



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

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MESOTELIALES DE PERITONEO DE  
RATA DIABÉTICA: EFECTO DEL LÍQUIDO DE DIÁLISIS EN LOS  
TRANSPORTADORES DE GLUCOSA Y EN LAS PROTEÍNAS DE LA  
UNIÓN ESTRECHA.**

**TESIS**

Que presenta:

**M en C. YAZMIN DEBRAY GARCIA**

Para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE FISIOLÓGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

Director de Tesis:

Dr. José Luis Reyes Sánchez

Ciudad de México

Diciembre del 2018

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y en los laboratorios 35 y 36 del Dr. José Luis Reyes Sánchez del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) en la unidad Zacatenco.

El comité tutorial que asesoró el presente trabajo estuvo conformado por:

**Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido.** Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV.

**Dra. Marcia Hiriart Urdanivia.** Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

**Dra. María del Refugio García Villegas.** Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV.

**Dra. María de la Luz del Razo Jiménez.** Departamento de Toxicología del CINVESTAV.

## **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.

A mi director de tesis el Dr. José Luis Reyes Sánchez por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por su apoyo y entrega para la realización de este proyecto y por invertir tiempo y esfuerzo en mi formación académica.

A mis sinodales la Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido, Dra. María del Refugio García Villegas, Dra. María de la Luz del Razo Jiménez por todo su apoyo, su comprensión, su paciencia y sus valiosos consejos para la realización de esta tesis.

A la Dra. Lorenza González-Mariscal y Muriel por sus críticas durante su participación como asesora.

A los auxiliares de investigación; Elsa Sánchez, 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, por enseñarme el manejo de los equipos, pero sobre todo por sus consejos, su apoyo moral y su compromiso con el trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 35 y 36 del departamento de fisiología, biofísica y neurociencias. Eduardo Molina, Carmen Retana, Marisol Martínez, Brenda Luna, Edith Sierra, Marlenne Terán, Andrea Cetina por su amistad, por las risas, por los momentos graciosos y por haber hecho mi estancia en el laboratorio una experiencia maravillosa

A mis amigos de cinvestav. Ángeles, Eli, Any, Leo, Gama, Marce, Sandy, Moy, Miguel, Paco, Jessi; gracias por su amistad por todos los buenos y divertidos momentos que pasamos juntos.

A Ángeles Andrade y Gamaliel Aztatzi por que han estado conmigo en los momentos difíciles y buenos brindándome su apoyo y cariño.

A mis padres y hermanas, por haber estado siempre a mi lado y ser un apoyo incondicional.

## Resumen

La diabetes es una enfermedad metabólica multifactorial que a largo plazo puede producir enfermedad renal en fase terminal (ERT). En México la terapia alternativa más utilizada para la ERT es la diálisis peritoneal. Debido al daño progresivo que ocasiona la exposición crónica a concentraciones altas de glucosa de los líquidos de diálisis sobre el peritoneo, la eficiencia de este tratamiento se ve limitada, alterando las propiedades de transporte de agua y solutos del peritoneo. Las primeras células que están en contacto con los líquidos de diálisis son las células mesoteliales (CM).

El transporte de solutos sucede principalmente a través de las vías trans y paracelular. Ésta última se regula por las proteínas de la unión estrecha (UE). Las proteínas de la UE como claudina-1, claudina-2 y ocludina, son determinantes en el transporte paracelular. La segunda vía de transporte es mediada por los transportadores de glucosa SGLT-1, SGLT-2, GLUT-1 y GLUT-2.

Se desconocen las características de las uniones estrechas peritoneales en el diabético. Sin embargo, se sabe que éstas se alteran en presencia de altas concentraciones de glucosa y del estrés oxidativo. Por esta razón se evaluaron los cambios en los transportadores de glucosa y las proteínas de la UE, en cultivos primarios de células mesoteliales de peritoneo de ratas de un modelo de diabetes tipo 1 inducido con estreptozotocina.

Se encontró que la condición diabética induce daño peritoneal y en las CM provoca cambios estructurales (disminución de microvellosidades), inicia el proceso de transición mesotelio-mesénquima (aumento de  $\alpha$ -SMA y disminución de citoqueratina 4.62), altera de manera diferencial los transportadores de glucosa, sin modificar su localización, hay incremento de la expresión de claudina-2 y disminución de ocludina sin modificar claudina-1, sugiriendo la formación de poros catiónicos, que correlacionan con la disminución de la resistencia eléctrica transepitelial, resultando en una mayor permeabilidad de los cultivos de CM.

Estos cambios se relacionan con el estrés oxidante, iniciado por un incremento de especies reactivas de oxígeno y por la carbonilación de proteínas, donde la activación de una respuesta antioxidante, a través de Nrf-2, no se lleva a cabo y da como resultado una respuesta diferencial de las enzimas antioxidantes. Estos cambios se mantienen ante la exposición al líquido de diálisis lo que sugiere que la condición diabética induce un daño per se. Estos hallazgos sugieren que los cultivos de células obtenidos de una condición diabética son adecuados para realizar estudios futuros encaminados a disminuir el daño que se produce en las etapas iniciales de la diabetes.

## Abstract

Diabetes is a multifactorial metabolic disease that leads to end-stage renal disease (ESRD) in the long term. In Mexico, the most common alternative therapy for ESRD is peritoneal dialysis. Due to progressive damage caused by chronic exposure to the high glucose concentrations of dialysis fluids to the peritoneum, the efficiency of this treatment is limited, altering the peritoneal transport properties of water and solutes. The first cells that are in contact with dialysis fluids are mesothelial cells (MC).

The transport of solutes occurs mainly through the trans and paracellular pathways. The latter is regulated by the proteins of the tight junction (TJ). TJ proteins, such as claudin-1, claudin-2 and occludin, are determinants in paracellular transport. The second transport pathway is mediated by the glucose transporters SGLT-1, SGLT-2, GLUT-1 and GLUT-2.

The characteristics of the peritoneal TJ in the diabetic are unknown. However, it is known that they are altered in the presence of high glucose concentrations and oxidative stress. For this reason, changes in glucose transporters and TJ proteins were evaluated in primary cultures of peritoneal mesothelial cells of a murine model of type 1 diabetes, induced by streptozotocin.

It was found that the diabetic condition induced peritoneal damage and structural changes (diminution of microvilli), initiates the mesenchymal mesothelium transition process (increase of  $\alpha$ -SMA and decrease of ck, 4.62), differentially alters glucose transporters, without modifying its location. There is an increase in the expression of claudin-2 and decrease of occludin without modifying claudin-1, suggesting formation of cationic pores, which are related to the decrease of transepithelial electrical resistance, resulting in a greater permeability of MC cultures.

These changes are related to oxidative stress, initiated by an increase in reactive oxygen species and carbonylation of proteins, where the activation of an antioxidant response through Nrf-2 does not occur and it results in a differential response of the antioxidant enzymes. These changes are maintained during exposure to dialysis fluid suggesting that the diabetic condition already induce damage *per se*. These findings suggest that cell cultures obtained from a diabetic animal are suitable for future studies aimed at reducing the damage that occurs in the early stages of diabetes.

## Índice

<b>1. Introducción</b> .....	12
<b>1.1 Diabetes</b> .....	13
<b>1.2 insuficiencia renal</b> .....	15
<b>1.3 Diálisis peritoneal</b> .....	16
<b>1.4 Peritoneo</b> .....	18
<b>1.4.1 Células mesoteliales (CM)</b> .....	19
<b>1.4.1,1 Funciones de las células mesoteliales</b> .....	20
<b>1.5 Transición mesotelio-mesénquima (TMM)</b> .....	21
<b>1.6 Mecanismos de transporte transepitelial</b> .....	23
<b>1.6.1. Transporte transcelular</b> .....	23
<b>1.6.1.1 Transporte de glucosa a través de la membrana celular</b> .....	23
<b>1.6.2. Transporte paracelular</b> .....	28
<b>1.7. Efecto del líquido de diálisis en el peritoneo</b> .....	29
<b>1.8. Estrés oxidante y el sistema de defensa antioxidante</b> .....	30
<b>1.8.1 Carbonilación de proteínas</b> .....	33
<b>1.8.2. Hemo-oxigenasa tipo I (HO-1)</b> .....	35
<b>2. Planteamiento del problema</b> .....	38
<b>3. Hipótesis</b> .....	39
<b>4. Objetivo general</b> .....	39
<b>5. Objetivos particulares</b> .....	39
<b>6. Material y métodos</b> .....	40
<b>6.1. Reactivos</b> .....	40
<b>6.2. Equipo</b> .....	41
<b>6.3. Preparación del medio de cultivo</b> .....	41
<b>6.4. Preparación del medio DMEM + LD 2.5%glucosa</b> .....	42
<b>6.5. Estrategia experimental</b> .....	42
<b>6.5.1. Cuidado de los animales</b> .....	42
<b>6.5.2. Inducción de diabetes con estreptozotocina (SZT)</b> .....	42
<b>6.6. Parámetros bioquímicos estudiados para confirmar el modelo diabético</b> .....	43
<b>6.7 Obtención de las células mesoteliales de peritoneo de rata (CMPR)</b> .....	44
<b>6.7.1 Obtención de las CMPR por perfusión</b> .....	44
<b>6.7.2 Obtención de las CMPR del omentum (peritoneo visceral)</b> .....	44
<b>6.7.3 Obtención de peritoneo parietal</b> .....	45
<b>6.8. Determinación de la viabilidad celular</b> .....	45
<b>6.9. Microscopía de fuerza atómica</b> .....	46
<b>6.9.1 Principio</b> .....	46
<b>6.9.2. Procedimiento</b> .....	47

<b>6.10. Exposición al líquido de diálisis</b> .....	48
<b>6.11. Inmunofluorescencia</b> .....	48
6.11.1 Principio.....	48
6.11.2 Procedimiento .....	48
<b>6.12 Análisis por Western blot</b> .....	49
6.12.1 Principio.....	49
6.12.2 Procedimiento .....	49
<b>6.13. Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET)</b> .....	50
6.13.1. Principio.....	50
6.13.2. Procedimiento .....	51
<b>6.14. Medición de especies reactivas de oxígeno (ERO).</b> .....	51
6.14.1. Principio.....	51
6.14.2. Procedimiento .....	52
6.15 Carbonilación de proteínas .....	52
6.15.1. Principio .....	52
6.15.2. Procedimiento .....	52
<b>6.16. Análisis de datos</b> .....	53
<b>7. Resultados</b> .....	54
<b>7.1. La administración de streptozotocina induce un modelo experimental de diabetes tipo 1</b> .....	54
<b>7.2. La diabetes genera engrosamiento del submesotelio</b> .....	57
<b>7.3. Condiciones óptimas para la extracción de los cultivos primarios de rata diabética</b> .....	60
<b>7.4. La diabetes disminuye la longitud de las microvellosidades</b> .....	62
<b>7.5. La diabetes induce aumento en la expresión de los transportadores de glucosa SGLT-1, SGLT-2 y GLUT-2 y disminuye la expresión de GLUT-1</b> .....	65
<b>7.6. La diabetes modifica de manera diferencial a las proteínas de la unión estrecha</b> .....	68
<b>7.7. La diabetes disminuye la Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET)</b> .....	70
<b>7.8. La diabetes induce aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO) y carbonilación en células peritoneales en cultivo primario</b> .....	71
<b>7.9. La condición diabética incrementa la expresión de los receptores de los productos finales de glicosilación avanzada (RAGE)</b> .....	72
<b>7.10. La diabetes disminuye la expresión del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) y modifica de manera diferencial la expresión de enzimas antioxidantes</b> .....	73
<b>7.11. La diabetes induce la transición mesotelio mesénquima (TMM) en las células mesoteliales</b> .....	76



<b>7.12. El líquido de diálisis disminuye la expresión de pan-cadherina, sin modificar las de vimentina, ck 4.62 y <math>\alpha</math>-SMA, en CMPR provenientes del animal diabético</b> .....	78
<b>7.13. El líquido de diálisis disminuye la expresión de SGLT-2 y GLUT-2, sin modificar, SGLT-1 y GLUT-1 en CMPR provenientes de un animal diabético</b> .....	81
<b>7.14. El LD modifica de manera diferencial la señal y la distribución de claudina 1, claudina 2 y ocludina</b> .....	83
<b>7.15. El LD disminuye la resistencia eléctrica transepitelial (RET)</b> .....	85
<b>7.16. La exposición al LD incrementa el daño oxidante en la condición DBT</b> .....	86
<b>7.17. El LD mantiene la expresión de los receptores de los productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) en la condición diabética</b> ....	89
<b>7.18. El líquido de diálisis aumenta la expresión del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) en la condición diabética y disminuye la respuesta antioxidante</b> .....	90
<b>8. Discusión</b> .....	92
<b>9. Conclusiones</b> .....	100
<b>10. Conclusión General</b> .....	101
<b>11.- Perspectivas</b> .....	101
<b>12. Referencias</b> .....	102
<b>13. ANEXOS</b> .....	109

## Abreviaturas

<b>AFM</b>	<b>Microscopia de fuerza atómica</b>
<b>AGEs</b>	<b>Productos de glucosilación avanzada</b>
<b>BSA</b>	<b>Suero fetal bovino</b>
<b>CAT</b>	<b>Catalasa</b>
<b>Ck 4.62</b>	<b>Citoqueratina 4.62</b>
<b>CM</b>	<b>Células mesoteliales</b>
<b>CMPH</b>	<b>Células mesoteliales de peritoneo humano</b>
<b>CMPR</b>	<b>Células mesoteliales de peritoneo de rata</b>
<b>CTR</b>	<b>Control</b>
<b>DBT</b>	<b>Diabética</b>
<b>DFA</b>	<b>Diclorofloresceína de acetato</b>
<b>DM</b>	<b>Diabetes mellitus</b>
<b>DP</b>	<b>Diálisis peritoneal</b>
<b>ERO</b>	<b>Especies reactivas de oxígeno</b>
<b>ERT</b>	<b>Enfermedad renal en fase terminal</b>
<b>GDPs</b>	<b>Productos de degradación de la glucosa</b>
<b>GLUT-1</b>	<b>Transportador de glucosa 1</b>
<b>GLUT-2</b>	<b>Transportador de glucosa 2</b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Peróxido de hidrógeno</b>
<b>HO-1</b>	<b>Hemo oxigenasa 1</b>
<b>IR</b>	<b>Insuficiencia renal</b>
<b>IRA</b>	<b>Insuficiencia renal aguda</b>
<b>IRC</b>	<b>Insuficiencia renal crónica</b>
<b>JAM</b>	<b>Molécula de adhesión de unión</b>
<b>LD</b>	<b>Líquido de diálisis</b>
<b>Nrf-2</b>	<b>Factor nuclear eritroide-2</b>
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	<b>Anión superóxido</b>
<b>OH<sup>-</sup></b>	<b>Radical hidroxilo</b>
<b>RAGE</b>	<b>Receptor de productos de glucosilación avanzada</b>

<b>RET</b>	<b>Resistencia eléctrica transepitelial</b>
<b>SGLT-1</b>	<b>Transportador sodio glucosa 1</b>
<b>SGLT-2</b>	<b>Transportador sodio glucosa 2</b>
<b>SOD-1</b>	<b>Superóxido Dismutasa-1 citoplasmática</b>
<b>SOD-2</b>	<b>Superóxido Dismutasa-2 mitocondrial</b>
<b>SZT</b>	<b>Estreptozotocina</b>
<b>TMM</b>	<b>Transición mesotelio-mesénquima</b>
<b>UE</b>	<b>Unión estrecha</b>
<b>Y-GCSc</b>	<b>Gama glutamil cistein sintetasa catalítica</b>
<b>α-SMA</b>	<b>Alfa actina de músculo liso</b>

## 1. Introducción

La glucosa es una de las principales fuentes de energía, es utilizada de forma directa e indirecta en las diversas vías metabólicas como la glucólisis, gluconeogénesis, ciclo de Krebs entre otras y produce energía en forma de ATP (trifosfato de adenosina). El metabolismo intermediario de los carbohidratos, proteínas y grasas es mediado por hormonas como la insulina y el glucagon.

La insulina desempeña una función anabólica e incrementa el almacenamiento de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos. El glucagon tiene una función catabólica ya que moviliza los tres nutrientes antes mencionados de sus depósitos, y los hace pasar al torrente sanguíneo. Por esta razón, la insulina y glucagon tiene una acción global recíproca y de esa manera son secretados en muchas circunstancias.

Las células de los islotes de Langerhans se dividen en; células  $\alpha$  que secretan glucagon, las células  $\beta$  que secretan insulina y las células  $\delta$  que secretan somatostatina. Una de las principales acciones de la insulina es el transporte de glucosa, aminoácidos y potasio. La semivida de la insulina en la circulación sanguínea es de 5 minutos, se une a los receptores que le corresponden y parte de ella es internalizada. La destruyen proteasas en los endosomas formados por un proceso endocitótico.

La liberación de insulina depende de cambios de voltaje en la membrana de las células beta. El voltaje de la membrana de las células  $\beta$  en reposo es de -60 mV. Este cambio en el voltaje despolariza la membrana de las células  $\beta$  que liberan a la insulina. Los canales iónicos de potasio son regulados por las concentraciones de ATP. En condiciones de reposo, el potasio sale libremente de la célula por que la concentración de ATP es baja y el canal de potasio está abierto. Al aumentar la concentración de ATP por la glucólisis, la compuerta del canal se cierra, y la membrana adquiere un voltaje de -45 mV. Esta despolarización activa a los canales de calcio dependientes de voltaje. [1]

Éstos permiten la entrada de calcio e inducen un aumento sostenido en el voltaje de la membrana, provocando una meseta, durante la cual se activan nuevos canales dependientes de voltaje como los canales de sodio dependientes de voltaje. Esta entrada masiva de calcio y sodio produce una ráfaga de potenciales de acción que se asocia a la liberación de insulina [2, 3].

La glucosa penetra a las células por difusión facilitada, o al intestino y los riñones por transporte activo secundario con sodio, En músculos, grasa y otros tejidos, la insulina estimula el ingreso de glucosa a las células, al incrementar el número de transportadores de dicho carbohidrato en la membrana celular.

El transportador de glucosa 4 es el que corresponde a musculo y tejido adiposo y es estimulado por la insulina; dentro de vesículas, muchos de los otros transportadores de glucosa que no son insulinosensibles al parecer se expresan por un mecanismo constitucional en la membrana celular.

El glucagon se sintetiza y se secreta de las células  $\alpha$  pancreáticas de los islotes de Langerhans, cuando el nivel de glucosa en sangre desciende por debajo del valor normal (80 a 110mg/dl), entonces el glucagon liberado provoca en el hígado la degradación del glucógeno y restaura los niveles de glucosa en sangre a su valor normal. [4]. El glucagon promueve la movilización y utilización de carbohidratos almacenados para mantener la concentración de glucosa en sangre en el estado de ayuno. Las principales acciones del glucagon se realizan sobre el hígado (a diferencia de la insulina que actúa sobre el hígado, el tejido adiposo y el tejido muscular). El glucagon estimula la glucogenólisis y simultáneamente inhibe la formación de glucógeno a partir de la glucosa.

## 1.1 Diabetes

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica multifactorial, cuya frecuencia se ha incrementado tanto en los últimos años

que se le considera como una epidemia mundial. Se caracteriza por hiperglucemia crónica con niveles de glucosa en sangre superiores a 125 mg/dl en ayunas, que surge como resultado de defectos en la secreción de insulina, resistencia de las células del cuerpo a la acción de ésta o ambas cosas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a la diabetes en: 1) Diabetes tipo 1 también llamada insulino dependiente, juvenil o de inicio en la infancia. Es causada por la destrucción de células  $\beta$  pancreáticas, de tipo inmunológico, que origina alteraciones en la secreción de insulina y deficiencia absoluta de insulina, 2) diabetes tipo 2 también llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta, es producida por una combinación de factores genéticos y no genéticos cuyas consecuencias son la resistencia y la deficiencia de la insulina y la 3) diabetes gestacional que es un estado hiperglucémico que aparece o se detecta por primera vez durante el embarazo.

Aunque los diversos tipos de DM tienen distintos orígenes, sus efectos patológicos son similares. Las complicaciones en la DM se agrupan en tres tipos principales; microvasculares, macrovasculares y neuropáticas.

Las microvasculares comprende las cicatrices proliferativas de la retina (**retinopatía diabética**) las cuales culminan en ceguera, y afecciones de riñón (**nefropatía diabética**) cuya fase final es la insuficiencia renal.

Las macrovasculares provienen de la aterosclerosis acelerada la cual es consecuencia del incremento del valor plasmático de las lipoproteínas de baja densidad. El resultado es mayor incidencia de apoplejías e infarto al miocardio.

Las anomalías neuropáticas (**neuropatía diabética**) afecta el sistema autónomo y nervios periféricos. La neuropatía sumada a la insuficiencia circulatoria aterosclerótica de las extremidades y menos resistencia a las infecciones, puede terminar en úlceras crónicas y gangrena en los pies.

La causa definitiva de las complicaciones microvasculares y neuropáticas de la hiperglucemia crónica y su incidencia disminuye con el

control de la diabetes. La hiperglucemia intracelular activa la enzima aldosa reductasa; esto intensifica la formación de sorbitol en las células, lo cual a su vez disminuye la concentración de ATPasa de sodio y potasio.

Además, la glucosa intracelular puede ser transformada en los productos Amadori, los cuales a su vez pueden formar productos finales de glucosilación avanzada (AGE por sus siglas en inglés), con proteínas de matriz con enlaces cruzados, compuestos que dañan los vasos sanguíneos. Estos productos interfieren en la respuesta de los leucocitos a la infección

La Sociedad Americana de Diabetes estima que el 30% de los pacientes con DMT1 y DMT2 desarrollan nefropatía diabética después de 10-15 años del inicio de la enfermedad. La nefropatía diabética es la principal causa de enfermedad renal crónica y de su evolución a la fase terminal (ERT), y constituye uno de los factores más importantes de predicción de la mortalidad en los pacientes diabéticos [5, 6].

## **1.2 insuficiencia renal**

La insuficiencia renal (IR) se define como la incapacidad de los riñones para mantener el plasma libre de desechos nitrogenados y otras impurezas, así como para mantener la homeostasis del agua, electrolitos y el equilibrio ácido-base del organismo [7]. La IR se clasifica en:

- Insuficiencia renal aguda (IRA): Se caracteriza por una caída rápida de la tasa de filtración glomerular y se manifiesta clínicamente como un aumento brusco y sostenido de la urea y de la creatinina en el plasma [8]. Con el tratamiento adecuado, los riñones pueden recuperar su función normal.
- Insuficiencia renal crónica (IRC): Se define como un proceso patológico que tiene múltiples etiologías, tanto de carácter congénito y/o hereditario como adquiridas. La consecuencia principal es la pérdida progresiva del número de nefronas y de la funcionalidad de las mismas. Esto provoca, entre otras cosas, que la capacidad de

filtrado de la sangre disminuya y consecuentemente se acumulen en sangre sustancias nitrogenadas, como la urea o iones como el potasio, Se caracteriza por una disminución progresiva y global de la función renal, resultado de una destrucción gradual del tejido renal [9].

- Enfermedad renal en fase terminal (ERT): En esta etapa de la enfermedad renal, el riñón deja de funcionar.

En la actualidad no existe cura para la ERT, pero existen terapias alternativas como: a) trasplante renal; es la mejor opción, sin embargo tiene posibilidades limitadas debido a la escasez de donadores y a su costo, b) hemodiálisis en riñón artificial: se hace circular la sangre por un dializador, es decir un filtro capaz de depurar la sangre la cual se pone en contacto con un líquido dializante, y c) diálisis peritoneal; se aprovecha el propio revestimiento del interior del abdomen (membrana peritoneal) para depurar la sangre [10].

### **1.3 Diálisis peritoneal**

La diálisis peritoneal (DP) es un tratamiento de remplazo de la función renal. En este tratamiento, la membrana peritoneal funciona como un “dializador” que permite eliminar xenobióticos y metabolitos que se producen diariamente en el organismo. Ejemplo de estos metabolitos son: la urea, así como el exceso de potasio en la sangre y el exceso de líquidos.

La DP consiste en infundir una solución de composición y osmolaridad controladas y similares al suero normal, en la cavidad peritoneal. Se deja esa solución un tiempo de permanencia en el abdomen y posteriormente se drena. Durante el tiempo de permanencia, se lleva a cabo el intercambio de agua y solutos como urea, creatinina, potasio, sodio y glucosa desde los capilares peritoneales hacia el líquido de diálisis, que contiene sodio, cloro, lactato y una alta concentración de glucosa. De esta manera, a través del peritoneo se establece un equilibrio entre el plasma y el líquido de diálisis [11].



