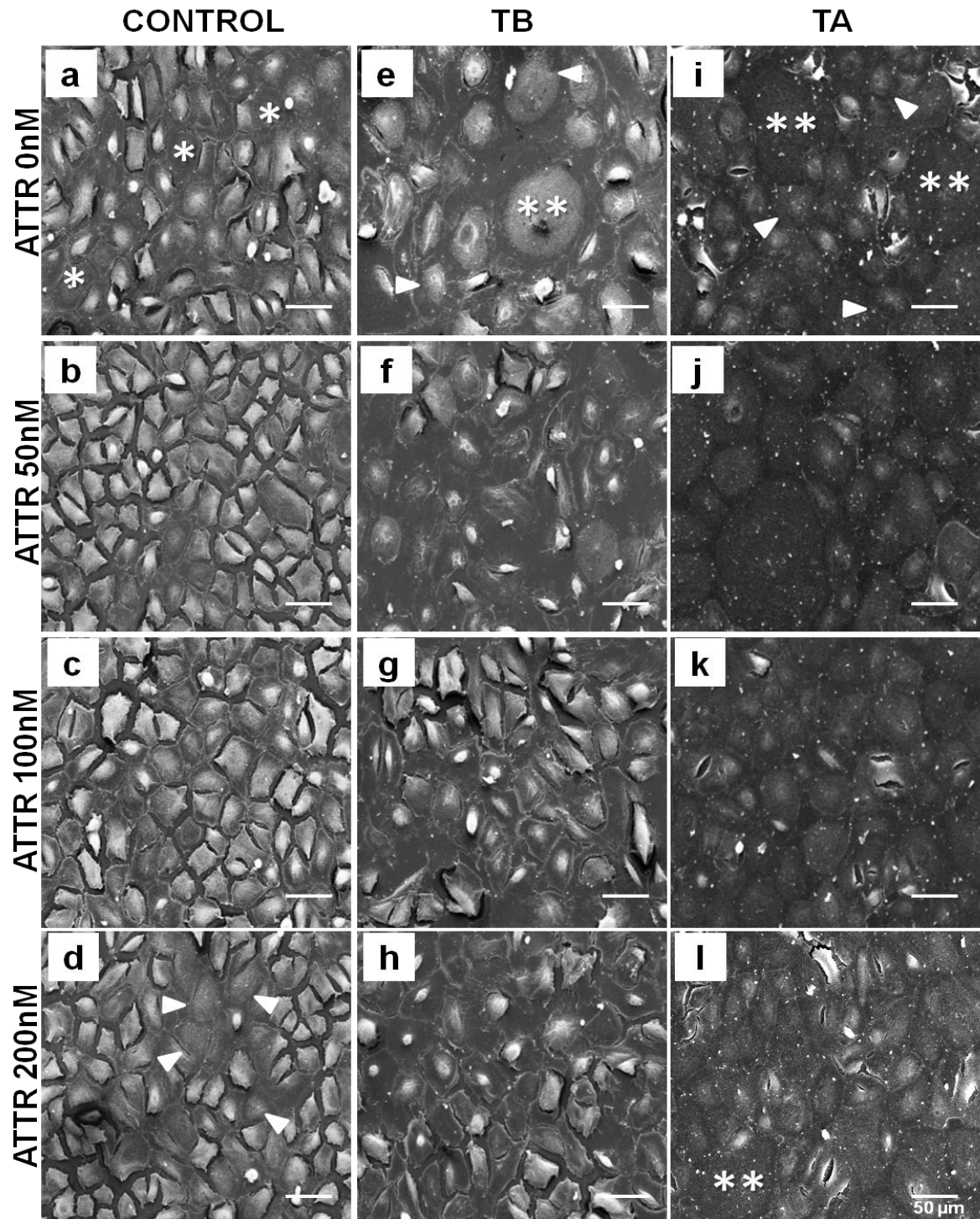
	<b>TB N=15</b>	<b>TA N=9</b>
<b>Edad</b>	<b>27.9 ± 2.0 (13-79 años)</b>	<b>36.3 ± 8.1 (13-71 años)</b>
<b>Hombre/Mujer</b>	<b>5/10</b>	<b>6/3</b>
<b>Riñones poliquísticos</b>	<b>2</b>	<b>0</b>
<b>Hipertensión arterial sistémica</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>Glomerulonefritis</b>	<b>1</b>	<b>0</b>
<b>Nefroangioesclerosis</b>	<b>0</b>	<b>2</b>
<b>Etiología desconocida</b>	<b>9</b>	<b>6</b>
<b>Tiempo en diálisis (meses)</b>	<b>29.6 ± 7.0 (1-84 meses)</b>	<b>17.0 ± 6.6 (1-48 meses)</b>
<b>D/P de creatinina a las 4h</b>	<b>0.5 ± 0.03</b>	<b>0.8 ± 0.03*</b>
<b>Nitrógeno ureico en sangre (mg/dL)</b>	<b>67.8 ± 5.6</b>	<b>56.8 ± 3.7</b>
<b>Albúmina (g/dL)</b>	<b>90.2 ± 2.1</b>	<b>88.6 ± 3.3</b>
<b>Urea en suero (mg/dL)</b>	<b>3.68 ± 0.09</b>	<b>3.64 ± 0.09</b>
<b>Creatinina en suero (mg/dL)</b>	<b>8.6 ± 0.6</b>	<b>9.2 ± 0.7</b>
<b>Episodios de peritonitis (seis meses previos al estudio)</b>	<b>7</b>	<b>3</b>

Abreviaturas: D/P, dializado/plasma; TB, transportador bajo y TA, transportador alto. Media ± Error estándar de la media. \* $p < 0.05$ , TB contra TA.

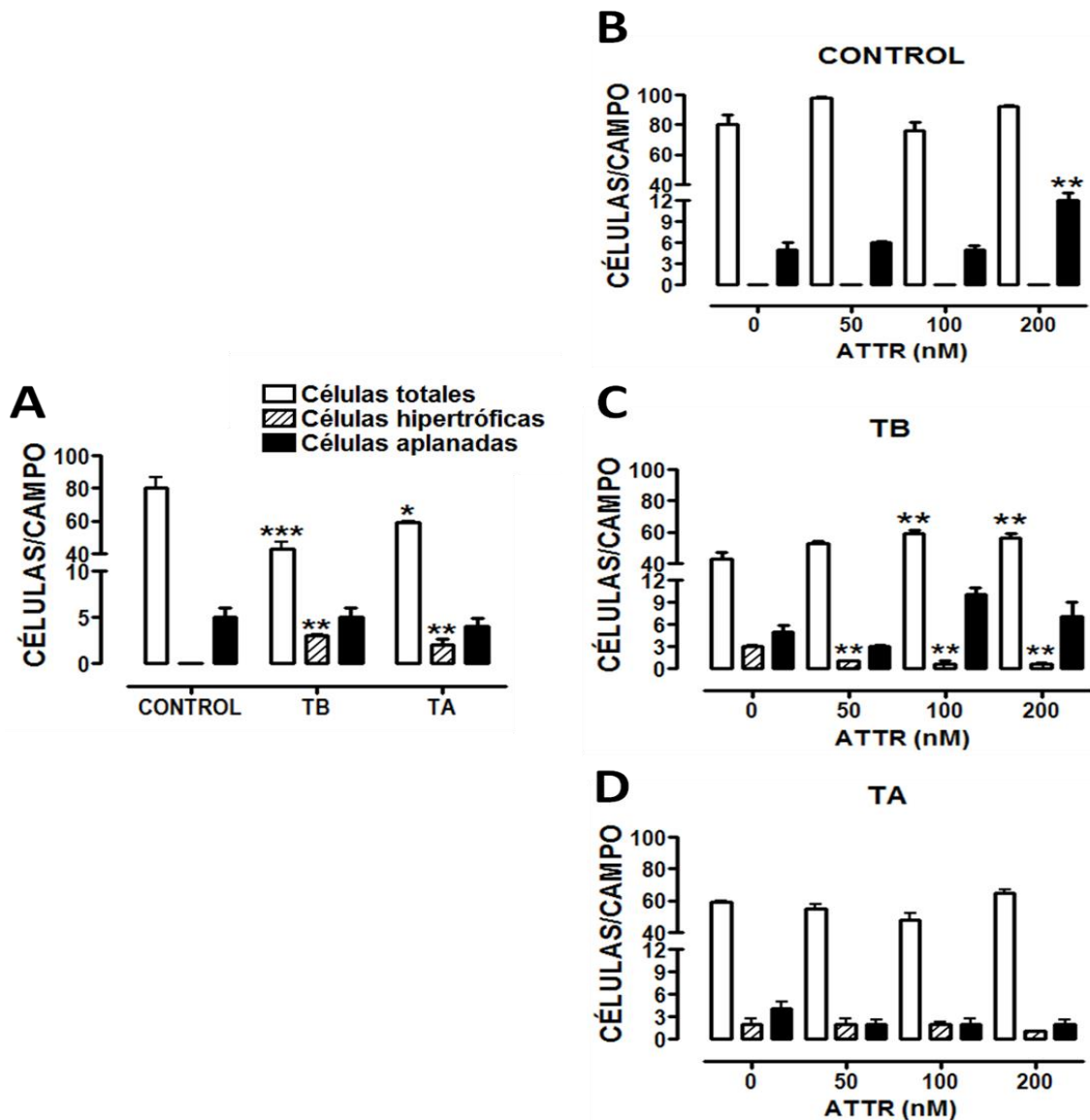


### **8.1 Disminución del número de células hipertróficas en los cultivos de células mesoteliales de TB debido al ATTR**

En los cultivos de células mesoteliales control, se observaron células con una morfología poligonal (Fig. 5, panel a) y ocasionalmente células con una apariencia aplanada (asteriscos). En presencia de ATTR, las células control (Fig. 5, paneles b y c) adquirieron una morfología de empedrado y con la concentración más alta de ATTR (200 nM) se observaron varias células aplanadas (Fig. 5, panel d, cabezas de flecha). En los cultivos de los TB (Fig. 5, panel e), las células exhibieron un aumento en su tamaño (cabezas de flecha) comparado con el grupo control y se observó la presencia de células hipertróficas (doble asterisco). Con el tratamiento con ATTR, las células de los TB adquirieron un tamaño similar al de las células del grupo control y se disminuyó la presencia de células hipertróficas (Fig. 5, paneles f, g y h). En el TA (Fig. 5, panel i), se observaron células hipertróficas (doble asterisco) y células con una morfología epitelial (cabeza de flecha). El tratamiento con ATTR no tuvo efecto sobre la morfología en estos cultivos. También se cuantificó el número de células totales. Comparado con el grupo control ( $80 \pm 7$ ), el TB ( $43 \pm 4.3$ ) y el TA ( $59 \pm 1.3$ ) tuvieron menos células por campo, siendo más marcado en el TB (Fig. 6A). En el grupo control, el ATTR (200 nM) aumentó el número de células aplanadas (Fig. 6B), mientras que en el TB disminuyó el número de células hipertróficas (Fig. 6C). En el TA, el ATTR no tuvo ningún efecto (Fig. 6D).



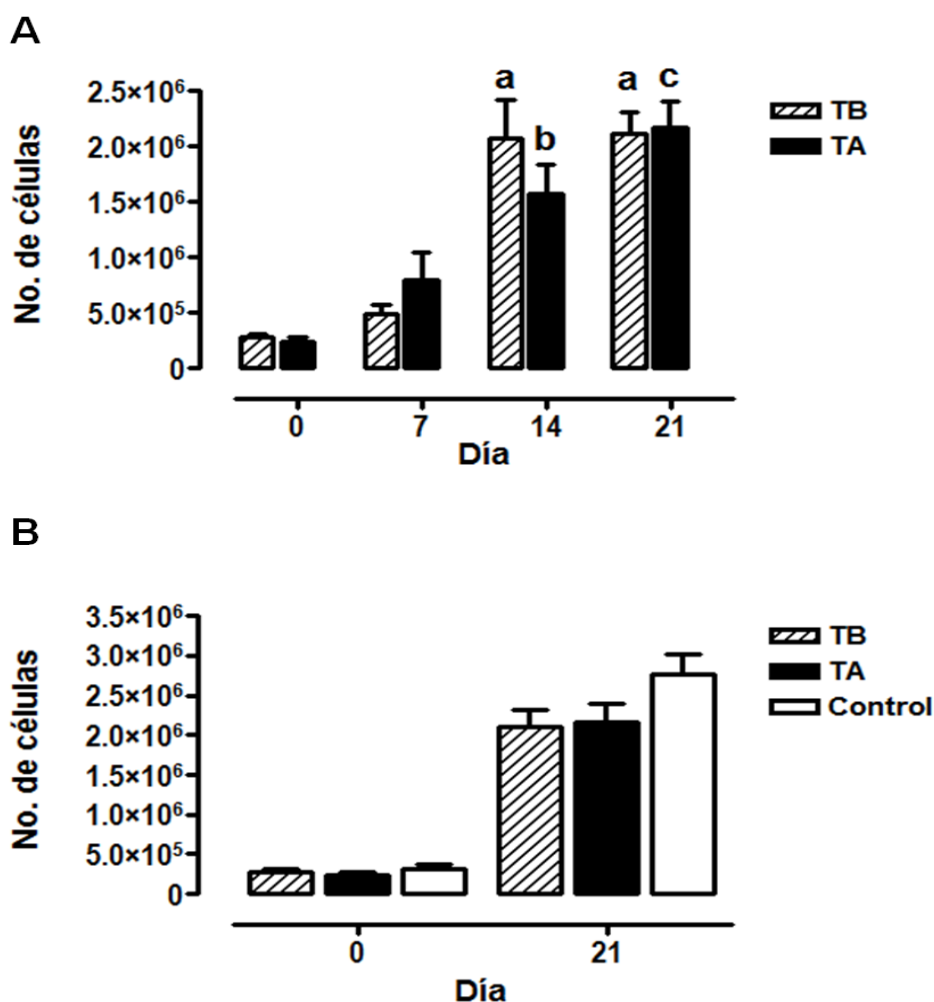
**Figura 5. Morfología de las células mesoteliales en cultivo de pacientes con TB o TA tratados con el ATTR.** Monocapas de células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia del ATTR (0, 50, 100 ó 200 nM). Microscopia electrónica de barrido (MEB), 300X, barra= 50 µm. Fotografías representativas de tres experimentos individuales. CMPH, células mesoteliales del peritoneo humano; TB, transportador bajo; TA, transportador alto; ATTR, ácido todo *trans* retinoico.



**Figura 6. Disminución del número de células hipertróficas en los cultivos de TB tratados con el ATTR.** Monocapas de células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR (0, 50, 100 ó 200 nM). **(A)** Cuantificación del número de células totales (barras blancas), de células hipertróficas (barras rayadas) y de células aplanadas (barras negras) por campo en condiciones basales y **(B-C)** en presencia del ATTR. Se muestra la media  $\pm$  ESM. **(A)**  $***P < 0.001$  células de TB totales vs células control totales;  $*P < 0.05$  células de TA totales contra células control totales;  $**P < 0.01$  células de TB hipertróficas y células de TA hipertróficas contra células control hipertróficas. **(B)**  $**P < 0.01$  células control aplanadas con 200 nM de ATTR contra células control aplanadas con 0 nM de ATTR. **(C)**  $**P < 0.01$  células de TB totales tratadas con 100 ó 200 nM de ATTR contra células de TB totales tratadas con 0 nM de ATTR;  $**P < 0.01$  células de TB hipertróficas tratadas con 50, 100 ó 200 nM de ATTR contra células de TB hipertróficas tratadas con 0 nM de ATTR. TB, transportador bajo; TA, transportador alto; ATTR, ácido todo *trans* retinoico.

## 8.2 Proliferación celular en los cultivos de los TB y de los TA

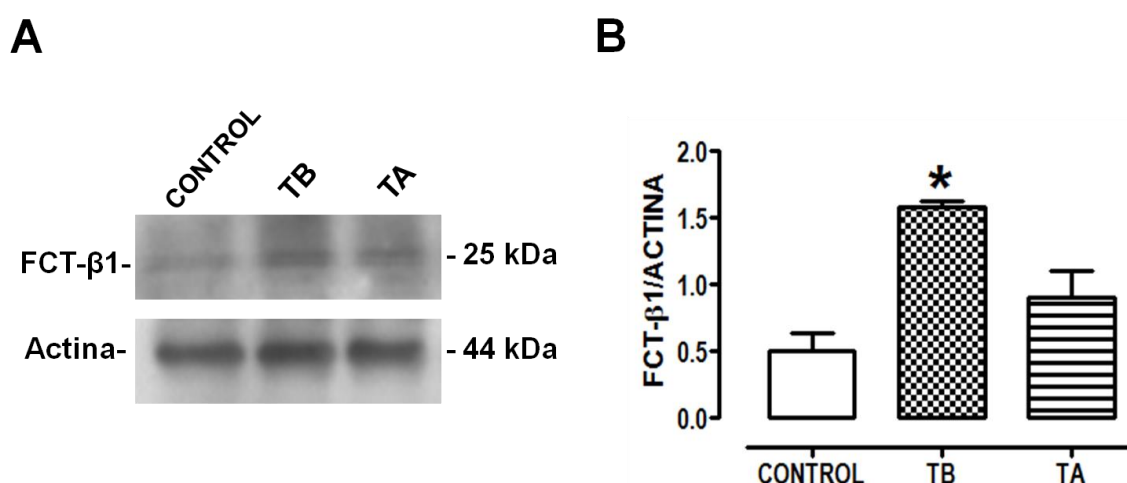
La exposición a largo plazo de las células mesoteliales a los líquidos de diálisis resulta en una disminución en la proliferación celular. Nosotros estudiamos, si entre los TB y los TA había diferencias en la proliferación celular. Un punto importante es que el número de células que se obtuvieron del efluente de diálisis fue similar entre los TA y los TB (Figura 7A, día 0). Estadísticamente no se encontró diferencia significativa en el número de células entre los dos grupos a los diferentes días, sin embargo se puede observar que en los TB se alcanza el máximo número de células a los 14 días (barra rayada), mientras que en el TA es a los 21 días (barra negra), figura 7A. Al comparar los cultivos de los TB y los TA con el grupo control a los 21 días se observó, aunque no fue estadísticamente significativo, una disminución en la proliferación celular en los cultivos de los pacientes en diálisis con respecto al grupo control. Cabe mencionar que al comparar al TB con el control, a los 21 días, se tuvo una  $p=0.0544$ .



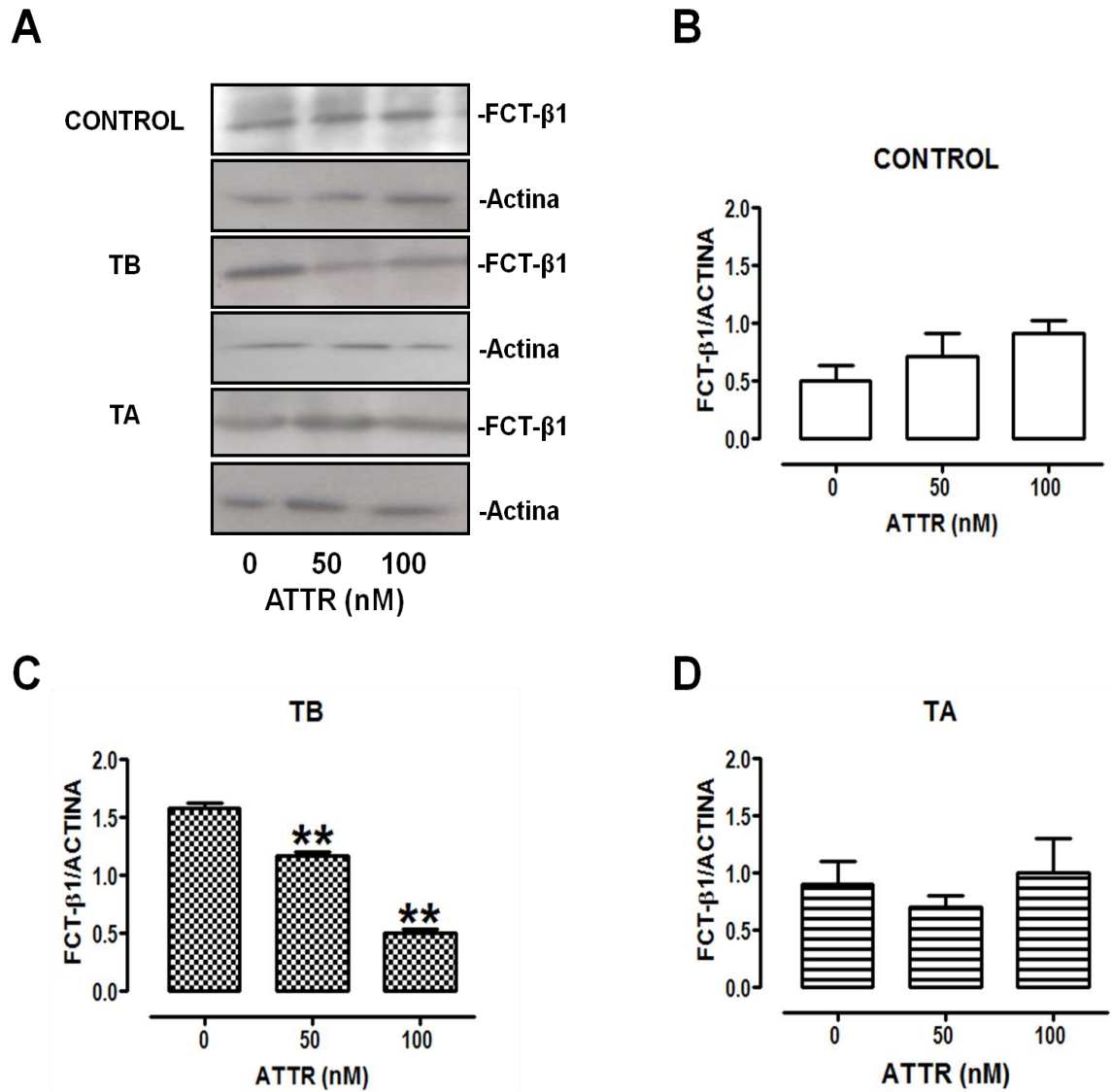
**Figura 7. Cuantificación del número de células en los cultivos de los TB y los TA a diferentes días de cultivo. (A)** Comparación de la proliferación celular entre los cultivos de los TB y de los TA al día 7 (pasaje 1), 14 (pasaje 2) y 21 (pasaje 3). **(B)** Comparación de la proliferación celular al día 21 entre los cultivos de los TB, los TA y el grupo control. Se muestra la media  $\pm$  ESM. <sup>a</sup>  $p < 0.001$  contra el TB al día 0, <sup>b</sup>  $p < 0.001$  contra el TA al día 0, y <sup>c</sup>  $p < 0.001$  contra el TA al día 0.

### 8.3 Disminución de la expresión del FCT-β1 en los cultivos de TB debido al ATTR

La exposición crónica de las CMPH a soluciones de diálisis o a un medio con alto contenido de glucosa, aumenta la expresión del FCT-β1 (88). En condiciones basales, la expresión del FCT-β1 estuvo aumentada en las células de los TB en comparación con el grupo control y con el TA (Fig. 8, A y B). En el TB, el tratamiento con el ATTR 50 y 100 nM disminuyó la expresión del FCT-β1 de una manera dependiente de la concentración (Fig. 9C).



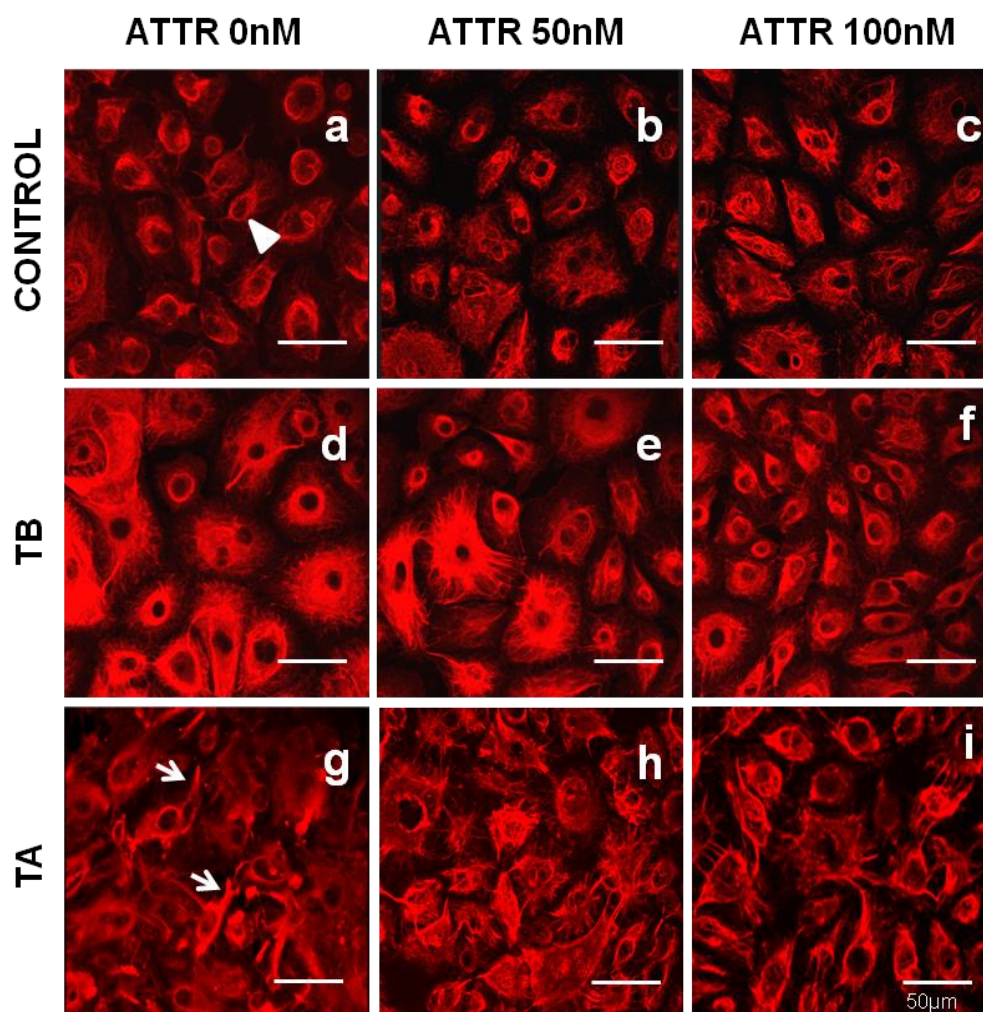
**Figura 8. Expresión del FCT-β1 en células mesoteliales de TB y de TA. (A)** Análisis por Western blot y **(B)** por densitometría de la expresión del FCT-β1 en lisados totales de células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de TB y de TA. Se muestra la media ± ESM de tres experimentos individuales. \* $P < 0.05$  TB contra control. FCT-β1, factor de crecimiento transformante-β1; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.



**Figura 9. Expresión del FCT-β1 en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con el ATTR.** (A) Análisis por Western blot y (B-D) por densitometría de la expresión del FCT-β1 en lisados totales de células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de TB y de TA, cultivadas en presencia de ATTR (0, 50 ó 100 nM). Se muestra la media ± ESM de tres experimentos individuales. (B)  $**P < 0.01$  TB tratado con 50 ó 100 nM de ATTR contra TB tratado con 0 nM de ATTR. FCT-β1, factor de crecimiento transformante β1; ATTR, ácido retinoico *todo trans*; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

#### 8.4 Mejoramiento de la organización de los filamentos de citoqueratina-18 en cultivos de TB y TA debido al ATTR

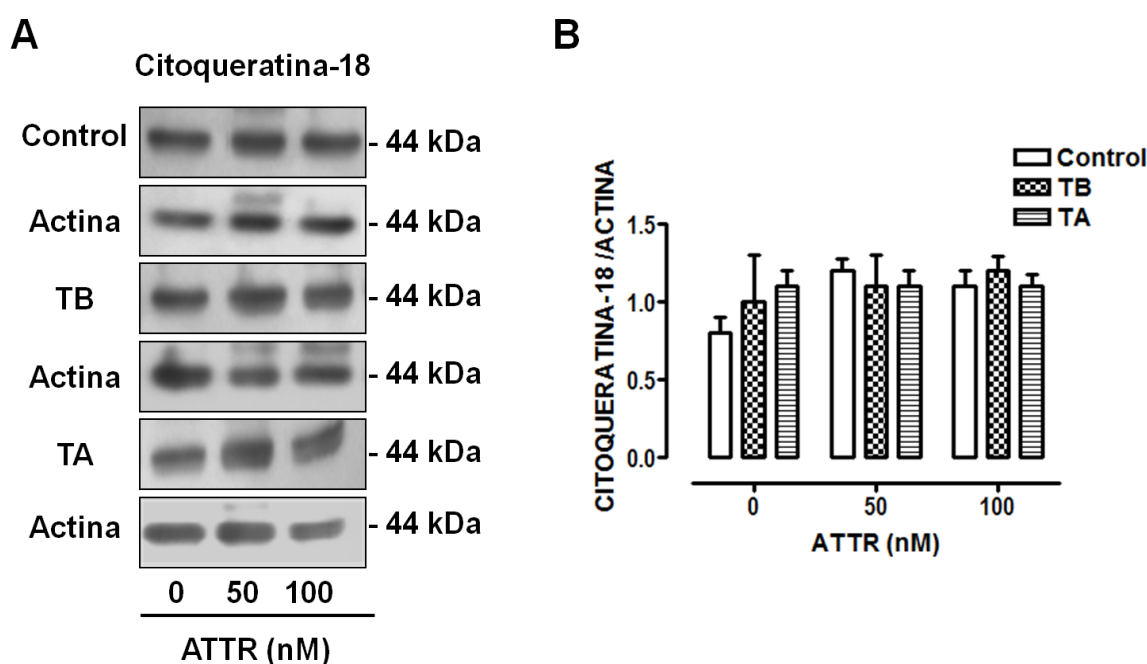
En las células mesoteliales control (Fig. 10, panel a), la marca de citoqueratina-18 se observó en la región perinuclear (cabeza de flecha), mientras que en las células de los TB, la marca para citoqueratina-18 es más intensa (Fig. 10, panel d). En el TA, la organización de los filamentos está alterada (Fig. 10, panel g) en comparación con el control, y en algunas células, se observa la salida de proyecciones gruesas (flechas). El tratamiento con ATTR 100 nM mejoró la organización de la citoqueratina-18 en el TB (Fig. 10, panel f) y también en el grupo control (Fig. 10, panel c), mientras que en el TA, este efecto fue parcial (Fig. 10, panel i).