El agua y los solutos pasan de los capilares peritoneales al líquido de diálisis a través de la membrana biológica que es el peritoneo, estableciéndose un flujo bidireccional entre el plasma y la cavidad peritoneal. Sin embargo a largo plazo la diálisis puede provocar deterioro de la membrana peritoneal y de los tejidos subyacentes, produciendo una disminución en el intercambio de fluidos, también conocida como falla de ultrafiltración [12].

El transporte de solutos a través de la membrana peritoneal se lleva a cabo por tres mecanismos que son difusión, convección y ultrafiltración [13].

- La difusión: es el principal mecanismo por el que la diálisis peritoneal promueve la salida de solutos. Se trata de un proceso espontáneo por el cual, dos soluciones separadas por una barrera semipermeable, tienden a alcanzar una concentración uniforme. En el caso de la DP, las dos soluciones son la sangre capilar por un lado y la solución introducida en la cavidad peritoneal por el otro, siendo el peritoneo la membrana permeable. Los factores que afectan a la difusión son: el gradiente de concentración, el tamaño del soluto y las características de permeabilidad de la membrana.
- La convección es un fenómeno de arrastre pasivo de solutos a través de la membrana por el movimiento del agua. Se realiza por poros grandes y pequeños y depende del coeficiente de permeabilidad para cada soluto.
- Ultrafiltración es el mecanismo por el que la diálisis peritoneal permite el desplazamiento de agua. Se produce por el movimiento de agua a través de la membrana peritoneal como resultado del gradiente osmótico que se genera al introducir una solución de diálisis con un agente capaz de generar una diferencia de presión hidrostática entre los dos lados de la membrana. Así, la fuerza osmótica de un soluto depende de su concentración y de su tamaño y es mayor si no atraviesa la membrana y permanece en la cavidad peritoneal en todo momento [11].

## 1.4 Peritoneo

El peritoneo es una membrana serosa que se divide en: peritoneo visceral y peritoneo parietal [11]. El peritoneo visceral es el que cubre a los órganos y vísceras, y el peritoneo parietal es el que recubre la pared de la cavidad abdominal. Debido a la disposición en forma de pliegues peritoneales, su superficie es de aproximadamente 2 m<sup>2</sup> en humanos adultos [14].

La membrana peritoneal está compuesta por: a) una monocapa de células mesoteliales (CM) que constituyen la primera barrera del peritoneo. Las CM residen sobre una membrana basal compuesta por colágeno tipo IV, laminina, fibronectina y proteoglicanos. [15]. b) Debajo del mesotelio se encuentra el tejido intersticial compuesto por colágeno tipo I y III, fibras de fibrina [16] y diversas células incluyendo fibroblastos, macrófagos, mastocitos, leucocitos y adipocitos. En esta región se encuentran los vasos linfáticos y sanguíneos,[17-19] (Figura 1).

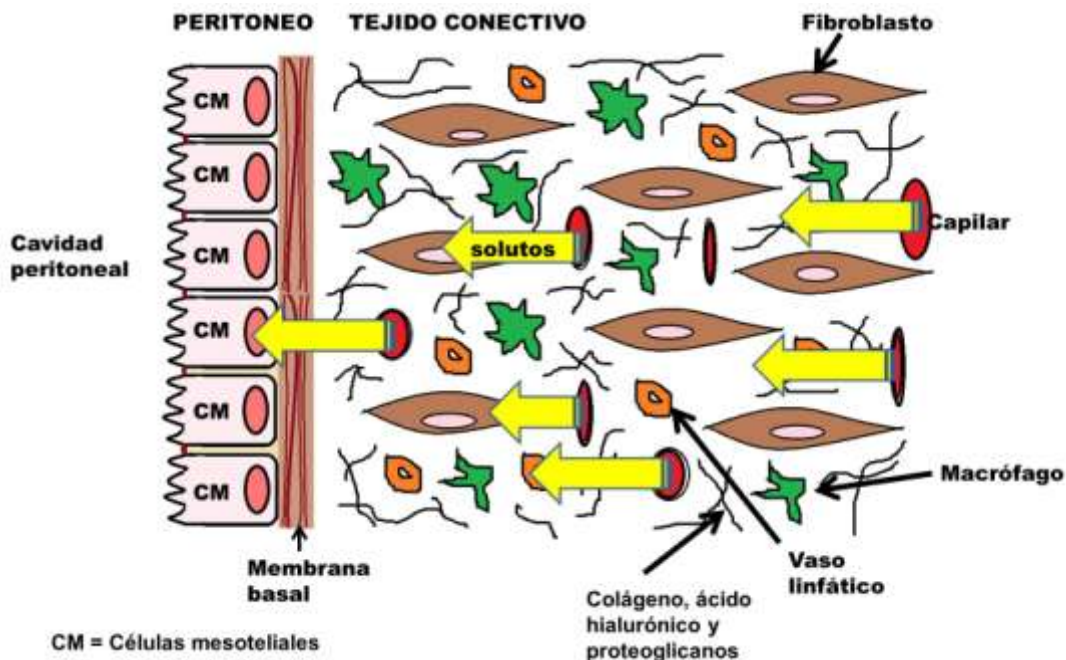


Figura 1. Membrana peritoneal.

### 1.4.1 Células mesoteliales (CM)

Las CM son predominantemente aplanadas, con apariencia escamosa y con el citoplasma levantado en la región donde se encuentra el núcleo, el cual puede ser redondo u oval. Aunque el mesotelio parietal está conformado en su mayoría por células escamosas, también contiene células con morfología cuboidal, como las que se encuentran en el peritoneo visceral [20, 21] (Tabla 1). Aunque las CM tienen un origen mesodérmico, poseen características de células epiteliales tales como: un dominio apical y basolateral, descansan sobre una membrana basal y están unidas entre sí a través de uniones estrechas [22, 23].

En la superficie luminal de las CM se localizan microvellosidades que varían en forma, longitud y densidad [24]. Las microvellosidades son pequeñas evaginaciones de la membrana celular apical. Estas estructuras contienen complejos de señalización que permiten un rápido procesamiento de las señales. Las microvellosidades en las CM varían en número y forma, dependiendo de las condiciones externas a las que se encuentran sometidas [25].

Estos cambios dependen de la carga eléctrica de la superficie de las células [26], que se genera por los cambios en la composición del glicocalix [27] o por cambios en las proteínas (actina y vilina) que conforman las microvellosidades y otras moléculas de los fluidos serosos que son las encargadas de la protección de la superficie del mesotelio y que aseguran su integridad [28, 29].

Las CM también exhiben cilios sobre su superficie que son cinco veces más largos que las microvellosidades, están compuestos por microtúbulos que contienen  $\alpha$ -tubulina acetilada y  $\alpha$ -tubulina destirosinada [22]. El cilio sensa los cambios en la composición del fluido seroso y media una respuesta celular rápida, debido a su proximidad con orgánulos como el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi [23].

**Tabla 1. Diferencias entre células mesoteliales escamosas y cuboidales**

	Células mesoteliales escamosas	Células mesoteliales cuboidales
<b>Núcleo</b>	Redondo u ovalado	Grande y con nucléolos
<b>Mitocondrias</b>	Pocas	Abundantes
<b>Retículo endoplásmico rugoso</b>	Escaso	Abundante
<b>Aparato de Golgi</b>	Poco desarrollado	Bien desarrollado
<b>Vesículas</b>	Pocas	Numerosas
<b>Microfilamentos</b>	Presentes	Numerosos
<b>Microvellosidades</b>	Abundantes	Abundantes

Las CM expresan filamentos intermedios de vimentina, desmina y  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA por sus siglas en inglés) característicos de su origen mesodérmico, aunque también expresan filamentos intermedios de citoqueratina y E-cadherina que son características de las células epiteliales.

#### **1.4.1.1 Funciones de las células mesoteliales**

Las CM tienen diversas funciones como: la presentación de antígenos, la síntesis de citocinas, de factores de crecimiento y la secreción de glicosaminoglicanos, predominantemente hialuronato. Éste último se encuentra alrededor de las microvellosidades y protege a las células del daño abrasivo y de los agentes infecciosos.

Las CM también secretan fosfatidilcolina, el mayor constituyente de los cuerpos lamelares que actúan como lubricantes para reducir la fricción entre las cavidades serosas [21]. El mesotelio está involucrado activamente en el transporte de moléculas y en el movimiento de fluidos a partir de uniones estrechas y de estomas. Estos últimos son cavidades de 3 a 12  $\mu$ m de diámetro presentes entre dos o más células mesoteliales cuboidales que

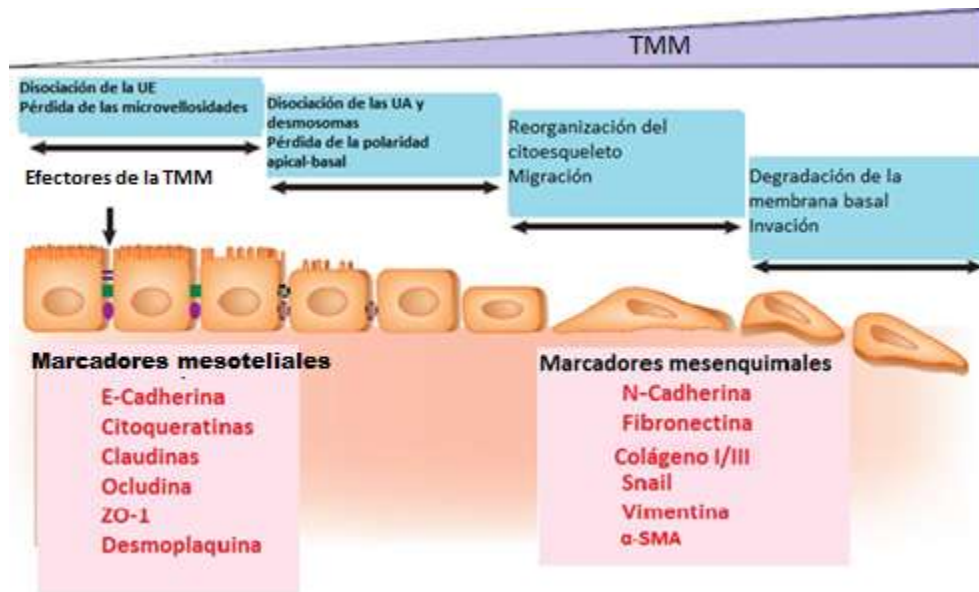
proveen un acceso directo al sistema linfático subyacente, permitiendo así una rápida eliminación de fluidos y células de las cavidades serosas [30].

El mesotelio permite el mantenimiento de la homeostasis del peritoneo, el control de fluidos y el transporte de solutos [18, 19].

### **1.5 Transición mesotelio-mesénquima (TMM)**

Las CM también experimentan el proceso de transición mesotelio-mesénquima (TMM), que participa en la reparación de los tejidos cuando hay daño y en procesos patológicos como la fibrosis, la invasión de células tumorales y la metástasis [31]. La TMM es un proceso complejo, que involucra la alteración de la arquitectura celular y la reprogramación molecular que hace que las células mesoteliales adquieran una apariencia fibroblástica, con reducción en las adhesiones intercelulares y un incremento de la motilidad.

La TMM inicia con la disociación de las uniones intercelulares por lo que disminuye la expresión de claudinas, ocludina, ZO-1, E-cadherina y desmoplaquina. Esto lleva a la pérdida de las microvellosidades y de la polaridad apical-basolateral [32]. En esta etapa de la TMM, las células adquieren una morfología elongada, aumentan la expresión de  $\alpha$ -SMA, el citoesqueleto se reorganiza y las células incrementan su capacidad de migración. En la última etapa de la TMM, las células adquieren la capacidad para degradar la membrana basal a través de la expresión de metaloproteinasas (MMP) Figura 2.



**Figura 2. Eventos de la transición mesotelio-mesénquima. (Modificada de [32]).**

Las células mesoteliales de peritoneo humano (CMPH), cultivadas *in vitro* adoptan una apariencia fibroblástica antes de llegar a confluencia [14, 33]. El daño mecánico provocado por una herida a una monocapa mesotelial puede generar TMM en las células situadas en la periferia de la herida. En las CMPH el fenómeno TMM se induce por el factor de crecimiento transformante- $\beta$ 1 (por sus siglas en inglés TGF- $\beta$ 1) y se acompaña de un incremento en la expresión del receptor para los productos finales de la glicosilación avanzada (RAGE, por sus siglas en inglés) [34].

Se ha demostrado que durante la TMM disminuye la expresión de E-cadherina y citoqueratina, lo que se asocia con la activación del factor transcripcional SNAIL [35]. Los cambios en la morfología mesotelial pueden ser revertidos por la participación de la proteína morfogénica ósea (BMP-7) que restablece las características epiteliales [36, 37].

## **1.6 Mecanismos de transporte transepitelial**

El transporte transepitelial ocurre a través de dos vías que son la transcelular y la paracelular. La vía transcelular se da a través de la célula, es direccional y depende de la presencia de bombas, canales y transportadores transmembranales localizados en el lado apical y basolateral de la célula. El transporte paracelular, se lleva a cabo en el espacio entre célula y célula, se regula por las uniones estrechas y ocurre de forma pasiva como resultado de la difusión, mediada por gradientes eléctricos y osmóticos, creados por mecanismos celulares [38].

### **1.6.1. Transporte transcelular**

#### **1.6.1.1 Transporte de glucosa a través de la membrana celular**

La oxidación de la glucosa es la fuente más importante de obtención de energía para la célula, proceso que requiere transportar la glucosa al interior de la célula. No obstante, la membrana celular no es permeable a moléculas polares como la glucosa, por lo cual, su internalización debe llevarse a cabo mediante proteínas transportadoras acopladas a la membrana. En células eucariotas, existen dos tipos de proteínas transportadoras: 1) los cotransportadores de Na<sup>+</sup>-glucosa (SGLT) en los cuales el ion Na<sup>+</sup> aporta la energía motriz para la internalización de la glucosa, y 2) los GLUT, que actúan por difusión facilitada. [39]

La estructura propuesta de los SGLT contiene 14 cruces transmembranales tipo  $\alpha$ -hélice con sus grupos amino y carboxilo terminales del lado extracelular y un sitio de glicosilación entre los segmentos 6 y 7. El transporte de Na<sup>+</sup> se realiza en una región cercana al amino terminal y la glucosa entra por la región cercana al carboxilo terminal. Inicialmente la interacción con el Na<sup>+</sup> promueve un cambio conformacional en la proteína que aumenta la afinidad por la glucosa. El Na<sup>+</sup> transportado al interior de las células es bombeado por la ATPasa de Na<sup>+</sup> /K<sup>+</sup> a través de la membrana basolateral. La glucosa acumulada en las células epiteliales se moviliza fuera

de la célula mediante los facilitadores del transporte de glucosa GLUT. Los SGLT más estudiados son el SGLT1, el SGLT2 y el SGLT3 que se diferencian por la afinidad por la glucosa y el sodio, la capacidad de transportar glucosa y la ubicación tisular.

El SGLT 1 es una proteína de 664 aminoácidos codificada por un gen localizado en el cromosoma 22; tiene una alta afinidad por la glucosa, con una constante de Michaelis ( $K_m$ ) de 0,3 mM la  $K_m$  corresponde a la concentración de sustrato que semisatura el sistema de transporte. Transporta dos moléculas de sodio por una de glucosa o galactosa, con un  $K_m$ , para el sodio, de 32 mM.

Se expresa en el intestino delgado y en el segmento S3 de la nefrona proximal; en este último, por sus características cinéticas, se encarga de la reabsorción de la glucosa filtrada que no se reabsorbió en los segmentos S1 y S2. Su conformación proteica presenta catorce dominios transmembranales en orientación  $\alpha$  hélice, con los dominios amino (N) y carboxilo (C) terminales localizados en la región extracelular de la membrana (1); presentan un sitio de glicosilación entre los dominios transmembranales seis y siete.[[40](#), [41](#)].

SGLT-1 presenta un sitio de glicosilación entre los dominios transmembranales seis y siete y tiene una alta afinidad por la glucosa. Transporta dos moléculas de sodio por una de glucosa. El sodio ingresa por una región del transportador cercana al extremo N-terminal y la glucosa lo hace a través de la región C-terminal. La unión del sodio al SGLT genera un cambio de conformación que permite la unión y el transporte de la glucosa al interior de la célula. De esta manera ingresan dos moléculas de sodio, una de glucosa y 260 moléculas de agua [[42-44](#)].

SGLT-2 presenta una similitud del 59 % con el SGLT1. Se codifica por un gen localizado en el cromosoma 16 y está formado por 672 aminoácidos.



Su  $K_m$  para la glucosa es de 1.63 mM, transporta una molécula de glucosa por un ión  $\text{Na}^+$ .

Se expresa principalmente en el túbulo contorneado proximal de las nefronas reabsorbiendo la glucosa filtrada. Su defecto congénito en la membrana apical del segmento S1 de las células del túbulo renal proximal produce una glucosuria renal primaria. Los pacientes con este padecimiento presentan niveles normales de glucosa en la sangre, así como resultados normales de tolerancia oral a la glucosa, pero presentan glucosuria persistente. En los casos graves, los pacientes pueden excretar una alta cantidad de la glucosa filtrada

Como se menciona la entrada o salida de glucosa, puede efectuarse por difusión facilitada a través de los transportadores de glucosa (GLUT) Se han descrito hasta la fecha 14 GLUT, los cuales presentan características estructurales comunes: 12 dominios alfa hélice transmembranales, cuyos grupos amino y carboxilo terminal están localizados intracitoplasmáticamente un dominio extracelular altamente glucosilado en el tercer o quinto bucle o asa dependiendo del GLUT. Los GLUT se pueden agrupar en tres clases principales de acuerdo a sus secuencias homólogas y a la posición del asa de glucosilación.

La clase I comprende del GLUT1 al 4 y GLUT14. La clase II (transportadores impares) incluye a los GLUT5, 7, 9 y 11. La clase III (transportadores pares) está conformada por GLUT6, 8, 10 y 12 y el transportador de mioinositol impulsado por protones (HMIT) o GLUT13.

Las clases I y II de GLUT tienen su sitio de glucosilación en la primera asa extracelular entre las hélices 1 y 2 transmembranales. En tanto que en la clase III el sitio de glucosilación se ubica en el asa 9. Las secuencias proteicas de los GLUT poseen una homología del 14 al 63%. Mientras que en regiones conservadas, la homología aumenta del 30 al 79%.[\[45\]](#).

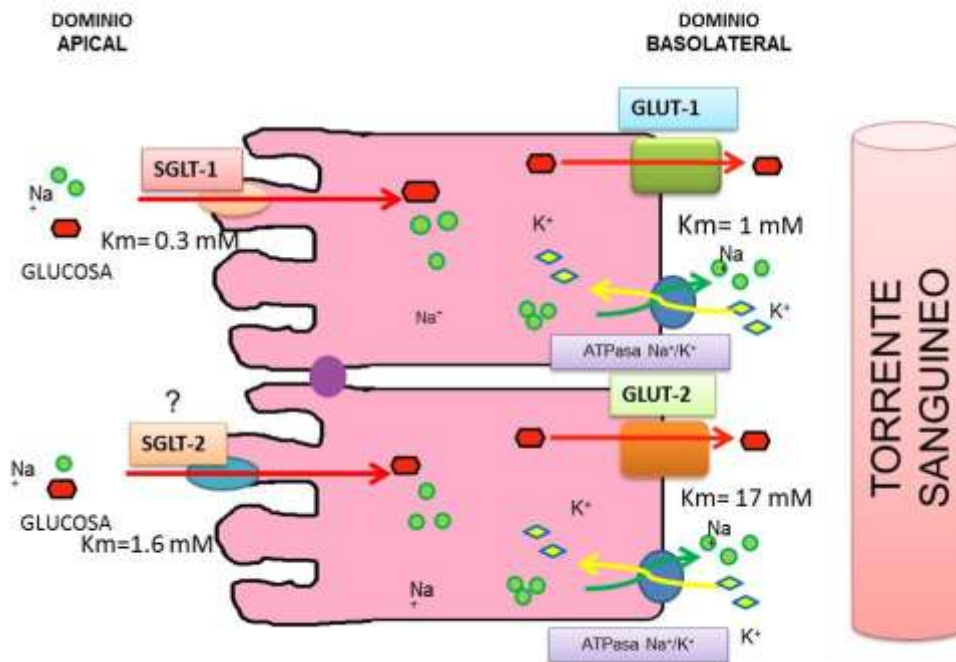
A excepción de GLUT-4, los GLUT no necesitan de hormonas, neurotransmisores para regular su abundancia en la membrana plasmática. Sin embargo, las células que dependen de GLUT-4 para la entrada de glucosa, como células del músculo esquelético, del cardíaco y de los adipocitos, necesitan de la activación de los receptores de insulina en la membrana plasmática para que se exprese el transportador [\[46-48\]](#).

GLUT 1 es una proteína de 664 aminoácidos, la principal función de GLUT1 es mantener la respiración celular mediante el consumo basal de glucosa y el aporte de esta al cerebro. GLUT1 también transporta otras moléculas como galactosa, manosa y glucosamina. El valor de Km de este GLUT para glucosa es 1 mM. Posee una homología de aminoácidos entre especies de un 98% (humano, rata, conejo y cerdo). Se expresa en los eritrocitos, los astrocitos, las células endoteliales y las células de la retina. En el riñón se ha encontrado en prácticamente todos los segmentos de la nefrona. En la membrana basolateral de las células ubicadas en la porción contorneada y recta de la nefrona proximal, se asocia con el proceso de reabsorción de la glucosa; en el resto de la nefrona se asocia con el aporte nutritivo a la célula [\[49\]](#).

GLUT 2 es una proteína de 522 aminoácidos. A diferencia de los otros GLUT su afinidad por la glucosa es baja (Km: 17 mM). Transporta además galactosa y fructosa. Se expresa en células  $\beta$  pancreáticas, en hepatocitos, en enterocitos y en células tubulares renales. En células  $\beta$  pancreáticas y en hepatocitos GLUT2 facilita el ingreso de la glucosa a la célula, como respuesta al incremento de la glicemia. Debido a su elevado valor de Km, funciona en condiciones cinéticas de primer orden; esto quiere decir que es muy sensible a los cambios de glicemia e incrementa su actividad cuando aumenta la glucosa en la sangre. Las características mencionadas permiten que la entrada de glucosa sea el primer paso en el estímulo para la secreción de insulina en las células  $\beta$  del páncreas y en el proceso de glucogenogénesis en el hígado. En el enterocito GLUT 2 se encuentra en la

membrana basolateral, en la cual es transportador bidireccional y transloca glucosa entre ambos lados de la membrana, siempre a favor de su gradiente de concentración [50]. En el riñón se localiza en la membrana basolateral del túbulo proximal, donde también permite el paso de glucosa al espacio extracelular [48].

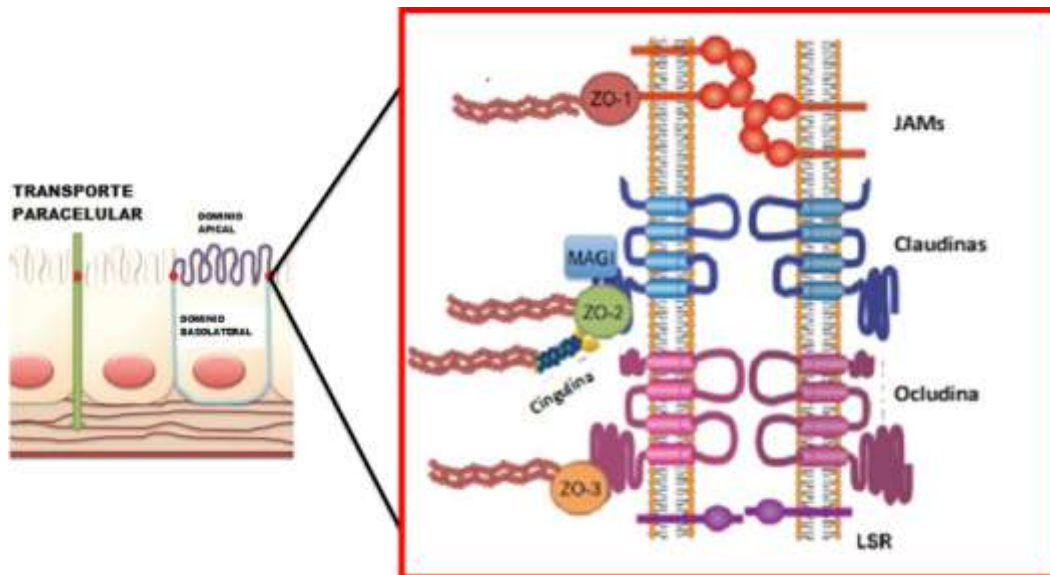
## Transporte de glucosa



**Figura 3. Transportadores de glucosa.** La glucosa entra a la célula a través de los transportadores SGLT-1 y SGLT-2 acoplados al ion  $\text{Na}^+$ . Cuando la glucosa entra a la célula a través de SGLT-1 lo hace acoplada a dos iones  $\text{Na}^+$  y cuando entra por el transportador SGLT-2 solo entrará con un ion  $\text{Na}^+$  y la glucosa saldrá de la célula hacia el torrente sanguíneo a través de los transportadores GLUT-1 y GLUT-2. Las concentraciones de  $\text{Na}^+$  se regulará a través de la bomba sodio potasio  $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$  La velocidad y afinidad del transporte de glucosa depende de la  $K_m$  de cada transportador.