**Figura 10. Distribución de los filamentos de citoqueratina-18 en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con ATTR.** Inmunofluorescencia para citoqueratina-18 en monocapas de células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR (0, 50 ó 100 nM). Imágenes representativas de tres experimentos individuales. Barra= 50µm. ATTR, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

### 8.5 Expresión de la citoqueratina-18 en los cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con el ATTR

En condiciones basales, el contenido de la citoqueratina-18 es similar entre las células del grupo control y las células de los TB y de los TA (Fig. 11A y 11B). El tratamiento con el ATTR no modificó la expresión de la citoqueratina-18 en ninguno de los grupos (Fig. 11A y 11B).

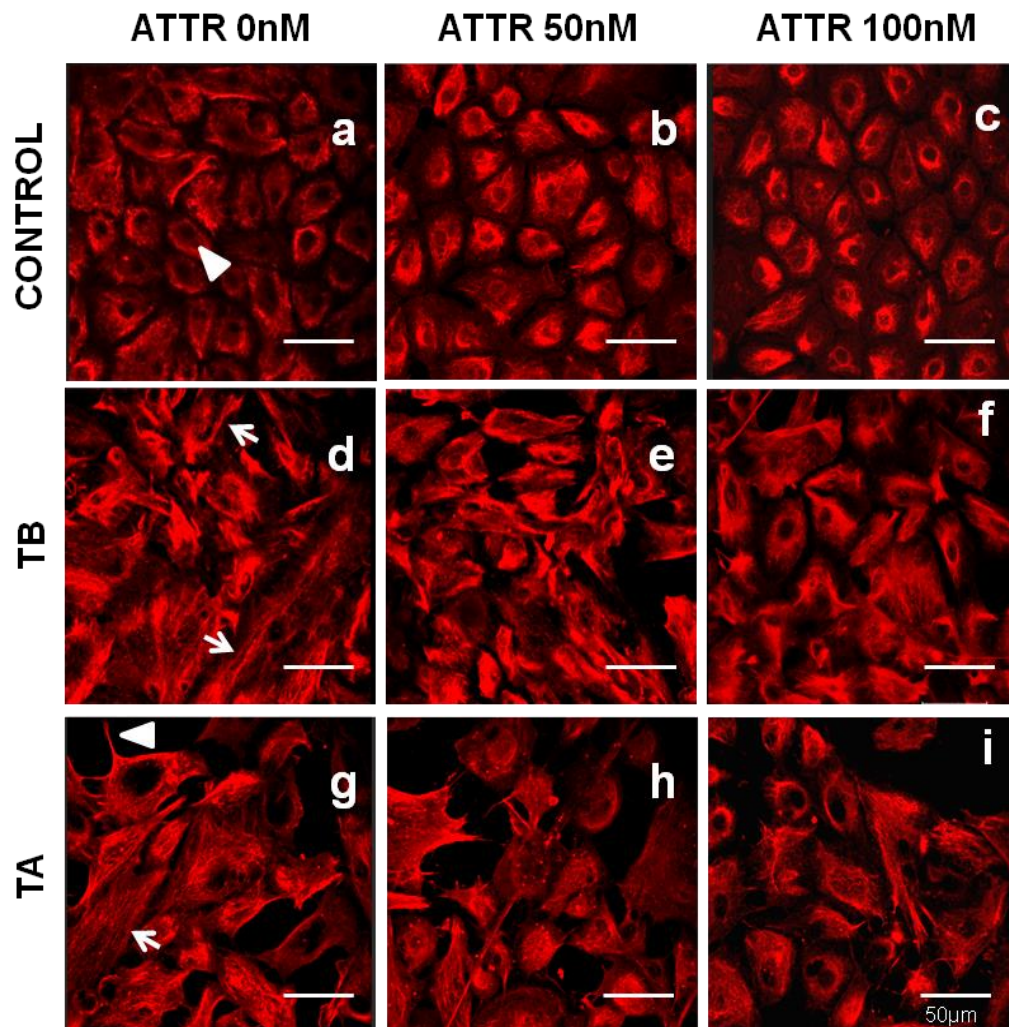


**Figura 11. Expresión de la citoqueratina-18 en cultivos de células mesoteliales de TB y TA tratados con ATTR. (A)** Análisis por Western blot y **(B)** por densitometría de la expresión de la citoqueratina-18 en lisados totales de células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR (0, 50 ó 100 nM). Se muestran la media  $\pm$  ESM de tres experimentos individuales. ATTR, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.



## 8.6 Mejoramiento en la distribución de los filamentos de vimentina en las células de los TB y los TA debido al ATTR

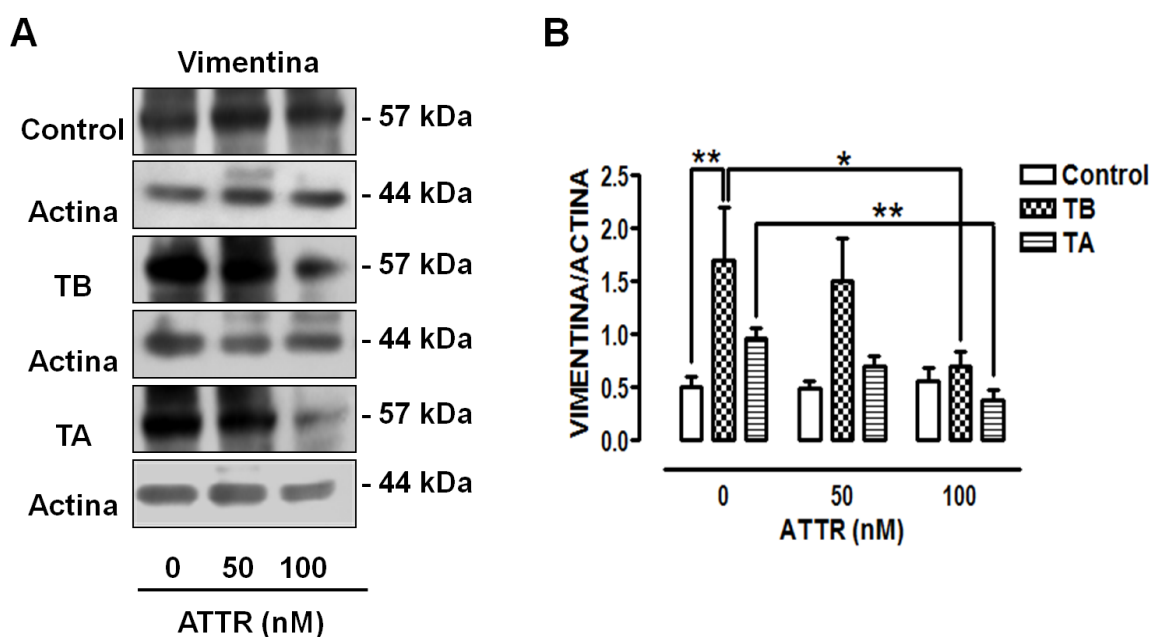
En las células control (Fig. 12, panel a), la marca de vimentina se observó en la región perinuclear (cabeza de flecha). En las células de los TB (Fig. 12, panel d), la marca de vimentina es intensa y los filamentos muestran una apariencia estirada, como si la célula estuviera aplanada (flechas). En las células de los TA (Fig.12, panel g), los filamentos de vimentina exhiben el mismo patrón (flecha) observado en el TB, y en algunas células se observan proyecciones (cabeza de flecha). El tratamiento con ATTR (100 nM) mejoró parcialmente la distribución de los filamentos de vimentina en el TB (Fig. 12, panel f) y en el TA (Fig. 12, panel i).



**Figura 12. Organización de los filamentos de vimentina en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con ATTR. (A)** Inmunofluorescencia para vimentina en células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR (0, 50 ó 100 nM). Imágenes representativas de tres experimentos. Barra= 50 µm. ATTR, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

## 8.7 Disminución en la expresión de vimentina en los cultivos de los TB y de los TA por el ATTR

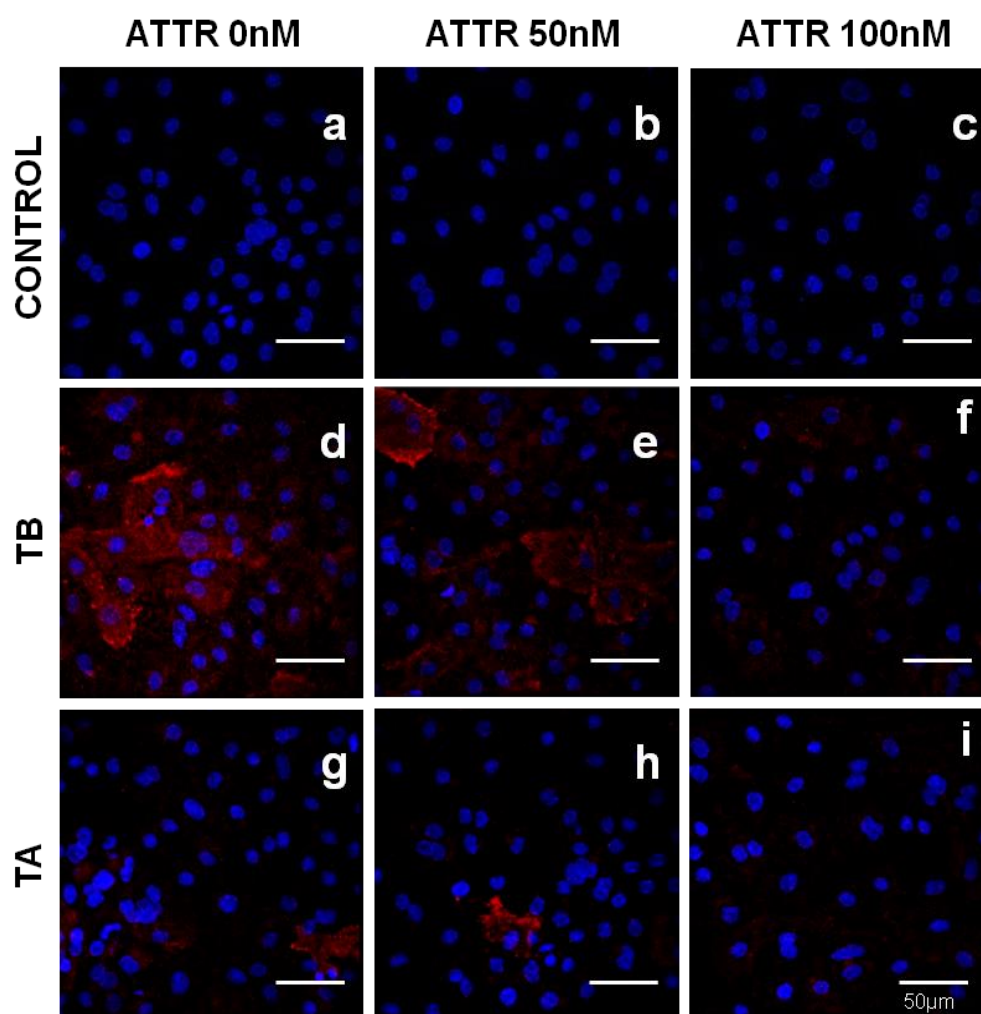
En comparación con el grupo control, la expresión de vimentina se encuentra aumentada en los cultivos de los TB (Fig. 13A y 13B). Con el tratamiento con 100 nM de ATTR se observa una disminución en el contenido de vimentina, en el TB y en el TA, quedando en valores similares a los del grupo control (Fig. 13B).



**Figura 13. Expresión de vimentina en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con ATTR.** (A) Análisis por Western blot y (B) por densitometría de la expresión de vimentina en lisados totales de células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR (0, 50 ó 100 nM). Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos individuales.  $**P < 0.01$  TB 0 nM contra el grupo control 0 nM;  $*P < 0.05$  TB 0 nM contra el TB 100 nM y  $**P < 0.01$  TA 0 nM contra el TA 100 nM. ATTR, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

### 8.8 Disminución de la marca para la $\alpha$ -AML en cultivos de los TB y de los TA debido al ATTR

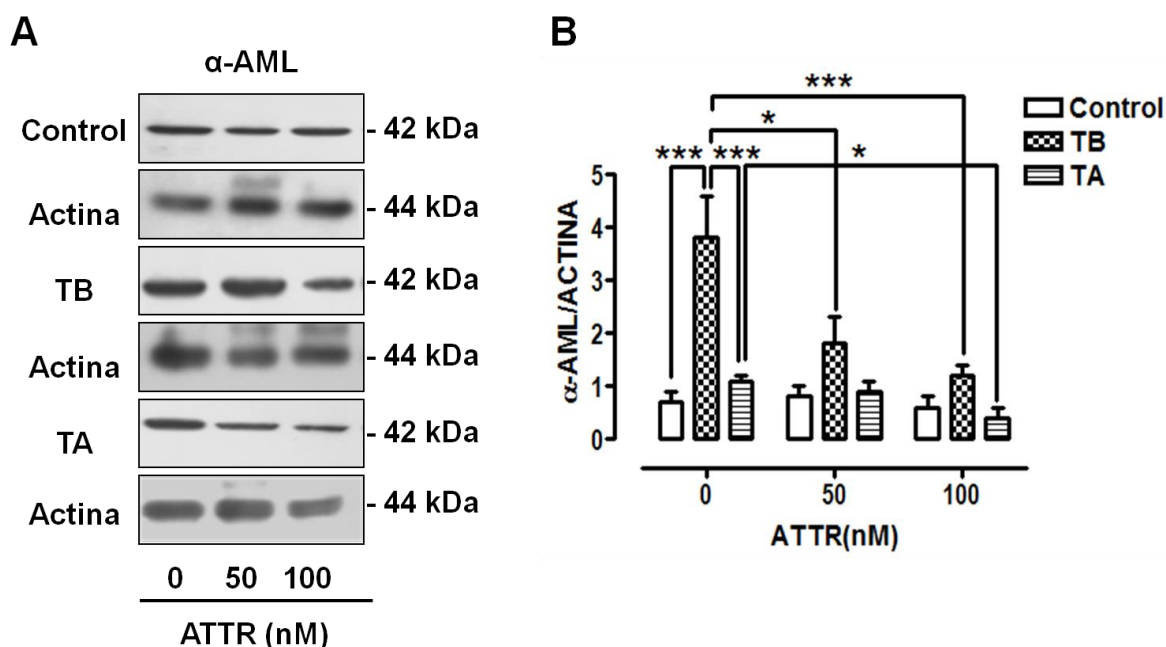
En los cultivos control, no se observó marca para la  $\alpha$ -AML (Fig. 14, panel a). En contraste, los cultivos de los TB (Fig. 14, panel d) y de los TA (Fig. 14, panel g) son positivos para la  $\alpha$ -AML, siendo la marca más intensa en el TB. El tratamiento con ATTR (50 ó 100 nM) disminuyó la expresión de la  $\alpha$ -AML en el TB (Fig. 14, paneles e y f) y en el TA (Fig. 14, paneles h y i) de una manera dependiente de la concentración.



**Figura 14. Análisis por inmunofluorescencia de  $\alpha$ -AML en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratadas con ATTR.** Monocapas de células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR (0, 50 ó 100 nM). Las células se marcaron con anti- $\alpha$ -AML (rojo) y con ToPro-3 (azul) para marcar los núcleos. Imágenes representativas de tres experimentos individuales. Barra=50  $\mu$ m. ATRA, ácido todo *trans* retinoico;  $\alpha$ -AML,  $\alpha$ -actina del músculo liso; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

## 8.9 Disminución de la expresión de la $\alpha$ -AML en cultivos de los TB y de los TA debido al ATTR

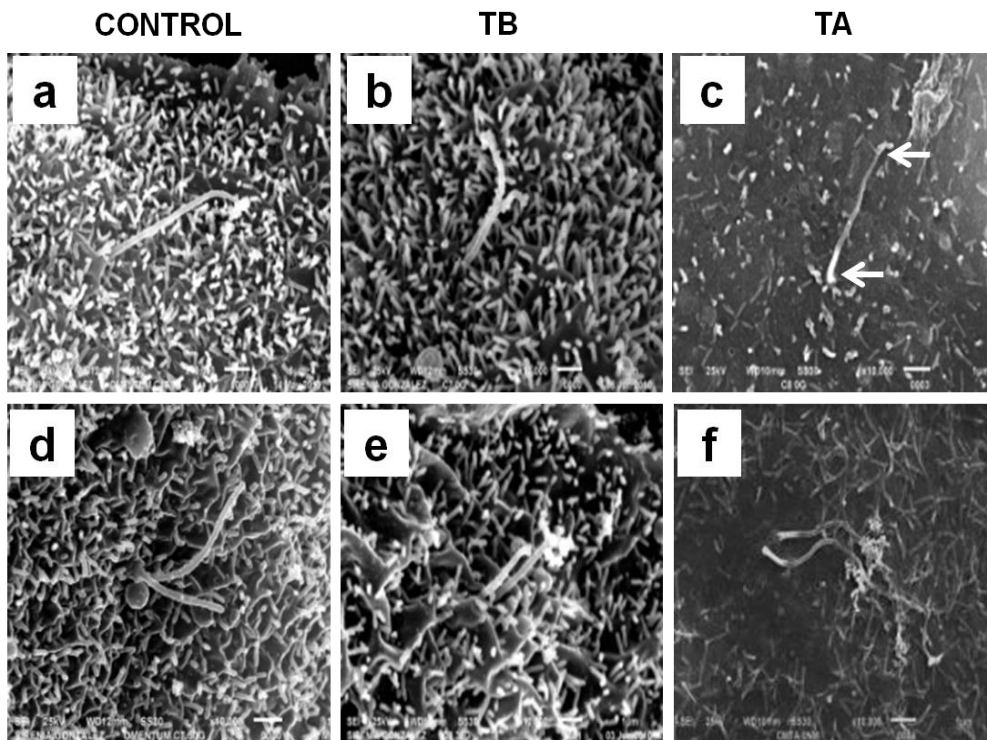
En condiciones basales, la expresión de la  $\alpha$ -AML se encuentra significativamente aumentada en el TB comparado con el grupo control y con el TA (Fig. 15A y 15B). El tratamiento con ATTR disminuyó la expresión de la  $\alpha$ -AML en el TB de una manera dependiente de la concentración (Fig. 15B), mientras que en el TA también se observó una reducción en la expresión de la  $\alpha$ -AML, pero solo con la concentración de 100 nM de ATTR (Fig. 15B).



**Figura 15. Expresión de la  $\alpha$ -AML en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con ATTR.** (A) Análisis por Western blot y por (B) densitometría de la expresión de la  $\alpha$ -AML en lisados totales de células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR (0, 50 ó 100 nM). Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos individuales. \*\*\* $P < 0.001$  TB 0nM contra control 0 nM; \*\*\* $P < 0.001$  TB 0 nM contra TA 0 nM; \* $P < 0.05$  TB 0 nM contra TB 50 nM y \*\*\* $P < 0.001$  TB 0 nM contra TB 100 nM; \* $P < 0.05$  TA 0 nM contra TA 100 nM. ATRA, ácido todo *trans* retinoico;  $\alpha$ -AML,  $\alpha$ -actina del músculo liso; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

### 8.10 La morfología del cilio se encuentra alterada en las células de los TA

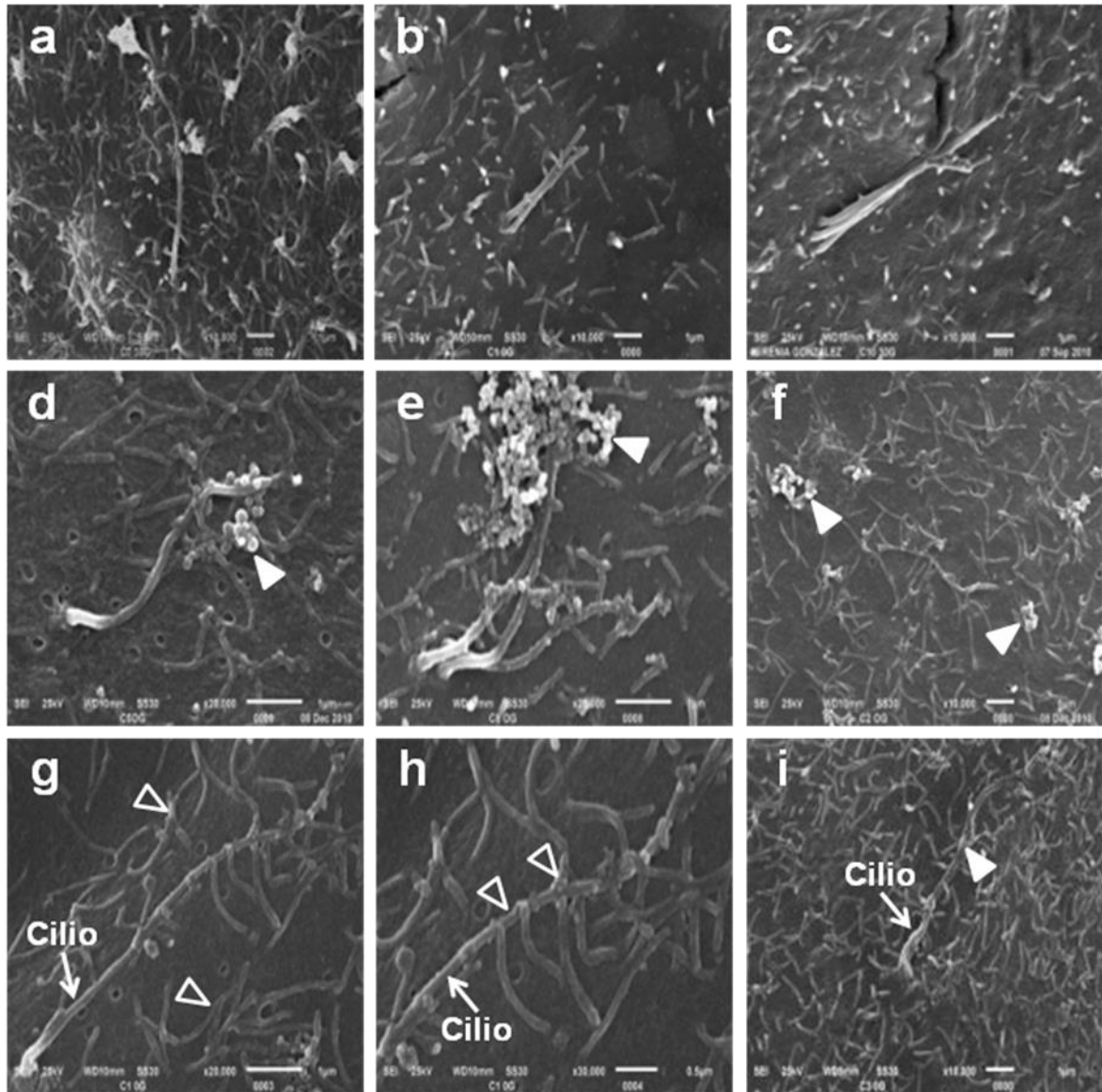
En los cultivos control (Fig.16, paneles a y d), TB (Fig.16, paneles b y e) y TA (Fig. 16, paneles c y f), se observaron células con uno o dos cilios. En el control (Fig. 16, panel a) y en el TB (Fig. 16, panel b), el cilio presenta una morfología cilíndrica y un grosor continuo desde la base hacia la punta, mientras que en el TA se observa un adelgazamiento del cilio desde la base hacia la punta (Fig. 16, panel c, flechas).



**Figura 16. Morfología del cilio en células mesoteliales de pacientes en diálisis con TB o TA.** Células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA. Imágenes representativas de tres experimentos. MEB, 10,000X, barra=1  $\mu$ m. TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

En los cultivos de los TA, además de células con uno (Fig. 17a) o dos cilios (Fig. 17b), se observó la presencia de células con tres cilios (Fig. 17c). En la mayoría de las células multiciliadas de los TA, las puntas de los cilios parecen estar fusionadas (Fig. 17c). En adición, en algunas de las células de los TA, la punta del cilio se encuentra rodeada por estructuras redondas como “perlas” (Fig. 17d, cabeza de flecha), las cuales en algunos cilios llegan a ser abundantes (Fig. 17e). Estas “perlas” también se llegan a observar en regiones periféricas al cilio (Fig. 17f). Además, las células de los TA exhiben unas estructuras, parecidas a las microvellosidades, las cuales están fusionadas a la membrana (Fig. 17g, cabeza

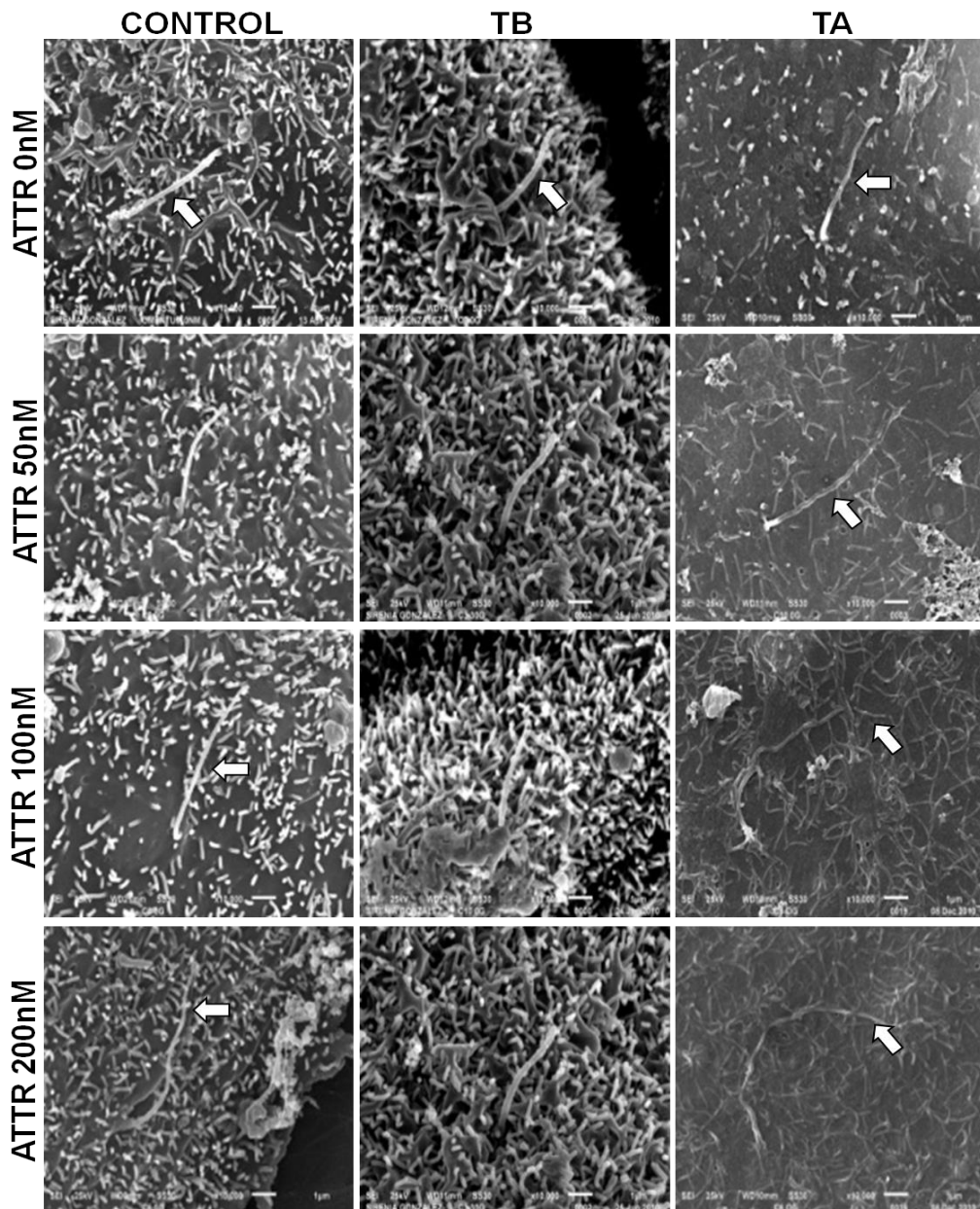
de flecha vacía). En algunas células, estas estructuras rodean al cilio formando ramificaciones (Fig. 17h, cabezas de flecha vacías). En adición, en los cultivos de los TA se encontró con frecuencia células en las que el cilio se encuentra fusionado a la membrana (Fig. 17i).



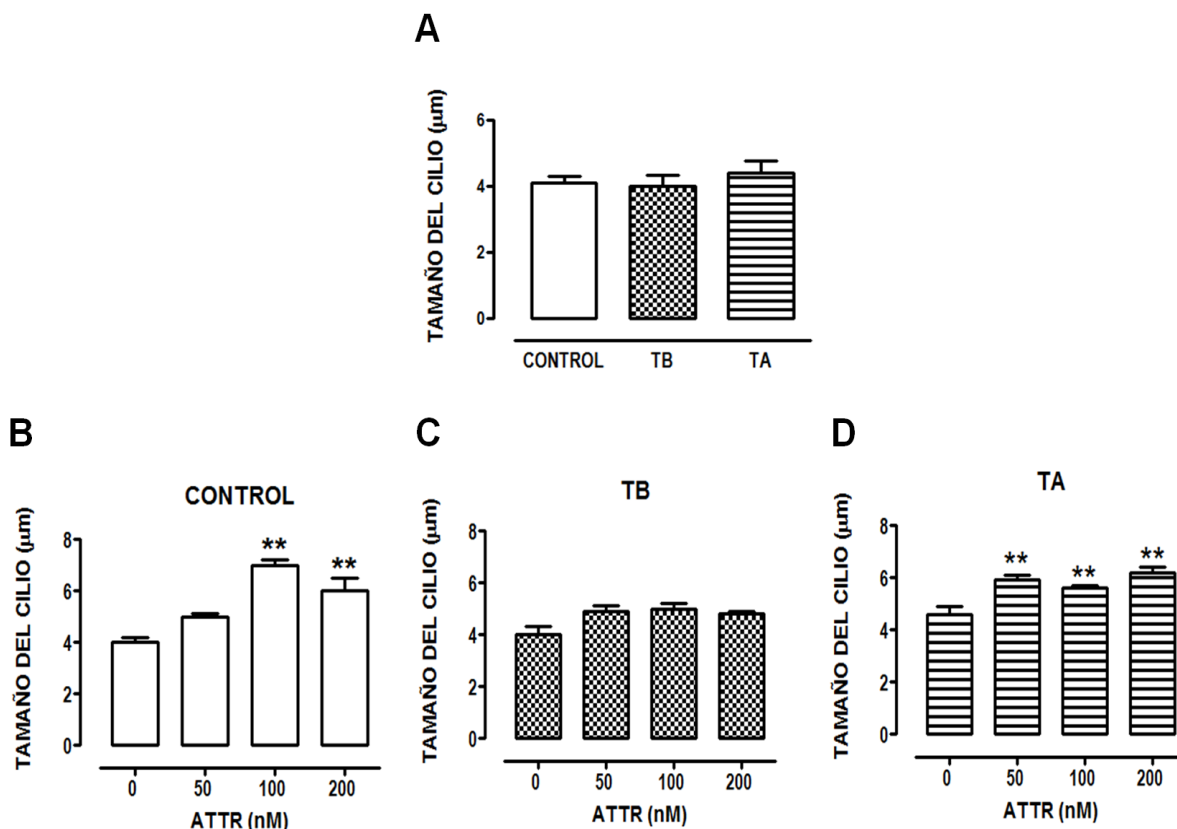
**Figura 17. Alteraciones en la morfología del cilio en células mesoteliales de TA.** Células mesoteliales del efluente de diálisis de pacientes con TA. Imágenes representativas de tres experimentos. MEB. Imágenes tomadas a 10,000X (paneles a, b, c, f y i), a 20,000X (paneles d, e y g) y a 30,000X (panel h), barra= 1 μm. TA, transportador alto.

### 8.11 Aumento del tamaño del cilio en células mesoteliales control y de TA por medio del ATTR

No se observó diferencias en el tamaño del cilio entre las células del grupo control, TB y TA (Fig. 18 y Fig. 19A). El ATTR aumentó el tamaño del cilio en las células control (Fig. 18 y Fig. 19B) y en las células de los TA (Fig. 18 y Fig.19D). En el TA, este efecto se observó a partir de la concentración de 50 nM de ATTR, mientras que en el control, es con la concentración de 100 nM de ATTR. En el TB, el tratamiento con ATTR no modificó el tamaño del cilio (Fig. 19C).



**Figura 18. MEB del cilio de células mesoteliales control, TB y TA tratadas con el ATTR.** Células mesoteliales derivadas del omentum (control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB y TA, en presencia de ATTR 0, 50,100 ó 200 nM. MEB, 10,000X, barra= 1μm. Imágenes representativas de tres experimentos. TA, transportador alto; TB, transportador bajo y ATTR, ácido todo *trans* retinoico.

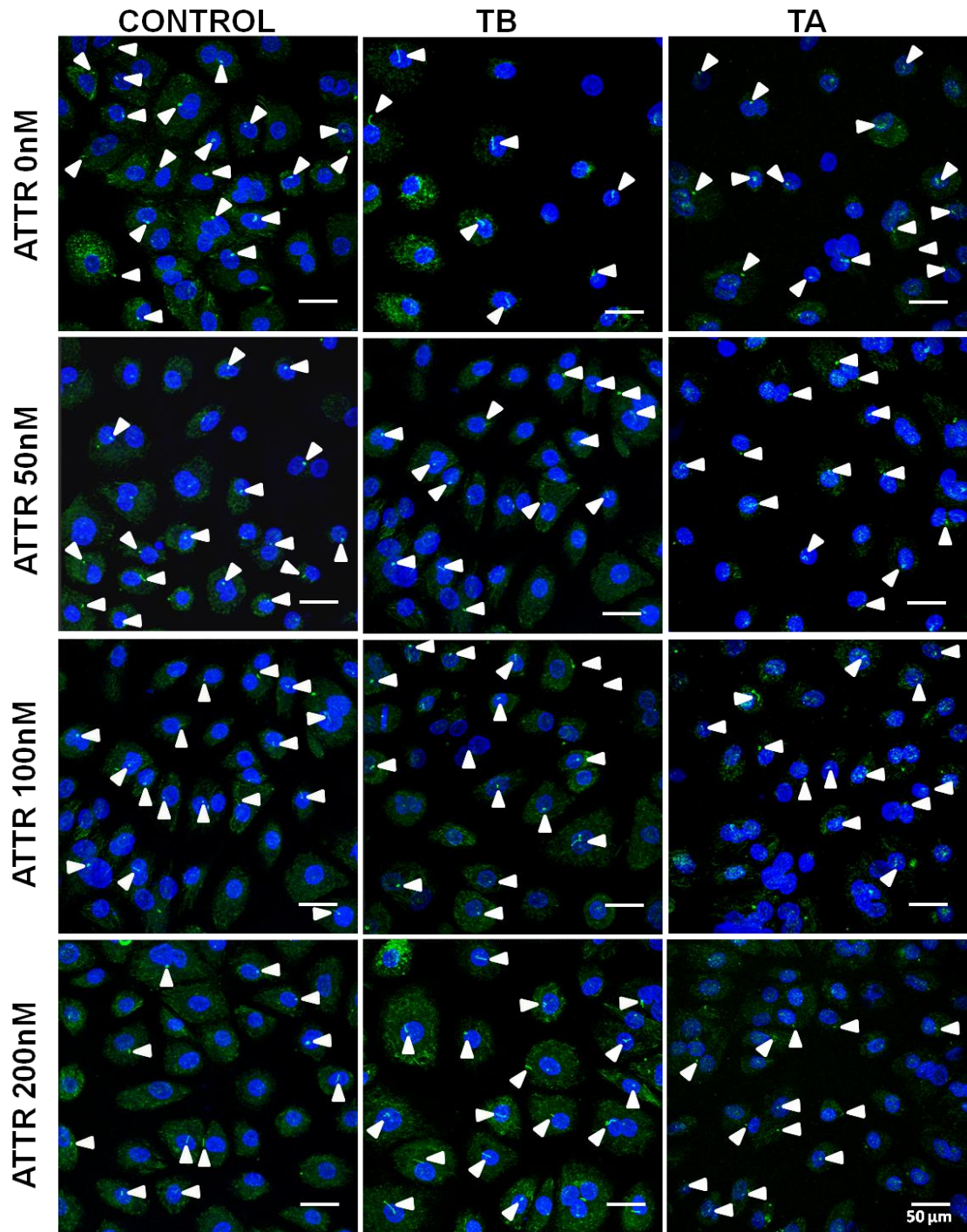


**Figura 19. Tamaño del cilio en cultivos de células mesoteliales de TB o TA tratados con el ATTR.** Medición del tamaño del cilio en células mesoteliales control y en células mesoteliales derivadas del efluente de diálisis de pacientes con TB y TA, en condiciones basales **(A)** y presencia de ATTR 0, 50, 100 ó 200 nM **(B-D)**. Se muestran la media  $\pm$  ESM de tres experimentos individuales. **(B)**  $**P < 0.01$  control 100 nM y 200 nM de ATTR contra control 0 nM. **(D)**  $**P < 0.01$  TA 50, 100 y 200 nM de ATTR contra TA 0 nM. ATTR, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

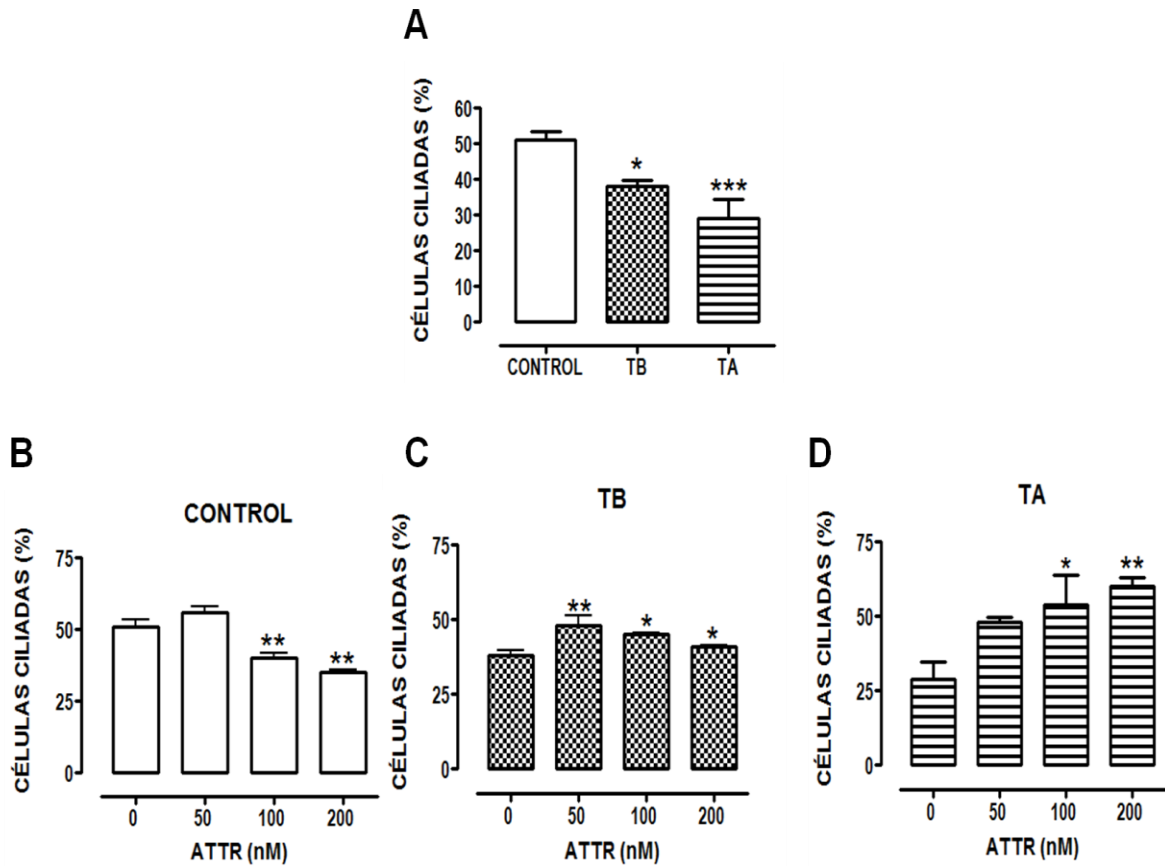
### 8.12 Aumento del número de células ciliadas en los cultivos de TB y de TA mediado por el ATTR

En comparación con el grupo control, los cultivos de los TB y de los TA mostraron una reducción en el porcentaje de las células ciliadas (Fig. 20 y Fig. 21A). El tratamiento con ATTR aumentó el número de células ciliadas en los cultivos de los TB (Fig. 20 y Fig. 21C) y de los TA (Fig. 20 y Fig. 21D), siendo más evidente en el TA. En contraste, en los cultivos control, el ATTR disminuyó el porcentaje de células ciliadas (Fig. 20 y Fig. 21B).





**Figura 20. Inmunofluorescencia para  $\alpha$ -tubulina acetilada en células mesoteliales de TB y de TA tratadas con el ATTR.** Monocapas de células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR (0, 50 ó 100 nM). Las células se marcaron con  $\alpha$ -tubulina acetilada (verde), un componente del cilio, y con ToPro-3 (azul), para marcar los núcleos. Imágenes representativas de tres experimentos individuales. Barra=50  $\mu$ m. ATRA, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

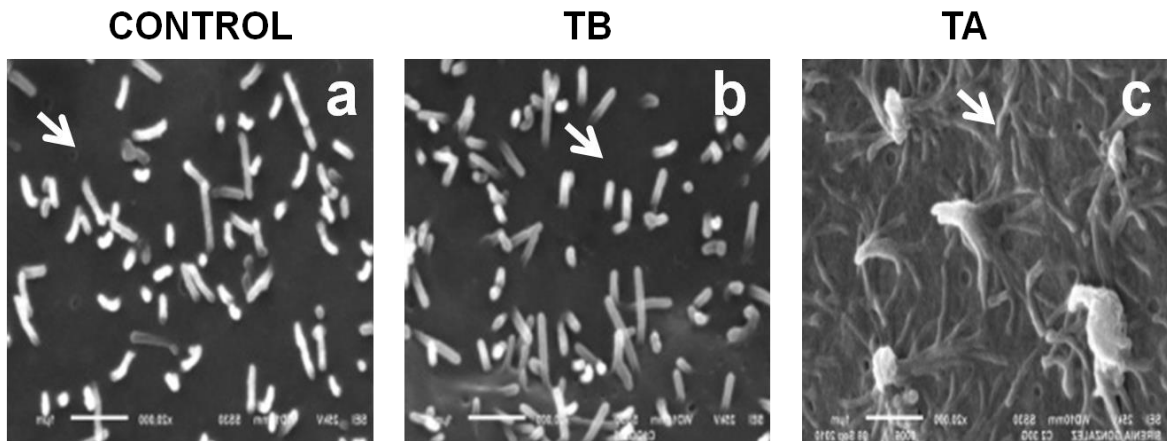


**Figura 21. Porcentaje de células ciliadas en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con ATTR.** Cuantificación del número de células ciliadas en cultivos de células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA en condiciones basales **(A)** y en presencia de ATTR 0, 50, 100 ó 200 nM **(B-D)**. Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos individuales. **(A)** \* $P < 0.05$  TB contra control; \*\*\* $P < 0.001$  TA contra control. **(B)** \*\* $P < 0.01$  control 100 y 200 nM de ATTR contra control 0 nM. **(C)** \*\* $P < 0.01$  TB 50 nM de ATTR contra control 0 nM; \* $P < 0.05$  TB 100 y 200 nM de ATTR contra TB 0 nM. **(D)** \* $P < 0.05$  TA 100 nM de ATTR contra TA 0 nM; \*\* $P < 0.01$  TA 200 nM de ATTR contra TA 0 nM. ATTR, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

### 8.13 La morfología de las microvellosidades se encuentra alterada en las células de los TA

Las microvellosidades en las células control se observan como estructuras cilíndricas e individuales (Fig. 22, panel a). Las microvellosidades en el TB

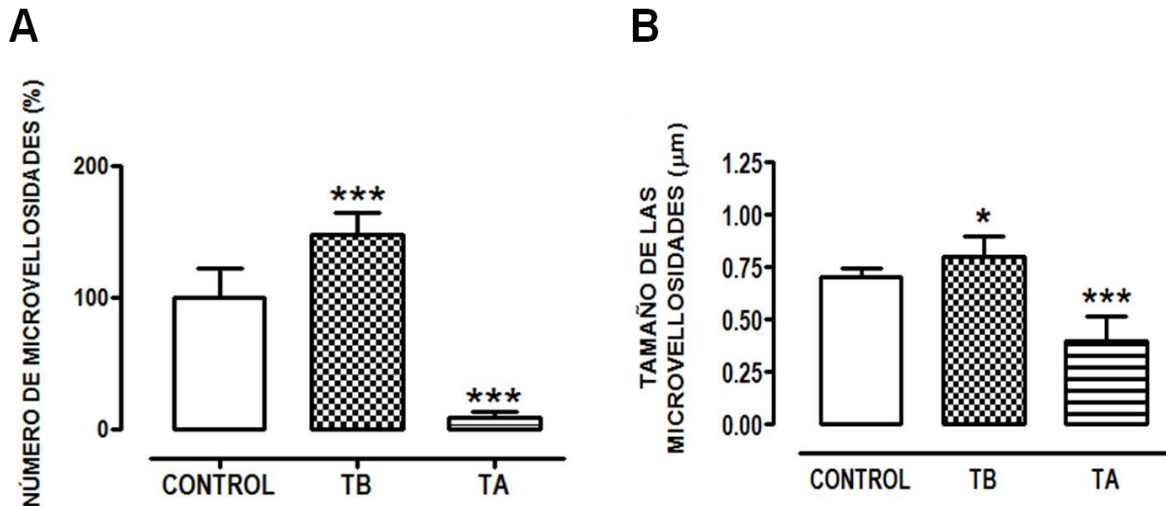
mostraron el mismo patrón descrito en el grupo control (Fig. 22, panel b). En contraste, en las células de los TA, las microvellosidades se encuentran fusionadas formando protrusiones (Fig. 22, panel c). Además, en las células de los TA, la membrana tiene una apariencia rugosa (Fig. 22, panel c, flecha), mientras que en las células del grupo control y de los TB, la membrana exhibe una apariencia lisa (Fig. 22, paneles a y b, flecha).



**Figura 22. Morfología de las microvellosidades en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA.** Células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB y TA. MEB, 20,000X, barra=1  $\mu$ m. TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

#### **8.14 Reducción significativa en el número y tamaño de las microvellosidades de las células mesoteliales de los TA**

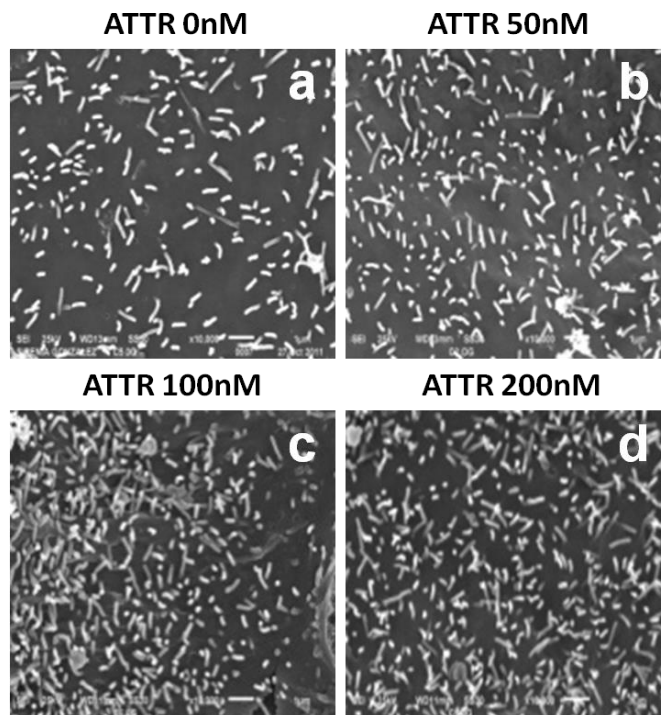
En condiciones basales, las microvellosidades de las células de los TB son más abundantes (48 %) (Fig. 23A) y más largas (Fig. 23B) comparadas con el grupo control. En contraste, las células de los TA exhiben una reducción del 91 % en el número de sus microvellosidades (Fig. 23A) y una reducción significativa en el tamaño de estas estructuras (Fig. 23B) comparadas con el grupo control.



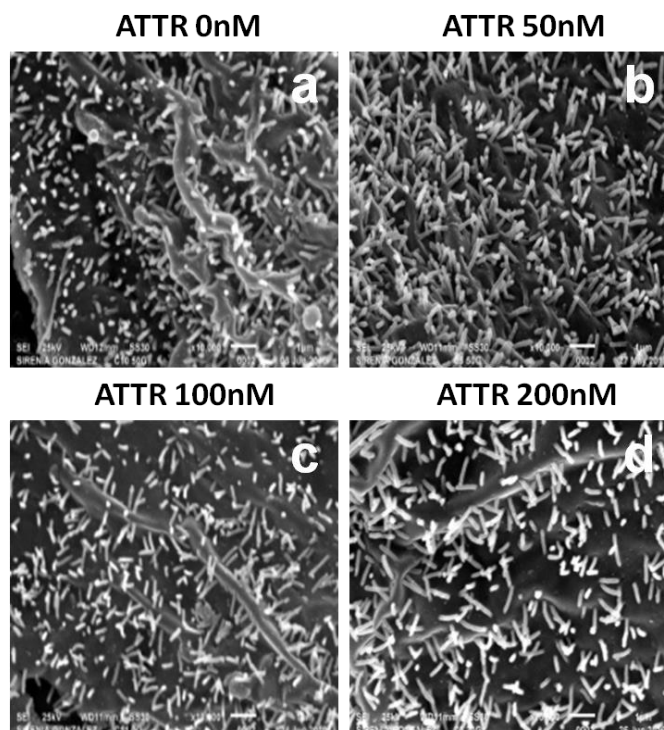
**Figura 23. Tamaño y número de microvellosidades en células mesoteliales de TB y TA.** Células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA. **(A)** Cuantificación del número de microvellosidades y **(B)** medición del tamaño de las microvellosidades. Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos. **(A)** \*\*\* $P < 0.001$  TB contra control; \*\*\* $P < 0.001$  TA contra control. **(B)** \* $P < 0.05$  TB contra control; \*\*\* $P < 0.001$  TA contra control. ATTR, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

### 8.15 Aumento en el número y en el tamaño de las microvellosidades de células mesoteliales control y de TB por medio del ATTR

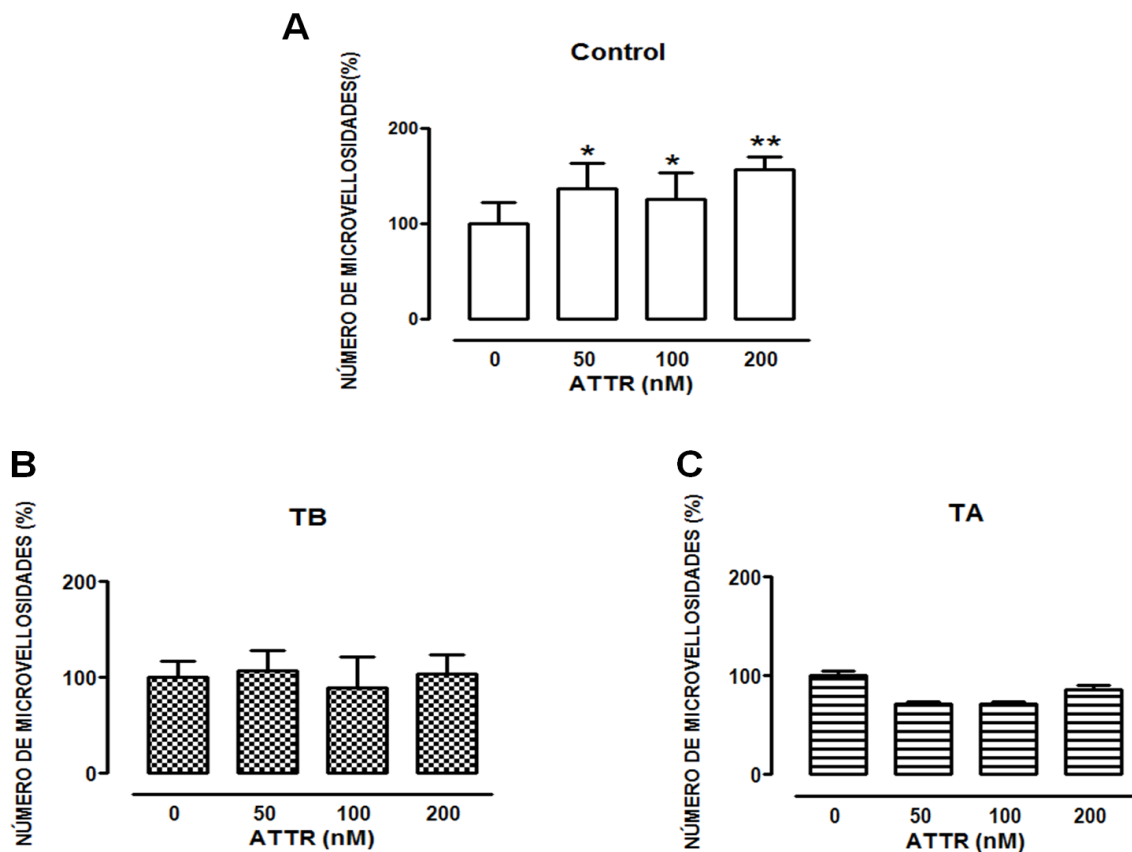
El tratamiento con ATTR aumentó el número de microvellosidades en las células control (Fig. 24 y Fig. 26A), mientras que en las microvellosidades de las células de los TB (Fig. 26B) y de los TA (Fig. 26C), el ATTR no se observó ningún efecto. En cuanto al tamaño de las microvellosidades, el ATTR incrementó el tamaño de las microvellosidades en las células de los TB (Fig. 25 y Fig. 27B). En las células control y en las células de los TA (Fig. 27A y Fig. 27C), el ATTR no modificó el tamaño de las microvellosidades.



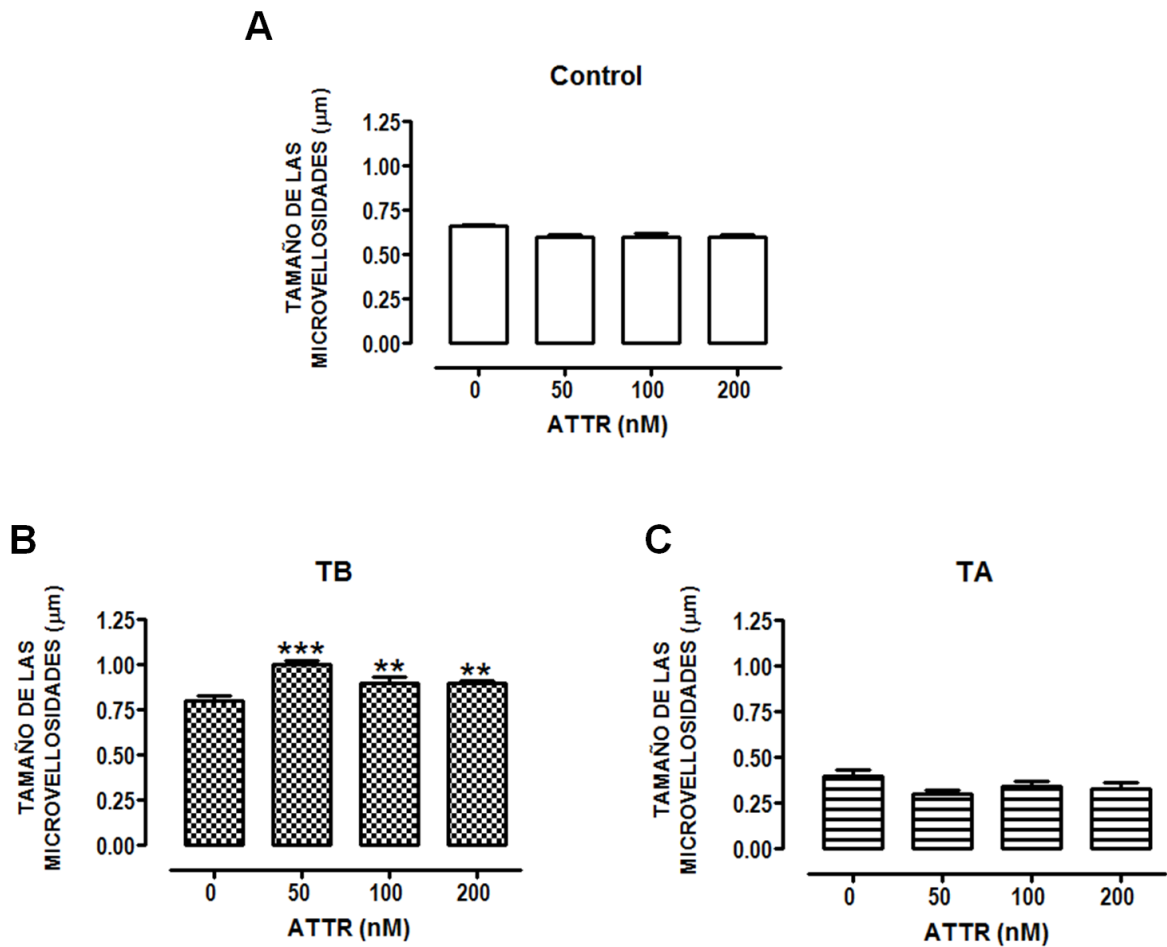
**Figura 24. El ATTR aumentó el número de microvellosidades en las células control.** MEB de células mesoteliales derivadas del omentum tratadas con ATTR 0, 50, 100 ó 200 nM hasta confluencia. 10,000X, barra=1  $\mu$ m. ATTR, ácido todo *trans* retinoico.



**Figura 25. El ATTR aumentó el tamaño de las microvellosidades en las células de los TB.** MEB de células mesoteliales de TB tratadas con ATTR 0, 50, 100 ó 200 nM hasta confluencia. 10,000X, barra=1  $\mu$ m. ATTR, ácido todo *trans* retinoico.



**Figura 26. Efecto del ATTR en el número de microvellosidades en células mesoteliales de TA y TB.** Medición del tamaño de las microvellosidades en células mesoteliales control **(A)** o del efluente de diálisis de pacientes con TB **(B)** y TA **(C)** cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR 0, 50, 100 ó 200 nM. Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos. **(A)**  $*P < 0.05$  Control 50 y 100 nM de ATTR contra control 0 nM;  $**P < 0.01$  control 100 nM de ATTR contra control 0 nM. ATTR, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA, transportador.

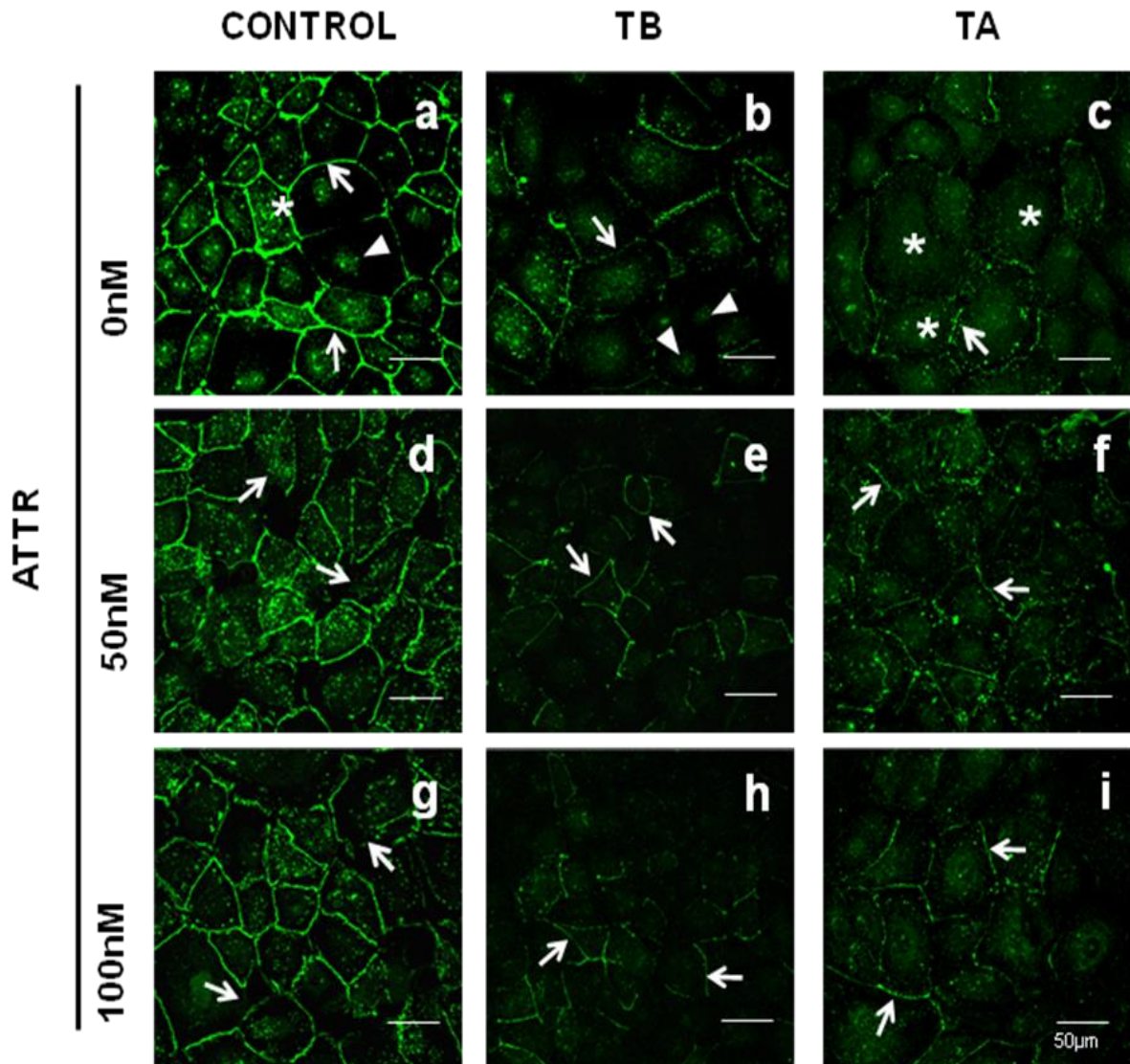


**Figura 27. Efecto del ATTR en el tamaño de las microvellosidades en células mesoteliales de TB y TA.** Medición del tamaño de las microvellosidades en células mesoteliales control (**A**) o del efluente de diálisis de pacientes con TB (B) y TA (**C**) cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR 0, 50, 100 ó 200 nM. Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos. (**B**) \*\*\* $P < 0.001$  TB 50 nM de ATTR contra TB 0 nM; \*\* $P < 0.01$  TB 100 y 200 nM de ATTR contra TB 0 nM. ATTR, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

### 8.16 Mejoramiento de la organización de la claudina-1 en el borde celular en el TB y en el TA por medio del ATTR

En las células mesoteliales control (Figura 28, panel a), la claudina-1 se localizó en el borde celular (flechas), mostrando el típico patrón de “malla de gallinero”, en el citosol (asterisco) y en el núcleo (cabeza de flecha). En el TB (Figura 28, panel b), se observó fluorescencia en el núcleo (cabezas de flecha) y también en el borde celular, siendo ésta débil y discontinua (flecha). En el TA (Figura 28, panel

c), la marca para la claudina-1 en el borde celular fue débil y discontinua (flecha) y también se observó claudina-1 en la región citosólica (asteriscos). En los cultivos control, el tratamiento con ATTR 50 y 100 nM (Figura 28, paneles d y g, respectivamente) deslocalizó a la claudina-1 del borde celular (flechas). Mientras que en el TB (Figura 28, paneles e y h) y en el TA (Figura 28, paneles f y i), el ATTR mejoró la localización de la claudina-1 en la UE (flechas), siendo más evidente con la concentración de 100 nM (panel h y panel i, respectivamente).