### 1.6.2 Transporte paracelular

El transporte paracelular se regula por la unión estrecha (UEs). Ésta es un complejo multiproteico de contacto célula-célula que se encuentra en el límite entre la membrana lateral y apical de las células epiteliales y endoteliales. Las UEs se constituyen por un conjunto diverso de proteínas. Las proteínas integrales comprenden a las claudinas, la ocludina, las moléculas de adhesión a la unión (JAM por sus siglas en inglés), y el receptor de lipoproteínas estimulado por lipólisis (LSR por sus siglas en inglés) las cuales establecen los contactos celulares en el espacio intercelular. Las proteínas periféricas zona ocludens ZO-1, ZO-2, ZO-3, cingulina, paracingulina y MAGIs que permiten la interacción de las proteínas transmembranales con el citoesqueleto de actina (Figura 4) [38, 51-53].



**Figura 4. Representación esquemática de la localización y estructura de la unión estrecha.** Las claudinas poseen cuatro dominios transmembranales y dos asas extracelulares y los dominios citosólicos N- y C- terminal. El primer dominio extracelular determina la selectividad iónica del epitelio. (Modificado de González-Mariscal, L. et al. 2012).

La unión estrecha funciona como una cerca y una compuerta. La función de compuerta regula el paso selectivo de moléculas de iones y agua,

a través de la ruta paracelular. La función de cerca consiste en la capacidad de la unión estrecha para evitar el paso de proteínas y lípidos de la cara apical de las células a la cara lateral en el plano de la membrana. Esta propiedad mantiene la polaridad de las células epiteliales (González-Mariscal, L. et al. 2012).

### **1.7. Efecto del líquido de diálisis en el peritoneo.**

Uno de los retos más importantes de la diálisis peritoneal (DP) es que se preserve la integridad de la membrana peritoneal. Desafortunadamente la exposición prolongada a soluciones de diálisis compromete la integridad y la funcionalidad de la membrana peritoneal. Se piensa que las alteraciones estructurales y funcionales de la membrana peritoneal son consecuencia de la alta concentración de glucosa contenida en el líquido de diálisis (LD) y de los productos de degradación que resultan del proceso de esterilización por calor de esos líquidos [54].

En el peritoneo el LD induce angiogénesis, esta alteración estructural se considera la principal causa de falla en la ultrafiltración en DP. También se ha observado en el peritoneo de pacientes sometidos a DP, un acortamiento y posterior pérdida de las microvellosidades de las células mesoteliales. Se ha postulado que esto depende del tiempo de duración de la DP [55]. Cuando los pacientes son sometidos a periodos largos en DP (10 a 15 meses) se observan cambios en marcadores de la TMM como: disminución de la expresión de E-cadherina y citoqueratina y aumento de vimentina y Snail, lo que indica una pérdida del fenotipo epitelial y las células adquieren características de fibroblastos. Este proceso de TMM comienza con la pérdida de las uniones intercelulares y de la polaridad celular y continúa después cuando las células adquieren un fenotipo de fibroblastos. En esta etapa aumentan la migración, la invasión y la acción fibrogénica [35, 56].

En cultivos de CPMH también se ha observado disminución de la expresión de proteínas de la UE como claudina1, claudina 8, ZO-1 y ocludina, así como también disminución de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) de los cultivos [57-60].

Otro de los problemas de la DP es que incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales generan estrés oxidante adicional en los pacientes [61]. Esta producción induce apoptosis y envejecimiento acelerado de las CM [62]. Estudios *in vitro* demuestran que la alta concentración de glucosa induce la generación de ERO en CMPH [60] y que estas especies también producen cambios en la organización y distribución de algunas proteínas de la UE como ocludina y ZO-2, así como disminución de la RET [63].

Ito y col. en 2000 [64, 65] evidenciaron que la alta concentración de glucosa en el medio de cultivo de las CMPH disminuye la proliferación celular, así como la expresión de ZO-1, E-caderina y  $\beta$ -catenina e incrementa la expresión de TGF $\beta$ -1. Posteriormente en 2003 evaluó el efecto de los LD y mostró que la alta concentración de glucosa contenida en las soluciones de diálisis disminuye la expresión de ZO-1, claudina 1, ocludina y  $\beta$ -catenina. Estos cambios pueden estar relacionados con la hiperpermeabilidad peritoneal, con la pérdida de CM y con la reducción progresiva en la eficiencia de la diálisis peritoneal.

En la actualidad se desarrollan nuevos líquidos de diálisis sin un pH ácido y que generen un mínimo de productos de degradación de la glucosa (GDPs por sus siglas en inglés), con el fin de producir un daño menor al peritoneo y de mejorar la eficiencia de la diálisis peritoneal. En México el sector salud aún no cuenta con estos líquidos, además de que algunos se encuentran en fase de experimentación y su costo es elevado [54].

### **1.8. Estrés oxidante y el sistema de defensa antioxidante**

El estrés oxidante es un estado de la célula en el cual se encuentra alterada la homeostasis óxido-reducción intracelular, es decir, el balance entre oxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce por una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes [66].

Las ERO se producen a partir del oxígeno singulete ( $O_2$ ), que se generan como resultado del metabolismo autótrofo, en el cual el hidrógeno fue tomado para producir agua y el oxígeno liberado como un subproducto [67].

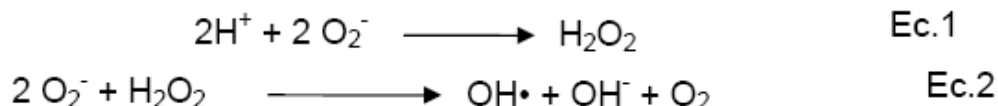
El  $O_2$  al completar su reducción a agua genera intermediarios reductores ( $O_2^{\cdot -}$ ,  $OH^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$ ). Dichos radicales son producidos durante el metabolismo normal; se ha estimado que aproximadamente entre 1 y 3% del  $O_2$  consumido por un sistema animal es convertido en ERO [68]

La reactividad y propiedades de las diferentes ERO varían considerablemente; la especie de oxígeno más reactiva es el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot -}$ ), ya que reacciona instantánea e indiscriminadamente. El  $OH^{\cdot -}$  puede ser generado durante reacciones térmicas o bajo los efectos de radiaciones ionizantes, reaccionando con todas las moléculas orgánicas, por lo tanto, su difusión es muy limitada.

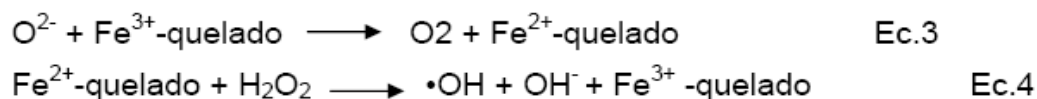
Por su parte el anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), caracterizado por su baja reactividad está limitado al compartimiento donde se produce y no es capaz de atravesar la membrana; es a partir de este anión que se forma el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

El  $H_2O_2$  se produce mediante la dismutación del  $O_2^{\cdot -}$  espontáneamente bajo las condiciones del pH fisiológico y además se puede catalizar por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El  $H_2O_2$  posee una reactividad moderada con una difusión elevada, teniendo la capacidad de atravesar las membranas [68].

De acuerdo con lo anterior, la producción de las diferentes ERO puede ser considerada interrelacionada, por lo que el  $O_2^{\cdot -}$  puede ser convertido a  $H_2O_2$  vía dismutación (Ec.1) y el  $O_2$  y el  $H_2O_2$  pueden reaccionar para producir  $OH^{\cdot}$  vía reacción Haber-Weiss, la cual es termodinámicamente favorable pero cinéticamente lenta Ec.2.



La fuente de radicales hidroxilos es catalizada por metales bajo condiciones fisiológicas, en donde el radical aniónico superóxido sirve como un reductor catalítico de oxido-reducción de un metal de transición como el hierro quelado (Ec. 3); posteriormente el metal reducido puede reaccionar con peróxido de hidrógeno y producir un radical hidroxilo (Ec.4), las ecuaciones 3 y 4 representan la reacción de Haber-Weiss catalizada por hierro; otros metales como cobre y manganeso pueden catalizar esta reacción. La ecuación final es conocida como la reacción de Haber-Weiss (Ec. 2)



A su vez, los pro-oxidantes generados en la reacción Haber-Weiss tienen la capacidad de producir otras especies reactivas como los radicales peroxil ( $\text{ROO}\cdot$ ) y alcoxil ( $\text{RO}\cdot$ ), producidos durante la oxidación de lípidos insaturados [66, 67].

En las células, los tres blancos moleculares más susceptibles para el daño producido por las ERO son el ADN, los lípidos y las proteínas. Cuando se da la interacción de un radical libre, como  $\text{OH}\cdot$ , con un ácido graso, generalmente triacilgliceroles ó fosfoacilgliceroles, localizados en la membrana celular, ocurre la lipoperoxidación, que tiene como consecuencia la desestabilización de la membrana y vuelve a la célula vulnerable a la apoptosis o la senescencia [69].

Las ERO también pueden actuar sobre las bases púricas y pirimídicas del ADN, como en el caso de la timina, a la que convierte en timinaglicol, un compuesto con carácter de radical libre que reacciona con el oxígeno para formar peroxitimina, una molécula muy reactiva que se une a las moléculas



adyacentes modificando la estructura del ADN, dañando a las bases y formando aductos, los cuales se asocian con el cáncer [70, 71].

En las proteínas se han identificado modificaciones por ERO en residuos de lisina, prolina, tirosina, triptófano, histidina y metionina [72, 73].

Los mecanismos de protección en los tejidos contra el efecto de las ERO son enzimáticos y no enzimáticos. Entre los no enzimáticos se incluye al glutatión,  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno y ácido úrico, entre otros. En los mecanismos enzimáticos se encuentran involucradas las enzimas antioxidantes catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx),  $\gamma$ -glutamil cisteín ligasa ( $\gamma$ GCL) y hemoxygenasa tipo 1 (HO-1).

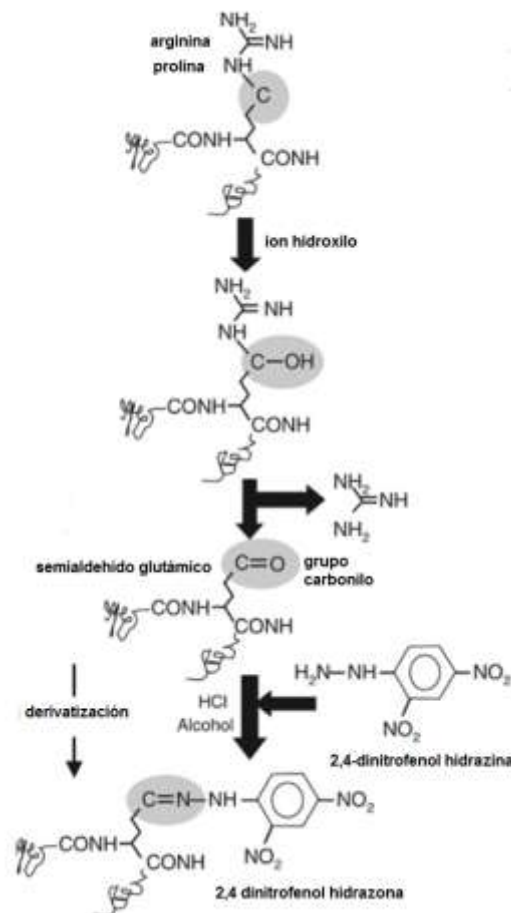
El estrés oxidante se relaciona con enfermedades metabólicas como la diabetes [74]. La concentración excesiva de glucosa altera el transporte de electrones de la cadena mitocondrial y causa una sobreproducción del radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) [75]. También se induce estrés oxidante por auto oxidación de la glucosa y a través de glicosilación no enzimática. Las EROs se generan en el proceso de la formación de los productos finales de glicosilación avanzada y en la interacción con su receptor RAGE. Además, la glicosilación inactiva a las enzimas antioxidantes, tal es el caso de la superóxido dismutasa [76].

### **1.8.1 Carbonilación de proteínas**

En presencia de altos niveles de ERO, las proteínas sufren oxidación. Existe oxidación reversible e irreversible de las proteínas. La oxidación reversible constituye, en ocasiones, una forma de activar o desactivar proteínas que tienen una función en la regulación redox. Tal es el caso de la formación de puentes disulfuro entre grupos tioles de cisteínas cercanas. Otras formas de oxidación reversible son la glutatiónilación y la S-nitrosilación. La oxidación irreversible se da a través de cuatro mecanismos: la carbonilación, la ruptura de enlaces peptídicos, la nitración y la formación

de enlaces proteína-proteína. Estas oxidaciones pueden ser catalizadas por metales [73].

La carbonilación de proteínas ocurre en los residuos de prolina, arginina y lisina, siendo estos los sitios más susceptibles a la oxidación catalizada por metales. Los productos de estos residuos son el semialdehído glutámico, producto de la oxidación de arginina y prolina y el semialdehído aminoalifático, producto de la oxidación de lisina [72].(Figura 5).



**Figura 5 Formación de un semialdehído glutámico a partir de la carbonilación de un residuo de arginina.** Para detectar al grupo carbonilo formado como consecuencia de la oxidación catalizada por un metal, se derivatiza con 2,4-dinitrofenilhidrazina. El grupo resultante, 2,4-dinitrofenilhidrazona puede detectarse con anticuerpos monoclonales o policlonales (Modificado de Nyström 2005. [77]).

La generación de grupos carbonilo en las proteínas ocurre por cuatro mecanismos: 1) Oxidación directa de los residuos de prolina, lisina, arginina y treonina por las ERO; 2) Ruptura de la cadena polipeptídica por medio de la ruta de  $\alpha$ -amidación o por la oxidación de residuos de ácido glutámico, formando péptidos en los cuales el aminoácido N-terminal está bloqueado por un derivado  $\alpha$ -cetoacilo; los mecanismos tres y cuatro implican reacciones secundarias con moléculas que presentan grupos carbonilo reactivos formados previamente por reacción directa de biomoléculas con las ERO [78]. De acuerdo a lo anterior, todas las proteínas son blancos potenciales de oxidación y las principales modificaciones son la pérdida de la actividad catalítica, modificaciones de los aminoácidos, alteración de la estabilidad térmica, cambio en la viscosidad, fragmentación, formación de enlaces covalentes inter ó intra-proteicos, formación de puentes disulfuro y mayor susceptibilidad a la proteólisis.

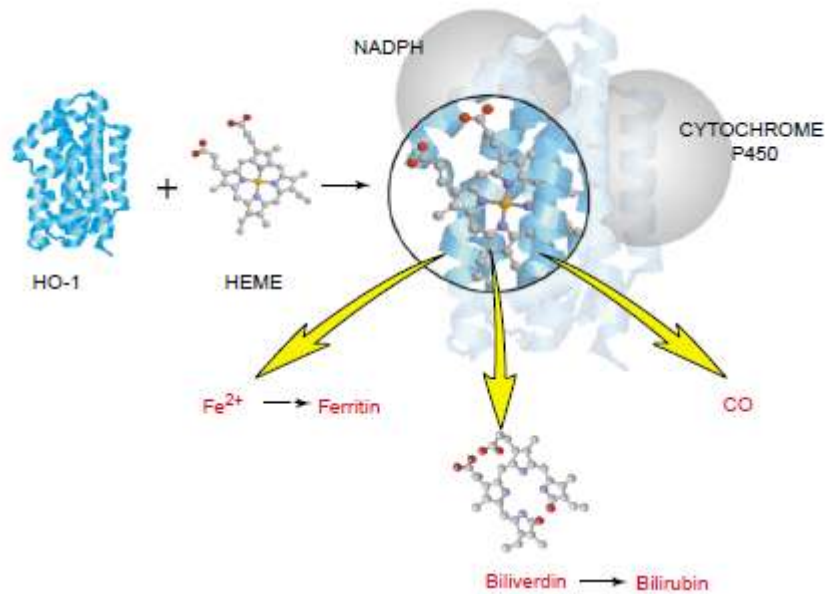
La carbonilación de proteínas es un biomarcador estable de estrés oxidante severo ya que se detecta en sangre hasta cuatro horas después del daño. A pesar de que es un indicador cualitativo de la oxidación de proteínas no específico, presenta mediciones reproducibles; a diferencia de marcadores de la lipoperoxidación como el malondialdehído, el cual tiene un tiempo de vida corto y requiere métodos de medición más sensibles y costosos [77-79].

### **1.8.2. Hemo-oxigenasa tipo I (HO-1)**

La HO-1 es una enzima antioxidante que tiene como principal papel fisiológico la degradación oxidativa del grupo hemo a biliverdina, hierro libre y monóxido de carbono. La biliverdina se metaboliza rápidamente a bilirrubina mediante la biliverdina reductasa (Figura 6).

La bilirrubina es un potente antioxidante en las células de mamífero que participa en una serie de procesos celulares como el crecimiento, la inflamación y la apoptosis. Adicionalmente, limita el daño a los tejidos en respuesta a los estímulos pro-inflamatorios y previene el estrés oxidante [79]. La función de esta enzima es proteger a la célula de los procesos

inflamatorios y del estrés oxidante generado por la respuesta celular inmune o por el metabolismo de xenobióticos, evitando el daño a lípidos, proteínas y ADN [80].



**Figura 6. Reacción enzimática de la hemo oxigenasa1 (HO-1).** La HO-1 oxida al grupo Hemo y lo transforma a biliverdina, un potente antioxidante, contribuyendo de igual manera a la formación de ferritina, un citoprotector. (Otterbein y Choi, 2000)[80].

A la fecha se han reportado tres isoformas de HO: HO-1, HO-2 y HO-3, que catalizan la reacción antes mencionada. De las tres isoformas, la HO-1 es una enzima inducible por un grupo diverso de estímulos como el grupo hemo, metales pesados, antioxidantes y mediadores pro-inflamatorios como lipopolisacárido (LPS), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-10 y lipoproteínas de baja densidad oxidada (LDLox). Los factores transcripcionales que dirigen la expresión de HO-1 son el factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), la proteína activadora 1 (AP-1), AP-2 y Nrf2. En cultivos de CPMH expuestos a altas concentraciones de glucosa, indujeron la expresión de HO-1 y observaron que se atenúa el proceso de TEM [81].

Nrf-2 es activado por el estrés oxidante. En condiciones basales, reside en el citoplasma asociado con una proteína inhibidora, Keap-1 (Kelch-like ECH asociado a la proteína 1) [82]. Keap-1 interactúa con cullin-3 E3-ubiquitina ligasa (Cul-3), resultando en la ubiquitinación, como plataforma para la degradación de Nrf-2 [83, 84]. Nrf-2 puede ser modulado por modificaciones postraduccionales, tales como fosforilaciones en serina y treonina por varias cinasas, tales como fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), proteína cinasa C (PKC), cinasa N-terminal de c-Jun (JNK) y cinasa regulada por señal extracelular (ERK). La fosforilación por estas enzimas facilita la disociación de Keap de Nrf-2 y su posterior translocación. También se ha descrito que la familia de proteína cinasa p38 de la proteína activadora del mitógeno (MAP) puede activar o inhibir la translocación nuclear de Nrf-2 dependiendo del tipo de célula implicada [85].

## 2. Planteamiento del problema

La diálisis peritoneal es la alternativa terapéutica más utilizada en pacientes con ERT. Una de las causas más frecuentes de esta condición es la diabetes.

Sin embargo, la eficiencia de este tratamiento se ve limitada debido al daño progresivo al peritoneo que ocasiona la exposición crónica a los líquidos de diálisis, lo que altera las propiedades de transporte de agua y solutos del peritoneo. Por estas razones, es de gran importancia el estudio de las células mesoteliales ya que son las células más importantes del peritoneo y éste constituye la superficie a través de la cual ocurre el intercambio de solutos durante la diálisis. Este transporte de solutos sucede a través de las vías transcelular y paracelular. Ésta última se regula por las UE.

Las proteínas de la UE como claudina-1, claudina-2 y ocludina son determinantes en el transporte paracelular. El transporte transcelular de la glucosa ocurre por los transportadores SGLT1, SGLT2, GLUT 1 y GLUT 2 por lo que es de gran relevancia estudiar qué papel tienen estas proteínas durante la diálisis y cómo se dañan por el contacto con los líquidos de diálisis.

En este estudio se analiza si las proteínas de transporte mencionadas anteriormente son blancos del estrés oxidante, si el daño a proteínas en este modelo diabético es por el estrés producido por la enfermedad y si se incrementa con el tratamiento por el líquido de diálisis. Por lo anterior, consideramos importante estudiar estos efectos en células mesoteliales del peritoneo en un modelo de animal diabético.

### **3. Hipótesis**

La diabetes aumentara la expresión de los transportadores de glucosa y las proteínas de la unión estrecha en las células peritoneales mesoteliales. Estos cambios incrementarán con la exposición al líquido de diálisis.

### **4. Objetivo general**

Estudiar la morfología y la expresión de las proteínas de la unión estrecha y de los transportadores de glucosa, en cultivos de células mesoteliales de peritoneo de ratas, en etapas iniciales de la diabetes y expuestos a líquido de diálisis.

### **5. Objetivos particulares**

1. Evaluar los cambios morfológicos en el peritoneo parietal en ratas con tres semanas de diabetes.
2. Identificar el fenotipo y los cambios estructurales presentes en los cultivos primarios de células mesoteliales de peritoneo de rata (CMPR).
3. Evaluar en los cultivos primarios de CMPR diabética y expuestos a LD.
  - a) La expresión de los transportadores de glucosa SGLT-1, SGLT2, GLUT-1 y GLUT-2.
  - b) La expresión de las proteínas de la unión estrecha (UE): claudina 1, claudina 2 y ocludina.
  - c) La resistencia eléctrica transepitelial.
  - d) La respuesta al estrés oxidante.
  - e) La transición mesotelio-mesénquima

## 6. Material y métodos

### 6.1. Reactivos

**Tabla 2, Anticuerpos utilizados para Western blot (WB) e inmunofluorescencia (IF)**

Anticuerpo/especie	Dilución	Casa comercial	No. de catálogo
Alexa-flúor 488 (conejo)	1:100 (IF)	Invitrogen	A21206
Alexa-flúor 488 (cabra)	1:100 (IF)	Invitrogen	A11055
Alexa-flúor 594 (ratón)	1:100 (IF)	Invitrogen	A21203
Claudina-1 (conejo)	1:250 (WB), 1:100 (IF)	Invitrogen	37-4900
Claudina-2 (conejo)	1:250 (WB), 1:100 (IF)	Invitrogen	35-5600
Ocludina (conejo)	1:250 (WB), 1:100 (IF)	Invitrogen	71-1500
SGLT-1 (conejo)	1:250 (WB), 1:100 (IF)	Millipore corp	AB1352
SGLT-2 (cabra)	1:250 (WB), 1:100 (IF)	Santa cruz Biotech	Sc-47403
GLUT-1 (conejo)	1:250 (WB), 1:100 (IF)	Millipore corp	AB1340
GLUT-2 (conejo)	1:250 (WB), 1:100 (IF)	Millipore corp	AB1342
HO-1 (conejo)	1:250 (WB), 1:100 (IF)	Sigma-Adrich	H4535
Nrf-2 (conejo)	1:250 (WB), 1:100 (IF)	Sigma-Adrich	SAB45011984
p-Nrf-2 (conejo)	1:100 (WB)	Bioss	Bs-2013R
Peroxidasa-conjugado (conejo)	1:1000 (WB)	Invitrogen	65-6120
Peroxidasa-conjugado (ratón)	1:1000 (WB)	Invitrogen	62-6520
Peroxidasa-conjugado (cabra)	1:1000 (WB)	Santa cruz Biotech	Sc2020
Citoqueratina 4.62	1:500 (WB), 1:100	Sigma-Adrich	C 7159



(ratón)	(IF)		
$\alpha$ -SMA (ratón)	1:1000 (WB), 1:100 (IF)	Merck Millipor	BCL171
Pancadherina (conejo)	1:250 (WB), 1:100 (IF)	Invitrogen	71-7100
Vimentina (ratón)	1:1000 (WB) 1:100 (IF)	Invitrogen	18-0052 08-0106
Catalasa (conejo)	1:100 (WB)	Sigma-Adrich	210836
SOD-1 (cabra)	1:100 (WB)	Santa cruz Biotech	Sc-8637
SOD-2 (cabra)	1:100 (WB)	Santa cruz Biotech	Sc-18503
Y-GCSc (conejo)	1:100 (WB)	Santa cruz Biotech	Sc-22755
RAGE (conejo)	1:250 (WB)	Sigma-Adrich	R5278

**SGLT (Cotransportador de Na<sup>+</sup> - glucosa), GLUT (transportador de glucosa), HO-1 (Hemo oxigenasa-1), Nrf-2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2),  $\alpha$ -SMA (alfa actina de músculo liso), RAGE(Receptor de productos de glucosilación avanzada) SOD (Superóxido dismutasa),  $\gamma$ -GCL (Gama-glutamil-cistein-ligasa). La  $\alpha$ -actina fue donada gentilmente por el Dr. José Manuel Hernández (Departamento de Biología Celular, CINVESTAV).**

## 6.2. Equipo

Microscopio confocal Leica TCS-SP8 (Germany), Microscopio de fuerza atómica N8 NEOS (Germany), sistema de imágenes EC3 UVP (BioImaging Systems, Cambridge, UK), espectrofotómetro de fluorescencia (Tecan infinite M200PRO Group Ltd). Voltímetro EVOM con electrodos, Sistema Millicell®-ERS.