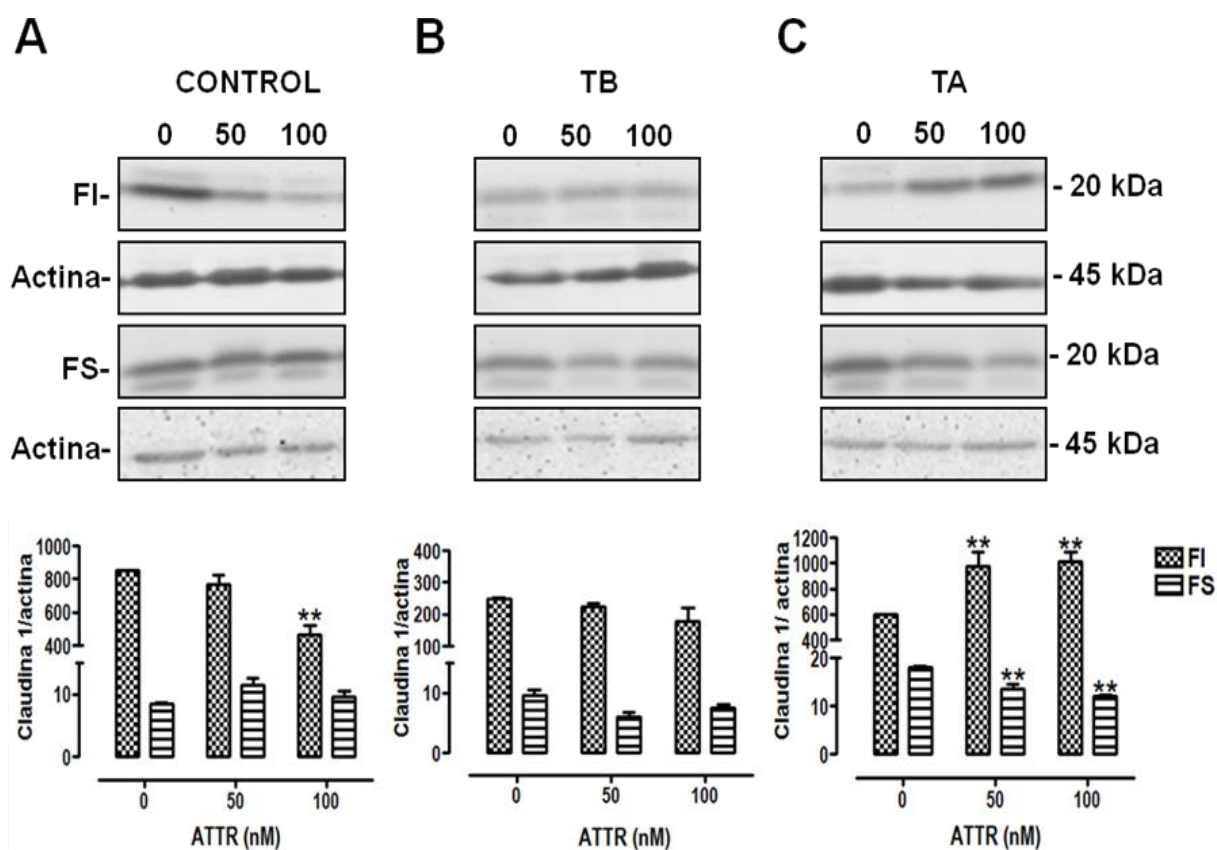


**Figura 28. Distribución de la claudina-1 en células mesoteliales de TB y de TA tratadas con ATTR.** Inmunofluorescencia para la claudina-1 en células mesoteliales derivadas del omentum (control) o derivadas del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR 0, 50 ó 100 nM. Imágenes representativas de tres experimentos. Barra= 50 µm. ATTR, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA; transportador alto.



### 8.17 Aumento de la expresión de la claudina-1 en los cultivos de TA debido al ATTR

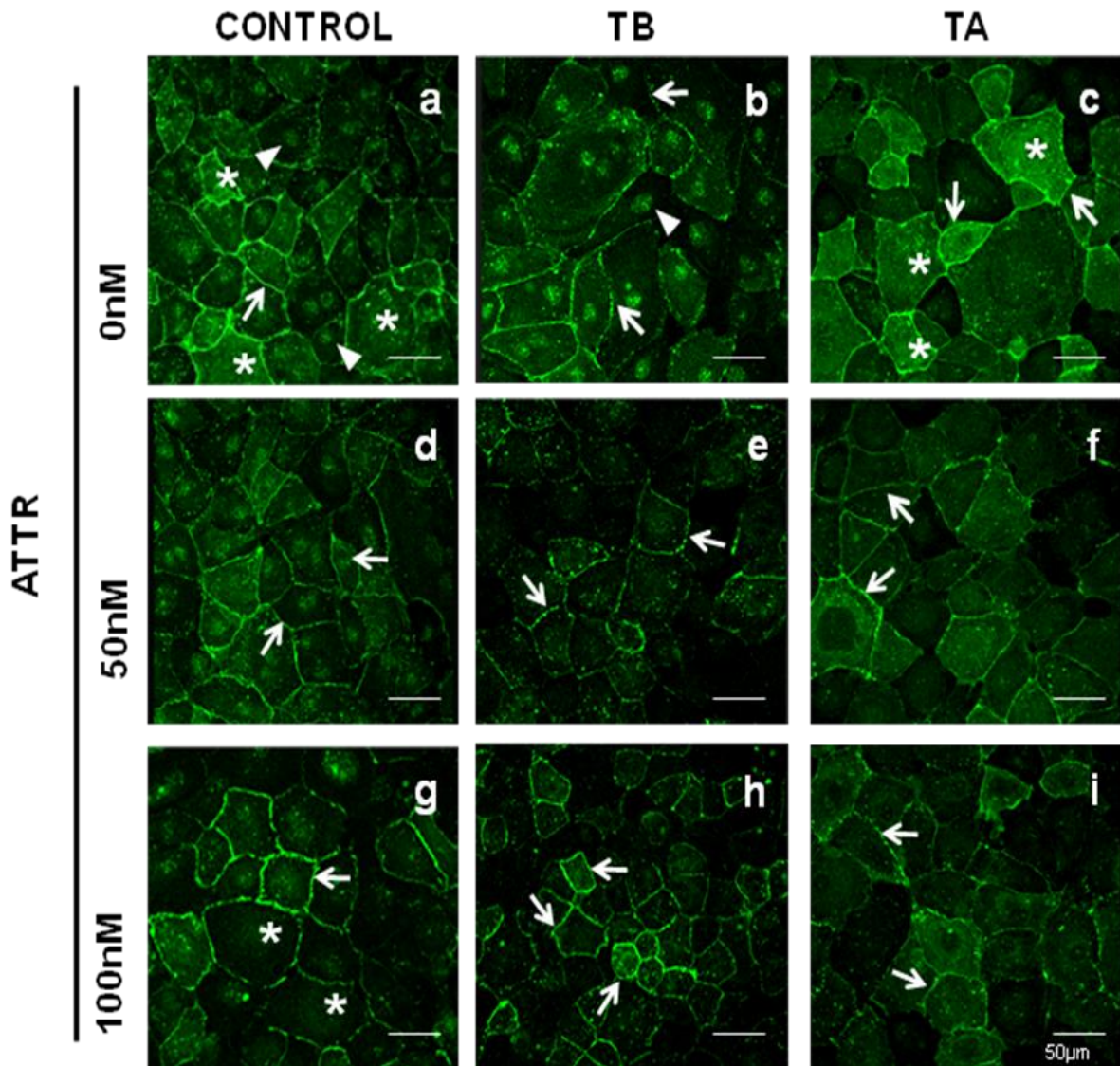
En condiciones basales, las células de los TB (Fig. 29B) y de los TA (Fig. 29C) exhiben una disminución en el contenido de la claudina-1 en la fracción insoluble o fracción membranal ( $250 \pm 3.1$  y  $595 \pm 0.4$ , respectivamente), comparados con el grupo control ( $851 \pm 4.0$ ) (Fig. 29A). En los cultivos control, el tratamiento con 100 nM de ATTR disminuyó la cantidad de la claudina-1 en la fracción insoluble, sin cambios en la cantidad de la claudina-1 en la fracción soluble o fracción citosólica (Fig. 29A). En contraste, en las células de los TA, el ATTR aumentó el contenido de la claudina-1 en la fracción insoluble, el cual fue acompañado de una reducción en el contenido de esta proteína en la fracción soluble (Fig. 29C). En el TB, el ATTR no modificó el contenido de claudina-1 en ninguna de las fracciones.



**Figura 29. Expresión de la claudina-1 en cultivos de células mesoteliales de TB y de TA tratados con ATTR.** Análisis por Western blot de la claudina-1 en la fracción insoluble o membranal (FI, barras a cuadros) y en la fracción soluble o citosólica (FS, barras a rayas) de células mesoteliales control (A), TB (B) y TA (C) cultivadas con ATTR 0, 50 ó 100 nM hasta la confluencia. Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos individuales. (A)  $**P < 0.01$  control FI con 100 nM de ATTR contra control FI 0 nM. (C)  $**P < 0.01$  TA FI con 50 ó 100 nM de ATTR contra TA FI 0 nM;  $**P < 0.01$  TA FS con 50 ó 100 nM de ATTR contra TA FS 0 nM.

### **8.18 Mejoramiento de la organización de la ocludina en el borde celular de células mesoteliales de TB y TA mediado por el ATTR**

En los cultivos control (Figura 30, panel a), la ocludina mostró una fina distribución a lo largo del borde celular (flecha). También se pudo observar marca en la región citosólica (asteriscos) y en la región nuclear (cabezas de flecha). En el TB (Figura 30, panel b), la fluorescencia para la ocludina en la UE fue débil y mostró un patrón discontinuo (flechas). Al igual que en el grupo control, en el TB también se observó marca de la ocludina en el núcleo (cabeza de flecha). Mientras que en el TA (Figura 30, panel c), la ocludina se observó en el borde celular (flechas) y, abundantemente, en la región citoplasmática de algunas células (asteriscos). En las células control, el tratamiento con ATTR no modificó la localización de la ocludina en la UE (Fig. 30, paneles d y g, flechas), mientras que con la concentración de 100 nM de ATTR se observó una disminución de la ocludina en la región citoplasmática (Fig. 30, panel g, asteriscos). En las células de los TB (Figura 30, paneles e y h) y en las células de los TA (Fig. 30, paneles f y i), el ATTR mejoró la localización de la ocludina en el borde celular (flechas).

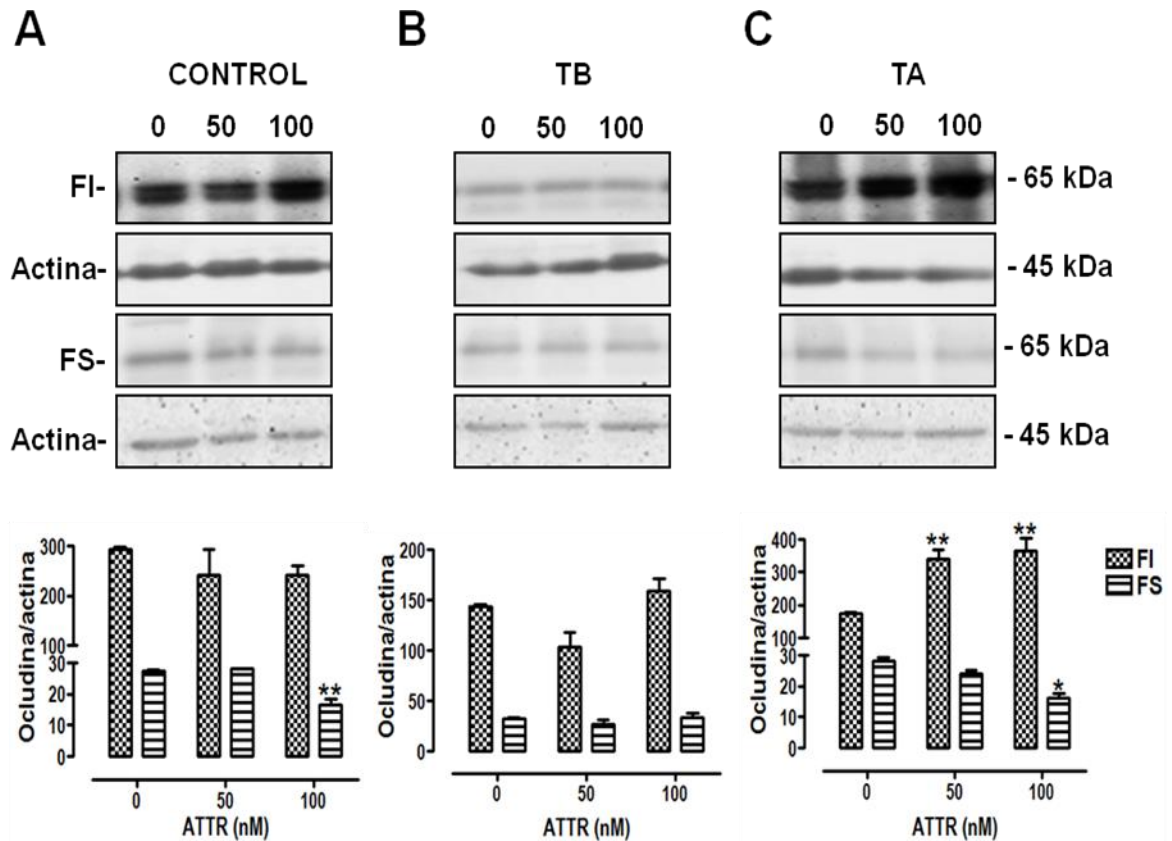


**Figura 30. Distribución de la ocludina en células mesoteliales de TB y TA tratadas con ATTR.** Inmunofluorescencia para la ocludina en células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o derivadas del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR 0, 50 y 100 nM. Imágenes representativas de tres experimentos individuales. Barra= 50 µm. ATTR, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA; transportador alto.

### 8.19 Aumento de la expresión de la ocludina en células mesoteliales de TA tratadas con ATTR

En condiciones basales, las células de los TB (Fig. 31B) y de los TA (Fig. 31C) exhiben una disminución en el contenido de la ocludina en la fracción insoluble o fracción membranal ( $144 \pm 1.7$  y  $176 \pm 2.7$ , respectivamente), comparados con el grupo control ( $294 \pm 3.7$ ) (Fig. 31A). En los cultivos control, el tratamiento con 100

nM de ATTR disminuyó la cantidad de la ocludina en la fracción soluble o citosólica (Fig. 31A). En las células de los TA, la concentración de 50 y 100 nM de ATTR incrementó el contenido de la ocludina en la fracción insoluble (Fig. 31C). En el TB, el ATTR no modificó el contenido de la ocludina en ninguna de las fracciones.

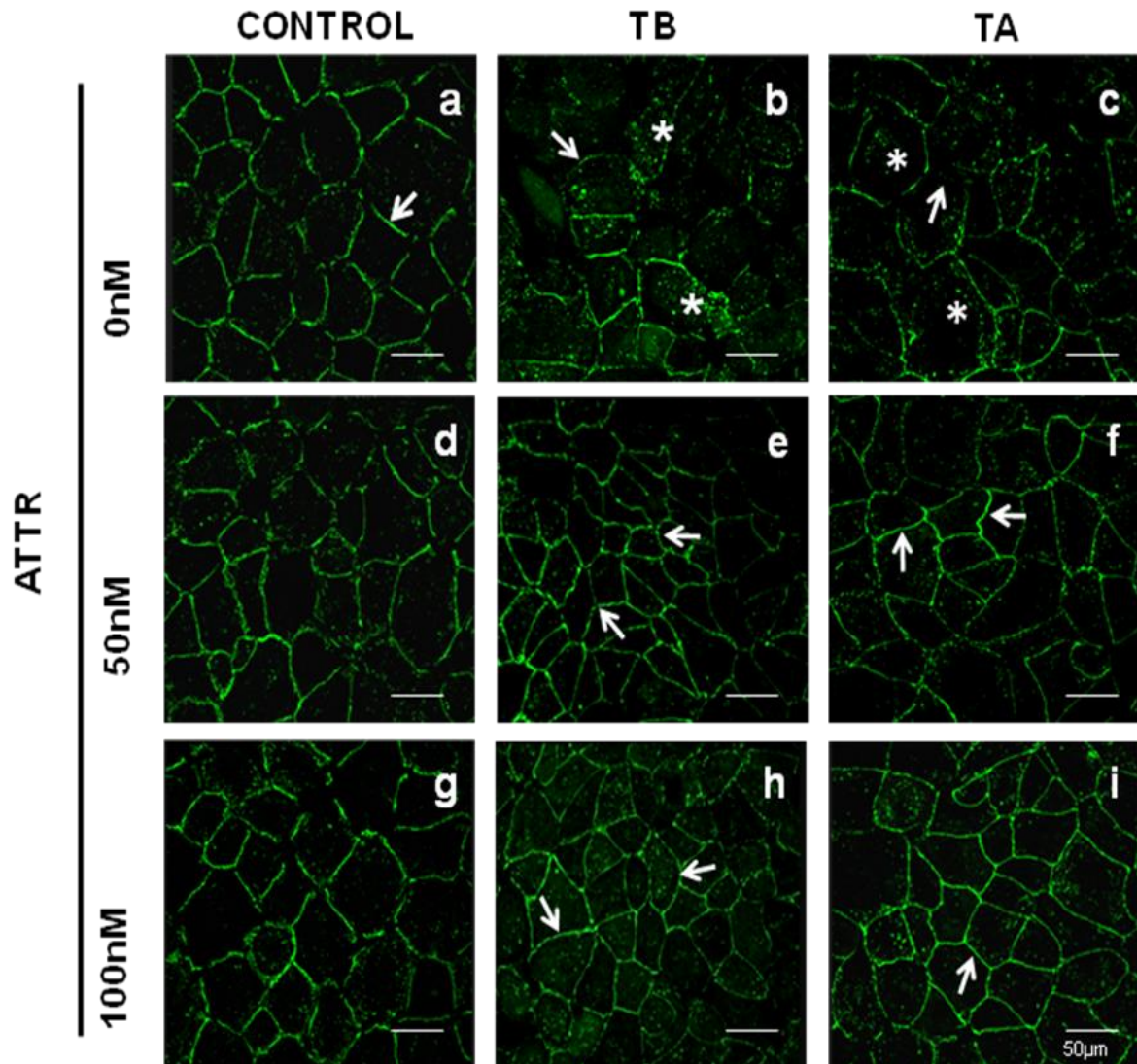


**Figura 31. Expresión de la ocludina en células mesoteliales de TB y TA tratadas con ATTR.** Análisis por Western blot para la ocludina en la FI (barras a cuadros) y en la FS (barras a rayas) de células mesoteliales control (A), TB (B) o TA (C) cultivadas con ATTR 0, 50 ó 100 nM hasta la confluencia. Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos individuales. (A)  $*P < 0.05$  control FS con 100 nM de ATTR contra control FS 0 nM. (C)  $**P < 0.01$  TA FI con 50 ó 100 nM de ATTR contra TA FI 0 nM. FI, fracción insoluble o membranal; FS, fracción soluble o citosólica; TB, transportador bajo; TA, transportador alto; ATTR, ácido todo *trans* retinoico.

## 8.20 Mejoramiento de la distribución de la ZO-1 en el borde celular de células mesoteliales de TB y TA por medio del ATTR

En las células control, la ZO-1 se observó en el borde celular mostrando un patrón lineal y continuo (Figura 32, panel a, flecha). En las células obtenidas del efluente

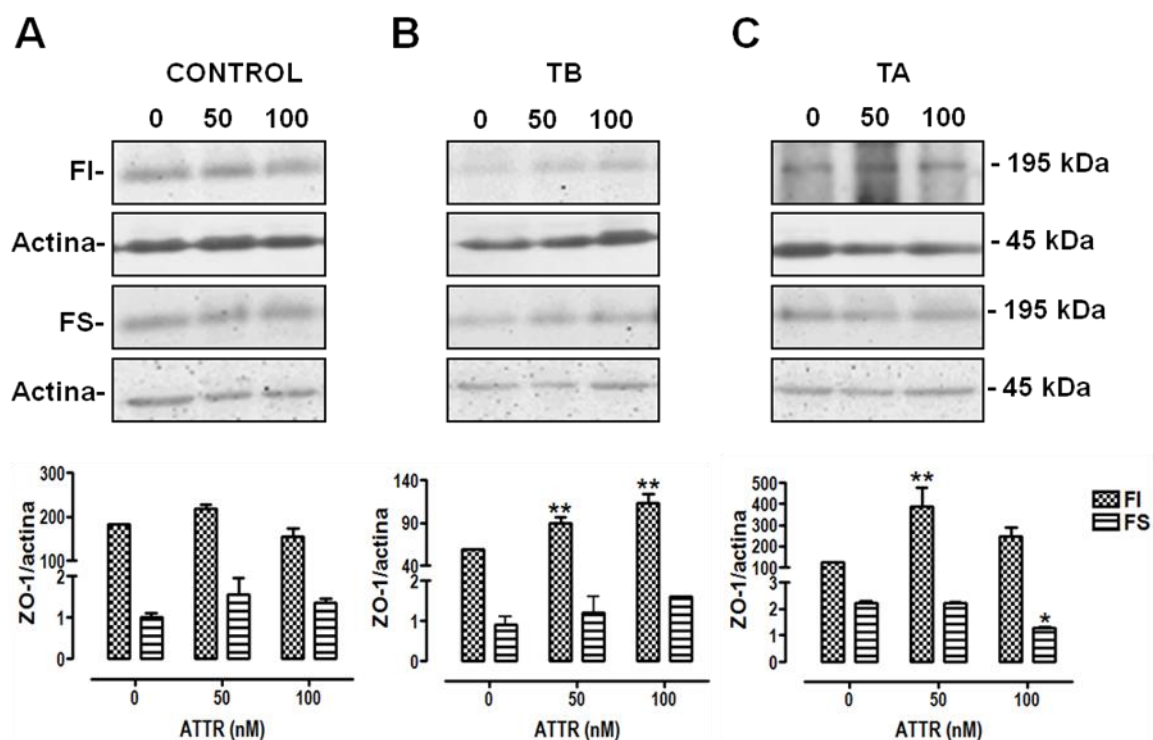
de diálisis de TB y TA (Figura 32, paneles b y c, respectivamente), se observó una disminución en la fluorescencia para la ZO-1 en la UE (flecha) comparadas con el grupo control, siendo más evidente en el TB. En los cultivos de TB y TA también se observó marca para ZO-1 en la región citosólica (asteriscos). El tratamiento con ATTR no modificó el patrón descrito para ZO-1 en el grupo control (Figura 32, paneles d y g). En contraste, en el TB (Figura 32, paneles e y h, flechas) y en el TA (Figura 32, paneles f y i, flechas), el ATTR mejoró la localización de la ZO-1 en el borde celular.



**Figura 32. Distribución de la ZO-1 en cultivos de células mesoteliales de TB y TA tratados con ATTR.** Inmunofluorescencia para la ZO-1 en células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o derivadas del efluente de diálisis de TB o de TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR 0, 50 ó 100 nM. Imágenes representativas de tres experimentos. Barra= 50 µm.

## 8.21 Aumento de la expresión de la ZO-1 en cultivos de células mesoteliales de TB y TA por el ATTR

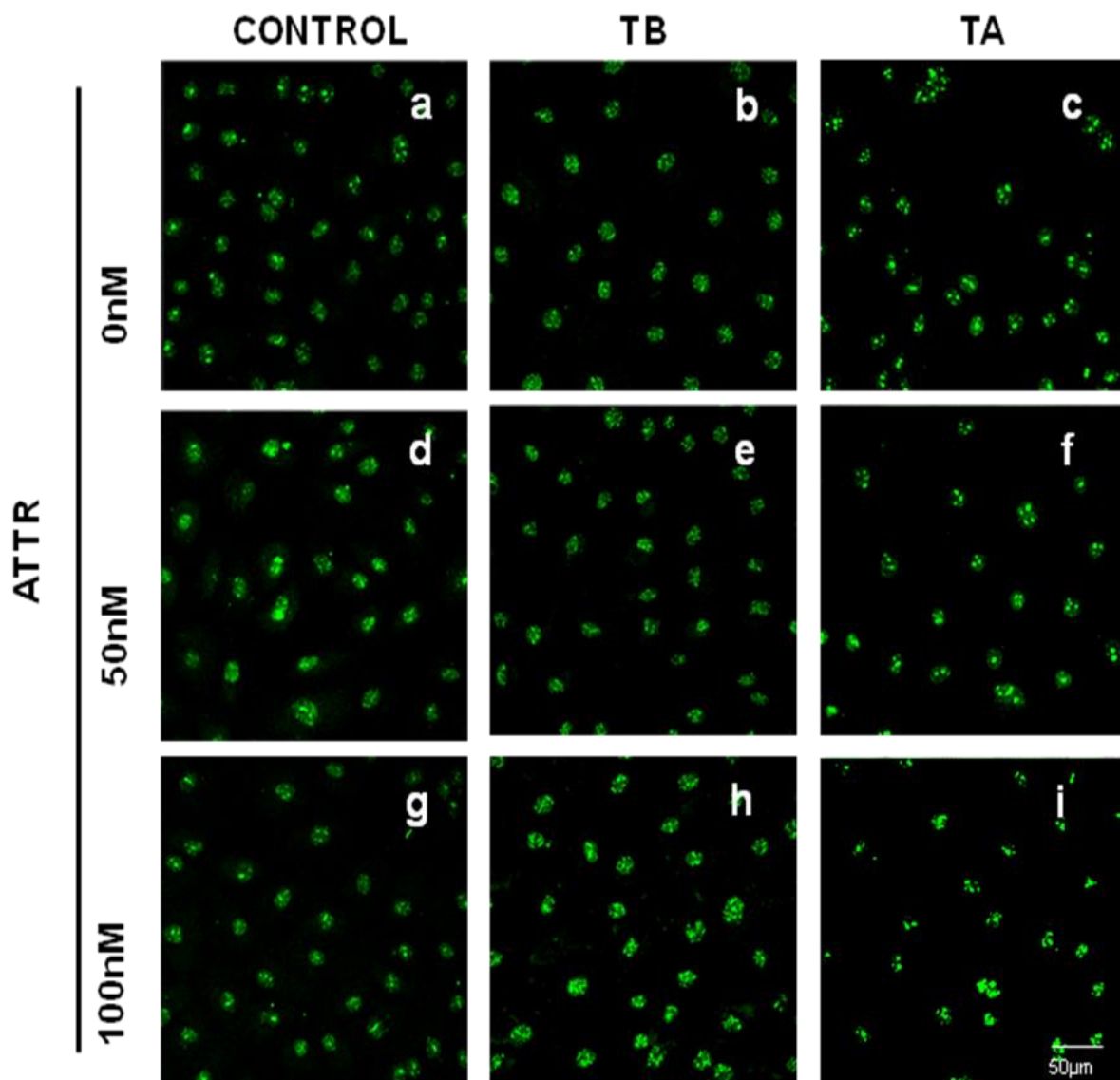
En condiciones basales, las células de los TB (Fig. 33B) y de los TA (Fig. 33C) exhiben una disminución en el contenido de la ZO-1 en la fracción insoluble o fracción membranal ( $59 \pm 0.4$  y  $123 \pm 0.8$ , respectivamente), comparados con el grupo control ( $183 \pm 0.8$ ) (Fig. 33A). En las células de los TB, la concentración de 50 y 100 nM de ATTR aumentó la expresión de la ZO-1 en la fracción insoluble o membranal, sin modificar la fracción soluble o citosólica (Fig. 33B). En el TA se observó un incremento en la expresión de la ZO-1 membranal con la concentración de 50 nM de ATTR (Fig. 33C), mientras que con la concentración de 100 nM disminuyó el contenido de la ZO-1 en la fracción soluble (Fig. 33C).



**Figura 33. Expresión de la ZO-1 en cultivos de células mesoteliales de TB o de TA tratados con ATTR.** Análisis por Western blot de la ZO-1 en la FI (barras a cuadros) y en la FS (barras a rayas) de células mesoteliales control (A), TB (B) y TA (C) cultivadas con ATTR 0, 50 ó 100 nM hasta la confluencia. Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos individuales. (B)  $**P < 0.01$  TB FI con 50 ó 100 nM de ATTR contra TB FI 0 nM. (C)  $**P < 0.01$  TA FI con 50 nM de ATTR contra TA FI 0 nM;  $*P < 0.05$  TA FS con 100 nM de ATTR contra TA FS 0 nM. FI, fracción insoluble o membranal; FS, fracción soluble o citosólica; TB, transportador bajo; TA, transportador alto; ATTR, ácido todo *trans* retinoico.

## 8.22 Localización de la claudina-2 en cultivos de células mesoteliales control, TB y TA tratados con ATTR

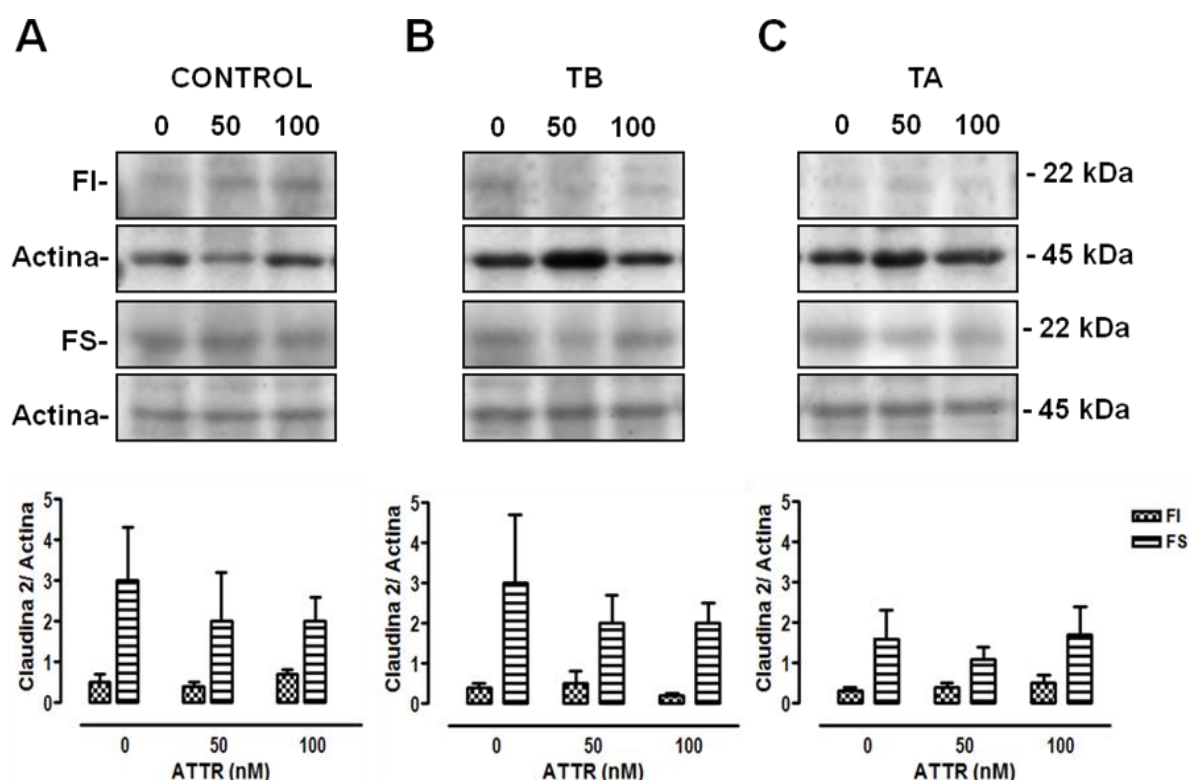
En las células control, la claudina-2 no se observó el patrón de “malla de gallinero”, típico de las claudinas. Esta proteína se localizó en el núcleo (Figura 34, panel a). Las células de los TB y los TA mostraron el mismo patrón observado en el grupo control (Figura 34, paneles b y c, respectivamente). El ATTR no modificó la localización de la claudina-2 en ninguno de los grupos estudiados (Figura 34, paneles d, g, e, h, f y i).



**Figura 34. Localización de la claudina-2 en cultivos de células mesoteliales de TB y tratados con ATTR.** Inmunofluorescencia para la claudina-2 en células derivadas del omentum (grupo control) o en células derivadas del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR 0, 50 ó 100 nM. Imágenes representativas de tres experimentos. Barra= 50 µm. TB, transportador bajo; TA, transportador alto; ATTR, ácido todo *trans* retinoico.

### 8.23 Expresión de la claudina-2 en cultivos de células mesoteliales control, TB y TA tratados con ATTR

Con el análisis por inmunofluorescencia se observó que la claudina-2 se localiza en el núcleo (Fig. 35), sin embargo, el análisis por Western blot mostró que también hay claudina-2 en la fracción insoluble o membranal de las células control, TB y TA (Fig. 35, panel A, B y C). La cantidad de la claudina-2 en la fracción insoluble y soluble fue similar entre los grupos (Fig. 35, panel A, B, C). El tratamiento con ATTR no modificó la cantidad de la claudina-2 en ninguno de los grupos.

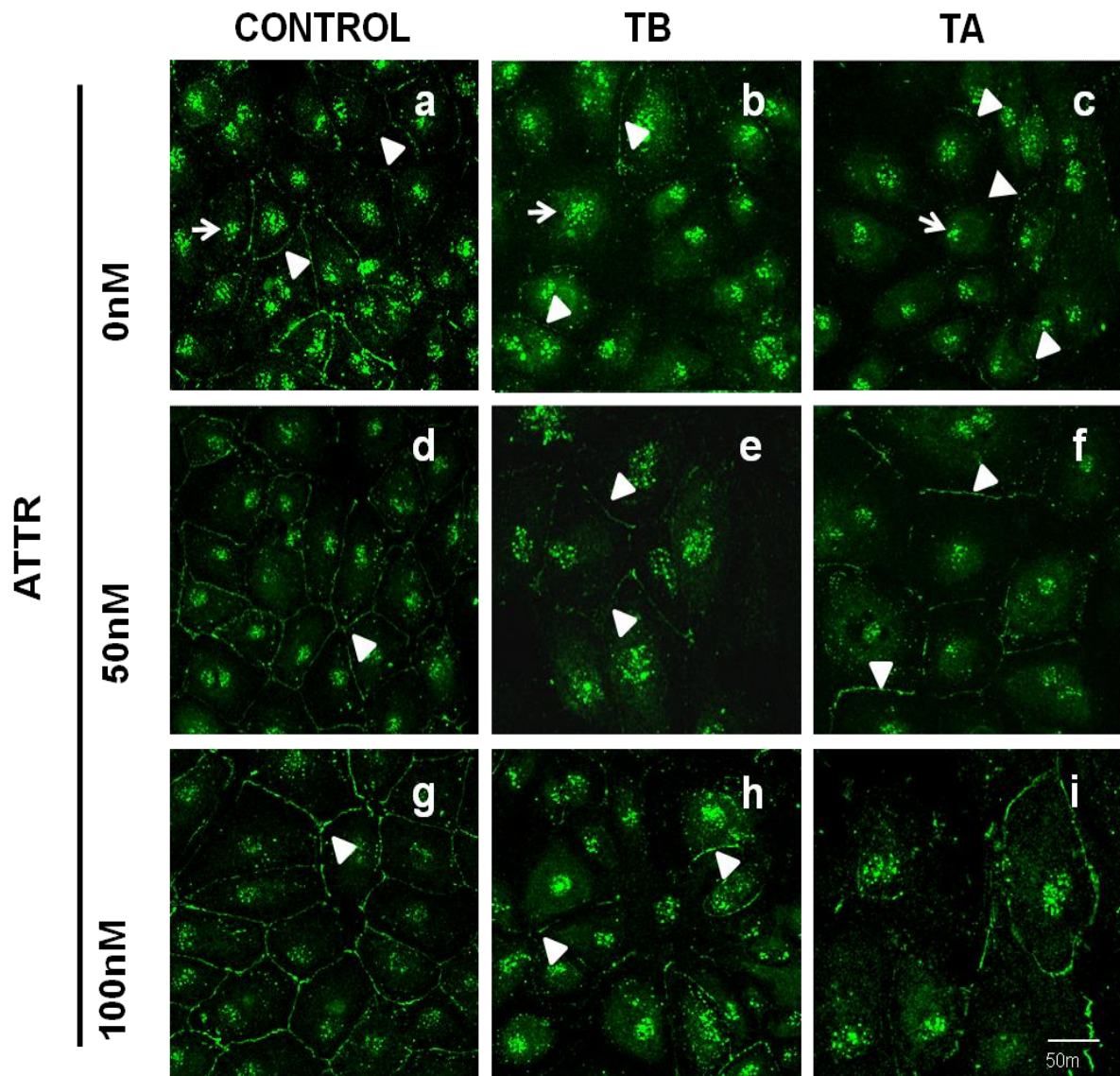


**Figura 35. Expresión de la claudina-2 en cultivos de células mesoteliales de TB y TA tratados con ATTR.** Análisis por Western blot de la claudina-2 en la FI (barras a cuadros) y en la FS (barras a rayas) de células mesoteliales control (A), TB (B) y TA (C) cultivadas con ATTR 0, 50 ó 100 nM hasta la confluencia. Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos individuales. FI, fracción insoluble o membranal; FS, fracción soluble o citosólica; TB, transportador bajo; TA, transportador alto; ATTR, ácido todo *trans* retinoico.



### 8.24 Mejoramiento de la distribución de la claudina-8 en el borde celular de células mesoteliales de TB y TA debido al ATTR

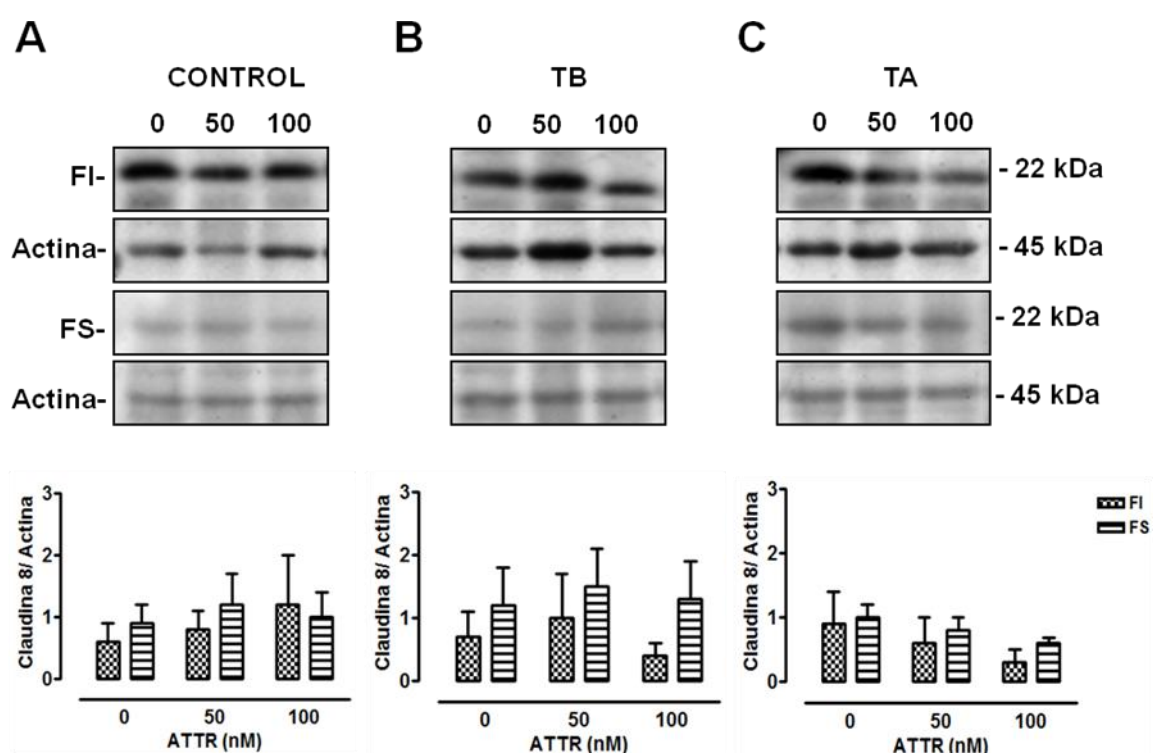
En las células control, la claudina-8 (Fig. 36, panel a) se observó en el borde celular, formando una línea fina y continua (cabezas de flecha), y en el núcleo (flecha). En el TB (Fig. 36, panel b) y en el TA (Fig. 36, panel c), la fluorescencia para la claudina-8 en el borde celular fue débil mostrando un patrón punteado y discontinuo (cabezas de flecha), pero en la región nuclear la marca fue intensa (flecha). El ATTR mejoró la distribución de la claudina-8 en el borde celular de las células control (Figura 36, paneles d y g, cabezas de flecha). En el TB (Fig. 36, paneles e y h) y en el TA (Fig. 36, paneles f y i), el mismo efecto se observó (cabezas de flecha).



**Figura 36. Distribución de la claudina-8 en cultivos de células mesoteliales tratadas con ATTR.** Inmunofluorescencia para la claudina-8 en células derivadas del omentum (grupo control) o en células derivadas del efluente de diálisis de pacientes con TB o TA cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR 0, 50 ó 100 nM. Imágenes representativas de tres experimentos. Barra= 50 µm.

## 8.25 Expresión de la claudina-8 en cultivos de células mesoteliales control, TB y TA en presencia de ATTR

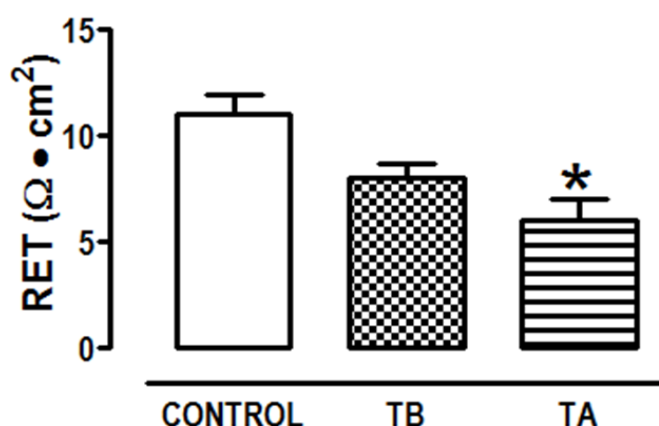
El análisis por Western blot mostró que la cantidad de la claudina-8, en la fracción soluble e insoluble, fue similar entre el grupo control (Fig. 37, panel A), TB (Fig. 37, panel B) y TA (Fig. 37, panel C). El tratamiento con ATTR no indujo ningún cambio en el contenido de la claudina-8 en el control y en el TB, mientras que en el TA (Figura 37, panel C) se observó una tendencia, no significativa, a disminuir la cantidad de la claudina-8 en la fracción soluble e insoluble.



**Figura 37. Expresión de la claudina-8 en cultivos de células mesoteliales de TB y TA tratados con ATTR.** Análisis por Western blot de la claudina-8 en la FI (barras a cuadros) y en la FS (barras a rayas) de células mesoteliales control (A), TB (B) y TA (C) cultivadas con ATTR 0, 50 ó 100 nM hasta la confluencia. Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos individuales. FI, fracción insoluble o membranal; FS, fracción soluble o citosólica; TB, transportador bajo; TA, transportador alto; ATTR, ácido todo *trans* retinoico.

## 8.26 Resistencia eléctrica transepitelial de monocapas de células mesoteliales de pacientes con TB y TA

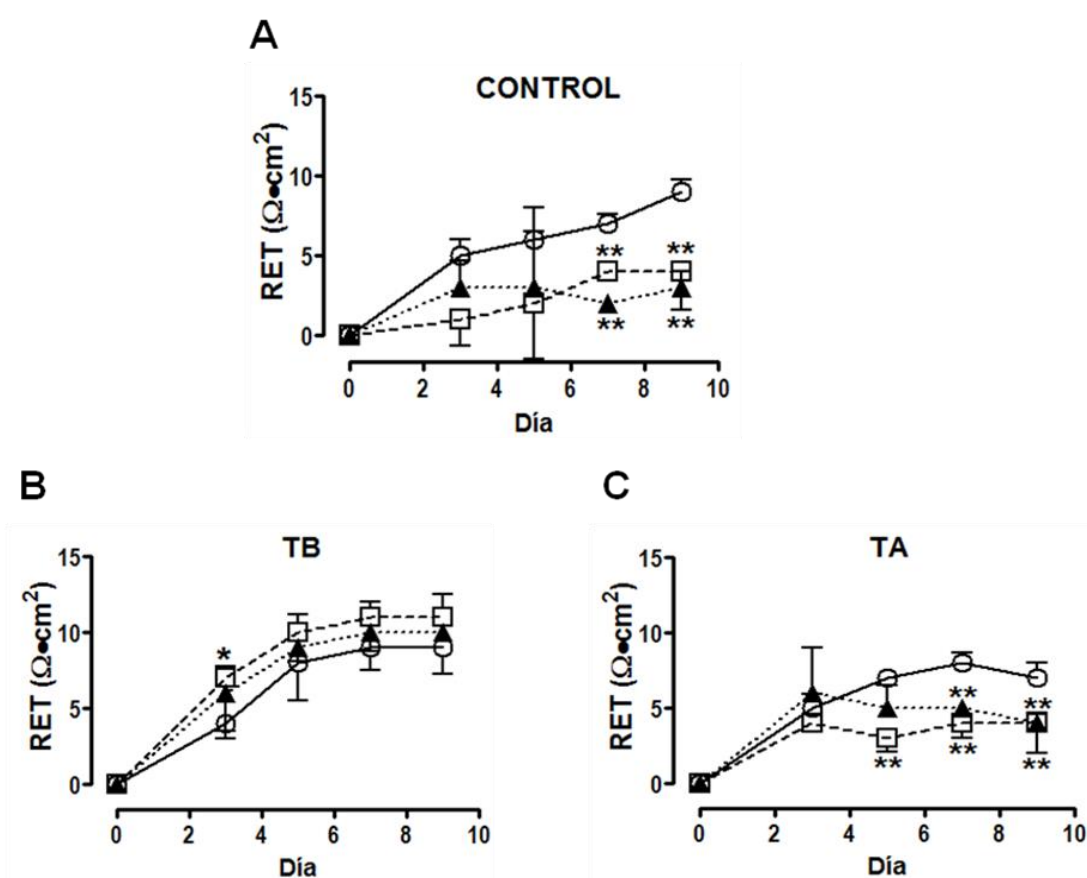
El transporte de agua y de solutos a través del mesotelio durante la diálisis ocurre principalmente a través de la ruta paracelular. La permeabilidad a través de esta ruta es evaluada por la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET), mientras más baja sea la resistencia, más permeable es un epitelio, y viceversa. Se midió la RET de las monocapas de las células mesoteliales control, TB y TA (Fig. 38). No se encontró diferencia significativa entre la RET del grupo control ( $11 \pm 0.9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) y el TB ( $9 \pm 0.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). En contraste, la RET de los TA fue significativamente baja ( $6 \pm 1.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) (Fig. 38).



**Figura 38. Resistencia eléctrica transepitelial de monocapas de células mesoteliales de control, TB y TA.** Monocapas de células mesoteliales derivadas del omentum (grupo control) o del efluente de diálisis de TB o TA cultivadas hasta la confluencia en filtros cubiertos con colágeno, a las cuales se les midió la resistencia eléctrica transepitelial (RET). Se muestra la media  $\pm$  ESM de seis experimentos individuales por duplicado. \* $P < 0.01$  TA comparado con el grupo control. TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

## 8.27 Disminución de la resistencia eléctrica transepitelial en monocapas de células mesoteliales control y de TB debido al ATTR

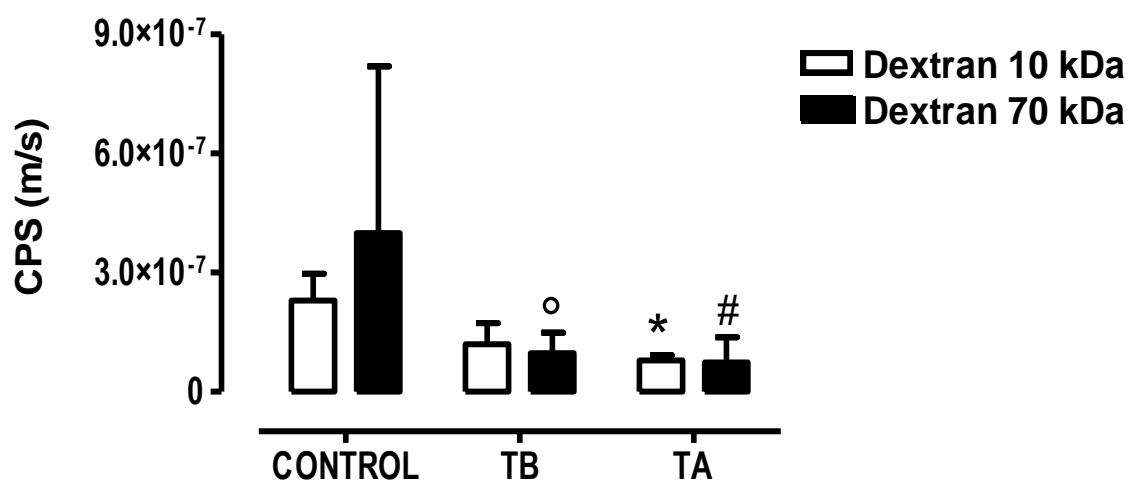
El tratamiento con ATTR disminuyó la resistencia eléctrica transepitelial (RET) de las monocapas control de  $11 \pm 0.9 \Omega \cdot \text{cm}^2$  a  $3 \pm 1.0 \Omega \cdot \text{cm}^2$  con la concentración de 50 nM, y de  $11 \pm 0.9 \Omega \cdot \text{cm}^2$  a  $4 \pm 2.4 \Omega \cdot \text{cm}^2$  con la concentración de 100 nM (Fig. 39, panel A). El mismo efecto fue observado en las monocapas de los TA. En las monocapas de los TA, el ATTR disminuyó la RET de  $6 \pm 1.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$  a  $4 \pm 0.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$  con la concentración de 50 nM, y de  $6 \pm 1.1 \Omega \cdot \text{cm}^2$  a  $4 \pm 2.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$  con la concentración de 100 nM (Fig. 39, panel C). En contraste, en las monocapas de los TB, el tratamiento con ATTR no modificó la RET, pero sí contribuyó a un establecimiento temprano de la RET comparado con el grupo que no recibió el retinoide (Fig. 39, panel B).



**Figura 39. Resistencia eléctrica transepitelial en monocapas de células mesoteliales control, TB y TA tratadas con ATTR.** Curso temporal de la RET en monocapas de células mesoteliales control (A), TB (B) y TA (C), cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR 0 nM (círculos blancos), 50 nM (triángulos negros) ó 100 nM (cuadrados blancos). Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos por duplicado. (A)  $**P < 0.01$  control con 50 nM de ATTR al día 7 y 9 contra control 0 nM al día 7 y 9;  $**P < 0.01$  control con 100 nM de ATTR al día 7 y 9 contra control 0 nM al día 7 y 9. (B)  $*P < 0.05$  TB con 100 nM de ATTR al día 1 contra TB 0 nM al día 1. (C)  $**P < 0.01$  TA con 50 nM de ATTR al día 7 y 9 contra TA 0 nM al día 7 y 9;  $**P < 0.01$  TA con 100 nM de ATTR al día 5, 7 y 9 contra TA 0 nM al día 5, 7 y 9.

## 8.28 Determinación de la permeabilidad a aniones en monocapas de células mesoteliales control, TB y TA

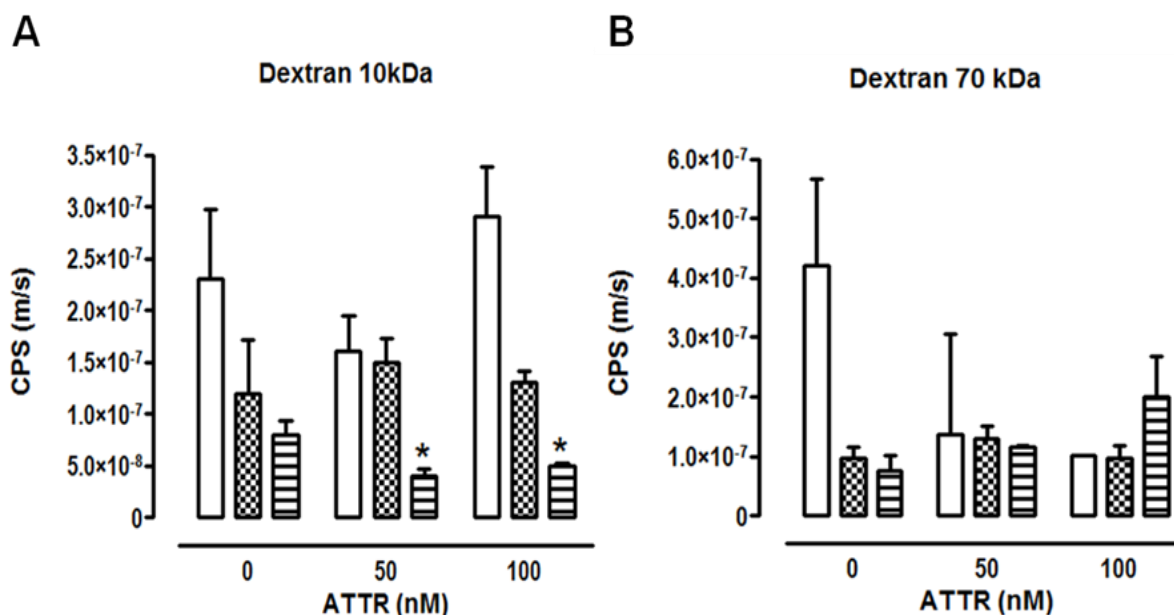
La permeabilidad de las monocapas fue determinada por la medición del flujo de dextran-FITC aniónico de diferentes tamaños. En las monocapas control, la permeabilidad para el dextran de 10 kDa y para el de 70 kDa fue similar (Fig. 40). Esta respuesta también se observó en los cultivos de los TB y de los TA (Fig. 40). Por otra parte, se observó que las monocapas de los TB y de los TA son menos permeables al dextran de 10 kDa y 70 kDa, en comparación con las monocapas control (Fig. 40), lo cual indica que las monocapas de los TB y de los TA oponen más resistencia al paso de aniones en comparación con el grupo control.



**Figura 40. Comparación del coeficiente de permeabilidad del soluto (CPS) entre células control, TB y TA.** CPS de células control, TB y TA para dextran-FITC de 10 (barras blancas) ó 70 kDa (barras negras) en condiciones basales. Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos por duplicado. °  $P < 0.05$  TB dextran de 70 kDa contra control dextran de 70 kDa; \*  $P < 0.05$  TA dextran de 10 kDa contra control dextran de 10 kDa; #  $P < 0.05$  TA dextran de 70 kDa contra TA dextran de 70 kDa. TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

## 8.29 Disminución de la permeabilidad de las monocapas al dextran, en el TA por el tratamiento con ATTR

El efecto del ATTR en la permeabilidad de las monocapas también se evaluó. El tratamiento con ATTR no modificó la permeabilidad al dextran de 10 kDa, de las monocapas control y TB (Fig. 41, panel A). En contraste, en las monocapas de los TA se observó una disminución en la permeabilidad al dextran de 10 kDa, cuando se trataron con 50 y 100 nM de ATTR (Fig. 41, panel A). En cuanto al dextran de 70 kDa, con el tratamiento de ATTR se observó una tendencia, aunque no fue estadísticamente significativa, a disminuir la permeabilidad para el dextran de 70 kDa en los controles (Fig. 41, panel B). Mientras que en los TB y los TA, el ATTR no indujo cambios en la permeabilidad para el dextran de 70 kDa (Fig. 41, panel B).



**Figura 41. Coeficiente de permeabilidad del soluto (CPS) en células control, TB y TA tratadas con ATTR.** CPS para Dextran de 10 kDa (A) y 70 kDa (B) en monocapas control (barras blancas), TB (barras a cuadros) o TA (barras rayadas) sembradas en filtros y cultivadas hasta la confluencia en presencia de ATTR 0, 50 y 100 nM. Se muestra la media  $\pm$  ESM de tres experimentos por duplicado. (A) \* $P < 0.05$  TA con 50 ó 100nM de ATTR contra TA 0nM. ATTR, ácido todo *trans* retinoico; TB, transportador bajo; TA, transportador alto.