## 6.3. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo (100 ml), se preparó con: DMEM-F12 con 1.8 g de bicarbonato de sodio, 12 mL de suero fetal bovino (SFB), 2 mL de HEPES 1 M, transferrina 0.5  $\mu$ g/mL, insulina 0.5  $\mu$ g/mL, glutamina 40  $\mu$ M/mL,

hidrocortisona 0.4 µg/mL y antibióticos (penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 ng/mL). Una vez preparada la solución, se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C.

#### **6.4. Preparación del medio DMEM + LD 2.5%glucosa**

El medio de cultivo se preparó como el medio DMEM-F12, pero se le adicionó el doble de los componentes para que quedara al 2X y se adicionó la solución de diálisis 2.5% de glucosa en una proporción 50:50.

#### **6.5. Estrategia experimental**

##### **6.5.1. Cuidado de los animales**

Ratas hembras de la cepa Wistar (200-250g de peso) se mantuvieron bajo ciclos de luz oscuridad de 12/12h a  $22 \pm 1$  °C y  $50 \pm 5\%$  de humedad. Los animales se alimentaron con dieta estándar (PMI, 5008, Purina, Alief City, TX) y agua purificada *ad libitum*. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y al comité de cuidado de animales institucional (UPEAL con el protocolo # 491).

##### **6.5.2. Inducción de diabetes con estreptozotocina (SZT)**

La diabetes tipo 1, se indujo mediante la administración única de SZT (60 mg/kg i.v) diluida en un amortiguador de citratos pH 6.0 con Tween 20 al 0.5%. Los animales se dividieron en 2 grupos (n=10 animales por grupo): a) grupo control (CTR), inyectado con vehículo y b) grupo diabético (DBT), inyectado con SZT. La SZT necrosa a las células  $\beta$  pancreáticas por lo tanto no hay producción de insulina o es mínima por lo cual se considera un modelo diabético tipo 1.

## 6.6. Parámetros bioquímicos estudiados para confirmar el modelo diabético

Se midieron los niveles de glucosa después de 12 h de ayuno (se obtuvo sangre de la cola) y se pesaron los animales antes de la administración de STZ y a los días 3, 7, 14 y 21 después de la administración de SZT, empleando un glucómetro One Touch® Ultramini™. Se midió el consumo de agua y de alimento desde el día 0 hasta el día 21.

A las ratas se les colocaban 50g de alimento y 500 ml de agua diarios, al siguiente día se pesaba el alimento y se medía el volumen de agua para obtener el consumo por día. Al día 20 los animales se colocaron en jaulas metabólicas para medir el volumen urinario durante 24 h (Figura 1). Las ratas se sacrificaron 21 días después de la inducción de la diabetes, para ello se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.).

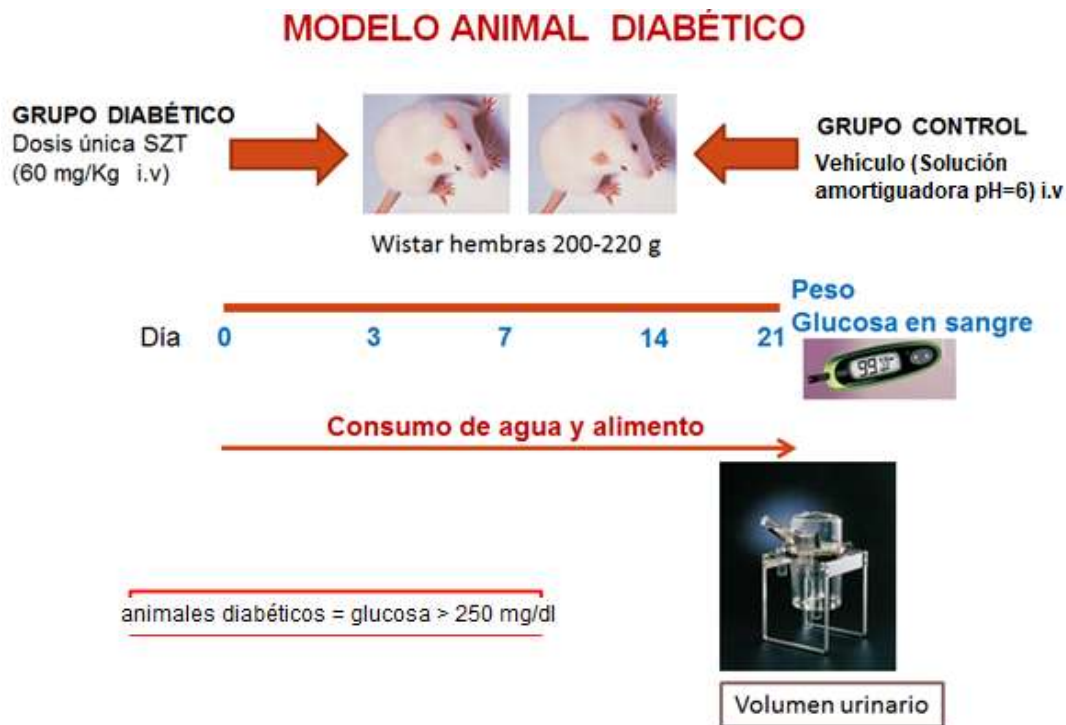


Figura 7. Diseño experimental y parámetros bioquímicos del modelo animal diabético.

## **6.7 Obtención de las células mesoteliales de peritoneo de rata (CMPR)**

### **6.7.1 Obtención de las CMPR por perfusión**

Una vez que las ratas fueron anestesiadas, se rasuraron y se hizo una pequeña incisión en la pared abdominal y una jareta con hilo de seda alrededor de la incisión. Se introdujo un catéter y se sujetó el catéter apretando con el hilo de la jareta, para mantenerlo en posición adecuada. Se introdujeron 20 ml de una solución de tripsina (0.11%) con EDTA (0.1%), la solución permaneció en la cavidad abdominal por 10 min. Después de este tiempo se recuperó la solución y se centrifugó a 1000 x g durante 5 min.

El sobrenadante se desechó y el botón celular se re-suspendió en 1 ml de medio de cultivo para contar el número de células utilizando azul de tripano y la cámara de Neubauer. En seguida, se sembraron  $1 \times 10^5$  células en cubreobjetos de 13 mm (pre-cubiertos con colágeno (1mg/ml)) y en filtros trans-well con medio de cultivo y se incubaron a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> a una proporción del 5 %. El cambio del medio de cultivo se realizó cada tercer día.

### **6.7.2 Obtención de las CMPR del omentum (peritoneo visceral)**

Una vez que se realizó la perfusión, se levantó el tejido parietal dejando expuestos los órganos. Se extrajo el omentum y se lavó con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a un pH de 7.4 para retirar el exceso de sangre. Posteriormente se colocó el omentum en una solución de tripsina 0.03% + EDTA 0.01% y se dejó en agitación durante 15 min a 37°C. Se retiró el omentum y se centrifugó el sobrenadante a 1000 x g durante 5 min.

Se desechó el sobrenadante y el botón celular se re-suspendió en un volumen final de 2 ml de medio de cultivo las células se sembraron en cajas de 3.5 cm de diámetro pre-cubiertas con colágeno (1mg/ml) y se incubaron a 37°C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> a una proporción del 5 %. El cambio del medio de cultivo se realizó cada tercer día.

### **6.7.3 Obtención de peritoneo parietal**

Se realizaron cortes transversales del peritoneo parietal de aproximadamente 0.5 cm de diámetro y se colocaron inmediatamente en 2-metilbutano (4°C) por 1 minuto y posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido. Se cortaron rebanadas de 6 µm con el criostato y se fijaron en portaobjetos tratados con gelatina. Las muestras se examinaron por microscopia confocal.

### **6.8. Determinación de la viabilidad celular**

La determinación de la proliferación celular se realizó por dos métodos: azul de tripano y fluoresceín diacetato (FDA, por sus siglas en inglés). Una vez que las células se extrajeron por perfusión, se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo para contar el número de células utilizando azul de tripano y la cámara de Neubauer. En seguida, las células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^5$  en cajas de 4 pozos precubiertas con colágeno (1 mg/mL) con medio de cultivo. Una vez que las células llegaron a confluencia al día 8, se retiró el medio de cultivo de las células, se hicieron dos lavados con PBS y se incubaron con tripsina al 0.06% + EDTA 0.1% por 20-40 seg para despegar a las células de la caja. La acción de la tripsina se detuvo con medio de cultivo y se centrifugó a 1000 x g por 3 min.

Finalmente, el sobrenadante se retiró y la pastilla celular se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo para contar el número de células con azul de tripano. Para la prueba de FDA se sembraron el mismo número de células y una vez que llegaron a confluencia se lavaron dos veces con PBS y se les agregó la FDA (12 µM) por 5 min. Posteriormente, las células se lavaron y la fluorescencia se leyó en un lector de placas Infinite 200 Tecan. La metodología se realizó como lo describe previamente Levey [10].

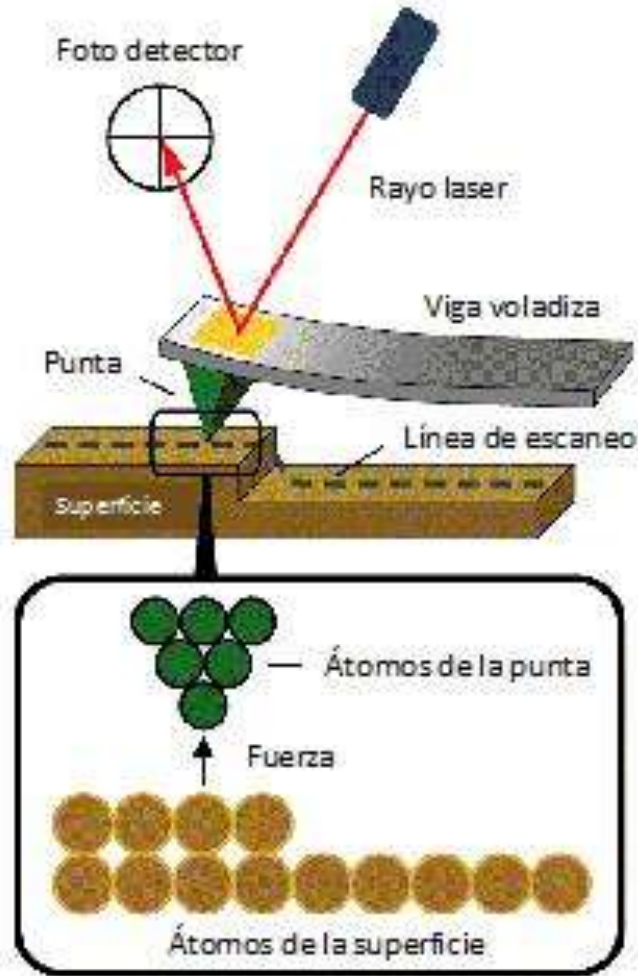
## 6.9. Microscopía de fuerza atómica

### 6.9.1 Principio

La microscopía de fuerza atómica permite obtener información sobre las propiedades mecánicas, la hidrofobicidad y la viscoelasticidad de la superficie de las muestras biológicas a tiempo real, bajo en un ambiente seco o líquido, y sin la necesidad de una previa preparación o tinción. Así, se puede estudiar la altura de la superficie y sus propiedades elásticas [86].

La microscopia de fuerza atómica mide las fuerzas que interactúan entre los átomos de la punta del sensor y los átomos de la muestra. La punta está unida a una placa flexible o *cantilever*, que se encuentra muy cerca de la superficie. Tanto las fuerzas de atracción como las de repulsión resultante de la interacción entre la punta y la muestra causan una encorvadura positiva o negativa a la viga (Figura 8). Una luz láser incide directamente sobre el cantilever por la cara opuesta a la de la punta y es reflejada al centro de un detector fotodiodo dividido en cuatro secciones denominadas “position Sensitive photo Detector” (PSDP).

Debido a los cambios en la superficie de la muestra, se producen doblamientos del cantilever que provocan cambios en el ángulo de la reflexión del láser. Esta diferencia de intensidad se transforma en una señal eléctrica con la que se pueden cuantificar tanto los movimientos verticales de la punta, debido a las fuerzas de atracción o de repulsión, como los movimientos laterales y de torsión del cantilever como consecuencia de la interacción entre la punta y la superficie de la muestra [87].



**Figura 8.** Esquema que muestra el principio de la técnica de microscopía de fuerza atómica. [http://morfocitologia.blogspot.mx/2008/07/microscopio-de-fuerza-atmica\\_11.html](http://morfocitologia.blogspot.mx/2008/07/microscopio-de-fuerza-atmica_11.html)

### 6.9.2. Procedimiento

Las células se sembraron en cubreobjetos cubiertos con colágeno y una vez que llegaron a confluencia se lavaron con PBS. Las monocapas se fijaron con metanol absoluto durante 10 min a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se hidrataron durante 5 min con PBS a temperatura ambiente y se colocaron sobre un portaobjetos para el estudio con el microscopio de fuerza atómica.

## **6.10. Exposición al líquido de diálisis**

Una vez que las células de los grupos de la condición control y diabética llegaron a confluencia se les añadió medio (DMEM 2x con solución de diálisis al 2.5 % de glucosa (50:50)) durante una hora.

## **6.11. Inmunofluorescencia**

### **6.11.1 Principio**

La inmunofluorescencia es una reacción de tipo antígeno-anticuerpo donde los anticuerpos están marcados con una sonda fluorescente y el complejo antígeno anticuerpo se ve utilizando un microscopio de fluorescencia. Los fluorocromos son sondas que absorben rayos ultravioleta y emiten luz visible la cual se registra por un sistema de fotomultiplicadores. Al anticuerpo que va dirigido hacia la proteína de interés se le llama anticuerpo primario. El anticuerpo secundario va acoplado al fluorocromo y está dirigido hacia el anticuerpo primario.

### **6.11.2 Procedimiento**

Las células se sembraron en placas de 24 pozos ( $1 \times 10^5$  células en cubreobjetos de 3 mm previamente cubiertos con colágeno) y una vez que llegaron a confluencia, se realizaron dos lavados con PBS con  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM. Las monocapas se fijaron con metanol absoluto durante 10 min a  $-20^\circ\text{C}$  y se hidrataron durante 5 min con PBS a temperatura ambiente. Se permeabilizaron durante 30 min con PBS-Tritón X-100, al 0.2 %. Se bloquearon con albúmina sérica bovina (ASB) libre de Igs 10 mg/ml en PBS-Triton X-100 a  $4^\circ\text{C}$  durante 30 min.

Posteriormente, las células se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario diluido en PBS-Triton X-100 (anti- $\alpha$ -SMA, vimentina, Pancaderina, citoqueratina 4.62 (CK 4.62), ocludina, claudina 1 y claudina 2, SGLT-1, SGLT-2, GLUT 1 y GLUT 2) a una dilución 1:100. Los anticuerpos secundarios Alexa Fluor® 488 anti-conejo, Alexa Fluor®488 anti-cabra, Alexa



Fluor® anti-ratón, Alexa Fluor® 594 anti-conejo, Alexa Fluor® 594 anti-ratón, Alexa Fluor® 594 anti-cabra se usaron a una dilución 1:200.

La inmunofluorescencia se evaluó usando un microscopio confocal (Leica TCS SP8, Alemania). Se tomaron imágenes de 4 campos diferentes y las inmunofluorescencia se realizaron 4 veces por grupo experimental.

## **6.12 Análisis por Western blot**

### **6.12.1 Principio**

Se basa en el reconocimiento del antígeno por un anticuerpo específico sobre proteínas transferidas a membranas (Western blot) a partir de geles SDS-PAGE. En estas una mezcla compleja de proteínas se separan en un campo eléctrico, en función de su tamaño [88]

### **6.12.2 Procedimiento**

Las células se sembraron en cajas Petri de 35 mm de diámetro. Una vez alcanzada la confluencia, se retiró el medio y las células se enjuagaron con PBS frío (4° C). En seguida las células se lisaron con medio RIPA (*Radio Immuno Precipitation Assay*) con inhibidores de proteasas (Complete y PMSF). La cuantificación de las proteínas totales se realizó mediante el método de Lowry. Se utilizaron 20 µg de proteína y se les colocó solución de Laemli con urea 0.5 mM y 2-β- mercaptoetanol 25% dilución 1:5.

Las muestras se desnaturalizaron colocándolas en agua en ebullición, por 10 min. Las muestras para detectar los trasportadores de glucosa no se hirvieron. Posteriormente las muestras se cargaron en geles de acrilamida SDS-PAGE al 12%, 10% y 8%. En paralelo se colocaron los marcadores estándar de peso molecular (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y se corrieron las muestras a 90 Volts durante 2 - 3 h.

Las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham Biosci, Upsala, Sweden) con una corriente de 100 Volt durante 2h. Una vez que se transfirieron se tiñeron con rojo de Ponceau 0.1% para verificar que hubieran trasferido.

Las membranas se lavaron hasta retirar el rojo de Ponceau y se bloquearon con leche al 0.5% por 1h a temperatura ambiente y se incubaron

toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios; anti  $\alpha$ -SMA, vimentina, pan-caderina, Citoqueratina 4.62, ocludina, claudinas 1 y claudina 2 , SGLT-1, SGLT2 2, GLUT 1, GLUT 2, NRf-2, SOD-1, SOD-2, catalasa,  $\gamma$ -GCL, RAGEs y HO-1. Después se hicieron 3 lavados de 5 min con PBS+Tween 20 al 0.1% y las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (HRP-Conjugated; 1:3000).

Las membranas se revelaron con el reactivo de detección ECL™ (Amersham, UK). La densitometría de las bandas se realizó con el programa UVP Bioluminescence Imaging Systems (Cambridge, UK). Las concentraciones de las proteínas se normalizaron con  $\alpha$ -actina (1:1000)

## 6.13. Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET)

### 6.13.1. Principio

La resistencia eléctrica transepitelial (RET), es un indicador de la formación de uniones estrechas entre las células. [89]

La RET se midió empleando un voltímetro EVOM con electrodos conocido como el sistema Millicell®-ERS. Uno de los electrodos se colocó en el compartimiento apical y el otro en la basolateral (Figura 9). La RET se expresa en  $\text{ohmios} \cdot \text{cm}^2$ .

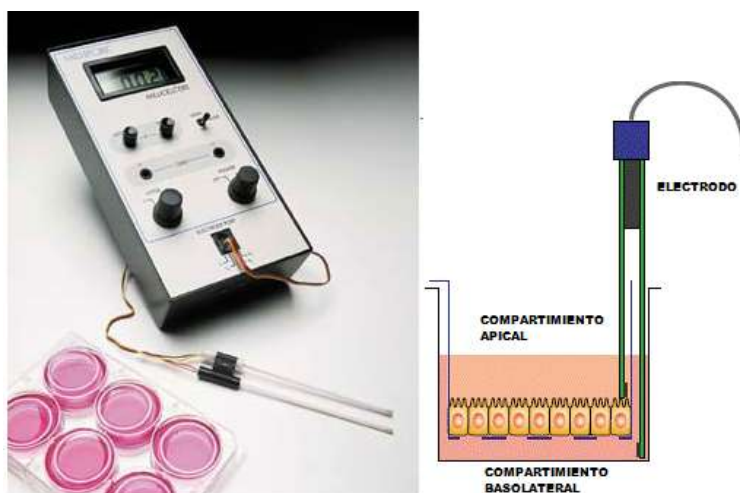


Figura 9. Representación de la medición de la RET

### **6.13.2. Procedimiento**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células/pozo en los filtros Transwell (Corning Incorporated 3496 Costal) con un poro de  $3.0 \mu\text{m}$  y un diámetro de  $6.5 \text{ mm}$ .

La RET se midió antes de sembrar a las células y una vez que las células llegaron a confluencia. La RET se calculó restando a las lecturas obtenidas el valor del filtro antes de sembrar a las células. Cada valor fue normalizado multiplicándolo por el valor del área de la membrana ( $0.33 \text{ cm}^2$ ), por ello, la RET se expresa en:  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ .

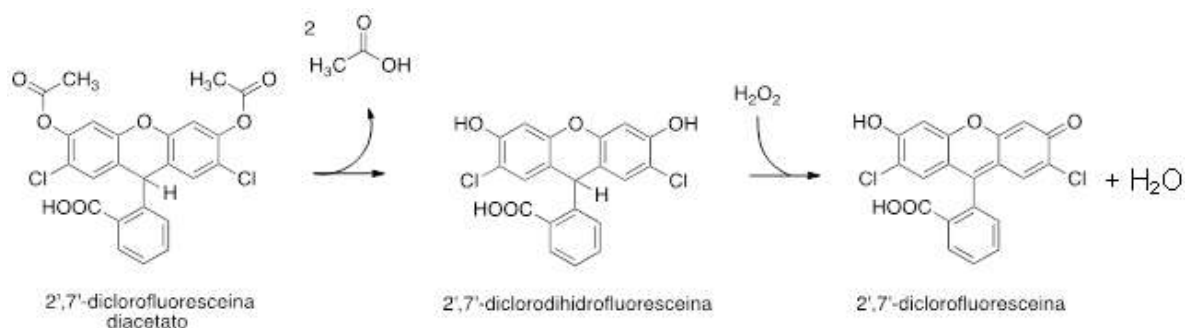
La RET de los grupos expuestos al líquido de diálisis se midió una hora después de colocar el medio con líquido de diálisis.

## **6.14. Medición de especies reactivas de oxígeno (ERO).**

### **6.14.1. Principio**

Este método se basa en la determinación de especies reactivas de oxígeno intracelulares con un compuesto lipofílico que ingresa a la célula en su forma reducida y acetilada (2',7'-diclorofluoresceína diacetato DCF-DA). Una vez en el citosol, los grupos diacetato de la DCF-DA son hidrolizados por acción de esterasas inespecíficas formando 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCHF), un compuesto polar que no sale de la célula.

La DCFH reacciona con especies oxidantes (principalmente  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}\cdot$  peroxinitritos o peroxilípidos) presentes en el ambiente formando el producto de su oxidación la 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Figura 10), que emite fluorescencia a  $530 \text{ nm}$ . El nivel de emisión de la fluorescencia de DCF tiene una relación lineal con los peróxidos presentes [\[90\]](#).



**Figura 10.** Mecanismo de reacción de la 2', 7'-diclorofluoresceina diacetato

### 6.14.2. Procedimiento

Se sembraron ( $10 \times 10^5$ ) células/pozo en placas de 96 pozos. Una vez alcanzada la confluencia, se realizaron dos lavados con PBS con  $\text{Ca}^{2+}$  1 mM. Se les agregó la solución DCHF-DA, a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  durante 20 minutos. Se incubaron a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  en la oscuridad. Concluida la incubación se obtuvieron lecturas de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 495 nm y emisión 530 en un lector de placas Infinite 200 (Tecan Group Ltd).

## 6.15 Carbonilación de proteínas

### 6.15.1. Principio

El reconocimiento de los grupos carbonilos presentes en las proteínas oxidadas, se da por la conjugación con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). La DNPH unida a la proteína oxidada, se detecta con anticuerpos específicos [78].

### 6.15.2. Procedimiento

Una vez cuantificada la muestra se tomó un volumen equivalente a 20  $\mu\text{g}$  de cada muestra y se derivatizaron para exponer los grupos carbonilos, de acuerdo a las indicaciones del proveedor (OxiBlot™ Protein Oxidativo Detection Kit S7150) (ANEXO2).

En seguida, las muestras se separaron en un gel al 12% y se corrieron a temperatura ambiente a voltaje constante (100 V), aproximadamente durante 2 h hasta 1 cm antes del borde del gel. Posteriormente, las proteínas

se transfirieron a una membrana de PVDF activada previamente durante 5 min con metanol, a un voltaje constante de 96 V durante 2 h.

La membrana se tiñó con rojo de Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas. Se lavó con PBS, se bloqueó por 1 h con la solución de bloqueo y se adicionó el Ac primario (1:150) el cual se dejó durante toda la noche. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces durante 5 min con PBS–Tween 0.05%. En seguida, la membrana se incubó con el Ac secundario (1:300) durante 2 h y se volvió a lavar 3 veces durante 5 min. Finalmente la membrana se reveló con luminol por dos minutos para posteriormente exponer por 20 min. Como control positivo se utilizó una muestra del grupo control, la cual fue tratada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.2 M).

Las muestras utilizadas se procesaron por duplicado. Una se utilizó para derivatizar con la solución de DNPH y la otra se trató con la solución control negativo de derivatización que se utilizó como control del manejo de la muestra. Esto indica si la muestra está oxidada por un manejo inadecuado o como producto de la exposición.

#### **6.16. Análisis de datos**

Los resultados se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar de la media. Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante la prueba de ANOVA de una vía con una prueba post hoc de Tukey ( $p < 0.050$ ) para la comparación entre grupos. También se utilizó la prueba de *t-student* para determinar diferencias entre dos grupos. Para el análisis se utilizó el programa GraphPad Prisma 6, California, USA.

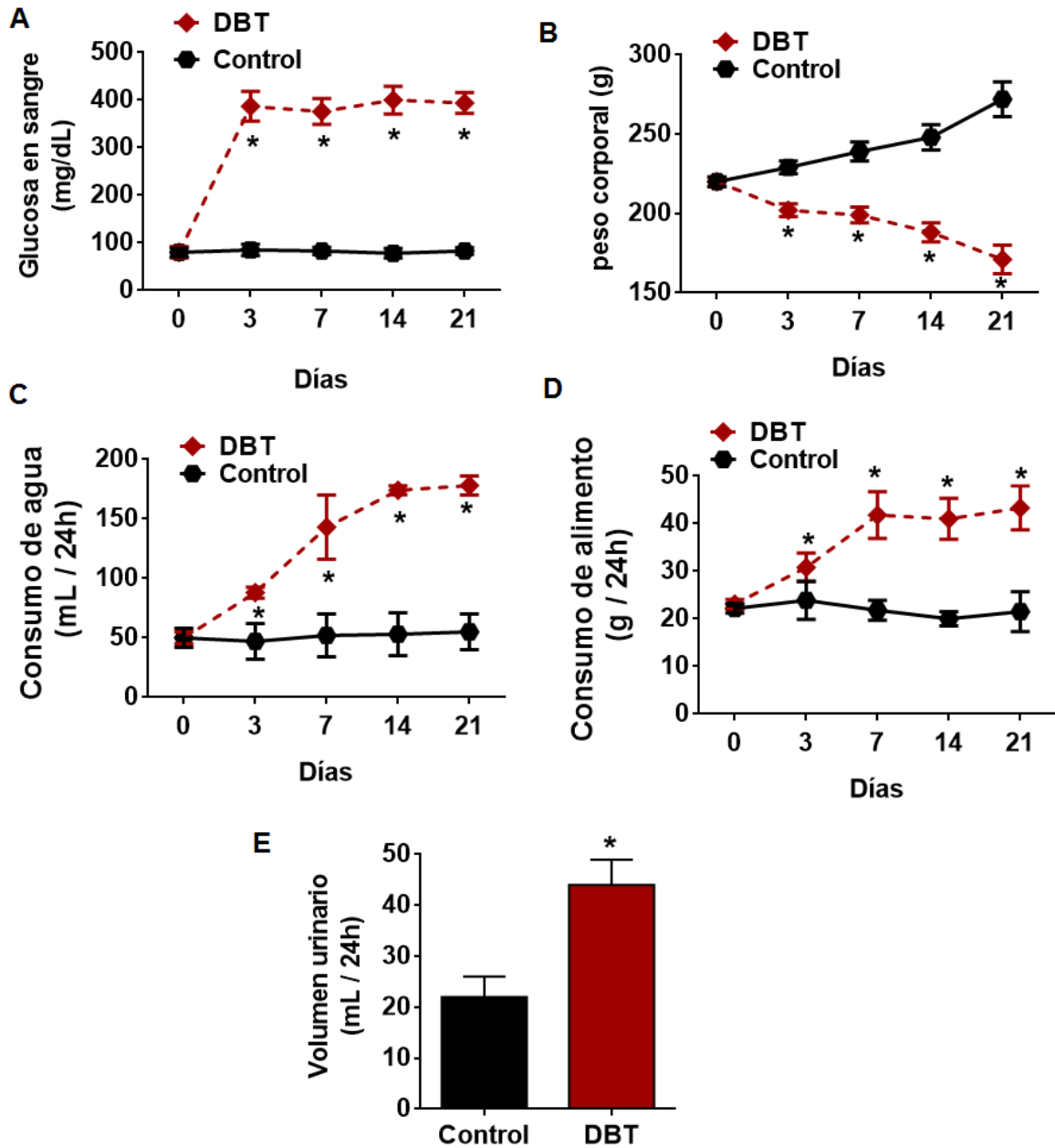
## **7. Resultados**

### **7.1. La administración de streptozotocina induce un modelo experimental de diabetes tipo 1**

Para la validación del modelo diabético se midieron los siguientes parámetros: concentración de glucosa, peso corporal, volumen urinario, consumo de agua y alimento (figura 11).

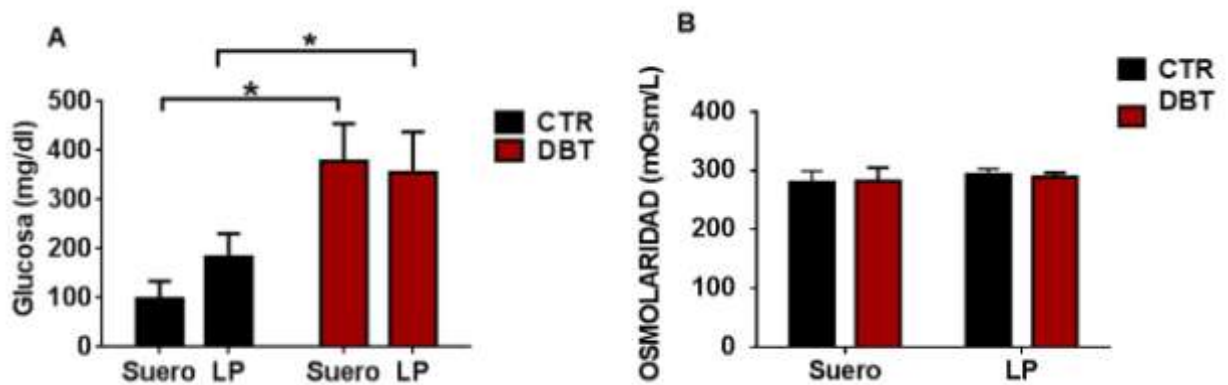
El nivel de glucosa en sangre aumentó de  $80 \pm \text{mg/dL}$  a  $385 \pm \text{mg/dL}$  a partir del tercer día y se mantuvo elevado durante los 21 días (Figura 11A). Así mismo, se observó una disminución del peso corporal en los animales administrados con SZT (Figura 11B). A pesar de la disminución del peso corporal, observamos que estos animales consumían una mayor cantidad de agua y alimento (Figura 11 C y D) y que el volumen urinario era mayor (Figura 11 E). Estos datos fueron estadísticamente significativos comparados con el grupo control.

Con base en estos parámetros, se determinó que el modelo de rata diabética inducido con STZ es adecuado ya que el grupo presenta características como: hiperglucemia (niveles de glucosa mayores a  $300 \text{ mg/dL}$ ), poliuria, polidipsia y polifagia. Estos parámetros se manifiestan en personas con diabetes y confirman además que la SZT induce diabetes experimental tipo 1 [\[91\]](#).



**Figura 11. Parametros fisiológicos del modelo diabético**, a) niveles de glucosa en sangre (mg/dL) control vs DBT (diabéticas) , b) peso corporal (g) de ratas control vs diabéticas, c) consumo de agua control vs diabéticas d) consumo de alimento control vs diabéticas e) Volumen urinario control vs diabéticas. \*Diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ )  $n=10$

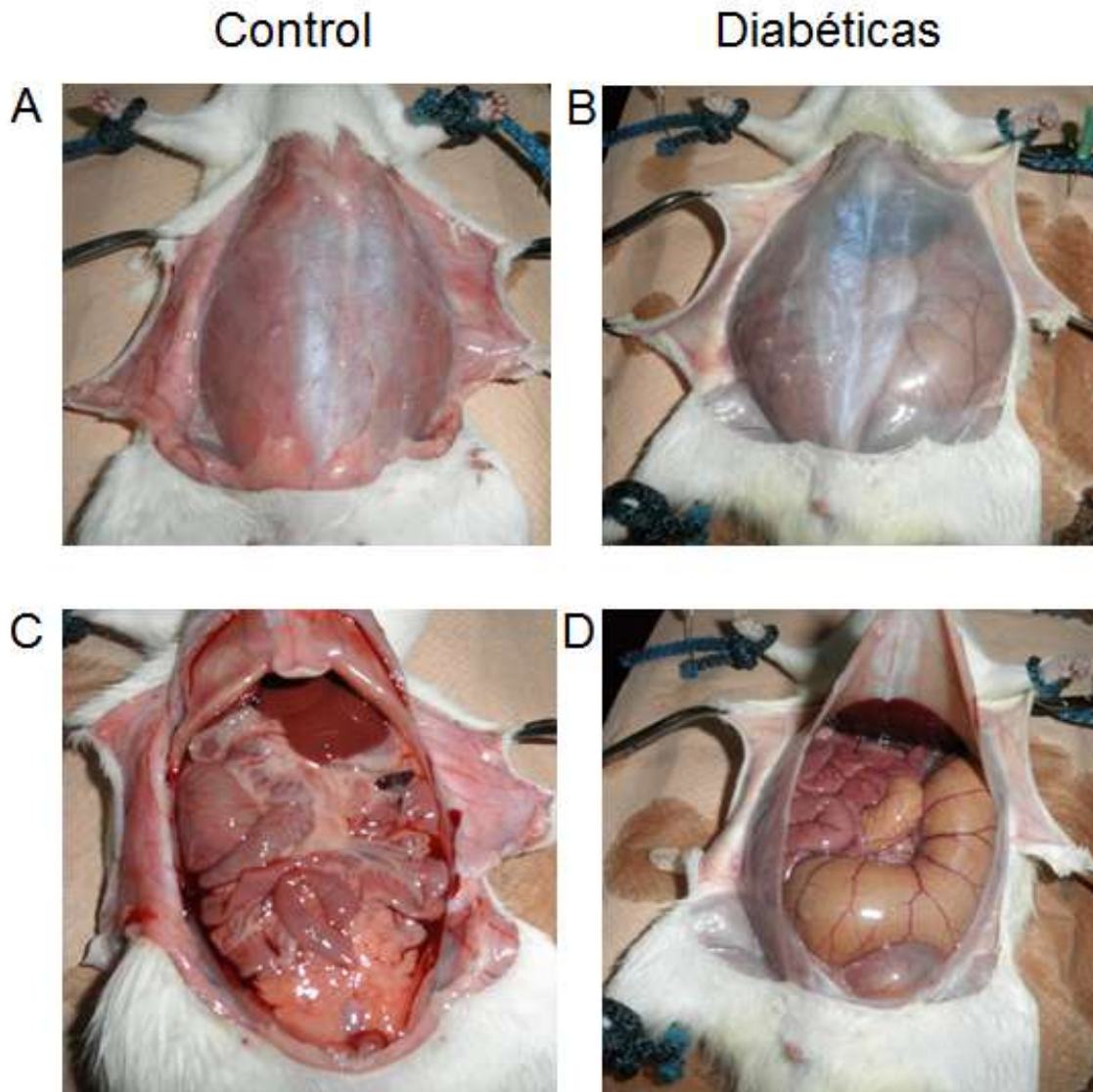
Posteriormente se midió la concentración de glucosa en el líquido peritoneal (LP) y en suero, para comprobar, que los niveles de glucosa se mantuvieran elevados en la condición diabética y que el peritoneo estuviera en contacto con altas concentraciones de glucosa a través del líquido peritoneal (Figura 12 A) se observa un incremento de glucosa en el grupo DBT en suero como en el LP. También se midió la osmolaridad (Figura 12B) No hubo cambios en la osmolaridad.



**Figura 12. Niveles de glucosa y osmolaridad en el líquido peritoneal (LP) y suero.** En la gráfica A se observa un incremento de la concentración de glucosa en el grupo BDT en suero y en LD comparado con el grupo CTR. En la gráfica B no se observan cambios en la osmolaridad. \*Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ )  $n=8$ .

Los animales diabéticos mostraron una piel erizada, distensión abdominal y diferencias morfológicas en comparación con el grupo CTR (Figura 13). Se observó reducción de la capa del músculo abdominal en ratas DBT (Figura 13B), lo que permite la visualización de los órganos abdominales a diferencia de la rata CTR (Figura 13A). Los animales control presentan órganos de un tamaño normal (Figura 13C) mientras que los animales DBT muestran distensión intestinal (Figura 13D).





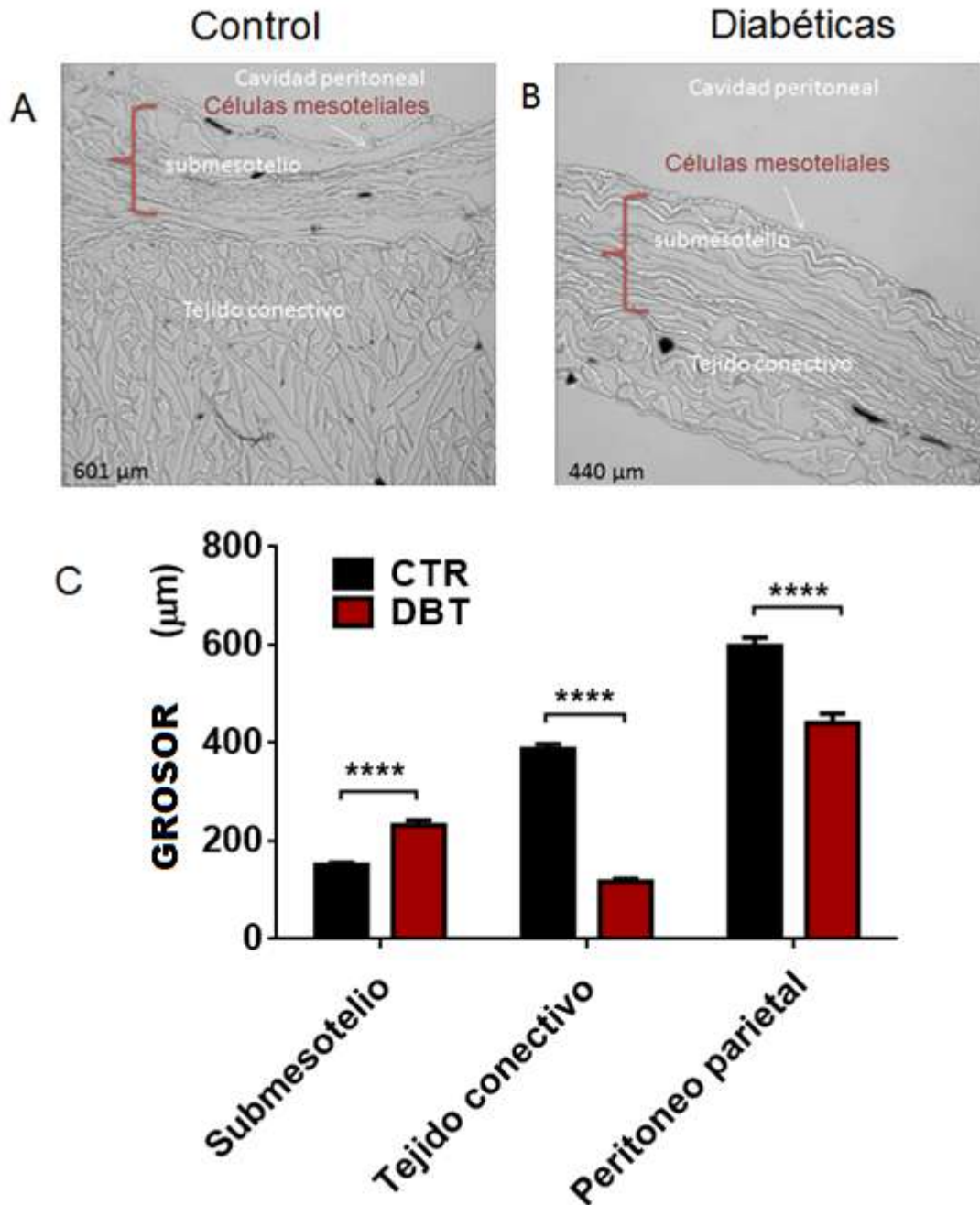
**Figura 13. Cambios morfológicos generados por la diabetes.** A) Rata control, la capa muscular se ve íntegra, B) rata diabética, se observa un adelgazamiento de la capa muscular, C) rata control, los órganos se observan de un tamaño normal, D) rata diabética, se observa distensión del intestino.

## **7.2. La diabetes genera engrosamiento del submesotelio**

Se realizaron cortes histológicos de la capa muscular y se localizaron las diferentes regiones del peritoneo parietal, para verificar que la monocapa de CM se preservara (Figura 14). El peritoneo muestra la morfología típica:

una monocapa de células mesoteliales, el submesotelio y subyacente el tejido conectivo.

En el grupo DBT la monocapa de células mesoteliales estaba presente con una reducción de tejido conectivo, en comparación con el grupo CTR (CTR  $387.43 \pm 10.82 \mu\text{m}$ , DBT  $117.03 \pm 5.31 \mu\text{m}$ ; Figura 14A y 14B, respectivamente). Además, se observó aumento del espesor submesotelial (CTR  $151.36 \pm 4.26 \mu\text{m}$ , DBT  $232.07 \pm 10.54 \mu\text{m}$ ; Figura 14A y 14B) y una reducción del peritoneo parietal, en comparación con el grupo CTR (CTR  $598 \pm 16 \mu\text{m}$ , DBT  $440 \pm 20 \mu\text{m}$ ; Figura 14A, 14B y 14C).



**Figura 14.** La diabetes induce engrosamiento del submesotelio, con adelgazamiento del tejido conectivo. A) Corte transversal del peritoneo parietal de rata CTR. Se localizan las células mesoteliales, el submesotelio y el tejido conectivo. El grosor promedio de estas capas celulares es de  $598 \pm 16 \mu\text{m}$ . B) Corte transversal del peritoneo de rata DBT. Se localizan las células mesoteliales, el

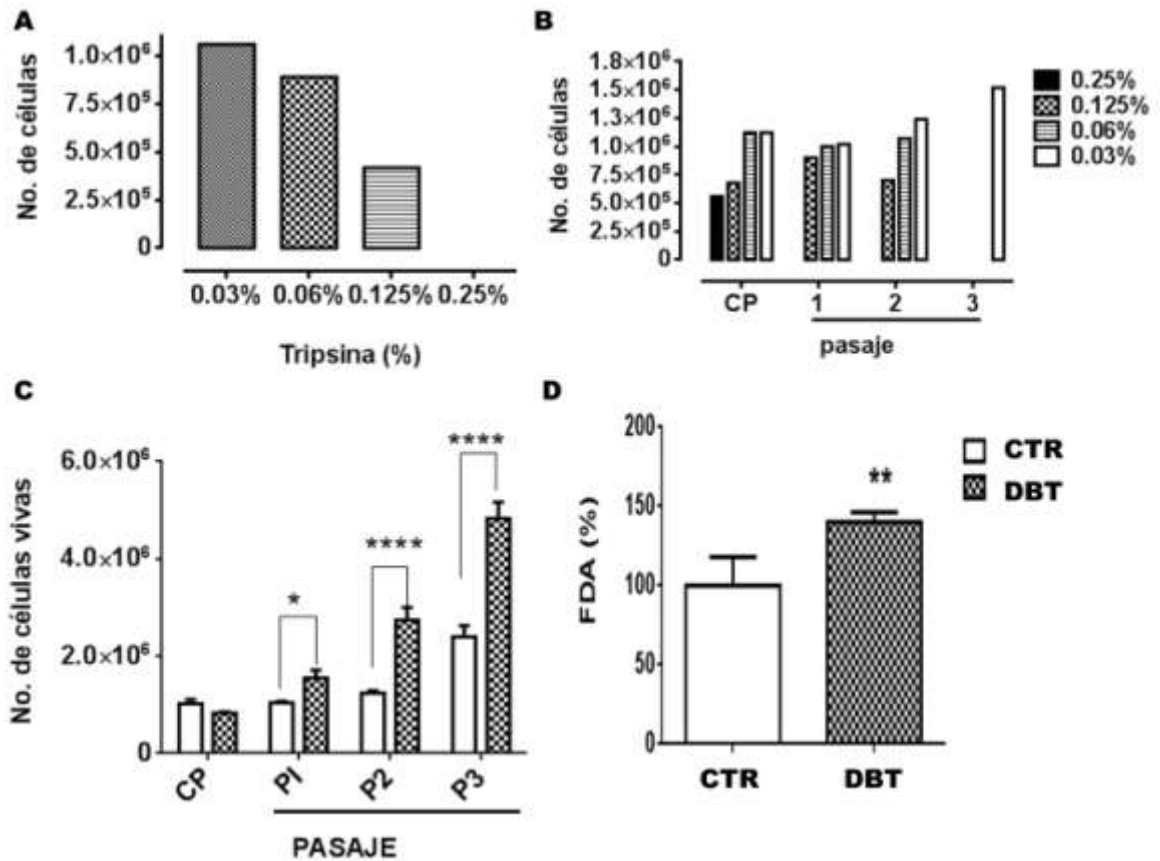
submesotelio y el tejido conectivo. Este último se encuentra reducido. El grosor de estas capas fue de  $440 \pm 20 \mu\text{m}$ . Media  $\pm$  DS \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### **7.3. Condiciones óptimas para la extracción de los cultivos primarios de rata diabética**

Para la obtención de los cultivos primarios de CM, se utilizó la metodología descrita por Young y col. (2006) [14] (0.12% de tripsina) Sin embargo observamos que los cultivos no se mantenían en condiciones óptimas y el número de células muertas era de un 80%. Por lo anterior se realizó un estudio de la concentración óptima de tripsina, con la que tendríamos un mejor rendimiento de células (Figura 15).

A menor concentración de tripsina obtuvimos un mayor número de células (Figura 15A). Se utilizaron las mismas concentraciones de tripsina durante diferentes pasajes y observamos que en pasaje 3 las únicas células que sobrevivían eran las que se trataban con la concentración más baja (Figura 15B). Los cultivos tardaron aproximadamente de 8 a 10 días en llegar a confluencia. Con la concentración de 0.03% de tripsina, las células se mantenían hasta el pasaje 3 en las condiciones DBT y CTR.

Sin embargo se observó que las células que obteníamos eran mayoritariamente de la condición DBT (Figura 15C), por lo que decidimos medir la viabilidad celular con el método de fluorescein de acetato (FDA) [92] y corroboramos que en la condición DBT había un mayor número de células en comparación con el grupo CTR (Figura 15D).

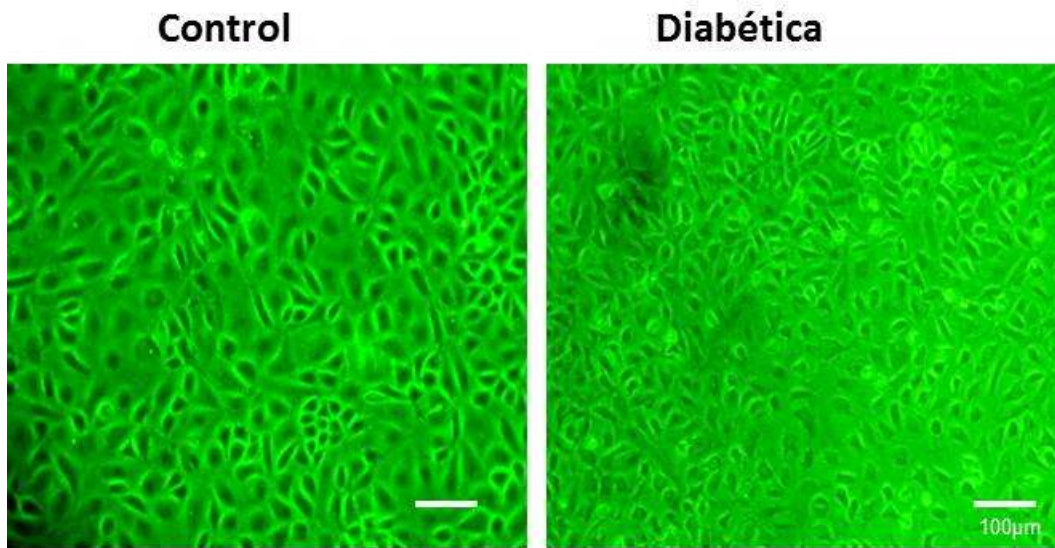


**Figura 15. Cuantificación del número de células en los cultivos primarios de CM.** A) Comparación de la proliferación celular con diferentes concentraciones de tripsina. B) Número de células, con diferentes concentraciones de tripsina y diferentes pasajes. C) Cuantificación del número de células CTR y DBT por azul de tripano en diferentes pasajes. D) Cuantificación del número de células CTR y DBT por FDA (fluoresceína diacetato). Se muestra el promedio  $\pm$  DS.  $n = 6-8$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.001$

#### 7.4. La diabetes disminuye la longitud de las microvellosidades

Con el fin de determinar si la condición diabética induce cambios morfológicos, los cultivos primarios de CMPR se observaron con dos técnicas de microscopía diferentes: a) microscopía de campo claro y b) microscopía de fuerza atómica (AFM por sus siglas en inglés Atomic Force Microscope).