## 9. DISCUSIÓN

La insuficiencia renal es la incapacidad de los riñones para realizar sus funciones y se clasifica en: insuficiencia renal aguda o crónica. La insuficiencia renal aguda ocurre rápidamente y es provocada por una pérdida severa de líquidos (quemaduras o diarrea), por traumatismos (síndrome de aplastamiento muscular masivo) o por fármacos. En contraste, en la insuficiencia renal crónica, la disminución de la función renal es progresiva resultado de la destrucción gradual (durante un lapso de tiempo) del tejido renal. Este tipo de insuficiencia renal es provocada por infecciones, medicamentos, lesiones que se acompañan de isquemia renal, la diabetes, la hipertensión, la aterosclerosis o malformaciones congénitas. En la insuficiencia renal aguda, con el tratamiento adecuado, los riñones pueden recuperar su función normal, mientras que en la insuficiencia renal crónica, el paciente debe recurrir a tratamientos que sustituyan la función renal para seguir viviendo. Entre los tratamientos para la insuficiencia renal crónica se encuentran: el trasplante de riñón, la hemodiálisis y la diálisis peritoneal. Aunque el trasplante de riñón es la mejor opción, sus posibilidades son limitadas debido a la escasez de donadores, por tal motivo, la mayoría de las personas con insuficiencia renal crónica tienen que recurrir a alguna de las formas de diálisis. La diálisis peritoneal ha sido la más utilizada en México por varias décadas, en 1996 se reportó que la prevalencia de pacientes en diálisis peritoneal fue de 200 pacientes por millón de personas (89), en 1998 aproximadamente, el 91% de los pacientes que requerían diálisis, se encontraban en diálisis peritoneal (90) y para el 2007, México se consideró como el país con mayor utilización de la diálisis peritoneal, en el mundo (91). La diálisis peritoneal es un tratamiento que consiste en infundir una solución dializante en la cavidad abdominal (a través de un catéter colocado por cirugía en la cavidad abdominal), que permanece ahí de 4 a 6 h para que extraiga los desechos y los líquidos excedentes de la sangre a través del peritoneo; posteriormente la solución dializante es drenada y se vuelve a reemplazar por una solución de diálisis nueva. A este proceso de eliminación y reposición de líquido se le llama “cambio”. La diálisis peritoneal se clasifica en dos tipos: en diálisis peritoneal ambulatoria continua (DPAC) y en diálisis peritoneal automatizada (DPA). En la DPAC, el paciente puede dializarse en su casa o en el lugar de trabajo, en esta modalidad el paciente requiere de 4 cambios en un día

(por lo menos) y los horarios son: en la mañana, al medio día, por la tarde y al acostarse. Al hacer estos 4 cambios, la sangre se está limpiando continuamente. En contraste, la DPA se realiza durante la noche y se requiere de una maquina cicladora que realiza los cambios. En esta modalidad, mientras el paciente descansa o duerme, la maquina se encarga de infundir y drenar el líquido 4 veces durante la noche, dejando la solución dializante en contacto con el peritoneo aproximadamente 2 h. El éxito de la diálisis a largo plazo depende de la preservación de la integridad y de la función de la membrana peritoneal. A diferencia de la hemodiálisis en la que se usa un filtro nuevo cada vez que se realiza, en la diálisis peritoneal, el peritoneo siempre es el mismo y en éste se modifica el comportamiento del transporte de solutos y de líquidos, a lo largo del tiempo. Se ha reportado que más del 40 % de los pacientes en DPAC presentan fallas en la ultrafiltración, esta falla es considerada la causa más frecuente de deserción en la DPAC (92). La ultrafiltración falla debido a un aumento en el transporte de solutos en la membrana peritoneal. El aumento en la permeabilidad del peritoneo se ha relacionado con el tiempo de diálisis, la incidencia de peritonitis, la diabetes mellitus y la comorbilidad (5,93-95). Sin embargo, la contribución de estos factores sobre el aumento en el transporte peritoneal aun sigue en controversia. Por otra parte, nosotros encontramos que algunos de nuestros pacientes mostraban un aumento en el transporte de solutos desde el inicio de la DPAC. Los factores que contribuyen con un transporte peritoneal alto al comienzo de la DPAC no han sido claramente establecidos. Sin embargo, se ha reportado que en pacientes con diabetes mellitus, con enfermedad cardiovascular o con enfermedad hepática (cirrosis) se observa un transporte de solutos alto al inicio de la DPAC (96-98). La velocidad del transporte peritoneal depende del área superficial peritoneal efectiva y de la permeabilidad, esta última se encuentra afectada por la circulación sanguínea peritoneal. Chung y col., (2000) reportaron que existe una relación entre la velocidad del transporte peritoneal y la comorbilidad. La comorbilidad es un término médico que describe el efecto de una o más enfermedades, en un paciente, sobre la enfermedad primaria, en este caso la insuficiencia renal crónica. La comorbilidad puede afectar la microcirculación, modificando las características del transporte peritoneal (97). En adición, se ha sugerido que el tipo de transporte peritoneal podría estar relacionado con el género. Se ha descrito que hay una alta proporción de hombres dentro del grupo



de los TA (96,99). En un estudio de 60 pacientes en DPAC, Ates y col., (1996) reportaron que el D/P de creatinina estaba fuertemente correlacionado con el género masculino (99). Otro estudio mostró que hay una alta proporción de hombres con un aumento en la velocidad de transporte de solutos (96). En nuestro estudio encontramos que la mayor parte de los TA son hombres y que en los TB, la minoría son hombres (Tabla 1). También se ha descrito que la uremia *per se* puede ser un factor que contribuya con el transporte peritoneal alto en los pacientes antes de iniciar la DPAC. Por ejemplo, el peritoneo de ratas parcialmente nefrectomizadas (extirpar una parte del riñón) mostró un aumento en la permeabilidad asociado con una sobrerregulación en la sintasa de óxido nítrico, del factor de crecimiento endotelial vascular y del factor de crecimiento básico de fibroblastos, y una acumulación en los productos finales de glicosilación avanzada (100). En otro estudio realizado en biopsias del peritoneo de pacientes urémicos, no dializados, se demostró que la uremia aumenta la vasculopatía de una manera similar a la observada en el peritoneo de pacientes en DPAC (101). Además, Vaziri y col., (2012) demostraron que la exposición de las células epiteliales intestinales a suero urémico daña sus UE y la función de la barrera (102). Es probable que el transporte alto en algunos de los pacientes al inicio de la DPCA esté relacionado con el género, la comorbilidad o la uremia. En este estudio no se recopiló la información acerca de las enfermedades que los pacientes padecieron antes o al momento de iniciar la diálisis y tampoco se obtuvieron los valores de uremia en el suero de los pacientes al inicio de la diálisis. Sin embargo, se sugiere realizar un estudio hecho en pacientes mexicanos, con una muestra de pacientes más grande, donde se contemplen las enfermedades, el género y los valores urémicos de los pacientes antes de iniciar la diálisis para analizar la distribución de estos parámetros en los dos tipos de transportadores y determinar su posible relación con el tipo de transporte peritoneal, y comparar los resultados con los de los otros investigadores.

La eficiencia de la DPAC como tratamiento depende importantemente de la permeabilidad del peritoneo. La prueba de equilibrio peritoneal descrita por Twardowski y col., (1989), fue desarrollada con el propósito de evaluar la tasa de transporte peritoneal de los pacientes en DPAC (103). Basado en los resultados de la prueba, el tipo de transporte peritoneal de un paciente determinado puede

clasificarse como: transportador alto (TA), transportador promedio alto, transportador promedio bajo o transportador bajo (TB)(103). La distribución de los pacientes dentro de estas categorías puede variar, en un estudio realizado en México en 1999, Cueto-Manzano y col., reportaron que un alto porcentaje de los pacientes en DPAC se encuentra dentro de los transportadores promedio alto o promedio bajo (68 %), mientras que un pequeño porcentaje de la población (32 %) son transportadores alto o bajo (93). Estos dos últimos, son los grupos de mayor interés en la clínica. El tipo de transporte peritoneal se ha asociado con los resultados de los pacientes en DPAC; por ejemplo los pacientes con TA muestran tasas de supervivencia significativamente menores que los pacientes con otro tipo de transporte (104,105). En los TA, la eliminación de fluidos y de pequeños solutos es baja, además tienen una alta pérdida de proteínas y un aumento en la absorción de glucosa, estas alteraciones resultan en una sobrecarga de líquidos, desnutrición y anomalías lipídicas, que aumentan la mortalidad en estos pacientes (5,104,105). Por otra parte, los TB tienen una adecuada ultrafiltración, pero debido a su transporte peritoneal lento, la eficiencia en la eliminación de solutos es baja (5). Para este estudio, se decidió trabajar con los grupos de TA y TB, debido a las complicaciones técnicas que presentan en la DPAC y que en el caso de los TA, tienen un alto impacto en su supervivencia. Los cambios en el transporte peritoneal durante la DPAC a largo plazo están asociados con cambios en la morfología del peritoneo que incluyen una reducción del mesotelio, engrosamiento submesotelial y vasculopatía (106). Se ha considerado que el daño a las células mesoteliales, es la causa primaria de la disminución en la ultrafiltración y en la eficacia de la DPAC (64,106). Varios autores han descrito la morfología de las células mesoteliales (en cultivo) en condiciones normales y en los pacientes en DPAC (6,57,58,107). Sin embargo, hasta el momento se desconocen las características morfológicas de las células mesoteliales cuando los pacientes se comportan como TB o TA, así que en este estudio se exploraron las características morfológicas y funcionales de las células mesoteliales de los pacientes en DPAC que se comportan como TB o TA. Para estudiar la morfología de las células se realizaron cultivos de las células mesoteliales obtenidas del efluente de diálisis de pacientes en diálisis con TB o TA. Una de las ventajas más importantes de usar las células mesoteliales derivadas del efluente de diálisis, es que estas células son representativas del mesotelio remanente y que pueden

reflejar el estatus funcional y estructural del tejido peritoneal (58). Se ha argumentado que las células del efluente no son representativas del mesotelio, ya que pueden ser células comprometidas a desprenderse del tejido. Sin embargo, datos obtenidos *in vivo* e *in vitro* indican que las células mesoteliales liberadas en el efluente de diálisis son representativas de una población de células mesoteliales que permanece unida al peritoneo (57,108-110). En cultivo, las células mesoteliales derivadas del efluente de DPAC pueden presentar una morfología de empedrado, una morfología transicional, una morfología fibroblástica o una mezcla de estas poblaciones (57), y ocasionalmente, también se pueden observar células hipertróficas solas o acompañadas de células de tamaño normal (58). Nosotros encontramos que las células de los TB y los TA de pacientes en DPAC exhiben cambios en el fenotipo celular, caracterizado por la adquisición de un fenotipo hipertrófico y la expansión de la superficie celular. Es importante mencionar que este fenotipo se encuentra más marcado en los TB, ya que en los TA todavía hay presencia de células de tamaño normal. La hipertrofia celular se ha relacionado con la hiperglicemia. Wolf y col., (2001) demostraron que la exposición de las células mesangiales a un medio con un alto contenido de glucosa, altera el metabolismo y el ciclo celular de estas células, desarrollando finalmente hipertrofia (111). Otros estudios realizados en células endoteliales humanas, en células del túbulo proximal de cerdo (LLC-PK1), en células del túbulo proximal de ratón y en fibroblastos humanos, muestran que la exposición a un ambiente alto en glucosa (más alto que 20 mM/L) por periodos de entre 3 y 8 días induce hipertrofia celular (112-114). Se ha descrito que las CMPH expuestas a un medio con alta glucosa exhiben hipertrofia (61). De una manera similar, nosotros encontramos que los pacientes con TB o TA exhiben hipertrofia. Se ha descrito que un fenotipo hipertrófico en las células mesoteliales, se asocia con un proceso de senescencia (6,58,115). La senescencia en las células mesoteliales se caracteriza por la adquisición de un fenotipo hipertrófico distinguido por un aumento en el área superficial de la célula, células multinucleadas, baja proliferación celular, reducida viabilidad, un aumento en la actividad enzimática, un aumento en la expresión de genes que inhiben el ciclo celular como p21<sup>Waf1</sup> y p27<sup>Kip1</sup>, y un aumento en la expresión de marcadores senescentes como la  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia (61,116). Aunque no se realizó un análisis morfométrico, por medio de las microfotografías se observó que las

células de los TB exhiben un área superficial mayor que las células control (Fig.5, paneles a y e), lo cual se corroboró por la disminución en el número de células por campo (Fig.6). Para saber si las células de los TB y los TA tenían características de senescencia se midió la proliferación celular. Estadísticamente se encontró que la proliferación celular en los TB y los TA, no muestran una diferencia significativa con respecto al grupo control. Por otra parte, se esperaba que la proliferación en los TB fuera menor que en los TA, debido a que en el TB, el aumento en el tamaño celular fue más evidente, sin embargo, nuestros datos muestran que no hay diferencias entre estos dos grupos. Esto sugiere que las células hipertróficas observadas en los TB y en los TA, no necesariamente corresponden a células senescentes. Con respecto a esto, Gotloib (1996) describe que la exposición *in vivo* de las células mesoteliales a una solución con 4.5 % de glucosa, no induce cambios degenerativos en las células, ya que al estudiarlas por microscopía electrónica, las células grandes tenían numerosas microvellosidades, un aumento en la cantidad de retículo endoplásmico rugoso, mitocondrias normales y una membrana basal intacta (117). Sumado a esto, Gotloib se refiere a las células hipertróficas como células que se adaptan, por medio de la inducción de enzimas y de un aumento en los componentes ultraestructurales, para poder responder a la continua exposición de la alta concentración de glucosa en el ambiente extracelular (117). Nosotros encontramos que en los TB, las microvellosidades eran más largas y abundantes que en las del grupo control, lo cual sugiere una mayor actividad metabólica en estas células y quizás un proceso adaptativo. En adición, en los TA se observó daño severo de la ultraestructura caracterizado por una reducción significativa en el número de sus microvellosidades y alteraciones morfológicas en los cilios. Después de varios meses en diálisis, las células mesoteliales pierden sus microvellosidades. Fang y col., (2004) reportaron que a los 15 meses en DPAC, no se observan microvellosidades en las células mesoteliales (56). El tiempo que estuvieron nuestros pacientes en DPAC fue de  $29.6 \pm 7.0$  meses para los TB y de  $17.0 \pm 6.6$  meses para los TA. A pesar de que estadísticamente no hubo diferencia significativa en el tiempo en diálisis, entre estos dos grupos, encontramos que los TB preservan sus microvellosidades, mientras que en los TA, las microvellosidades están casi ausentes, similar a lo descrito por Fang y col., (2004) (56). Esto sugiere que las células de los TA son más sensibles al

daño por la glucosa que las células de los TB. En este estudio encontramos que los cultivos de células mesoteliales de los pacientes en diálisis con TB o TA exhiben células hipertróficas, y que más que ser indicativas de senescencia celular, pueden ser resultado de una respuesta adaptativa a la agresión por la glucosa, en los TB. Sin embargo, es importante considerar el estudio del ciclo celular, la expresión de genes que inhiben el ciclo celular y de marcadores de senescencia, así como, la actividad metabólica, en las células de los TB y TA, con el fin de confirmar si hay un proceso temprano de senescencia. En adición nuestros hallazgos indican que las células de los TA son más sensibles a la agresión del líquido de diálisis que las células de los TB.

La transición epitelio-mesénquima (TEM) juega un papel importante en los procesos patológicos como tumorigénesis y en desórdenes crónicos asociados con la acumulación de la matriz extracelular y la fibrosis. Existen estudios que reportan que las células mesoteliales del peritoneo sufren la TEM una vez que inicia el tratamiento de DPAC (57,58,118). Durante la TEM, las células epiteliales adquieren un fenotipo fibroblástico y la capacidad de migrar y de remodelar su matriz extracelular (18). Durante este proceso, las células epiteliales modifican gradualmente la organización de su citoesqueleto y la expresión de los marcadores de tipo epitelial (la E-cadherina, la citoqueratina, la ZO-1, etc., los cuales se encuentran ausentes en los fibroblastos), sobreexpresando marcadores de tipo mesenquimal (la vimentina, la  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -AML), la proteína superficial de fibroblastos-1, colágeno I, II y el factor transcripcional *snail*) (58,118,119). En este estudio, se exploró la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales en células de TB y TA, para evaluar la presencia de TEM en estos cultivos. La citoqueratina es un marcador epitelial que se encuentra altamente expresado en células mesoteliales, mientras que en fibroblastos se encuentra ausente. La ausencia o disminución en la expresión de la citoqueratina es un indicativo de TEM en CMPH (57,58). En los cultivos de los TB y los TA se observaron cambios en la organización de los filamentos intermedios de citoqueratina-18. Es importante mencionar que estos cambios en la organización de la citoqueratina-18, no eran igual al observado en una célula mesotelial en TEM, en donde los filamentos se observan extendidos (57). En las células de los TB, la citoqueratina-18 se observó perinuclear, al igual que en las células control,

pero la marca para esta proteína fue más intensa que en el grupo control, y en algunas células se observaba empastada. En los TA, los filamentos de citoqueratina-18 no se encuentran delimitando al núcleo como en el control y además, en algunas células se ve la formación de proyecciones. Sin embargo, estas alteraciones no corresponden con una célula en TEM. Otro aspecto importante es que el contenido de citoqueratina-18 en los TB y los TA era igual al del grupo control, lo cual indica que estas células aún preservan un fenotipo epitelial. Para corroborar esto también se exploró la expresión de marcadores de tipo mesenquimal (vimentina y  $\alpha$ -AML) en estos cultivos. A diferencia del grupo control en el que los filamentos de vimentina se encuentran perinuclear, en los TB y los TA estos filamentos se observaron extendidos en todo el cuerpo celular, dando la apariencia de una célula aplanada. Esta reorganización de los filamentos puede estar relacionada con la hipertrofia celular en estos cultivos, en donde, el área superficial de la célula aumenta y el citoplasma se extiende (116). La expresión de la vimentina y de la  $\alpha$ -AML se encuentra aumentada solo en los TB. La TEM es un proceso que se acompaña de cambios morfológicos y de cambios en la expresión de marcadores epiteliales y mesenquimales (22,57,115,120). Nuestros resultados indican que a pesar de que las células de los TB y los TA exhiben una reorganización en sus filamentos intermedios y un aumento en la expresión de marcadores mesenquimales, aún preservan un fenotipo epitelial evidenciado por la expresión de la citoqueratina-18, la ausencia de células con morfología fibroblástica en cultivo y la presencia, aunque reducida en los TA, de microvellosidades y de los cilios. En adición, el aumento de marcadores mesenquimales en los TB podría indicar el inicio de un proceso de TEM en estos cultivos. La TEM es inducida por citocinas, por componentes de la matriz extracelular y por factores de crecimiento. Se ha reportado que el factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (FCT-  $\beta$ 1) induce la TEM en cultivos de CMPH (121). La expresión del FCT- $\beta$ 1 en las células de los TB estuvo aumentada tres veces más en comparación con el control, mientras que en el TA, aunque no fue significativo, se observó un aumento discreto de este factor. Estos resultados sugieren que la expresión alta de la vimentina y de la  $\alpha$ -AML, en los TB, podría estar relacionada con el aumento en la expresión del FCT- $\beta$ 1 en estos cultivos.

Las microvellosidades y el cilio de las células mesoteliales son estructuras que actúan como receptores y transductores del ambiente extracelular (122). Esto lo logran a través de la presencia de receptores, de transportadores y de canales que se encuentran localizados en la membrana del cilio y de las microvellosidades (123,124). Tanto las microvellosidades como los cilios protegen a la superficie mesotelial de la fricción a través de la captura de agua y la secreción de exudados. Por lo tanto, la reducción en el número de estas estructuras podría tener consecuencias en la función peritoneal. Las CMPH control y las células provenientes de pacientes en diálisis exhibieron células multiciliadas, con dos o más cilios originados del mismo penacho ciliar o adyacente a éste. El tamaño promedio del cilio en el grupo control, TB y TA fue de  $4.1 \pm 0.2\mu\text{m}$ , similar a lo reportado por Bird y col., ( $4.9 \pm 0.6\mu\text{m}$ ), en CMPH (11). Los cultivos de los TA y los TB mostraron una reducción en el número de células ciliadas en comparación con el grupo control, siendo más pronunciada en el TA. Las células pueden perder su cilio primario por dos mecanismos: por resorción o desciliación. La resorción es un proceso normal en el cual las células gradualmente retraen el cilio para entrar en mitosis. En contraste, la desciliación es la pérdida del cilio en respuesta al estrés ambiental (125). La desciliación se ha documentado en varias células epiteliales ciliadas incluyendo el oviducto, el cual experimenta desciliación en respuesta a hormonas o infecciones microbianas, y el tracto respiratorio superior, el cual se descilia en respuesta al humo del cigarro y a infecciones (125). Durante la DPAC, las células mesoteliales están expuestas a grandes volúmenes de líquido de diálisis (hasta 2 L), esto causa la dilución de los mediadores humorales secretados por las células, lo cual puede provocar que el cilio no detecte las señales del medio extracelular. En adición, es probable que los componentes del líquido de diálisis alteren la sensibilidad de los receptores localizados en la superficie del cilio. En estos cambios podrían alterar la función del cilio y resultar en un aumento en la actividad biosintética y en la estimulación de cambios morfológicos. Como mencionamos anteriormente, las células de los TA parecen ser más vulnerables al daño producido por el líquido de diálisis y es probable que la reducción marcada en el porcentaje de células ciliadas en los TA, sea una respuesta para no comprometer la integridad de la célula. En varias de las células de los TA, el cilio estaba fusionado a la membrana y en algunos casos se observaban estructuras redondas “perlas” o “ramificaciones” rodeando la parte del

cuerpo o de la punta del cilio. Es importante señalar que en los TA se observaron estructuras alargadas como “microvellosidades” embebidas en la membrana celular, lo cual le daba una apariencia rugosa. Haciendo un acercamiento al cilio, en los TA, se observó que estas “microvellosidades” se unen con el cilio (patrón ramificado), mientras que en otras imágenes las “perlas” parecen ser las puntas de estas “microvellosidades” saliendo a la superficie celular. Sin embargo, es importante verificar si estas estructuras son microvellosidades. En cuanto a las microvellosidades, a pesar de tener el mismo tiempo en DPAC, las células de los TA mostraron una importante reducción en el tamaño y en el número de sus microvellosidades (91 %), mientras que en los TB, las microvellosidades fueron largas y abundantes. Sumado a esto, las microvellosidades en los TA se encontraban fusionadas. La formación de las microvellosidades en las células mesoteliales aún no ha sido descrita. Se ha reportado que el número de microvellosidades en las células mesoteliales en regeneración, puede variar y es dependiente de la carga aniónica del glicocálix (126). Kultti y col., (2006) reportaron que la presencia de ácido hialurónico en el glicocálix de las células MCF-7 (células de adenocarcinoma de mama humano) es esencial para la formación de las microvellosidades y que el largo de estas protrusiones, es dependiente de la actividad de las sintetasas de ácido hialurónico y de la velocidad con que se sintetiza el ácido hialurónico (127). Durante la DPAC, los constituyentes del glicocálix, son diluidos y removidos con cada cambio de solución de diálisis. La pérdida de los componentes del glicocálix podría tener un impacto sobre la formación de microvellosidades en las CMPH (128). Las CMPH sintetizan ácido hialurónico, es posible que la formación de las microvellosidades en las CMPH esté regulada por la síntesis de ácido hialurónico como en las células MCF7, pero se requieren de estudios para corroborar la participación del ácido hialurónico en la formación de las microvellosidades en las CMPH y evaluar su expresión en los cultivos de los TA y los TB. Con nuestros resultados podemos concluir que las células de los TA son más sensibles que los TB al líquido de diálisis, ya que sus cilios y microvellosidades exhiben cambios morfológicos, los cuales más que un signo de degeneración podrían ser señal de adaptación.

El daño a las células mesoteliales, las cuales actúan como una barrera de permeabilidad selectiva para regular el paso de solutos y de agua entre el



compartimiento intravascular y la cavidad peritoneal, es considerado la causa primaria de la hiperpermeabilidad y/o de la fibrosis peritoneal. El transporte de solutos durante la DPAC, en las CMPH, ocurre principalmente a través del espacio paracelular. Las CMPH poseen diferentes tipos de uniones intercelulares, entre ellas la unión estrecha (UE)(38,64,129). La UE regula el paso de moléculas, iones y agua a través de la vía paracelular (31). La alta concentración de glucosa contenida en el líquido de diálisis, así como los productos de degradación de la glucosa generados por el proceso de esterilización por calor, la hiperosmolaridad, el FCT- $\beta$ 1 y las especies reactivas de oxígeno, son factores que dañan a las UE de las CMPH en la DPAC (38,63,64,130). También se ha reportado que el pH ácido de las soluciones de diálisis daña a las UE de las CMPH (131). Como medidas para disminuir el daño causado por las soluciones de diálisis convencionales, se ha sugerido el uso de icodextrina, de polímeros de glucosa o de poliéter, como agentes osmóticos, en lugar de la glucosa, y el uso de bicarbonato para neutralizar el pH ácido (131-133). La uremia es otro factor que causa daño morfológico al peritoneo (100,101,134) y a las UE en células epiteliales de intestino de rata (102). Los pacientes con TB o TA exhiben diferencias en el transporte peritoneal de solutos, sin embargo, los cambios en las UE, las cuales juegan un papel importante en controlar la permeabilidad y en mantener la organización de los tejidos, se desconocen aún en las CMPH de estos pacientes.

En este estudio se exploró la expresión y la distribución de las proteínas de la UE: la claudina-1, la ocludina y la ZO-1 en cultivos de CMPH de pacientes con TB o TA. La inmunofluorescencia para la claudina-1, la ocludina y la ZO-1 fue lineal y continua a lo largo del borde celular en las células control, mientras que en los TB y los TA fue débil y discontinua, siendo más severo este efecto en el TB. El análisis por Western blot confirmó que en los pacientes con TB o TA, la expresión de la claudina-1, la ocludina y la ZO-1 estaba disminuida con respecto al grupo control, siendo más evidente en el TB. Con estos resultados se observó que los TB y los TA tienen una reducción en la expresión de las proteínas de la UE, siendo más marcada en el TB. El FCT- $\beta$ 1 es un factor que puede alterar la expresión de las proteínas de la UE como se mencionó en el párrafo anterior (65,66). Ito y col., (2000) demostraron que el FCT- $\beta$ 1 disminuye la expresión y

altera la organización de las proteínas de la UE, en las CMPH (64). Se ha propuesto que el daño en las UE de las CMPH inducido por la alta glucosa del líquido de diálisis, es mediado por el FCT- $\beta$ 1, ya que el uso de un anti-FCT- $\beta$ 1 reduce los efectos de la glucosa en las UE (64). En párrafos anteriores se describió que en los TB, la expresión del FCT- $\beta$ 1 se encuentra tres veces aumentada en los TB con respecto a los controles, por lo tanto es probable que la disminución marcada en la expresión de las proteínas de la UE, en los TB, esté asociada con la sobreexpresión del FCT- $\beta$ 1, en estos cultivos.

Además de la claudina-1 también se estudió por primera vez, la expresión y la distribución de las claudinas -2 y -8 en los cultivos de CMPH sanas y de pacientes en DPAC. La claudina-2 es una proteína que forma un canal paracelular selectivo para cationes pequeños (44) y también un canal paracelular para agua (135). Se seleccionó la claudina-2 porque es una proteína característica de epitelios muy permeables como el túbulo proximal de riñón y el intestino delgado, los cuales se caracterizan por un alto transporte de iones y de agua (135). El túbulo proximal de riñón tiene una resistencia eléctrica transepitelial (RET) de 5 a 8  $\Omega \bullet \text{cm}^2$ , los valores de la RET en los cultivos de las CMPH (6 a 11  $\Omega \bullet \text{cm}^2$ ) son similares a los del túbulo proximal, por lo tanto, es probable que las CMPH expresen la claudina-2. Nuestro estudio demostró que en condiciones normales, las CMPH expresan la claudina-2, pero no se encuentra localizada en los bordes celulares, sino en el núcleo. Esta distribución, además, se observó en los cultivos de los TA y los TB. El análisis por Western blot del grupo control mostró una banda muy tenue para la claudina-2 en la fracción insoluble (membranal), mientras que la banda para la claudina-2 en la fracción soluble (citoplasmática) fue más intensa, confirmando con esto, los resultados obtenidos por la inmunofluorescencia. El Western blot para los TB y los TA mostró el mismo patrón observado en el grupo control. La claudina-8 es una proteína que provee una barrera para cationes mono y divalentes(46). Esta proteína es característica de epitelios poco permeables, se encuentra expresada en el intestino delgado y en el grueso, en la próstata y en la nefrona (46,48,49). Se ha reportado que la inducción de la expresión de la claudina-8 en cultivos celulares (MDCK II) induce un aumento en la RET (50). La claudina-1 es una proteína característica de epitelios poco permeables como el túbulo distal y el túbulo colector (52), sin embargo se sabe que las CMPH la

expresan, a pesar de tener una RET baja. La claudina-8 al igual que la claudina-1 es una proteína formadora de barrera, así que se estudió su expresión en los cultivos de CMPH. La fluorescencia para la claudina-8, en las células control, fue continua a lo largo del borde celular y también se observó en el núcleo. Al comparar la marca de la claudina-8 con la de claudina-1, en los controles, se notó que la línea continua que dibuja la claudina-8 alrededor de las células es más delgada que la observada para la claudina-1. En los TB y los TA, la marca para la claudina-8 se observó en el núcleo y, solo en pocas células, en el borde celular con un patrón punteado y discontinuo. Con estos resultados podemos concluir que las CMPH expresan las claudinas -2 y -8, de las cuales, la claudina-2 no participa en la regulación de la permeabilidad de la UE, ya que se encuentra localizada en el núcleo y no en la UE. En adición, el que la claudina-2 se localice en el núcleo, sugiere que esta proteína podría tener otra función, quizás transcripcional, además de la de formar canales paracelulares.

La resistencia transepitelial (RET) refleja la integridad funcional de las uniones intercelulares en varios tipos celulares (136-138). La RET mide el flujo de todos los iones a través de un epitelio, la medición se realiza aplicando una corriente transepitelial, posteriormente se mide el potencial generado, y utilizando la ley de Ohm se calcula la resistencia al flujo de corriente (139). Entonces, una RET alta indica que un epitelio es poco permeable, mientras que una resistencia baja refleja un epitelio muy permeable. La permeabilidad de las CMPH de los TB y los TA fue evaluada por la medición de la RET. Las monocapas control y las monocapas de los TB no mostraron diferencias en los valores de RET, mientras que las monocapas de los TA exhibieron una RET más baja en comparación que los controles y los TB. Nosotros observamos que en las CMPH, la claudina-1 y la -8 se encuentra en el borde celular en los controles, mientras que en los TB estas proteínas están casi ausentes, sin embargo, sus valores de RET son iguales entre los controles y los TB. La RET neta de un epitelio está dada por todas las claudinas que constituyen a la UE. El daño en la claudina-1 y -8 en los TB no modifica la RET, ya que su RET es igual a la de los controles, esto sugiere que la claudina-1 y -8 no regulan la RET en las CMPH, lo cual indica que aunque estas proteínas se encuentran en la UE, no la están sellando. Sin embargo, la importancia en la expresión de la claudina-1 y -8 en las CMPH, podría ser el

mantenimiento de la polaridad celular, más que la regulación del transporte paracelular. En adición es importante caracterizar la expresión tanto de claudinas formadoras de barrera (la claudina-3, -4, -11, -14 ó -19) como de formadoras de canales (la claudina-10 ó-15)(30;46;140) en las CMPH, y además estudiar su participación en la regulación de la UE, para poder justificar los hallazgos encontrados y conocer las claudinas que regulan la RET en las CMPH. Además, la baja RET en los TA con respecto al control y el TB, sugiere la presencia de diferentes poros para cationes y aniones (139), entre estos grupos. En conclusión, la claudina-1 y -8 no participan en la regulación de la RET en las CMPH, y las monocapas de los TA son más permeables que las monocapas de los TB y de los controles.

Otra manera de evaluar la permeabilidad de la vía paracelular es la medición del flujo de dextran (28). El tamaño y selectividad de los poros en la UE se puede evaluar usando dextrans de diferentes tamaños, neutros o con carga (28). En este trabajo se midió el flujo de dextran-FITC aniónico de 10 y de 70 kDa en las monocapas de células control, TB y TA. En condiciones basales, las monocapas control fueron igualmente permeables al dextran de 10 y de 70 kDa, por el tamaño del dextran se esperaba que la permeabilidad para el dextran de 10 kDa fuera mayor que la del dextran de 70 kDa. Los dextrans utilizados tenían la misma carga, lo cual sugiere que la permeabilidad en los controles depende de la carga y no del tamaño. En las monocapas de los TB y los TA tampoco hubo distinción entre el tamaño de los dextrans, la permeabilidad para el dextran de 10 kDa fue igual a la del dextran de 70 kDa. Al comparar con las monocapas control, la permeabilidad de los TB y los TA a los diferentes dextrans, las monocapas de los TB y los TA mostraron ser menos permeables a los dextrans de 10 y 70 kDa que las monocapas control. Estos resultados muestran cambios en la selectividad iónica del poro en los TB y los TA con respecto al grupo control, caracterizados por una disminución en la permeabilidad a aniones.