Con la microscopía de campo claro observamos la morfología de los cultivos de CMPR CTR y DBT. Las células mostraron un patrón poligonal con apariencia aplanada ocasional. Ambos grupos tienen la morfología de adoquines y mostraron una monocapa uniforme (Figura 16). Con esta técnica no hubo diferencias evidentes entre las células de los animales controles y las de los animales diabéticos.



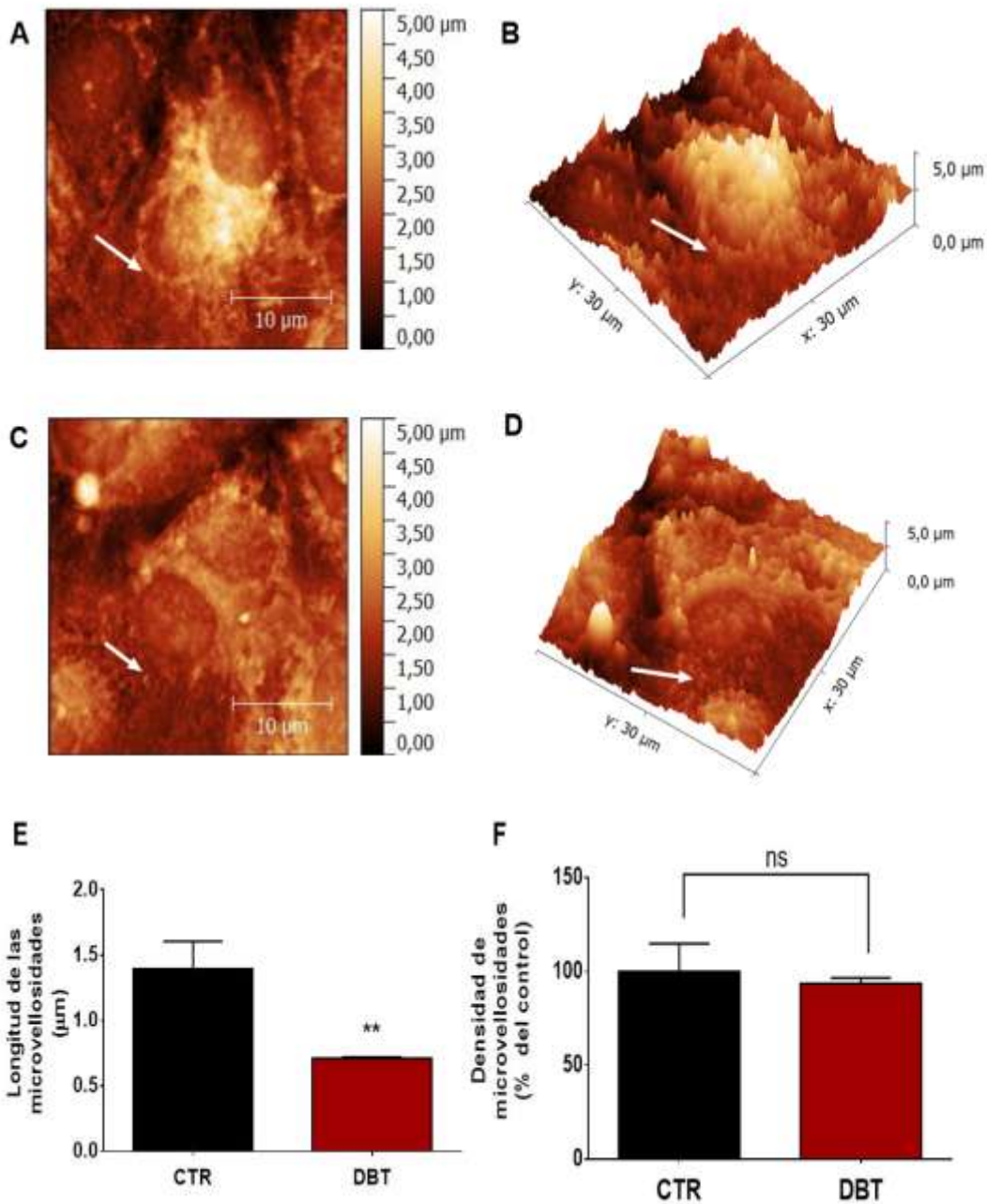
**Figura 16. Microscopia de campo claro.** La morfología de las células es en forma de empedrado, forman una monocapa uniforme y no hay diferencias aparentes entre el grupo CTR y DBT. Las imágenes se tomaron a 40X.

La AFM es una herramienta que nos permite analizar a detalle la estructura que presenta cualquier tipo de materia orgánica e inorgánica. Utilizamos esta herramienta para observar la presencia de microvellosidades

que se encuentran en la superficie de las CMPR, y estudiar si la condición diabética altera a estas estructuras (Figura 17).

En la figura 17 A y C observamos la imagen panorámica de los cultivos, junto con la escala de intensidad de resolución de la microscopía. En la imagen B y D se hizo un acercamiento de la región marcada con la flecha blanca. Se muestra la imagen tridimensional de las microvellosidades. Se midió la longitud y la densidad de las microvellosidades.

El tamaño de las microvellosidades disminuye en la condición DBT (CTR es de  $1.39 \pm 0.12 \mu\text{m}$ ; DBT  $0.71 \pm 0.05 \mu\text{m}$ ), sin embargo no hay diferencias de la densidad de las microvellosidades entre el grupo CTR y DBT, como se muestran en las gráficas de la figura 17E y F.

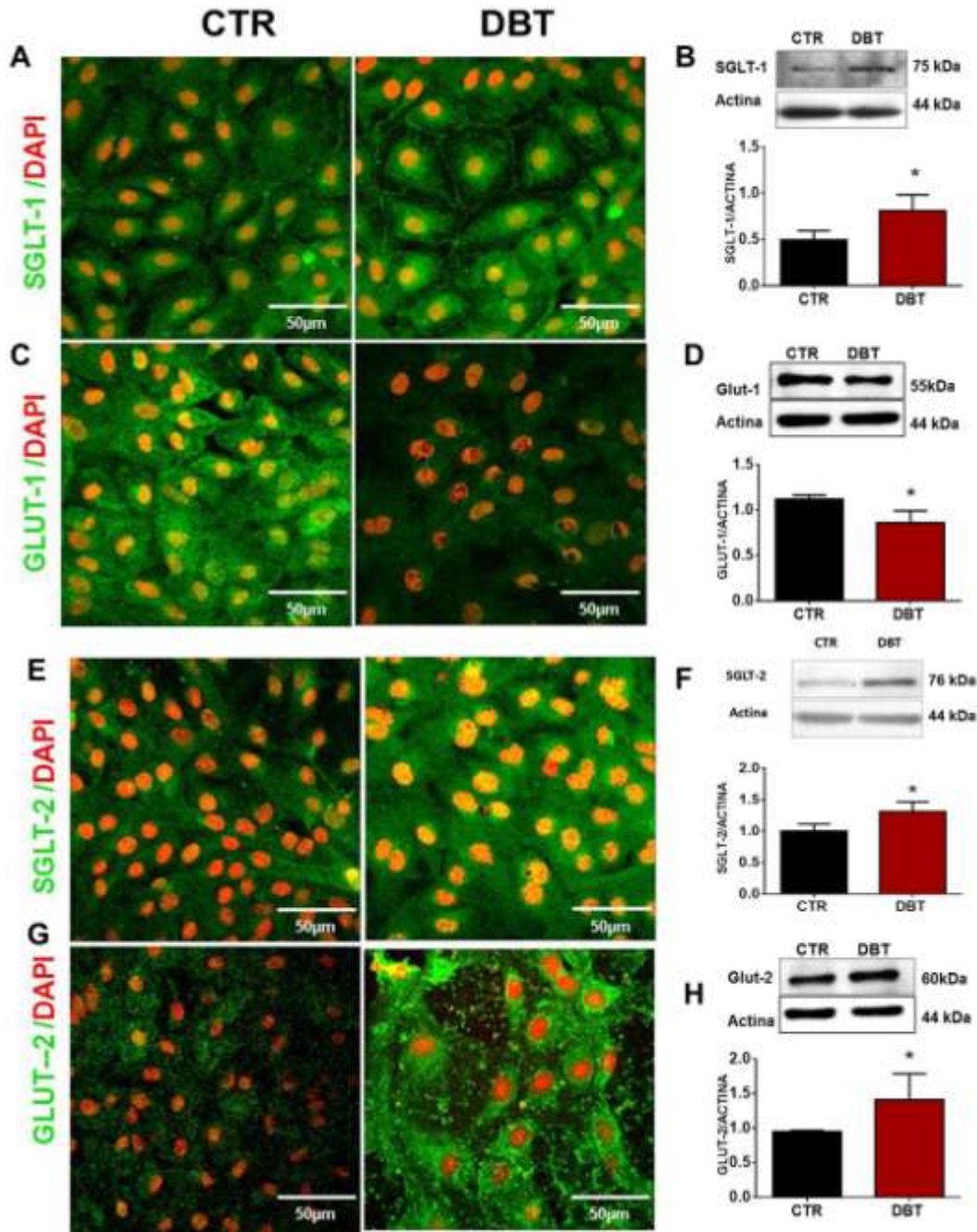


**Figura 17. La diabetes disminuye la longitud de las microvellosidades de CMPR.** A y C) Imágenes de microscopía de fuerza atómica de cultivos de CMPR, B y D) reconstrucción tridimensional de las microvellosidades. Se observan las microvellosidades en toda la superficie de las células del grupo CTR a diferencia del grupo DBT en el que se observan mayoritariamente en las regiones cercanas al núcleo (flecha blanca), E) la DBT disminuyó la longitud de las microvellosidades, sin embargo no disminuyó la densidad (F). Los valores corresponden a la media  $\pm$  DS \*\*  $p=0.005$ .



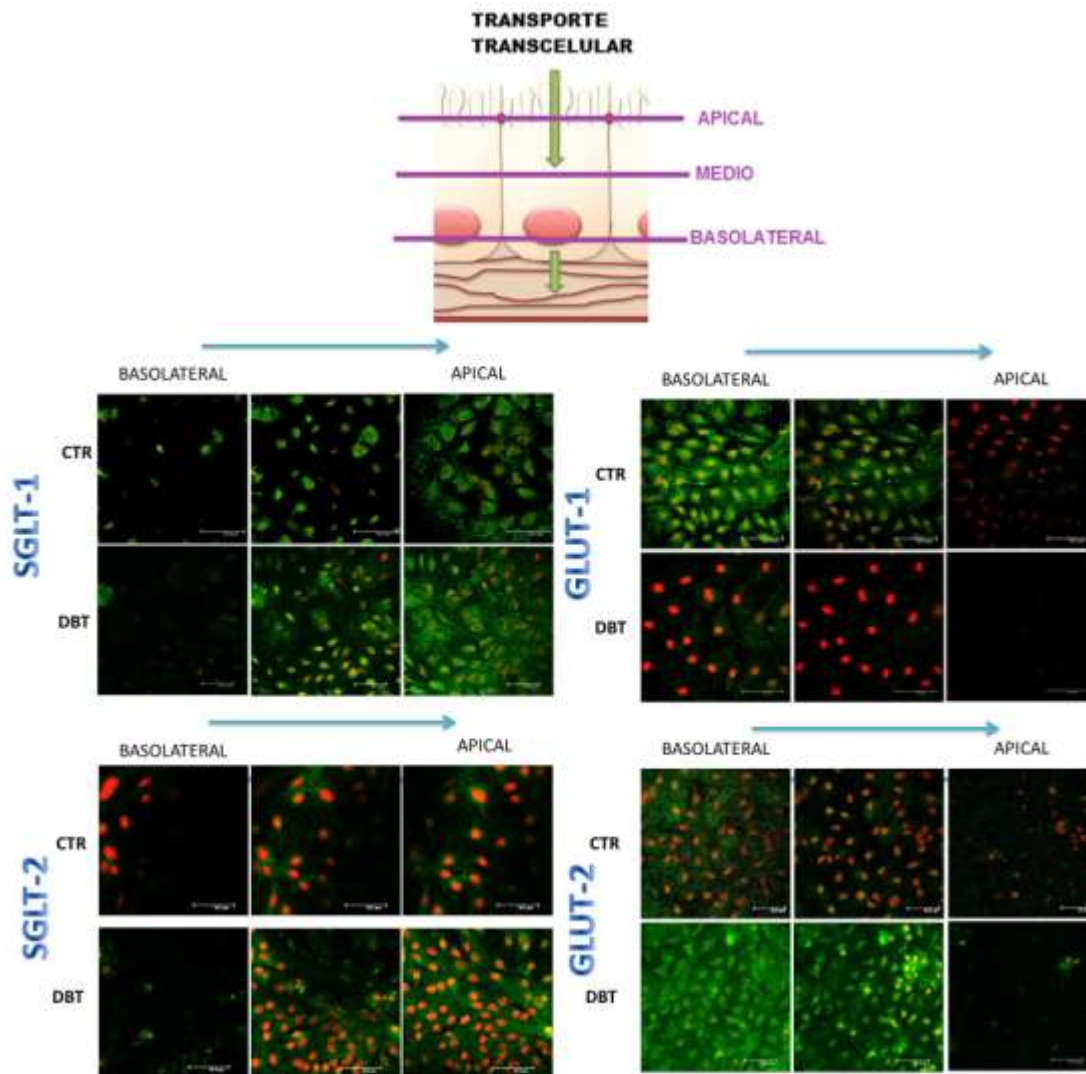
### **7.5. La diabetes induce aumento en la expresión de los transportadores de glucosa SGLT-1, SGLT-2 y GLUT-2 y disminuye la expresión de GLUT-1**

Debido a que la hiperglucemia aumenta la expresión de los transportadores de glucosa, se analizó la expresión de los transportadores SGLTs y GLUTs. Se evidenció por primera vez la presencia del transportador SGLT-2 en las CM y se observó que la condición diabética aumenta la señal en inmunofluorescencia y la expresión de SGLT-1, SGLT-2 y GLUT 2, aunado a que disminuye la expresión de GLUT-1 (Figura 18).



**Figura 18.** La Diabetes modifica de manera diferencial la expresión de los transportadores de glucosa. Se evaluó la localización de los transportadores de glucosa mediante microscopia confocal y su expresión por Western blot. La diabetes aumenta la expresión de SGLT-1, SGLT-2 y GLUT-2, y disminuye GLUT-1 (marca en verde). El análisis densitométrico de Western blot se muestra en los paneles B, D, F y H. Se utilizó a la  $\alpha$ - actina como control de carga. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra el promedio  $\pm$  DS.  $n= 4$ .  $*p<0.05$ .

La localización de los transportadores, no cambia en la condición diabética. Se obtuvieron imágenes a diferentes niveles de la célula y se evidenció que los transportadores SGLT-1 y SGLT-2, se siguen localizando en la membrana apical de las células y que los transportadores GLUT-1 y GLUT-2 se localizan en la membrana basolateral (Figura 19).

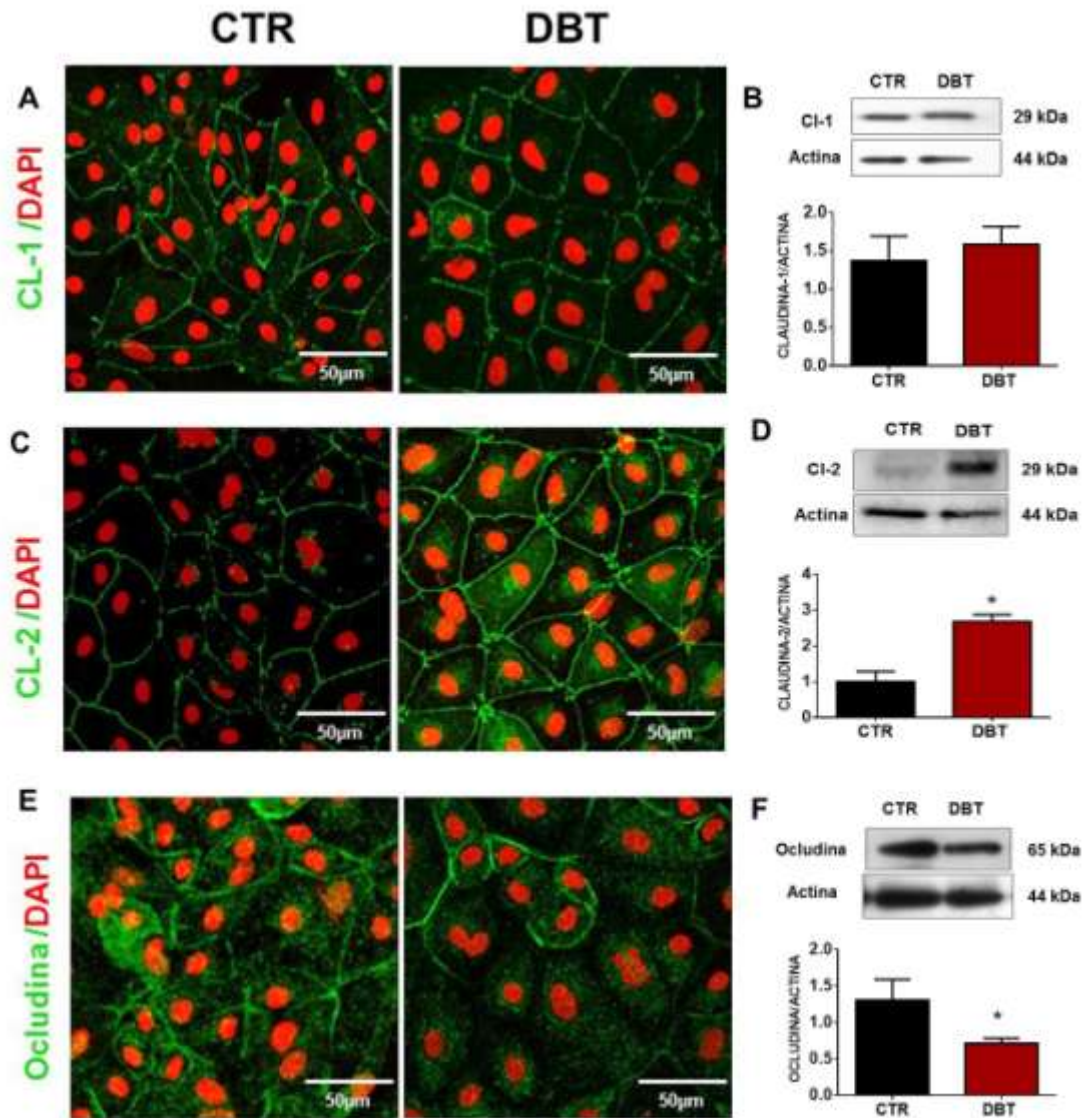


**Figura 19. La diabetes no modifica la localización de los transportadores.** Se obtuvieron imágenes a diferentes niveles de los cultivos, para localizar la ubicación de los transportadores. Las imágenes que se muestran son de la parte basal, media y apical. Los transportadores SGLT-1 y SGLT-2 se siguen localizando en la parte apical, y los transportadores GLUT-1 y GLUT-2 en la región basolateral. Escala = 50  $\mu$ m.

## **7.6. La diabetes modifica de manera diferencial a las proteínas de la unión estrecha**

Se observó la distribución de las claudinas 1 y 2, y ocludina en las CM. En la condición CTR, las claudinas 1 y 2, se observan en el borde celular, y muestran un patrón de malla de gallinero. La ocludina se localiza en el borde celular y en el citoplasma. La condición diabética no modifica la localización de las claudinas 1 y 2, pero aumenta la señal de claudina 2.

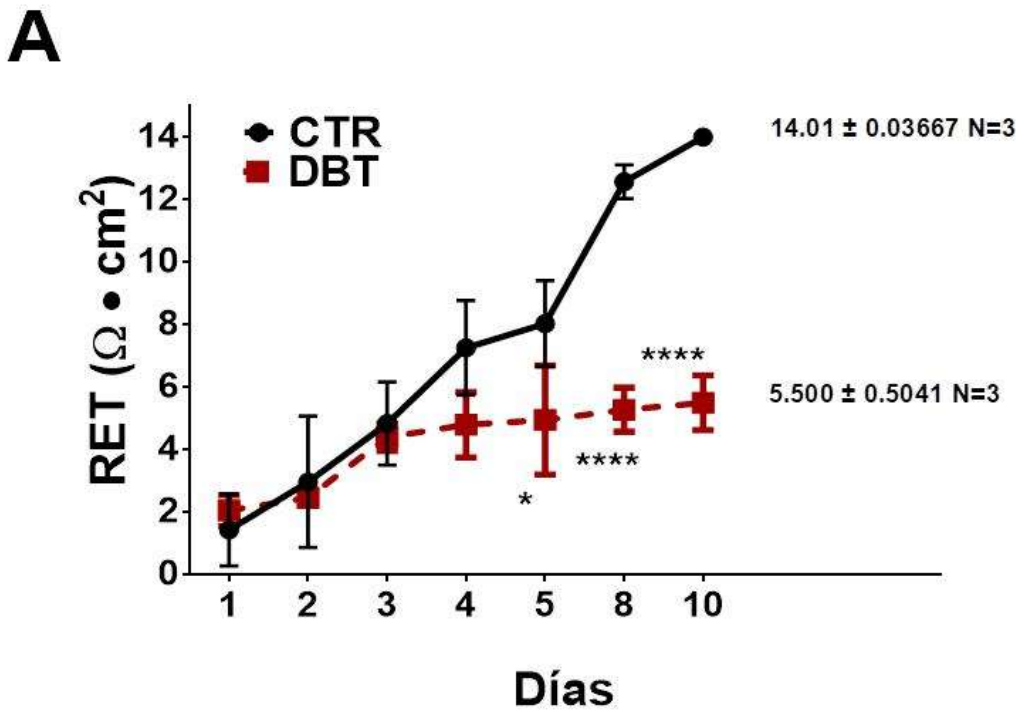
La ocludina se ve en forma discontinua en el borde celular (Figura 20A, C y E). Por Western blot se observa que incrementa la expresión de la claudina 2 en la condición diabética y disminuye la expresión de ocludina. En cuanto a la claudina 1 no hubo cambio en su expresión. (Figura 20B, D y F).



**Figura 20. La diabetes aumenta la expresión de claudina 2 y disminuye la de occludina, sin modificar la de claudina 1.** Se evaluó la localización mediante inmunofluorescencia, y la expresión mediante Western blot de las claudinas 1 y 2 y de occludina. La diabetes no indujo cambios en la localización y expresión de claudina 1. Por el contrario, la diabetes aumentó la localización en la UE (C marca en verde) y la expresión (D) de claudina 2, deslocalizando a occludina de la UE (E marca en verde) y disminuyendo su expresión. Las densitometrías de los Western blot se muestran en los paneles B, D y F. Se utilizó  $\alpha$ -actina como control de carga. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra el promedio  $\pm$  DS. n= 4. \*p<0.05.

### 7.7. La diabetes disminuye la Resistencia Eléctrica Transepitelial (RET)

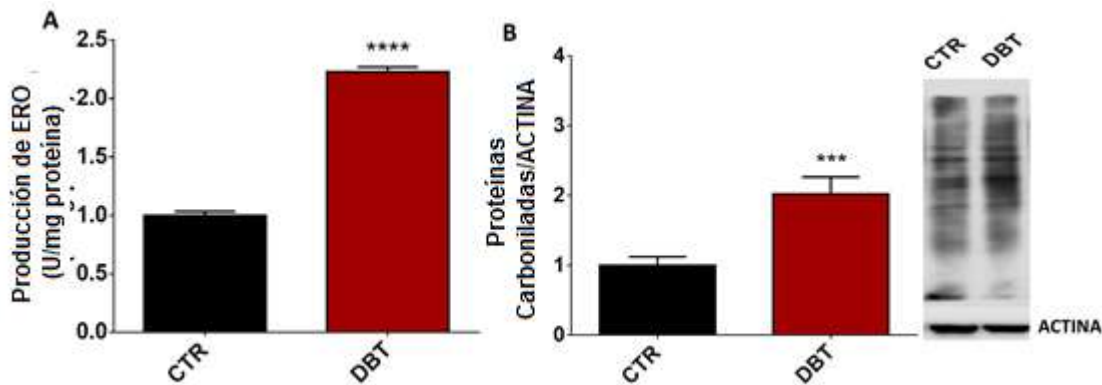
El transporte de agua y solutos a través del mesotelio durante la DP ocurre principalmente a través de la vía paracelular. Se midió la RET de las monocapas de los cultivos de las CMPR control y diabéticas (Figura 21). La RET se midió desde el día 1 hasta el día 10. Se observa que las CM de la condición DBT alcanzan una RET estable al 5to día, mientras que las CTR lo alcanzan hasta el día 10. También se observa que la resistencia de la condición DBT ( $5.5 \pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) es menor que la del grupo CTR ( $14.01 \pm 0.03667 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) desde el día 4.



**Figura 21.-Resistencia eléctrica transepitelial es menor en las células de ratas diabéticas.** La RET desde el día 4 al día 10 es menor en el grupo DBT. Los valores muestran la media  $\pm$  DS. \* $p < 0.005$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## 7.8. La diabetes induce aumento de especies reactivas de oxígeno (ERO) y carbonilación en células peritoneales en cultivo primario

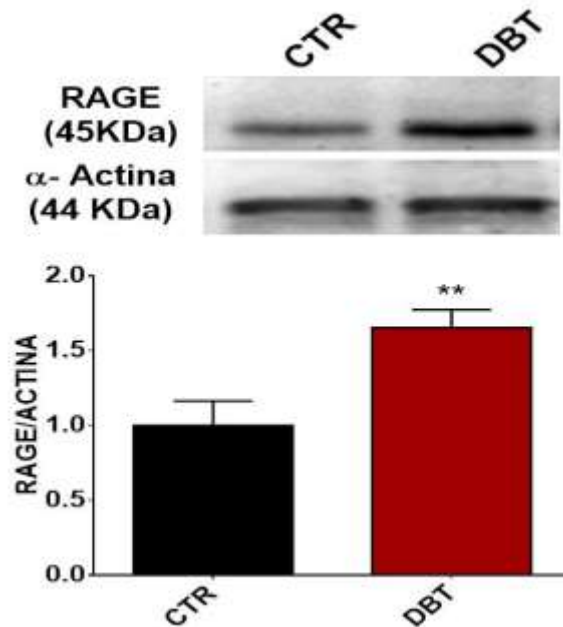
Debido a que la diabetes aumenta la producción de ERO y que las proteínas son uno de los principales blancos de éstas, se evaluó el daño oxidante a proteínas a través de la detección de la carbonilación de las proteínas. Se observó un incremento de ERO (Figura 22A) y una mayor carbonilación de proteínas en la condición diabética en comparación con el grupo control en los cultivos de CMPR (Figura 22B).



**Figura 22. La diabetes induce generación de ERO y daño a proteínas.** La producción de ERO se midió por el método de DCHF-DA en cultivos de CMPR. Los cultivos de la condición diabética mostraron un aumento en la producción de ERO (A), así como también un aumento en la carbonilación de proteínas. (B) Los análisis densitométricos de la carbonilación, se realizaron cuantificando el carril de la muestra, y se utilizó actina como control de carga. Se representa la media  $\pm$  DS de 5 experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 7.9. La condición diabética incrementa la expresión de los receptores de los productos finales de glicosilación avanzada (RAGE)

Los AGEs interactúan con el receptor de los productos finales de glicosilación avanzada (RAGE), que estimula a la NADPH oxidasa, un potente productor de ERO [8, 93]. Al evaluar la expresión de este receptor, observamos que en la condición diabética incrementa su expresión (Figura 23).



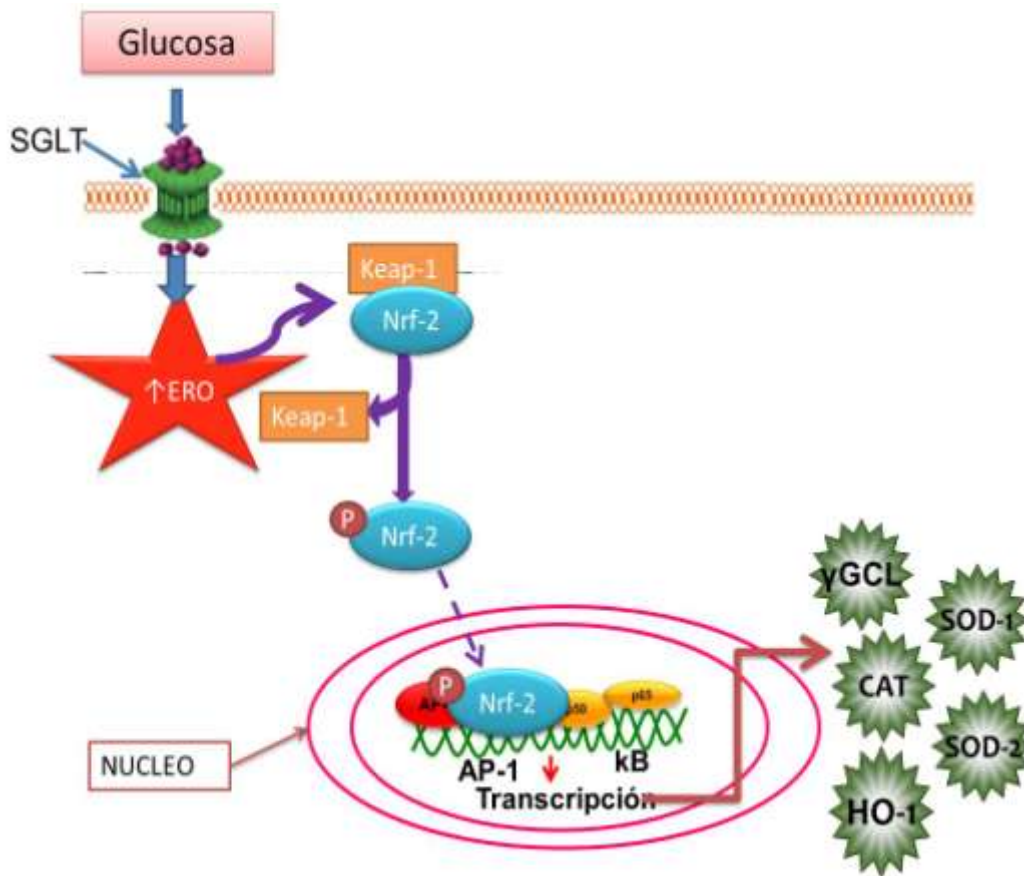
**Figura 23. La diabetes induce sobreexpresión de RAGE.** Se analizó por Western blot la expresión de los RAGE en cultivos de CMPR. La condición diabética aumenta la expresión de RAGE comparada con el grupo control. Se utilizó  $\alpha$ -actina como control de carga. Se representa la media  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$ .



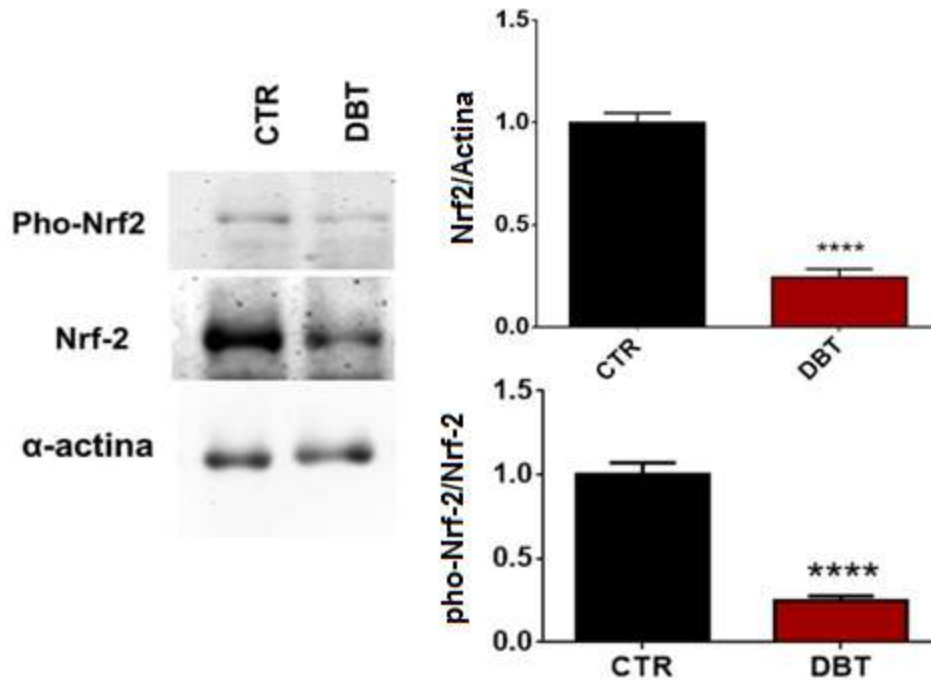
### 7.10. La diabetes disminuye la expresión del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) y modifica de manera diferencial la expresión de enzimas antioxidantes

La producción de ERO induce la activación del factor transcripcional Nrf2, regulador principal de la respuesta antioxidante. Sin estrés, la concentración de Nrf2 es baja, y la proteína se retiene en el citoplasma por la proteína inhibidora Keap-1. En respuesta al estrés oxidante, Nrf2 se fosforila (pho-Nrf2) y transloca al núcleo, regulando la transcripción de genes, cuyo promotor contiene elementos de respuesta antioxidante (Figura 24) [10-12].

En la condición diabética observamos que disminuyó la expresión de Nrf2 total y fosforilado (Figura 25).

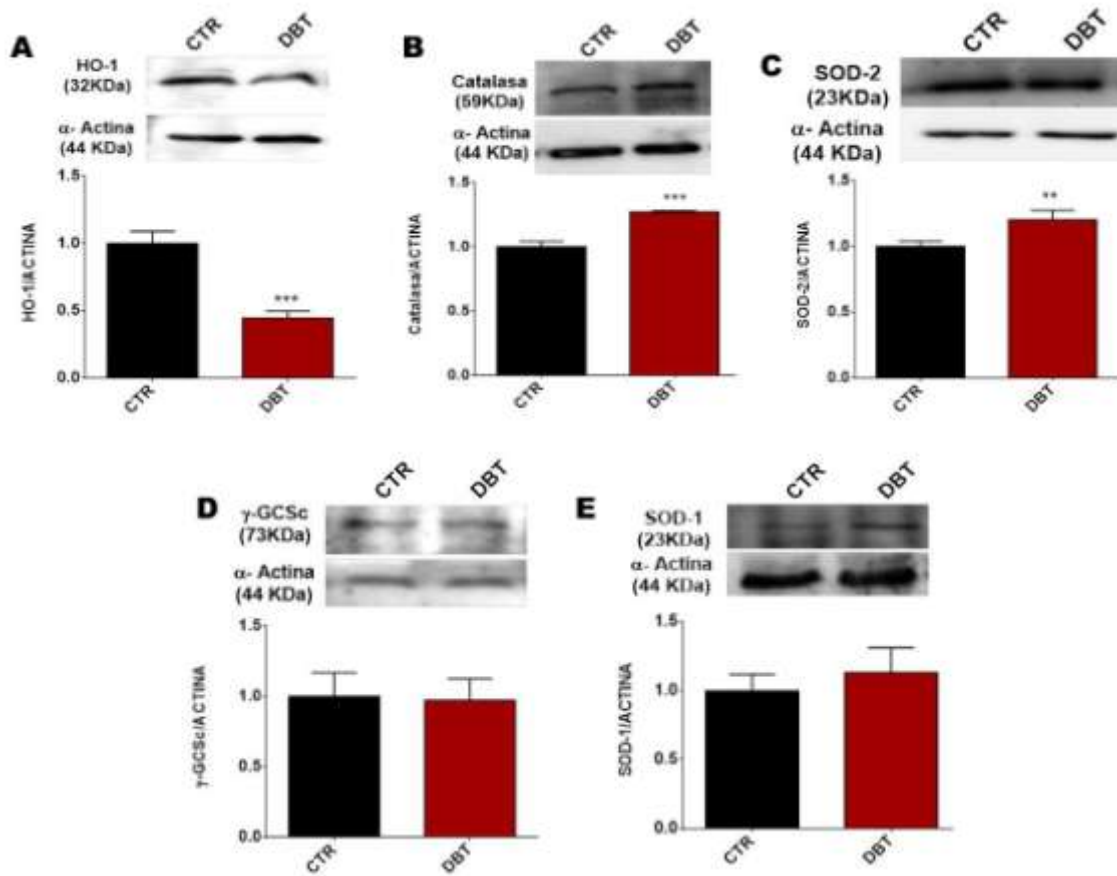


**FIGURA 24.** Vía de activación de genes involucrados en la respuesta oxidante a través de Nrf-2



**Figura 25. La diabetes disminuye la expresión de Nrf2 y Nrf-2 fosforilado.** Se analizó por Western blot la expresión de Nrf2 y pho-Nrf2 en proteínas totales de cultivos de CMPR. La condición diabética disminuye las expresiones de Nrf2 y de pho-Nrf2 en comparación con el grupo control. Se utilizó α-actina como control de carga. Se representa la media ± DS de 3 experimentos independientes. \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

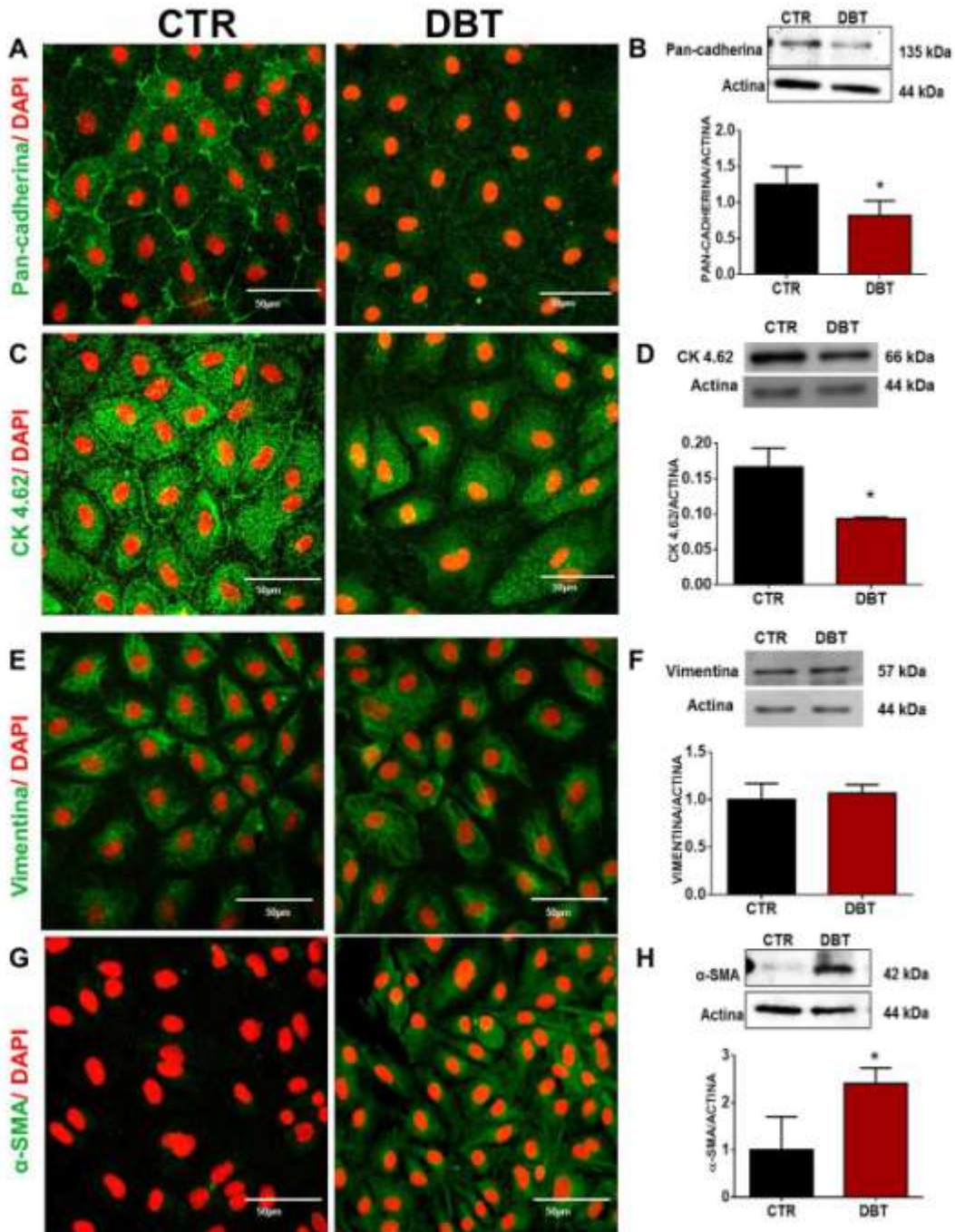
También se evaluó la expresión de enzimas antioxidantes que se generan por la activación de Nrf2. En la condición diabética disminuye la expresión de HO-1 y no cambia la expresión de γ-GCSc y SOD-1, sin embargo, aumenta la expresión de catalasa y SOD-2 (Figura 26).



**Figura 26. La diabetes modifica la expresión de las enzimas antioxidantes de manera diferencial.** Se analizó por Western blot la expresión de las enzimas antioxidantes cultivos de CMPR. La condición diabética disminuye la expresión de HO-1 (A), aumenta la expresión de catalasa y SOD-2 (B y C), no modifica la expresión de  $\gamma$ -GCSc (gama glutamil cistein sintetasa catalítica) y SOD-1 (D y E), en comparación con el grupo control. Se utilizó  $\alpha$ -actina como control de carga. Se representa la media  $\pm$  DS de 5 experimentos independientes. \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$

### **7.11. La diabetes induce la transición mesotelio mesénquima (TMM) en las células mesoteliales**

Se evaluaron las proteínas que marcan la transición de mesotelio a mesénquima (Figura 27). La condición diabética disminuyó la señal de pan cadherina y ck 4.62 (una citoqueratina específica de las CM) (Figura 27A y C). Aumentó la señal de la proteína  $\alpha$ -SMA (Figura 27G) y no afectó la expresión de vimentina (Figura 27E), probablemente debido a que las CM son predominantemente de origen mesenquimatoso y expresan vimentina en condiciones basales. Estos hallazgos se confirmaron mediante Western blot (Figura 27B, D, F y H). La disminución de los marcadores del fenotipo epitelial (CK 4.62 y cadherinas) y el aumento de  $\alpha$ -SMA sugiere que se está iniciando el proceso de TMM.



**Figura 27. La diabetes modifica la expresión de proteínas marcadoras de la TMM.** La localización de indicadores proteicos que cambian durante la TMM se evaluó mediante microscopia confocal; y su expresión por Western blot. La diabetes induce aumento de  $\alpha$ -SMA y disminución de cadherinas y ck 4.62. No hubo cambios en la expresión de vimentina (señal en verde). El análisis densitométrico se muestra

en la parte inferior de los paneles B, D, F y H. Se utilizó  $\alpha$ - actina como control de carga. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestra la media  $\pm$  DS. n= 4. \*p<0.05.

### **7.12. El líquido de diálisis disminuye la expresión de pan-cadherina, sin modificar las de vimentina, ck 4.62 y $\alpha$ -SMA, en CMPR provenientes del animal diabético**

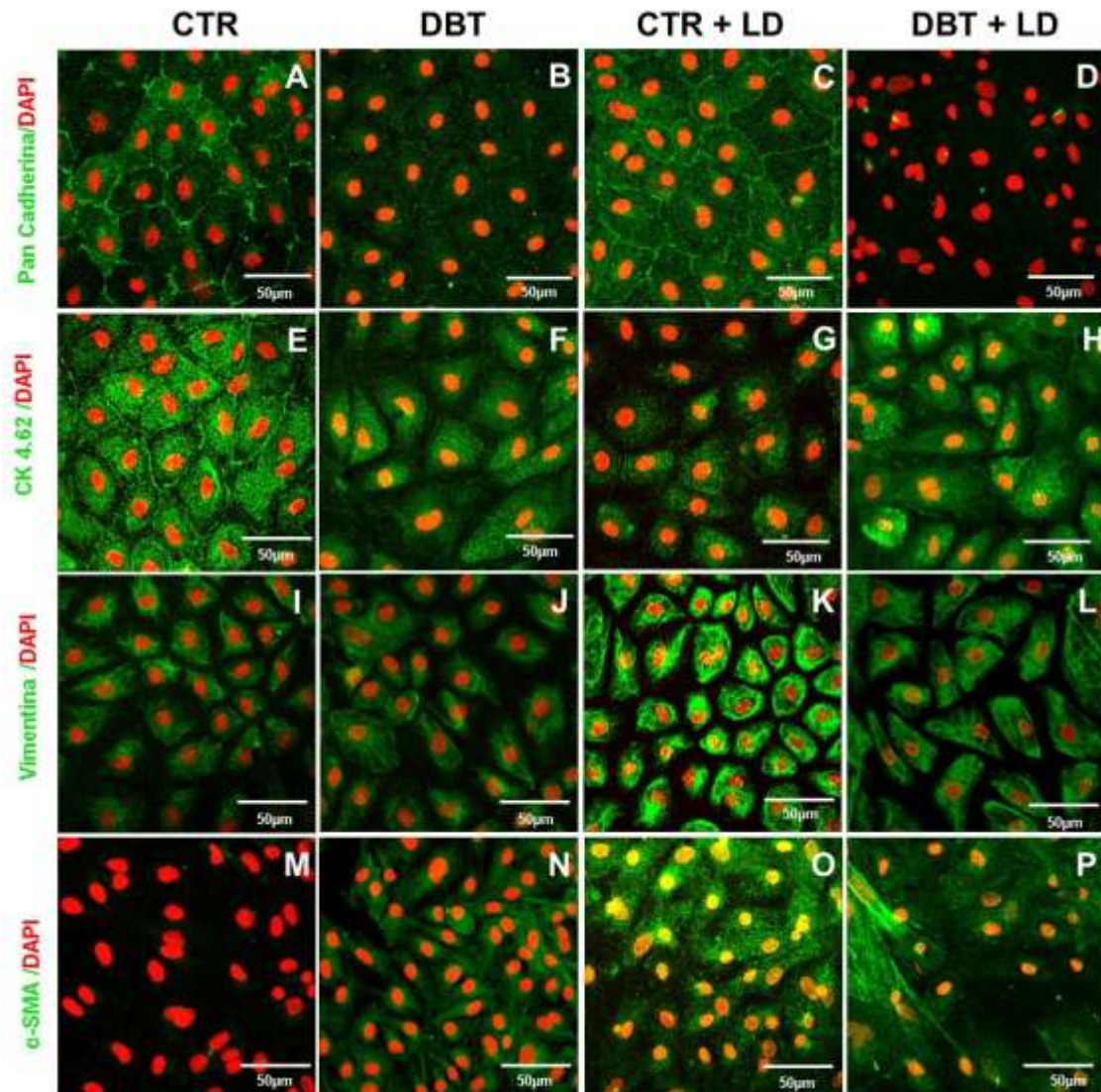
Como ya se mencionó, las altas concentraciones de glucosa contenidas en las soluciones de diálisis, alteran la morfología de las CMPH, desregulan a las proteínas de la UE e inducen el proceso de TMM, sin embargo se desconoce si estas alteraciones se incrementan en la condición diabética, en ausencia de uremia. Por ello, se expusieron CMPR provenientes de un animal diabético a una solución de diálisis (2.5% de glucosa) y se estudió si las alteraciones observadas en la condición diabética aumentaban.

Como ya habíamos observado, en la condición DBT disminuye la señal de pan-cadherina y ck 4.62 (Figura 28B y F), aumenta la señal de  $\alpha$ -SMA (Figura 28N) y no hay cambio en vimentina (Figura 28J) con respecto al grupo CTR (Figura 28A, E, I y M). En el grupo CTR + LD se observó un aumento de la señal de pan cadherina, Vimentina y  $\alpha$ -SMA, y disminución de ck 4.62 (Figura 28C, G, K y H) en comparación con el grupo CTR.