Los cambios en la morfología y en la función fueron diferentes entre las células de los TB y los TA. Tratando de encontrar una explicación de los hallazgos anteriormente descritos, analizamos los datos clínicos de los pacientes (Tabla 1). Se sugirió que los cambios morfológicos y funcionales de los TB y los TA, podrían

estar relacionados con la edad y con el tiempo en diálisis, pero como se mencionó en párrafos anteriores no hubo diferencias, entre los TB y los TA. Los cambios funcionales del peritoneo con respecto al tiempo en diálisis se han relacionado también con los episodios de peritonitis. En los TB, el 46.6 % de los pacientes tuvieron peritonitis, mientras que los TA solo el 33.3 % de los pacientes tuvieron peritonitis. Sin embargo, es importante mencionar que estos eventos se presentaron 6 meses antes del estudio. En adición, Wong y col., (2000) describieron que la velocidad de transporte en pacientes con repetidos episodios de peritonitis (3 ó más episodios) no fue diferente de aquellos que tuvieron solo un episodio de peritonitis (94). Sin embargo, Wong y col., describen que la función del peritoneo se modifica solo cuando la peritonitis es severa, describiéndola como una peritonitis en la que se requiere cambiar el catéter o de un tratamiento con antibióticos por más de tres semanas (94). En este estudio no se llevó el registro de la causa y la duración de la peritonitis, ni del tipo de antibióticos con los que fue tratada la peritonitis en los pacientes estudiados. Sin embargo, más que el tiempo de diálisis, la edad y la peritonitis consideramos que los cambios entre los TB y los TA, están más relacionados con la dosificación de la diálisis. Como se mencionó anteriormente, la desventaja de los TA en la DPAC, es que pierden el gradiente osmótico muy rápido y por lo tanto no hay una buena remoción de líquidos, así que estos pacientes requieren de un mayor número de cambios (5 ó 6 cambios), con permanencias cortas en cavidad (de 1 h o menos), un mayor volumen de líquido de diálisis y una concentración de glucosa alta. En el caso de los TB, la eliminación de líquidos es excelente pero la depuración de los solutos es baja, así que estos pacientes requieren de 4 cambios, con permanencias largas (de 3 a 4 h). En general, el TB esta “húmedo” durante el día, es decir su cavidad peritoneal siempre está llena de líquido, mientras que en los TA están “secos” durante el día, es decir su cavidad peritoneal está vacía. Considerando los tratamientos de diálisis, el peritoneo de los TB se encuentra más tiempo expuesto a las soluciones de diálisis, casi todo el día, mientras que en los TA, el peritoneo tiene periodos de descanso. Por otro lado, aunque el TA tiene periodos de descanso, su tratamiento también podría impactar la función del peritoneo, ya que al tener más cambios, las sustancias que son secretadas por las células mesoteliales son removidas con mayor frecuencia. Con lo mencionado podemos sugerir que la hipertrofia, el aumento en la expresión del FCT- $\beta$ 1, el

aumento en los marcadores de TEM, el daño y reducción importante en las UE observados en los TB, en comparación con los TA, podría ser resultado de que los TB están más expuestos al líquido de diálisis que en los TA, esto último apoya la hipótesis de que los cambios en las células de los TB son resultado de un proceso adaptativo. Por otra parte, en el TA, la pérdida de las microvellosidades, considerando la hipótesis de que la formación de las microvellosidades depende del glicocálix, podría deberse a la remoción constante del glicocálix, en estos cultivos. A reserva de que se corrobore lo antes mencionado, la dosificación de la diálisis puede tener un papel importante en los cambios morfológicos y funcionales de las células mesoteliales, en la diálisis a largo plazo.

El ácido todo *trans* retinoico (ATTR) regula varios programas genéticos que son críticos para el control del desarrollo, la homeostasis, la proliferación y la diferenciación celular, así también como la muerte y la sobrevivencia celular (141). El ATTR regula la expresión de los genes a través de dos tipos de receptores nucleares: los receptores para ácido retinoico (RAR) y los receptores para retinoides X (RXR), los cuales están compuestos de tres subtipos ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ )(73). Se ha reportado que en las células mesoteliales, el ácido retinoico induce la adquisición de un fenotipo epitelial (16) y en varios tipos celulares induce la formación de la UE (79,82,83,142,143). En este trabajo se exploró el efecto del ATTR en la morfología y en la función de las CMPH provenientes de pacientes con TB o TA.

Al tratar los cultivos de los controles, los TB y los TA con ATTR se observó que el tratamiento con ATTR redujo el tamaño de las células y con ello la presencia de células hipertróficas, en los cultivos de los TB, mientras que en las células de los controles y los TA, el ATTR no tuvo ningún efecto. La hipertrofia inducida por la alta glucosa en las CMPH ha sido asociada con el estrés oxidativo y el FCT- $\beta$ 1(115). Se ha demostrado que la exposición continua y prolongada a agentes oxidantes induce hipertrofia, y consecuentemente senescencia prematura y la activación de mecanismos que conducen a apoptosis (144). Las CMPH hipertróficas presentan un aumento en la generación de las especies reactivas de oxígeno, una disminución en el contenido de glutatión (principal antioxidante), y daño oxidativo en el ADN evidenciado por la presencia de 8-hidroxi-2-

deoxiguanosina (marcador de daño oxidativo en el ADN) (145,146). En cuanto al FCT- $\beta$ 1, Ksiazek y col., (2007) demostraron que la exposición de las CMPH al FCT- $\beta$ 1 produce hipertrofia (61). De acuerdo con estos hallazgos, se encontró que los niveles del FCT- $\beta$ 1 estuvieron elevados en los TB y en estos cultivos se observó un aumento en el tamaño promedio de las células e hipertrofia. El ATTR tiene efectos antioxidantes (147), además dependiendo del tipo celular, el ATTR puede incrementar o disminuir la expresión del FCT- $\beta$ 1 (148-151). En un modelo de DP en rata, el ATTR disminuyó la expresión peritoneal del FCT- $\beta$ 1 (152). De acuerdo con esto, se encontró que el ATTR disminuyó la expresión del FCT- $\beta$ 1 en las células de los TB, mientras que en los controles y en los TA, el ATTR no modificó la expresión de este factor. En adición, la disminución de la expresión del FCT- $\beta$ 1 en el TB estuvo acompañada de una reducción en el tamaño de las células y en el número de las células hipertróficas, en estos cultivos. Los resultados sugieren que la hipertrofia en las células mesoteliales de los TB está asociada con la expresión del FCT- $\beta$ 1, ya que la disminución en la expresión del FCT- $\beta$ 1 inducida por el ATTR, se acompañó de una reducción en el número de células hipertróficas. En adición, es probable que los efectos antioxidantes del ATTR también contribuyan con la reversión de la hipertrofia observada en los TB.

También se estudió el efecto del ATTR en la TEM en los cultivos de las células mesoteliales de los TB y los TA. En ambos grupos, el ATTR indujo la reorganización de los filamentos intermedios de vimentina y de citoqueratina-18, y redujo la expresión de la vimentina y de la  $\alpha$ -AML. Anteriormente, se mencionó que el FCT- $\beta$ 1 es un inductor de la TEM en las CMPH, en los TB este factor de crecimiento estuvo aumentado, mientras que los TA tuvieron valores iguales a los del control. El tratamiento con ATTR solo disminuyó la expresión del FCT- $\beta$ 1 en el TB, sin embargo en ambos, TB y TA, el ATTR redujo la expresión de la vimentina y de la  $\alpha$ -AML, y reorganizó los filamentos intermedios, lo cual sugiere que los efectos del ATTR observados en los TB y los TA, podrían ser mediados por un mecanismo diferente al de la disminución en la expresión del FCT- $\beta$ 1. Se ha reportado que la proteína cinasa activada por mitógeno p38, también conocida como p38MAP cinasa, inhibe la inducción de la TEM en las CMPH (153). Strippoli y col., (2010) mostraron que el uso de un inhibidor de la vía p38 (SB203580) induce la desorganización de los filamentos de citoqueratina, una disminución en

la expresión de la citoqueratina y la ZO-1, y aun aumento en la expresión de la vimentina, en las CMPH (153). Además, estos autores mostraron que la inhibición de la vía p38 aumenta la translocación nuclear y la actividad transcripcional de p65 NF- $\kappa$ B, un importante inductor de la TEM (153). Se ha descrito que el ácido retinoico activa a la vía p38MAP cinasa (76), esta activación requiere de la formación de un complejo entre el RAR $\alpha$  (presente en la membrana) con una proteína G $\alpha$ q, en respuesta al tratamiento con ácido retinoico (76). Aquí se mostró que el ATTR revirtió la tendencia a un proceso de TEM en los cultivos de los TB y los TA. Los efectos del ATTR podrían estar mediados por la activación de la vía p38.

Existe evidencia de que el ácido retinoico y la activación de los RAR inducen ciliogénesis (154-157). El tratamiento con ATTR indujo un aumento en el tamaño del cilio en las células control a partir de la concentración de 100 nM de ATTR y en los TA a partir de la concentración de 50 nM de ATTR. En condiciones basales los cultivos de los TB y los TA mostraron una reducción en el porcentaje de las células ciliadas en comparación con el grupo control, siendo más importante en el TA. El tratamiento con ATTR indujo un aumento en el porcentaje de células ciliadas en el TB a partir de la concentración de 50 nM de ATTR, mientras que en el TA fue a partir de la concentración de 100 nM de ATTR. La información acerca del o los mecanismo(s), por el cual, el ácido retinoico induce la ciliogénesis es escasa. Hill y col., (1998) reportaron que el ácido retinoico induce un aumento en la expresión de la 15-lipooxigenasa y de la sintasa de la prostaglandina-H, enzimas asociadas con ciliogénesis, en células epiteliales traqueo bronquiales de humano (158). Por otra parte, Larre y col., (2011) reportaron que la ouabaína induce la ciliogénesis en las células MDCK y que depende de la activación de la vía de las proteínas cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2) (159). Se ha reportado que el ATTR activa la vía de ERK1/2 en las células COS-1 (línea celular de riñón de mono verde africano) y que esta activación afecta el ciclo celular prolongando la fase G1, a través de un aumento en la expresión de la proteína p27 (160). Este podría ser un mecanismo, sin embargo es necesario corroborar la participación de la vía de ERK1/2 en los efectos observados por el ATTR en los TB y los TA, y estudiar los efectos del ATTR sobre el ciclo celular. En contraste con los TB y los TA, en el grupo control la concentración de 100 y 200



nM de ATTR causó una reducción en el porcentaje de las células ciliadas. Los cilios son estructuras postmitóticas presentes en las células que se encuentran en la fase G0/G1 y al inicio de la fase S del ciclo celular, que es cuando las células están en un estado no proliferativo (122). En este trabajo no se evaluó el efecto del ATTR sobre el ciclo celular, sin embargo sería importante, para determinar si la reducción del porcentaje de células ciliadas en el control, se debe a que las células están en una fase proliferativa. Por otro lado, se ha descrito que el desarrollo del cilio está asociado con la polaridad celular (125,159). En las células control, el tratamiento con ATTR deslocalizó a la claudina-1 del borde celular y esto se acompañó de una reducción en su expresión en la fracción insoluble (membranal), es posible que el ATTR esté causando cambios en la polaridad de las células control y con ello, la pérdida del cilio en estas células. Considerando este razonamiento, entonces el aumento en el porcentaje de las células ciliadas en los TB y los TA puede ser debido a que el tratamiento con ATTR ayude al establecimiento de la polaridad en estos cultivos. Esta hipótesis es muy probable dado que el ATTR disminuyó la expresión de los marcadores mesenquimales, y aumentó la expresión de las proteínas de la UE y las relocalizó en el borde celular, favoreciendo la adquisición de un fenotipo epitelial. Nuestros resultados mostraron que el ATTR induce un aumento en el tamaño del cilio en las células control y en los TA, y ciliogénesis en las células de los TB y los TA, mientras que en los controles, a las concentraciones más altas (100 y 200 nM) tienen el efecto opuesto. La ciliogénesis inducida por el ATTR podría estar relacionada con el establecimiento de la polaridad celular.

El efecto del ATTR sobre las microvellosidades también se exploró. El tratamiento con ATTR aumentó el tamaño de las microvellosidades en el TB, mientras que en los TB y los TA no tuvo efecto. En cuanto al número de microvellosidades, el ATTR aumentó el número de microvellosidades solo en el grupo control. En cuanto a la morfología de las microvellosidades, en el TA (microvellosidades fusionadas), el ATTR no tuvo ningún efecto. Hasta el momento no existe evidencia sobre la participación del ácido retinoico en la formación de las microvellosidades. Se ha descrito que el RAR está involucrado en la síntesis del RNAm de la sintasa de ácido hialurónico (161), como se mencionó en párrafos anteriores, el ácido hialurónico induce la formación de las microvellosidades en

las células MCF-7 (células de adenocarcinoma de mama humano). En adición, Pasonen y col., (2008) mostraron que el ATTR incrementa la síntesis del ácido hialurónico y la expresión de su sintasa en cultivos de queratinocitos de rata (162). Sin embargo, es necesario estudiar si el ácido hialurónico participa en la formación de microvellosidades en las CMPH. Con nuestros resultados podemos concluir que el ATTR no modifica la forma de las microvellosidades y no induce su formación, en los cultivos de los TB y los TA.

El ATTR juega un papel importante en la formación de la UE, a través de mecanismos transcripcionales mediados por el heterodímero RAR/RXR (79,82). Se ha descrito que la interrupción de la vía de señalización del ácido retinoico, a través de mutaciones en los RAR y en los RXR, se encuentra asociada con la desorganización de la arquitectura epitelial, tal como la que se observa en tejidos cancerosos (79). Chung y col., (2010) demostraron que en las células de Sertoli de un ratón deficiente del RAR $\alpha$ , se presenta un retraso en la incorporación de la ZO-1 dentro de la UE (163). La activación transcripcional depende de la formación del heterodímero RAR/RXR, el cual reconoce una secuencia, en el ADN, llamada elementos de respuesta para el ácido retinoico (RARE del inglés *Retinoic acid response elements*). Un estudio bioinformático reveló que varios genes que son componentes de la UE y de las uniones comunicantes, están contenidos en la secuencia RARE (163). Se ha descrito que el ATTR induce la expresión de las proteínas de la UE en varios tipos celulares como: las células F9 de carcinoma embrionario, en las células MDCK y en los queratinocitos orales (79,82,83). En este trabajo se estudió por primera vez el efecto del ATTR en la expresión y en la distribución de las proteínas de la UE en CMPH normales y de pacientes en diálisis. En el control, el ATTR deslocalizó a la claudina-1 del borde celular y disminuyó su expresión con la concentración de 100 nM, pero no modificó la expresión, ni la distribución de la ocludina, la ZO-1 y la claudina-2. En adición, en el control, el ATTR localizó a la claudina-8 en el borde celular, observándose una distribución mucho mejor en comparación con las que no recibieron el ATTR. En el TB y en el TA, el tratamiento con ATTR mejoró la localización de la claudina-1 y -8, la ocludina y la ZO-1 en el borde celular. Además, el tratamiento con ATTR aumentó la expresión de la claudina-1, la ocludina y la ZO-1 en el TA, y la expresión solo de la ZO-1 en el TB, pero no modificó la expresión de la claudina-2

y -8, en el TB y en el TA. La localización de las proteínas de la UE y el grado de sellado de la UE, está regulada por la fosforilación. La fosforilación de las claudinas, la ocludina y la ZO-1, impactan la función de las células epiteliales y endoteliales (28). La fosforilación puede ser lograda por la acción de diferentes cinasas sobre distintos residuos (tirosina, serina, trionina o cisteína) en la misma proteína (28). Las MAP cinasas están involucradas en la regulación de la UE (28). p38 es uno de los miembros de la familia de las MAP cinasas. En las CMPH se ha descrito que la inhibición de la vía p38 resulta en la desorganización de la E-cadherina y la ZO-1 (153). Se ha reportado que el ácido retinoico induce la activación de la vía p38 (76). La relocalización inducida por el ATTR de las proteínas claudina-1 y -8, la ocludina y la ZO-1 dentro de la UE, en los TB y los TA, podría estar mediada por la vía p38 ó por la activación de otras cinasas (la PKC, la PKA, la PKG, la PI3K, las cinasas de las cadenas ligeras de miosina o la vía de Rho) o fosfatasas (PP1, PP2A o PP2B) que también regulan el grado de fosforilación de la UE (28). Nuestros resultados indican que los efectos del ATTR favorecen la relocalización y/o la expresión de las proteínas de la UE, principalmente en las células donde existen alteraciones en la UE, como en las células de los TB y los TA, ya que el tratamiento con ATTR en el grupo control induce deslocalización y disminución, en la expresión de la claudina-1.

El ATTR regula la resistencia eléctrica transepitelial (RET) de la UE en varios tipos celulares (82,164,165). Tobioka y col., (1996) reportaron que el ATTR aumenta la resistencia eléctrica transepitelial (RET) en las células mesoteliales del peritoneo de rata (136). Nuestros resultados mostraron que el ATTR disminuye la RET, en las células control y en las células de los TA, mientras que en el TB, el ATTR no modificó la RET, pero ayudó a que la RET se estableciera antes, en comparación con las células que no recibieron el retinoide. La disminución de la RET inducida por ATTR también ha sido observada en las células Caco-2 (células de cáncer de colon) y en las células CasKi (células cervicales humanas) (142,164). Es importante notar que en el grupo de Tobioka y col., (1996) se usó una concentración de ATTR mucho más alta (100  $\mu$ M) que la utilizada en este trabajo (50 y 100 nM). La diferencia en la concentración del ATTR utilizada por el grupo de Tobioka y col. y en este trabajo puede estar relacionada con la especie (humano en este estudio y rata en el trabajo de

Tobioka), sugiriendo que las células humanas son más sensibles que las células de rata, al tratamiento con ATTR. Con nuestros resultados podemos concluir que el ATTR regula la RET de las CMPH control y de los TA, mientras que en los TB, el ATTR no modifica la RET.

Posteriormente, se evaluó el efecto del ATTR en los flujos de dextran aniónicos de 10 y 70 kDa. En el grupo control, el ATTR no modificó la permeabilidad al dextran de 10 kDa, mientras que con el dextran de 70 kDa se observa una tendencia, aunque no fue significativa, a reducir su permeabilidad. En los TB, la permeabilidad al dextran de 10 y 70 kDa, no fue modificada por el tratamiento con ATTR. Pero en el TA, el ATTR indujo una disminución en la permeabilidad al dextran de 10 kDa, lo cual indica que en las monocapas de los TA, el ATTR disminuye la permeabilidad a aniones. Con estos resultados se puede concluir que el ATTR no modificó la permeabilidad para aniones en los controles y en los TB, pero si restringió su paso en los TA, lo cual sugiere que el ATTR indujo cambios en la actividad, selectividad y/o en la forma del poro, en los TA.

Los efectos del ATTR en la RET y en la permeabilidad al dextran fueron diferentes entre los TB y los TA. Los efectos del ATTR son mediados a través de receptores nucleares (79). Además de los receptores nucleares, los efectos del ATTR dependen del balance entre su síntesis y su metabolismo (166), y su biodisponibilidad (82). La biodisponibilidad del ATTR depende del transporte y distribución de la vitamina A, el cual es mediado por un grupo específico de proteínas: la proteína fijadora de retinol (RBP, *retinol binding protein*), que transporta al retinol desde el hígado hacia sus células blanco; la proteína fijadora de retinol celular (CRBP, *celular retinol binding protein*) y la proteína fijadora de ácido retinoico celular (CRABP, *celular retinoic acid binding protein*), ambas proteínas se encuentran dentro de las células (167,168). La importancia del complejo vitamina A/ acarreadores son marcadores de biodisponibilidad. Aguilera y col., (2002) reportaron que aunque los niveles de vitamina A están aumentados en el plasma de los pacientes en diálisis, se observan frecuentemente algunos signos clínicos de hipovitaminosis (169). Esto se debe a que los pacientes tienen una baja expresión de la RBP, una proteína sensible a la deficiencia de proteínas y de zinc, por lo tanto, si el suplemento de nutrientes es bajo, los pacientes

pueden mostrar signos de deficiencia de vitamina A, aún si su ingesta es adecuada (169). Es probable que las diferentes respuestas al tratamiento con ATTR observados en el TB y en el TA, puedan ser resultado de diferencias en la expresión y en la función de las moléculas involucradas en la vía de señalización y/o en la biodisponibilidad del ATTR, en estos pacientes.

## 10. CONCLUSIONES

- Las células mesoteliales de pacientes en diálisis peritoneal ambulatoria continua con TB o TA exhiben cambios morfológicos y funcionales que pueden estar asociados con la dosificación de la diálisis.
- Las monocapas de las células de los TB y de los TA exhiben permeabilidades diferentes, correlacionándose con la permeabilidad peritoneal descrita en estos pacientes.
- Se demostró que las CMPH expresan claudina-2 y -8, y que la baja RET en las CMPH no se debe a la claudina-2, ya que esta se localiza en el núcleo y no en la UE.
- La baja RET observada en las monocapas de las CMPH normales, a pesar de que expresan la claudina-1 y -8, sugiere que aunque estas proteínas se encuentran en la UE no la están sellando, o que no tienen una participación importante en la regulación de la RET, en estas células.
- El ATTR ayuda a la preservación del fenotipo epitelial en las CMPH de los pacientes en diálisis peritoneal ambulatoria continua con TB o TA.
- El ATTR induce la expresión de las proteínas de la UE y ayuda a su localización en la UE de una manera diferencial, en las CMPH de los TB y de los TA.
- El ATTR induce cambios en la permeabilidad de las monocapas control y en las monocapas de los TA, lo cual puede estar relacionado con cambios en la expresión de las proteínas de la UE o con cambios en la actividad y/o selectividad de los poros paracelulares inducidos por el ATTR, en estos cultivos.

## 11. CONCLUSIÓN GENERAL

- Las células mesoteliales de los TB o los TA, tienen cambios morfológicos y funcionales, que pueden estar asociados con la permeabilidad peritoneal descrita en estos pacientes. Estos cambios morfológicos y funcionales pueden estar relacionados con la dosificación de la diálisis peritoneal en estos pacientes.
- El ATTR puede ser una alternativa terapéutica para mantener la integridad del mesotelio en los pacientes en diálisis peritoneal, ya que los efectos del ATTR descritos están a favor de preservar la integridad de las células mesoteliales y con ello prolongar la función peritoneal.

## 12. PERSPECTIVAS

- Estudiar el ciclo celular, la expresión de genes que inhiben el ciclo celular y de marcadores de senescencia, así como, la actividad metabólica, en las células de los TB y TA, con el fin de confirmar si la hipertrofia observada en estos cultivos corresponde a un proceso temprano de senescencia o a un proceso adaptativo.
- Estudiar si el ácido hialurónico participa en la formación de las microvellosidades, en las CMPH.
- Estudiar si las estructuras alargadas que rodean al cilio, en los TA, son microvellosidades.
- Estudiar la expresión de claudinas formadoras de barrera (la claudina -3, -4, -11, -14 ó -19) y de claudinas formadoras de canales (la claudinas -10 ó -15), en las CMPH, así como su participación en la regulación de la UE.
- Estudiar el efecto del ATTR en la angiogénesis inducida por los líquidos de diálisis, en un modelo de diálisis peritoneal en rata.
- Estudiar la selectividad por tamaño (dextrans neutros de diferente tamaño) y por carga (dextrans catiónicos) de la ruta paracelular en las CMPH de los TB y los TA, y el efecto del ATTR.
- Estudiar si los efectos del ATTR en la expresión de los marcadores de TEM, en las CMPH de los TB y de los TA, son a través de la vía p38MAP cinasa.
- Estudiar la participación de la vía ERK1/2 en la ciliogénesis inducida por el ATTR, en los TB y en los TA.
- Estudiar la expresión de los RAR en las CMPH de los TB y los TA, ya que las diferentes respuestas observadas en estos cultivos al tratamiento con ATTR, podría ser por modificaciones en la expresión o función de estos receptores.
- Estudiar si las CMPH sintetizan el ATTR, así como su contenido en las CMPH de los TB y los TA, y si el ATTR exógeno modifica su síntesis.



## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Blake PG, Daugirdas JT (2003). Fisiología de la diálisis peritoneal: Daugirdas JT, Blake PG, Ing TS. (Eds.). Manual de Diálisis. 2a. Ed. Masson. Barcelona. Pp. 291-307.
- (2) Vallejo-Triano J (2013). Diálisis peritoneal. Hospital Regional Universitario Carlos Haya. En línea, disponible en <http://www.carloshaya.net/biblioteca/contenidos/docs/nefrologia/predialisis/josemiguel.PDF>
- (3) López-Bermúdez E (2012). Diferentes tipos de diálisis peritoneal, ventajas e inconvenientes. Sociedad española de enfermería nefrológica. En línea, disponible en <http://www.revistaseden.org/files/tema%208.diferentes%20tipos%20de%20dp.ventajas%20e%20inconvenientes.pdf>
- (4) Twardowski ZJ (2006). Pathophysiology of peritoneal transport. Contrib Nephrol. 150:13-9.
- (5) Correa-Rotter R, Cueto-Manzano A (2001). The problem of the high transporter: is survival decreased? Perit Dial Int. 21 Suppl 3:S75-S79.
- (6) Yung S, Li FK, Chan TM (2006). Peritoneal mesothelial cell culture and biology. Perit Dial Int. 26(2):162-73.
- (7) Flessner MF (2005). The transport barrier in intraperitoneal therapy. Am J Physiol Renal Physiol. 288(3):F433-F442.
- (8) Mutsaers SE (2004). The mesothelial cell. Int J Biochem Cell Biol. 36(1):9-16.
- (9) Yung S, Chan TM (2012). Pathophysiological changes to the peritoneal membrane during PD-related peritonitis: the role of mesothelial cells. Mediators Inflamm. 2012:1-21.
- (10) Yung S, Chan TM (2007). Mesothelial cells. Perit Dial Int. 27 Suppl 2:S110-S115.
- (11) Bird SD, Legge M, Walker RJ (2004). Cultured peritoneal mesothelial cells exhibit apical primary cilia. Cell Biol Int. 28(2):79-92.
- (12) Bird SD (2004). Mesothelial primary cilia of peritoneal and other serosal surfaces. Cell Biol Int. 28(2):151-9.
- (13) Praetorius HA, Spring KR (2001). Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. J Membr Biol. 184(1):71-9.
- (14) Praetorius HA, Frokiaer J, Nielsen S, Spring KR (2003). Bending the primary cilium opens Ca<sup>2+</sup>-sensitive intermediate-conductance K<sup>+</sup> channels in MDCK cells. J Membr Biol. 191(3):193-200.

- (15) Angelow S, Ahlstrom R, Yu AS (2008). Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295(4):F867-F876.
- (16) Kim KH, Stellmach V, Javors J, Fuchs E (1987). Regulation of human mesothelial cell differentiation: opposing roles of retinoids and epidermal growth factor in the expression of intermediate filament proteins. *J Cell Biol.* 105 (6 Pt 2):3039-51.
- (17) Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J (2008). Intermediate filaments. Rebecca Gruliow. (Ed.). *Cell Biology.* 2a. Ed. Elsevier. Philadelphia. Pp. 645-654.
- (18) Kalluri R, Weinberg RA (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119(6):1420-8.
- (19) Aroeira LS, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, del PG, Jiménez-Heffernan JA, Selgas R, López-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 (7):2004-13.
- (20) Gout S, Huot J (2008). Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer. *Cancer Microenviron.* 1(1):69-83.
- (21) Koli K, Keski-Oja J (1996). Transforming growth factor-beta system and its regulation by members of the steroid-thyroid hormone superfamily. *Adv Cancer Res.* 70:63-94.
- (22) Selgas R, Bajo A, Jimenez-Heffernan JA, Sánchez-Tomero JA, del PG, Aguilera A, López-Cabrera M (2006). Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell--its role in the response of the peritoneum to dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 21 Suppl 2:ii2-ii7.
- (23) Border WA, Noble NA (1994). Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 331(19):1286-92.
- (24) Barbera MJ, Puig I, Dominguez D, Julien-Grille S, Guaita-Esteruelas S, Peiro S, Baulida J, Francí C, Dedhar S, Larue L, García de Herreros A (2004). Regulation of Snail transcription during epithelial to mesenchymal transition of tumor cells. *Oncogene.* 23(44):7345-54.
- (25) Troussard AA, Costello P, Yoganathan TN, Kumagai S, Roskelley CD, Dedhar S (2000). The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). *Oncogene.* 19 (48):5444-52.
- (26) Anderson JM (2001). Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci.* 16:126-30.
- (27) Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N (2008). Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta.* 1778 (3):588-600.

- (28) González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*. 1778 (3):729-56.
- (29) Wiley J (1995). Intercellular junctions. HarperCollings College. En línea, disponible en <http://animalcellbiology.files.wordpress.com/2011/08/intercellularjunctions2.jpg>
- (30) Amasheh S, Fromm M, Gunzel D (2011). Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function. *Acta Physiol (Oxf)*. 201(1):133-40.
- (31) Cerejido M, Contreras RG, Shoshani L, Flores-Benítez D, Larre I (2008). Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochim Biophys Acta*. 1778(3):770-93.
- (32) Velázquez-Moyado JA (2012). Estudio de los cilios, las microvellosidades y las proteínas de la unión estrecha en las células mesoteliales peritoneales de ratas diabéticas. CINVESTAV. México. Pp.2
- (33) Furuse M (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(1):a002907.
- (34) González-Mariscal L, Garay E, Quirós M (2011). Identification of claudins by western blot and immunofluorescence in different cell lines and tissues. *Methods Mol Biol*. 762:213-31.
- (35) Rao R (2009). Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Ann N Y Acad Sci*. 1165:62-8.
- (36) Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S (1997). Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol*. 137(6):1393-401.
- (37) Basuroy S, Seth A, Elias B, Naren AP, Rao R (2006). MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. *Biochem J*. 393(Pt 1):69-77.
- (38) 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):c97-105.
- (39) Kaneda K, Miyamoto K, Nomura S, Horiuchi T (2006). Intercellular localization of occludins and ZO-1 as a solute transport barrier of the mesothelial monolayer. *J Artif Organs*. 9(4):241-50.
- (40) Horiuchi T, Matsunaga K, Banno M, Nakano Y, Nishimura K, Hanzawa C, Miyamoto K, Nomura S, Ohta Y (2009). HPMCs induce greater intercellular delocalization of tight junction-associated proteins due to a

- higher susceptibility to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared with HUVECs. *Perit Dial Int.* 29(2):217-26.
- (41) Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S (2002). Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol.* 13(4):875-86.
  - (42) Rahner C, Mitic LL, Anderson JM (2001). Heterogeneity in expression and subcellular localization of claudins 2, 3, 4, and 5 in the rat liver, pancreas, and gut. *Gastroenterology.* 120(2):411-22.
  - (43) Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Liebner S, Engelhardt B (2001). Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci Lett.* 307(2):77-80.
  - (44) Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2002). Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 115(Pt 24):4969-76.
  - (45) Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S (2001). Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol.* 153(2):263-72.
  - (46) Amasheh S, Milatz S, Krug SM, Markov AG, Gunzel D, Amasheh M, Fromm M (2009). Tight junction proteins as channel formers and barrier builders. *Ann N Y Acad Sci.* 1165:211-9.
  - (47) Li FK, To CH, Leung JK, Chan TM, Lai KN (2001). Electrophysiology and glucose transport of human peritoneal mesothelial cells: implications for peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 21(2):115-21.
  - (48) Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, Sakai N, Sugimoto K, Wada T, Kojima T, Yamashita T, Sawada N (2006). Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem.* 54(8):933-44.
  - (49) Angelow S, Schneeberger EE, Yu AS (2007). Claudin-8 expression in renal epithelial cells augments the paracellular barrier by replacing endogenous claudin-2. *J Membr Biol.* 215(2-3):147-59.
  - (50) Yu AS, Enck AH, Lencer WI, Schneeberger EE (2003). Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem.* 278(19):17350-9.
  - (51) Angelow S, Kim KJ, Yu AS (2006). Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells. *J Physiol.* 571(Pt 1):15-26.
  - (52) González-Mariscal L, Namorado MC, Martín D, Sierra G, Reyes JL (2006). The tight junction proteins claudin-7 and -8 display a different

subcellular localization at Henle's loops and collecting ducts of rabbit kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 21(9):2391-8.

- (53) Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S (2010). Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci USA* .107(42):18010-5.
- (54) González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE (2003). Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*. 81(1):1-44.
- (55) Ito T, Yorioka N (2008). Peritoneal damage by peritoneal dialysis solutions. *Clin Exp Nephrol*.12(4):243-9.
- (56) Fang W, Qian JQ, Yu ZY, Chen SS (2004). Morphological changes of the peritoneum in peritoneal dialysis patients. *Chin Med J (Engl)* . 117(6):862-6.
- (57) Yanez MM, Lara PE, Selgas R, Ramírez HM, Domínguez JC (2003). Peritoneal dialysis and epithelial to mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl Med*. 348:403-13.
- (58) López-Cabrera M, Aguilera A, Aroeira LS, Ramírez-Huesca M, Pérez-Lozano ML, Jiménez-Heffernan JA, Bajo M, Del PG, Sánchez-Tomero JA, Selgas R (2006). Ex vivo analysis of dialysis effluent-derived mesothelial cells as an approach to unveiling the mechanism of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int*. 26(1):26-34.
- (59) Takazoe K, Nakayama M, Utsunomiya Y, Osaka N, Hayakawa H, Kubo H, Kawaguchi Y, Sakai O (1997). Detection of TGF-beta 1 in CAPD effluents. *Clin Nephrol*. 47(1):67-9.
- (60) Wang T, Chen YG, Ye RG, Li SL, Li HQ, Chen YX (1995). Effect of glucose on TGF-beta 1 expression in peritoneal mesothelial cells. *Adv Perit Dial*. 11:7-10.
- (61) Ksiazek K, Korybalska K, Jorres A, Witowski J (2007). Accelerated senescence of human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose: the role of TGF-beta1. *Lab Invest*. 87(4):345-56.
- (62) Ling G, Zhu X, Xia Y, Liu F, Peng Y, Duan S, Liu H, Liu Y, Sun L (2009). Effect of glucose peritoneal dialysates on the transmesothelial electrical resistance and cellular migration of monolayer human peritoneal mesothelial cell. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 34(5):418-24.
- (63) Zhu X, Ling G, Xiao L, Liu Y, Duan S, Peng Y, Kanwar YS, Sun L, Liu F (2010). Role of mitochondrial respiratory chain complex III in high glucose peritoneal dialysate-induced hyperpermeability of HPMCs. *Ren Fail*. 32(9):1103-8.
- (64) Ito T, Yorioka N, Yamamoto M, Kataoka K, Yamakido M (2000). Effect of glucose on intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 11(11):1969-79.

- (65) Ronaldson PT, Demarco KM, Sánchez-Covarrubias L, Solinsky CM, Davis TP (2009). Transforming growth factor-beta signaling alters substrate permeability and tight junction protein expression at the blood-brain barrier during inflammatory pain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29(6):1084-98.
- (66) Pierucci-Alves F, Yi S, Schultz BD (2012). Transforming growth factor beta 1 induces tight junction disruptions and loss of transepithelial resistance across porcine vas deferens epithelial cells. *Biol Reprod.* 86(2):36.
- (67) Theodosiou M, Laudet V, Schubert M (2010). From carrot to clinic: an overview of the retinoic acid signaling pathway. *Cell Mol Life Sci.* 67(9):1423-45.
- (68) Blomhoff R, Blomhoff HK (2006). Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol.* 66(7):606-30.
- (69) Sommer A (1998). Xerophthalmia and vitamin A status. *Prog Retin Eye Res.* 17(1):9-31.
- (70) Collins MD, Mao GE (1999). Teratology of retinoids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:399-430.
- (71) Melhus H, Michaelsson K, Kindmark A, Bergstrom R, Holmberg L, Mallmin H, Wolk A, Ljunghall S (1998). Excessive dietary intake of vitamin A is associated with reduced bone mineral density and increased risk for hip fracture. *Ann Intern Med.* 129(10):770-8.
- (72) Ross AC, Zolfaghari R, Weisz J (2001). Vitamin A: recent advances in the biotransformation, transport, and metabolism of retinoids. *Curr Opin Gastroenterol.* 17(2):184-92.
- (73) Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H (2006). International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacol Rev.* 58(4):712-25.
- (74) Bastien J, Rochette-Egly C (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 328:1-16.
- (75) Masia S, Álvarez S, De Lera AR, Baretino D (2007). Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol.* 21(10):2391-402.
- (76) Piskunov A, Rochette-Egly C (2012). A retinoic acid receptor RARalpha pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein alphaQ to activate p38MAPK. *Oncogene.* 31(28):3333-45.
- (77) Klaus M (1990). Structure characteristics of natural and synthetic retinoids. *Methods Enzymol.* 189:3-14.

- (78) King M (2013). Retinoic. The medical Biochemistry. En línea, disponible en <http://themedicalbiochemistrypage.org/images/retinoic.jpg>
- (79) Kubota H, Chiba H, Takakuwa Y, Osanai M, Tobioka H, Kohama G, Mori M, Sawada N (2001). Retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor gamma mediate expression of genes encoding tight-junction proteins and barrier function in F9 cells during visceral endodermal differentiation. *Exp Cell Res.* 263(1):163-72.
- (80) Pérez A, Ramírez-Ramos M, Calleja C, Martín D, Namorado MC, Sierra G, Ramírez Ramos ME, Paniagua R, Sánchez Y, Arreola L, Reyes JL (2004). Beneficial effect of retinoic acid on the outcome of experimental acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 19(10):2464-71.
- (81) Kitamura M, Ishikawa Y, Moreno-Manzano V, Xu Q, Konta T, Lucio-Cazana J, Furusu A, Nakayama K (2002). Intervention by retinoic acid in oxidative stress-induced apoptosis. *Nephrol Dial Transplant.* 17 Suppl 9:84-7.
- (82) Osanai M, Nishikiori N, Murata M, Chiba H, Kojima T, Sawada N (2007). Cellular retinoic acid bioavailability determines epithelial integrity: Role of retinoic acid receptor alpha agonists in colitis. *Mol Pharmacol.* 71(1):250-8.
- (83) Hatakeyama S, Ishida K, Takeda Y (2010). Changes in cell characteristics due to retinoic acid; specifically, a decrease in the expression of claudin-1 and increase in claudin-4 within tight junctions in stratified oral keratinocytes. *J Periodontal Res.* 45(2):207-15.
- (84) Morath C, Dechow C, Lehrke I, Haxsen V, Waldherr R, Floege J, Ritz E, Wagner J (2001). Effects of retinoids on the TGF-beta system and extracellular matrix in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 12(11):2300-9.
- (85) Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, Border WA (1992). Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-beta 1. *Kidney Int.* 41(5):1213-21.
- (86) Kasinath BS (1993). Glomerular endothelial cell proteoglycans-regulation by TGF-beta 1. *Arch Biochem Biophys.* 305(2):370-7.
- (87) Delgadillo D, Barbier O, Sierra G, Reyes JL (2012). Retinoic acid improves recovery after nephrectomy and decreases renal TGF-beta1 expression. Gender-related effects. *Fundam Clin Pharmacol.* 26 (5):1-10
- (88) Kang DH, Hong YS, Lim HJ, Choi JH, Han DS, Yoon KI (1999). High glucose solution and spent dialysate stimulate the synthesis of transforming growth factor-beta1 of human peritoneal mesothelial cells: effect of cytokine costimulation. *Perit Dial Int.* 19(3):221-30.

- (89) Su-Hernández L, Abascal-Macías A, Méndez-Bueno FJ, Paniagua R, Amato D (1996). Epidemiologic and demographic aspects of peritoneal dialysis in Mexico. *Perit Dial Int.* 16(4):362-5.
- (90) Pastan S, Bailey J (1998). Dialysis therapy. *N Engl J Med.* 338(20):1428-37.
- (91) Pecoits-Filho R, Abensur H, Cueto-Manzano AM, Domínguez J, Divino Filho JC, Fernández-Cean J, Ortiz AM, Moretta G, Ramos A, Sanabria M, Sesso R, Paniagua R (2007). Overview of peritoneal dialysis in Latin America. *Perit Dial Int.* 27(3):316-21.
- (92) Smit W, Schouten N, van den Berg N, Langedijk MJ, Struijk DG, Krediet RT (2004). Analysis of the prevalence and causes of ultrafiltration failure during long-term peritoneal dialysis: a cross-sectional study. *Perit Dial Int.* 24(6):562-70.
- (93) Cueto-Manzano AM, Diaz-Alvarenga A, Correa-Rotter R (1999). Analysis of the peritoneal equilibration test in Mexico and factors influencing the peritoneal transport rate. *Perit Dial Int.* 19(1):45-50.
- (94) Wong TY, Szeto CC, Lai KB, Lam CW, Lai KN, Li PK (2000). Longitudinal study of peritoneal membrane function in continuous ambulatory peritoneal dialysis: relationship with peritonitis and fibrosing factors. *Perit Dial Int.* 20(6):679-85.
- (95) Fusholler A, zur NS, Grabensee B, Plum J (2002). Peritoneal fluid and solute transport: influence of treatment time, peritoneal dialysis modality, and peritonitis incidence. *J Am Soc Nephrol.* 13(4):1055-60.
- (96) Churchill DN, Thorpe KE, Nolph KD, Keshaviah PR, Oreopoulos DG, Page D (1998). Increased peritoneal membrane transport is associated with decreased patient and technique survival for continuous peritoneal dialysis patients. The Canada-USA (CANUSA) Peritoneal Dialysis Study Group. *J Am Soc Nephrol.* 9(7):1285-92.
- (97) Chung SH, Chu WS, Lee HA, Kim YH, Lee IS, Lindholm B, Lee HB (2000). Peritoneal transport characteristics, comorbid diseases and survival in CAPD patients. *Perit Dial Int.* 20(5):541-7.
- (98) Dadone C, Pincella G, Bonoldi G, Sforzini S, Redaelli B (1990). Transport of water and solutes in uremic patients with chronic hepatic disease in CAPD. *Adv Perit Dial.* 6:23-5.
- (99) Ates K, Erturk S, Nergisoglu G, Karatan O, Duman N, Erbay B, Ertug AE (1996). Sex-dependent variations in peritoneal membrane transport properties in CAPD patients. *Nephrol Dial Transplant.* 11(11):2375-6.
- (100) Combet S, Ferrier ML, Van LM, Stoenoiu M, Moulin P, Miyata T, Lamiere N, Devuyst O (2001). Chronic uremia induces permeability changes, increased nitric oxide synthase expression, and structural modifications in the peritoneum. *J Am Soc Nephrol.* 12(10):2146-57.



- (101) Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von RC, 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.
- (102) Vaziri ND, Yuan J, Rahimi A, Ni Z, Said H, Subramanian VS (2012). Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation. *Nephrol Dial Transplant.* 27(7):2686-93.
- (103) Twardowski ZJ (1989). Clinical value of standardized equilibration tests in CAPD patients. *Blood Purif.* 7(2-3):95-108.
- (104) Wang T, Heimbürger O, Waniewski J, Bergström J, Lindholm B (1998). Increased peritoneal permeability is associated with decreased fluid and small-solute removal and higher mortality in CAPD patients. *Nephrol Dial Transplant.* 13(5):1242-9.
- (105) Chung SH, Chu WS, Lee HA, Kim YH, Lee IS, Lindholm B, Lee HB (2000). Peritoneal transport characteristics, comorbid diseases and survival in CAPD patients. *Perit Dial Int.* 20(5):541-7.
- (106) Kanjanabuch T, Siribamrungwong M, Khunprakant R, Kanjanabuch S, Jeungsmarn P, Achavanuntakul B, Pongpirul K, Park MS, Tungsanga K, Eiam-Ong S (2008). Overnight mesothelial cell exfoliation: a magic tool for predicting future ultrafiltration failure in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 28 Suppl 3:S107-S113.
- (107) Díaz C, Selgas R, Castro MA, Bajo MA, Fernández de CM, Molina S, Jiménez C, Ortiz A, Vara F (1998). Ex vivo proliferation of mesothelial cells directly obtained from peritoneal effluent: its relationship with peritoneal antecedents and functional parameters. *Adv Perit Dial.* 14:19-24.
- (108) Margetts PJ, Bonniaud P (2003). Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int.* 23(6):530-41.
- (109) Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Bajo MA, Del PG, Ramírez M, Camallo C, Sánchez-Tomero JA, Álvarez V, López-Cabrera M, Selgas R (2004). Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch.* 444(3):247-56.
- (110) Aroeira LS, Aguilera A, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Pérez-Lozano ML, Cirugeda A, Bajo MA, Del PG, Sánchez-Tomero JA, Jiménez-Heffernan JA, López-Cabrera 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 Kidney Dis.* 46(5):938-48.
- (111) Wolf G, Schroeder R, Zahner G, Stahl RA, Shankland SJ (2001). High glucose-induced hypertrophy of mesangial cells requires p27(Kip1), an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Am J Pathol.* 158(3):1091-100.

- (112) Lorenzi M, Cagliero E, Toledo S (1985). Glucose toxicity for human endothelial cells in culture. Delayed replication, disturbed cell cycle, and accelerated death. *Diabetes*. 34(7):621-7.
- (113) Sibbitt WL, Jr., Mills RG, Bigler CF, Eaton RP, Griffey RH, Vander Jagt DL (1989). Glucose inhibition of human fibroblast proliferation and response to growth factors is prevented by inhibitors of aldose reductase. *Mech Ageing Dev*. 47(3):265-79.
- (114) Ziyadeh FN, Snipes ER, Watanabe M, Alvarez RJ, Goldfarb S, Haverty TP (1990). High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. *Am J Physiol*. 259(4 Pt 2):F704-F714.
- (115) Witowski J, Ksiazek K, Jorres A (2008). New insights into the biology of peritoneal mesothelial cells: the roles of epithelial-to-mesenchymal transition and cellular senescence. *Nephron Exp Nephrol*. 108(4):e69-e73.
- (116) Gotloib L, Shostak A, Wajsbrodt V, Kushnier R (1999). High glucose induces a hypertrophic, senescent mesothelial cell phenotype after long in vivo exposure. *Nephron*. 82(2):164-73.
- (117) Gotloib L, Shostak A (1996). Large mesothelial cells in peritoneal dialysis: a sign of degeneration or adaptation? *Perit Dial Int*. 16(2):118-20.
- (118) Witowski J, Ksiazek K, Jorres A (2008). New insights into the biology of peritoneal mesothelial cells: the roles of epithelial-to-mesenchymal transition and cellular senescence. *Nephron Exp Nephrol*. 108(4):e69-e73.
- (119) Zeisberg M, Neilson EG (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*. 119(6):1429-37.
- (120) López-Cabrera M, Aguilera A, Aroeira LS, Ramírez-Huesca M, Pérez-Lozano ML, Jiménez-Heffernan JA, Bajo MA, Del PG, Sánchez-Tomero JA, Selgas R (2006). Ex vivo analysis of dialysis effluent-derived mesothelial cells as an approach to unveiling the mechanism of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int*. 26(1):26-34.
- (121) Yang AH, Chen JY, Lin JK (2003). Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int*. 63(4):1530-9.
- (122) Cárdenas-Rodríguez M, Badano JL (2009). Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 151C(4):263-80.
- (123) Rohatgi R, Snell WJ (2010). The ciliary membrane. *Curr Opin Cell Biol*. 22:1-6.

- (124) Lange K (2011). Fundamental role of microvilli in the main functions of differentiated cells: Outline of an universal regulating and signaling system at the cell periphery. *J Cell Physiol.* 226(4):896-927.
- (125) Overgaard CE, Sanzone KM, Spiczka KS, Sheff DR, Sandra A, Yeaman C (2009). Deciliation is associated with dramatic remodeling of epithelial cell junctions and surface domains. *Mol Biol Cell.* 20(1):102-13.
- (126) Mutsaers SE, Whitaker D, Papadimitriou JM (1996). Changes in the concentration of microvilli on the free surface of healing mesothelium are associated with alterations in surface membrane charge. *J Pathol.* 180(3):333-9.
- (127) Kultti A, Rilla K, Tiihonen R, Spicer AP, Tammi RH, Tammi MI (2006). Hyaluronan synthesis induces microvillus-like cell surface protrusions. *J Biol Chem.* 281(23):15821-8.
- (128) Yung S, Chan TM (2011). Pathophysiology of the peritoneal membrane during peritoneal dialysis: the role of hyaluronan. *J Biomed Biotechnol.* 2011:180594.
- (129) Simionescu M, Simionescu N (1977). Organization of cell junctions in the peritoneal mesothelium. *J Cell Biol.* 74(1):98-110.
- (130) Leung JC, Chan LY, Li FF, Tang SC, Chan KW, Chan TM, Lam MF, Wieslander A, Lai KN (2005). Glucose degradation products downregulate ZO-1 expression in human peritoneal mesothelial cells: the role of VEGF. *Nephrol Dial Transplant.* 20(7):1336-49.
- (131) Chan TM, Leung JK, Sun Y, Lai KN, Tsang RC, Yung S (2003). Different effects of amino acid-based and glucose-based dialysate from peritoneal dialysis patients on mesothelial cell ultrastructure and function. *Nephrol Dial Transplant.* 18(6):1086-94.
- (132) Quirós-Ganga PL, Remon-Rodríguez C (2012). Achieving better results for peritoneal dialysis in recent years. *Nefrologia.* 32(5):587-96.
- (133) Mendelson AA, Guan Q, Chafeeva I, da Roza GA, Kizhakkedathu JN, Du C (2013). Hyperbranched polyglycerol is an efficacious and biocompatible novel osmotic agent in a rodent model of peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 33(1):15-27.
- (134) Contreras-Velázquez JC, Soto V, Jaramillo-Rodríguez Y, Samaniego-Ríos LI, Quinones-Pérez V, Ávila M, Amato D, Paniagua R (2008). Clinical outcomes and peritoneal histology in patients starting peritoneal dialysis are related to diabetic status and serum albumin levels. *Kidney Int Suppl.* 108:S34-S41.
- (135) Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Gunzel D, Fromm (2010). Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci.* 123(Pt 11):1913-21.

- (136) 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.
- (137) 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.
- (138) Zhu Y, Maric J, Nilsson M, Brannstrom M, Janson PO, Sundfeldt K (2004). Formation and barrier function of tight junctions in human ovarian surface epithelium. *Biol Reprod*. 71(1):53-9.
- (139) Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR (2011). Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol*. 73:283-309.
- (140) Krug SM, Gunzel D, Conrad MP, Lee IF, Amasheh S, Fromm M, Yu AS (2012). Charge-selective claudin channels. *Ann N Y Acad Sci*. 1257:20-8.
- (141) Clagett-Dame M, Knutson D (2011). Vitamin A in reproduction and development. *Nutrients*. 3(4):385-428.
- (142) Baltés 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.
- (143) Telgenhoff D, Ramsay S, Hilz S, Slusarewicz P, Shroot B (2008). Claudin 2 mRNA and protein are present in human keratinocytes and may be regulated by all-trans-retinoic acid. *Skin Pharmacol Physiol*. 21(4):211-7.
- (144) Shostak A, Wajsbrot V, Gotloib L (2000). High glucose accelerates the life cycle of the in vivo exposed mesothelium. *Kidney Int*. 58(5):2044-52.
- (145) Ksiazek K, Piwocka K, Brzezinska A, Sikora E, Zabel M, Breborowicz A, Jörres A, Witowski J (2006). Early loss of proliferative potential of human peritoneal mesothelial cells in culture: the role of p16INK4a-mediated premature senescence. *J Appl Physiol*. 100(3):988-95.
- (146) Ksiazek K, Passos JF, Olijslagers S, Saretzki G, Martin-Ruiz C, Von ZT (2007). Premature senescence of mesothelial cells is associated with non-telomeric DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun*. 362(3):707-11.
- (147) Siddikuzzaman, Grace VM (2013). Antioxidant potential of all-trans retinoic acid (ATRA) and enhanced activity of liposome encapsulated ATRA against inflammation and tumor-directed angiogenesis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 35(1):164-73.
- (148) Zhong H, Chen FY, Wang HR, Lin JY, Xu R, Zhong JH, Huang HH (2009). Modification of TGF-beta1 signaling pathway during NB4 cells differentiation by all-trans retinoid acid induction. *Int J Hematol*. 89(4):438-44.

- (149) Singh B, Murphy RF, Ding XZ, Roginsky AB, Bell RH, Adrian TE (2007). On the role of transforming growth factor- $\beta$  in the growth inhibitory effects of retinoic acid in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer*. 6:82.
- (150) Danielpour D (1996). Induction of transforming growth factor- $\beta$  autocrine activity by all-trans-retinoic acid and 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in NRP-152 rat prostatic epithelial cells. *J Cell Physiol*. 166(1):231-9.
- (151) Cohen PS, Letterio JJ, Gaetano C, Chan J, Matsumoto K, Sporn MB, Thiele C (1995). Induction of transforming growth factor  $\beta$  1 and its receptors during all-trans-retinoic acid (RA) treatment of RA-responsive human neuroblastoma cell lines. *Cancer Res*. 55(11):2380-6.
- (152) Wang GH, Tang XH, Ma YL, Gao YC (2008). Effects of all-trans retinoic acid on the expression of TGF- $\beta$  1 and COL-I in rat model of peritoneal dialysis. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 39(4):575-8.
- (153) Strippoli R, Benedicto I, Foronda M, Pérez-Lozano ML, Sánchez-Perales S, López-Cabrera M, Del Pozo MA (2010). p38 maintains E-cadherin expression by modulating TAK1-NF- $\kappa$ B during epithelial-to-mesenchymal transition. *J Cell Sci*. 123(Pt 24):4321-31.
- (154) Erickson VR, Antunes M, Chen B, Cohen NA, Hwang PH (2008). The effects of retinoic acid on ciliary function of regenerated sinus mucosa. *Am J Rhinol*. 22(3):334-6.
- (155) Leung MK, Hwang PH (2007). Rehabilitation of surgically traumatized paranasal sinus mucosa using retinoic acid. *Am J Rhinol*. 21(3):271-5.
- (156) Hwang PH, Chan JM (2006). Retinoic acid improves ciliogenesis after surgery of the maxillary sinus in rabbits. *Laryngoscope*. 116(7):1080-5.
- (157) Million K, Tournier F, Houcine O, Ancian P, Reichert U, Marano F (2001). Effects of retinoic acid receptor-selective agonists on human nasal epithelial cell differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 25(6):744-50.
- (158) Hill EM, Eling T, Nettesheim P (1998). Changes in expression of 15-lipoxygenase and prostaglandin-H synthase during differentiation of human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 18(5):662-9.
- (159) Larre I, Castillo A, Flores-Maldonado C, Contreras RG, Galván I, Muñoz-Estrada J, Cereijido M (2011). Ouabain modulates ciliogenesis in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(51):20591-6.
- (160) Persaud SD, Lin YW, Wu CY, Kagechika H, Wei LN (2013). Cellular retinoic acid binding protein I mediates rapid non-canonical activation of ERK1/2 by all-trans retinoic acid. *Cell Signal*. 25(1):19-25.
- (161) Saavalainen K, Pasonen-Seppänen S, Dunlop TW, Tammi R, Tammi MI, Carlberg C (2005). The human hyaluronan synthase 2 gene is a primary

retinoic acid and epidermal growth factor responding gene. *J Biol Chem.* 280(15):14636-44.

- (162) Pasonen-Seppanen SM, Maytin EV, Torronen KJ, Hyttinen JM, Hascall VC, MacCallum DK, Kultti AH, Jokela TA, Tammi MI, Tammi RH (2008). All-trans retinoic acid-induced hyaluronan production and hyperplasia are partly mediated by EGFR signaling in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 128(4):797-807.
- (163) Chung SS, Choi C, Wang X, Hallock L, Wolgemuth DJ (2010). Aberrant distribution of junctional complex components in retinoic acid receptor alpha-deficient mice. *Microsc Res Tech.* 73(6):583-96.
- (164) 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 Pt 1):C1707-C1713.
- (165) Rong J, Liu S (2011). Effect of all-trans retinoic acid on the barrier function in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 407(3):605-9.
- (166) Napoli JL (2012). Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta.* 1821(1):152-67.
- (167) Giguere V (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev.* 15(1):61-79.
- (168) Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H (2007). A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science.* 315(5813):820-5.
- (169) Aguilera A, Bajo MA, del PG, Diez JJ, Codoceo R, Rebollo F, Mariano M, Selgas R (2002). True deficiency of antioxidant vitamins E and A in dialysis patients. Relationship with clinical patterns of atherosclerosis. *Adv Perit Dial.* 18:206-11.

# **ANEXOS**

## ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE LA ESTANCIA DOCTORAL

**Carmen Retana**, Elsa I. Sánchez, Sirenia González, Alejandro Pérez-López, Armando Cruz, Jesús Lagunas Muñoz, Carmen Alfaro Cruz, Socorro Vital Flores, José L. Reyes **(2013)**. Retinoic Acid Improves Morphology of Cultured Peritoneal Mesothelial Cells from Patients Undergoing Dialysis. Plos One. 8(11): e79678.

**Carmen Retana**, Elsa Sánchez, Alejandro Pérez-López, Armando Cruz, Jesús Lagunas, Carmen Cruz, Socorro Vital, José L. Reyes **(2014)**. Alterations of intercellular junctions in peritoneal mesothelial cells from patients undergoing dialysis: effect of retinoic acid. Perit Dial Int. InPress. Doi:10.3747/pdi.2012.00323.



## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

### Preparación del medio de cultivo

En todos los ensayos se utilizó medio de cultivo compuesto por una mezcla de las siguientes soluciones: Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM/F12) con 1.8 g de bicarbonato de sodio, 2 mL de HEPES 1 M, 15 mL de suero fetal bovino, 200  $\mu$ L de antibiótico (penicilina 100 U/mL y estreptomina 100  $\mu$ g/mL), 1 mL de glutamina (2  $\mu$ g/mL), 100  $\mu$ L de transferrina (5  $\mu$ g/mL), 100  $\mu$ L de insulina (5  $\mu$ g/mL) y 80  $\mu$ L de hidrocortisona (0.4  $\mu$ g/mL). Una vez preparada la solución, se esterilizó por filtración y se guardó a una temperatura de 4 °C.

### Preparación del ácido todo *trans* retinoico (ATTR)

Se disolvieron 3 mg de ATTR en 1 mL de Dimetil sulfóxido, obteniéndose una solución stock, con una concentración de 10 mM. De esta solución se tomaron 10  $\mu$ L y se diluyeron con 990  $\mu$ L de medio de cultivo, para tener una concentración de 100  $\mu$ M. Posteriormente, se tomaron 10  $\mu$ L de esta solución y se diluyeron con 990  $\mu$ L de medio de cultivo, para tener una concentración final de 1  $\mu$ M. Se guardaron protegidas de la luz, en un ambiente de nitrógeno y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

### Preparación del amortiguador RIPA del inglés *Radio Immuno Precipitation Assay*, para el aislamiento de proteínas unidas a la membrana (fracción insoluble)

Reactivos	Para preparar 100 mL	Concentración final
Tris-HCl pH=7.6	0.4844 g	40 mM
NaCl	0.8766 g	150 mM
EDTA	0.076 g	2 mM
Glicerol	10 mL	10 %
Tritón X-100	1 mL	1 %
Deoxicolato de Na	0.5 g	0.5 %
SDS	0.2 g	0.2 %

A 80 mL de agua desionizada, en agitación, se le adicionan cada uno de los reactivos y posteriormente se lleva a 100 mL con agua desionizada.

### Preparación del amortiguador MBL para el aislamiento de proteínas citosólicas (fracción soluble)

Reactivos	Para preparar 100mL	Concentración final
Tritón X-100	1 mL	1%
Tris HCl pH=7.6	0.191 g	20 mM
NaCl	0.876 g	150 mM
EDTA	0.0744 g	2 mM
Fluoruro de Na	0.020 g	5 mM
Ortovanadato de Na	0.0183 g	1 mM

A 80 mL de agua desionizada, en agitación, se le adicionan cada uno de los reactivos y posteriormente se lleva a 100 mL con agua desionizada.

### Preparación del Laemmli 5x

Reactivos	Para preparar 10mL	Concentración final
Tris HCl	0.378 g	312.5 mM
SDS	1 g	10 %
Glicerol	5 mL	50 %
2-β-mercaptoetanol	2.5 mL	25 %
Azul de bromofenol	0.05 g	0.5 %

A 10 mL de agua, en agitación, se le adicionan cada uno de los reactivos y se ajusta el pH a 6.8.

### Preparación del buffer de corrida

Reactivos	Para preparar 1 L (5X)
Tris-Base	15 g
Glicina (192 mM)	72 g
SDS	5 g

Se adiciona a 1L de agua desionizada, en agitación, cada uno de los reactivos. Posteriormente, de esta solución 5x, tomar 200 mL, se lleva a 1 L con agua desionizada (solución 1x) y se ajusta el pH a 8.3

### Preparación del buffer de transferencia

Reactivos	Para preparar 2L
Tris	6.05 g
Glicina	28.8 g
Metanol	400 mL

Se adiciona al metanol el Tris poco a poco, en agitación, y después la glicina. Posteriormente se lleva a un volumen de 1.8 L con agua desionizada, se ajusta el pH a 8.3 y se afora a 2 L.

**Nota:** Se proteger el buffer de la luz utilizando un frasco ámbar y se mantiene en refrigeración.

### Preparación del Ringer bicarbonato

Se pesan 0.0292 g de glutamina y se colocan en un matraz aforado de 100 mL, posteriormente, se adicionan **a)** 5.75 mL de NaCl 2 M, **b)** 2.5 mL de NaHCO<sub>3</sub> 1M, **c)** 6.25 ml de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 M y **d)** 2 mL de MgSO<sub>4</sub> 0.1 M. Después se agrega agua desionizada, aproximadamente  $\frac{3}{4}$  partes, 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M lentamente (gota a gota) para evitar que se precipite. Finalmente se afora a 100 mL con agua desionizada, se agita y se ajusta el pH a 7.5.

**Nota:** en caso de que se precipite el CaCl<sub>2</sub>, se burbujea la solución con carbógeno hasta que la solución se torne cristalina. Posteriormente se mide el pH y se ajusta a 7.5.