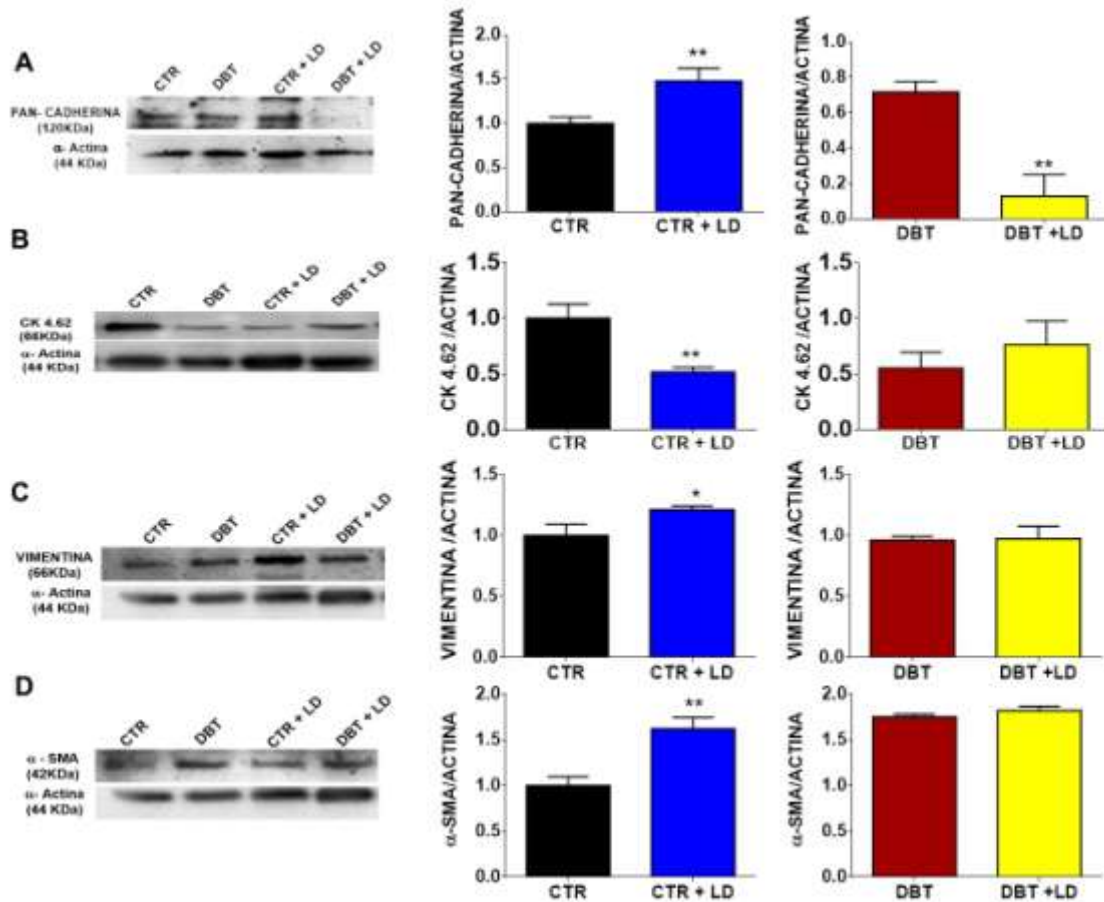
En el grupo DBT + LD disminuyó la señal de pan-cadherina, sin embargo no hubo modificaciones de la señal de ck 4.62, vimentina y  $\alpha$ -SMA en comparación con el grupo DBT (Figura 28D, H, L y P). Estos resultados se confirmaron, cuantificando la expresión de los marcadores mesoteliales, mediante western blot (Figura 29). Las gráficas de las densitometrías se separaron para observar mejor el efecto del LD.

El LD incrementa la expresión de pan-cadherina Vimentina y  $\alpha$ -SMA, y disminuye ck 4.62 (29 A, B, C y D) en el grupo CTR, lo que indica que el LD induce el proceso de TMM como en la condición diabética. Sin embargo, en el grupo DBT + LD disminuye pan-cadherina y no hay cambios en la expresión de vimentina,  $\alpha$ -SMA y ck 4.62. Lo que sugiere que las CMPR

expuestas a líquidos de diálisis persisten en la TMM iniciada en la condición diabética.



**Figura 28.** El líquido de diálisis disminuye la señal de pan-cadherina sin modificar a vimentina, ck 4.62 y  $\alpha$ -SMA en ratas diabéticas. Se observó la señal de los marcadores por inmunofluorescencia. La diabetes induce un aumento del marcador mesotelial  $\alpha$ -SMA, disminuye la señal de pan-cadherina y ck 4.62 y no modifica la señal de vimentina en comparación con el grupo CTR. Sin embargo el LD aumenta la pérdida de pan-cadherina, pero no modifica ck, vimentina y  $\alpha$ -SMA en comparación con el grupo DBT. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestran imágenes representativas del análisis de 5 cultivos diferentes por cada grupo experimental.



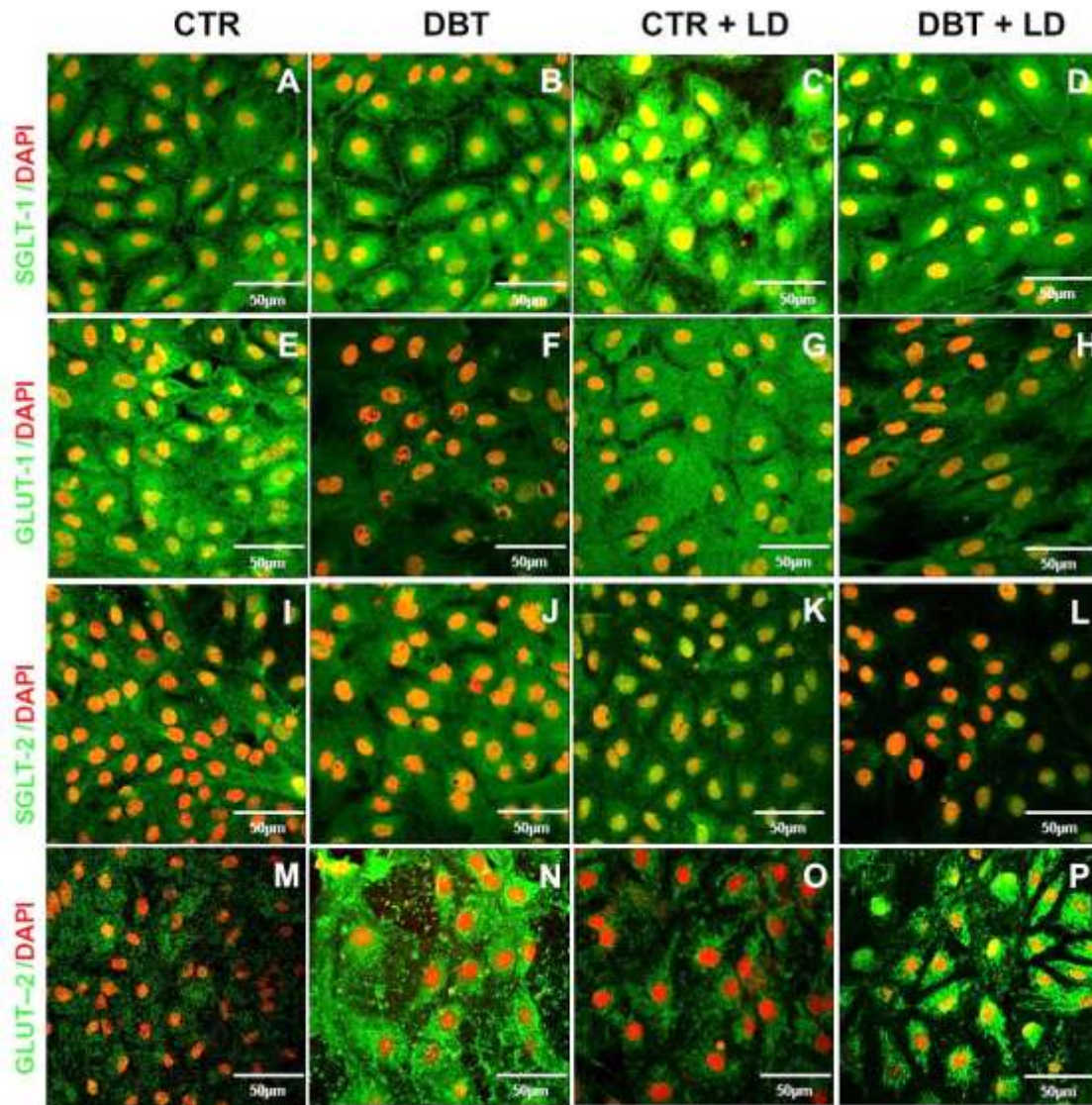
**Figura 29. El LD disminuye la expresión de pan-cadherina en la condición diabética.** Se cuantificó la expresión de los marcadores mesoteliales por Western blot, En el grupo CTR +LD aumentó la expresión de pan-cadherina (A),  $\alpha$ -SMA (D) y la expresión de vimentina (C) y disminuyó ck 4.62 (B), en comparación con el grupo CTR. En el grupo DBT + LD disminuye la expresión de pan-cadherina y no cambian los otros marcadores comparados con el grupo DBT. Los valores expresan la media  $\pm$  DS. n=3 \*p<0.005, \*\*p< 0.01,



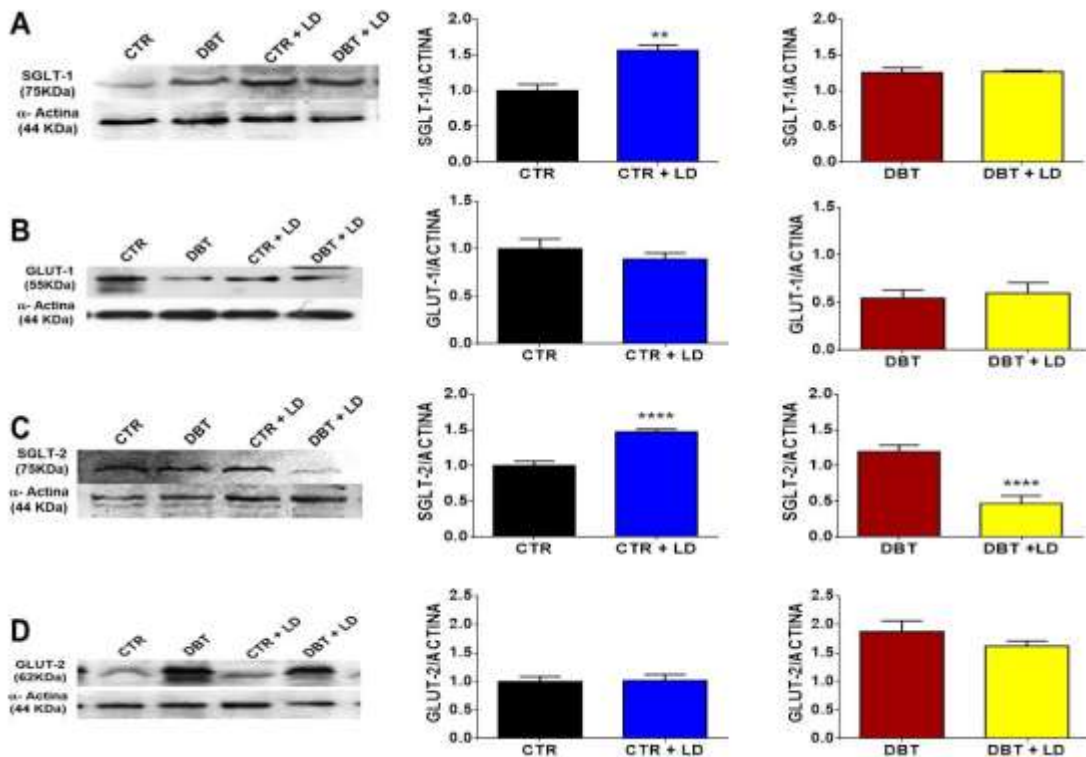
### **7.13. El líquido de diálisis disminuye la expresión de SGLT-2 y GLUT-2, sin modificar, SGLT-1 y GLUT-1 en CMPR provenientes de un animal diabético**

Se evaluó por inmunofluorescencia la señal de los transportadores de glucosa SGLT-1, SGLT-2, GLUT-1 y GLUT-2 en células que se expusieron a LD (Figura 30). En el grupo CTR +LD, aumentan las señales de SGLT-1 y SGLT-2 (Figura 30 C y K), y no se modifican las señales de GLUT-1 y GLUT-2 (Figura 30G y O) en comparación con el grupo CTR (Figura 30A, E, I y M).

En el grupo DBT + LD disminuye la señal de SGLT-2 (Figura30L) sin modificar la señal de SGLT-1, GLUT-1 y GLUT-2 (Figura 30 D, H y P) en comparación con el grupo DBT. Estos resultados se corroboraron por Western blot (Figura 31). Se ha descrito que los transportadores, que se sobreexpresan cuando hay incrementos de glucosa son SGLT-2 y GLUT-2, como se observó en la condición DBT, sin embargo estos cambios no se observaron cuando se exponen las células al LD.



**Figura 30. El LD modifica la señal de los transportadores de glucosa de manera diferencial.** Se observó por microscopia confocal la localización de los transportadores de glucosa. El grupo CTR+LD aumentó la señal de los transportadores SGLT-1 y SGLT-2, y no presentó cambios en los transportadores GLUT-1 y GLUT-2, en comparación con el grupo CTR. Para el grupo DBT+ LD disminuyó la señal de SGLT-2, pero no se observaron cambios en los otros transportadores. La señal de los transportadores, bajo condiciones normales y expuestas a LD, se observa mayoritariamente en el citoplasma. Escala = 50  $\mu\text{m}$ . Se muestran imágenes representativas del análisis de 5 cultivos diferentes por cada grupo experimental.



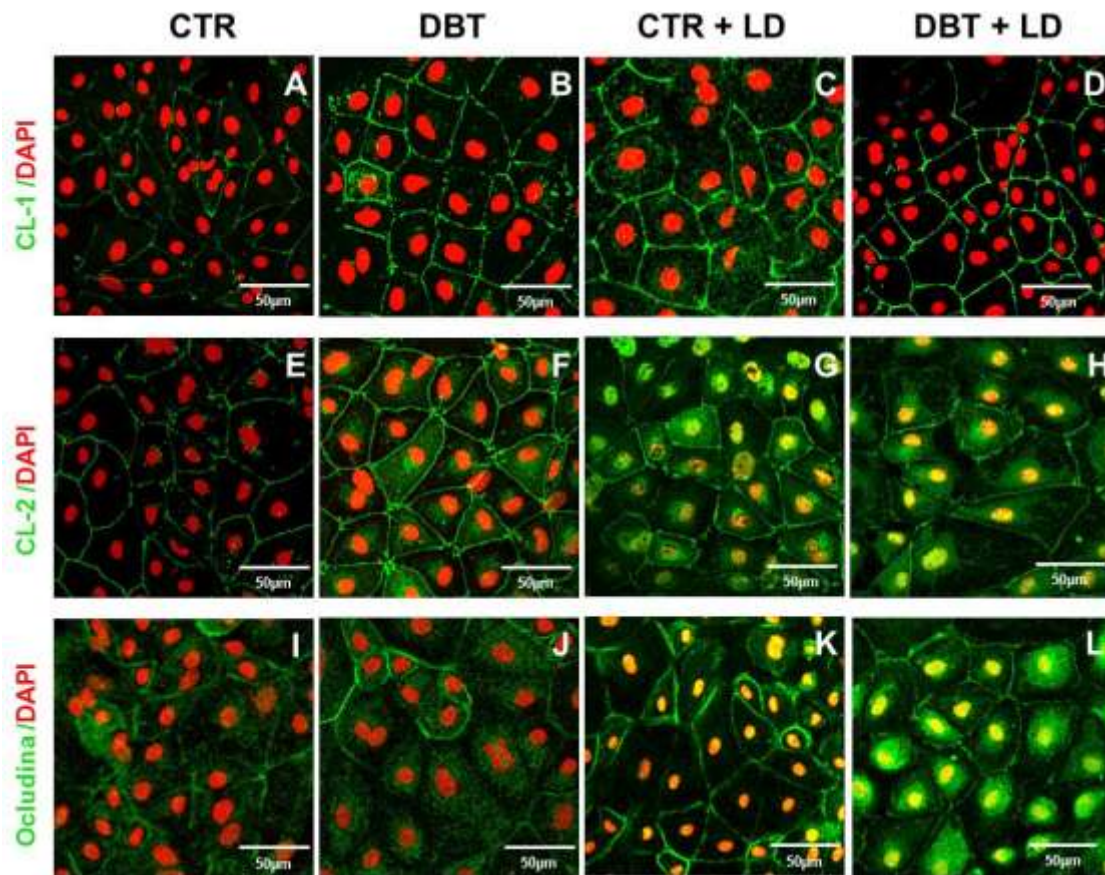
**Figura 31. El LD disminuye la expresión de SGLT-2 en la condición diabética.** Se cuantificó la expresión de los transportadores de glucosa durante el efecto del LD. En el grupo CTR se incrementa la expresión de SGLT-1 y SGLT-2 sin modificar la expresión de GLUT-1 y GLUT-2. En el grupo DBT + LD sólo disminuye la expresión de SGLT-2 y no cambia la de los otros transportadores en comparación con el grupo DBT. Los valores son la media  $\pm$  DS. \* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

#### 7.14. El LD modifica de manera diferencial la señal y la distribución de claudina 1, claudina 2 y ocludina

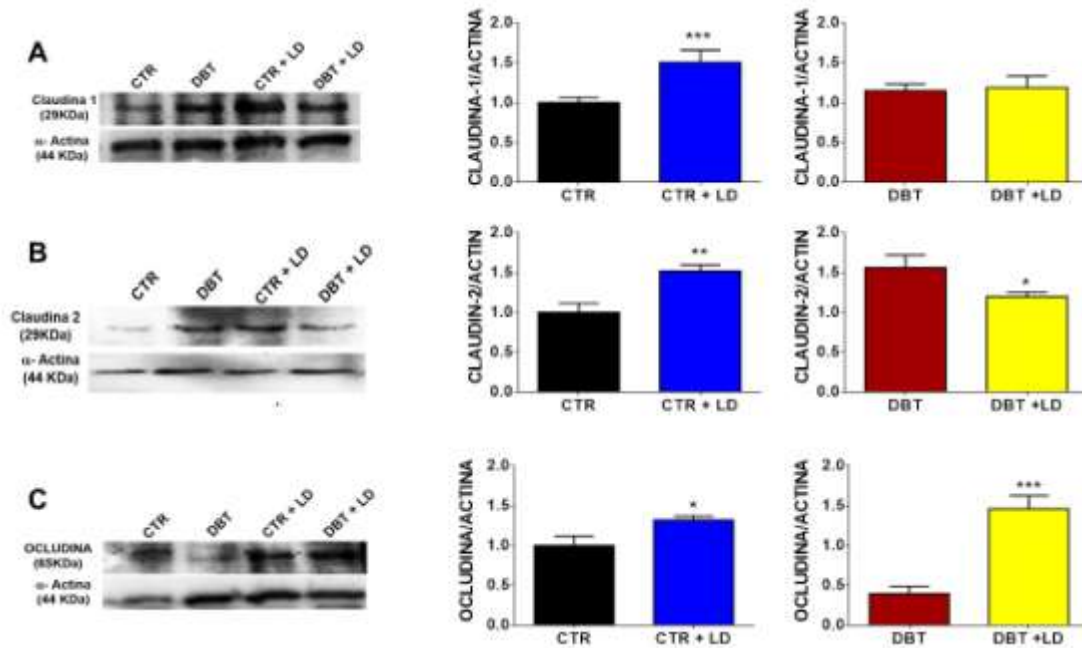
Se determinó por inmunofluorescencia, la localización de las proteínas de la UE. En el grupo CTR + LD incrementaron las señales de claudina 1 (Figura 32 C), claudina 2 (Figura 32G) y ocludina (Figura 32 K). Su localización se mantuvo en el borde celular mostrando el patrón típico de malla de gallinero. También se observó señal en el citoplasma (Figura 32 A, E, I). En el grupo DBT + LD, la señal de claudina 2 en el borde celular se ve

discontinua (Figura 32 H). La señal de ocludina incrementa en el borde celular (Figura 32 L) y la señal de claudina 1 se encuentra en el borde celular (Figura 32 D). Comparando con el grupo DBT (Figura 32 B, F y J).

Estos resultados se corroboraron por Western blot. El LD en el grupo CTR, incrementó la expresión de claudina 1, claudina 2 y ocludina. Sin embargo en el grupo DBT+LD disminuyó la expresión de claudina 2, aumentó la expresión de ocludina y no se modificó la expresión de claudina 1 en comparación con el grupo DBT (Figura 33).



**Figura 32. El LD disminuye la señal de claudina 2 y aumenta la de ocludina en la condición diabética.** Se observó por microscopía confocal la localización de las proteínas de la UE. En el grupo CTR+LD aumentó la señal de claudina 1 y 2, y ocludina, en comparación con el grupo CTR. En el grupo DBT+LD disminuyó la señal de claudina 2 y aumentó la señal de ocludina. No hubo cambios en claudina 1. Escala = 50  $\mu$ m. Se muestran imágenes representativas del análisis de 5 cultivos diferentes por cada grupo experimental.



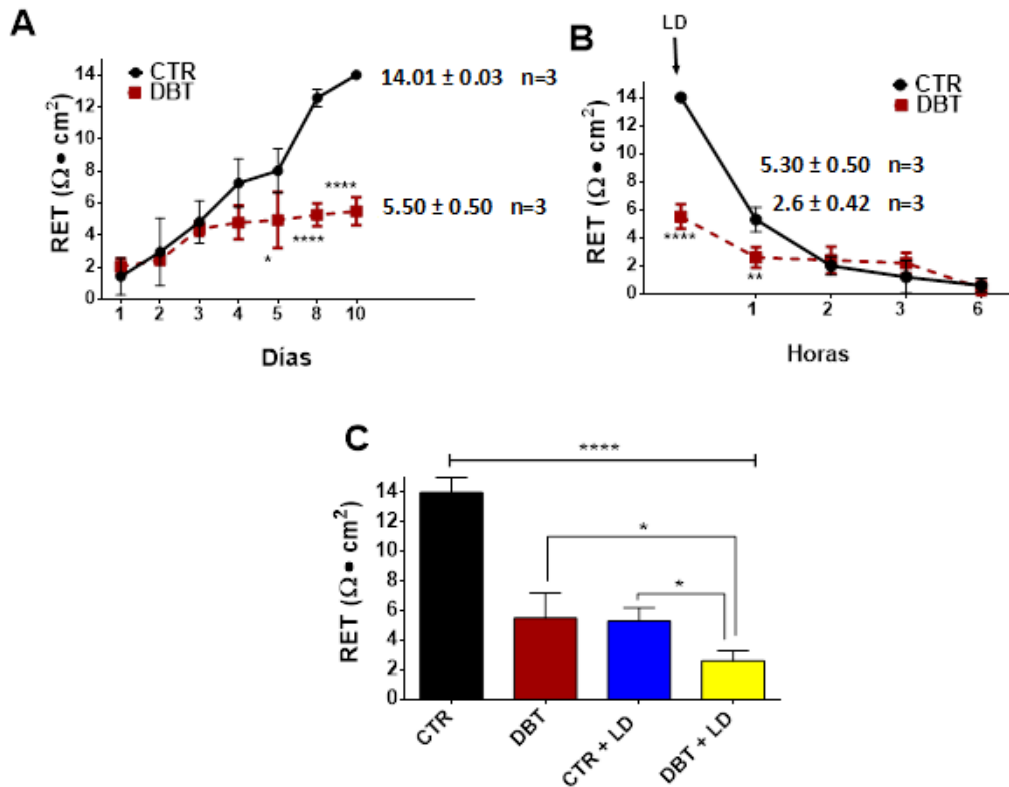
**Figura 33. El LD disminuye la expresión de claudina-2 e incrementa ocludina en la condición diabética.** Se cuantificó la expresión de las proteínas de la UE. El LD en el grupo CTR incrementa la expresión de claudina1, claudina 2 y ocludina comparado con el grupo CTR. Sin embargo, en el grupo DBT + LD disminuye la expresión de claudina 2 e incrementa ocludina en comparación con el grupo DBT. Los valores son la media  $\pm$  DS. \* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 7.15. El LD disminuye la resistencia eléctrica transepitelial (RET)

El transporte de agua y solutos a través del mesotelio durante la DP ocurre principalmente a través de la vía paracelular. Se midió la RET de las monocapas de los cultivos de las CMPR control, diabéticas y expuestas a LD (Figura 34). La RET se midió desde el día 1 hasta el día 10 entre el grupo CTR y DBT (Figura 34 A). Se observa que las CM de la condición DBT alcanzan una TER estable antes que las CTR (día 5) y se mantienen hasta el día 10, que es cuando las células CTR alcanzan la máxima TER.

También se observa que la resistencia de la condición DBT ( $5.5 \pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) es menor que la del grupo CTR ( $14.01 \pm 0.03 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) desde el día 3. Cuando los cultivos se exponen al LD observamos que la resistencia

disminuye desde la primer hora tanto en el grupo CTR como en el grupo DBT (CTR + LD  $5.3 \pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ; DBT + LD  $2.06 \pm 0.42 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) y la RET desaparece a las 6 horas de exposición (Figura 34 B). En la Figura 34 C se muestran las RET de los 4 grupos al día 10 y después de 1 hora de exposición al LD.



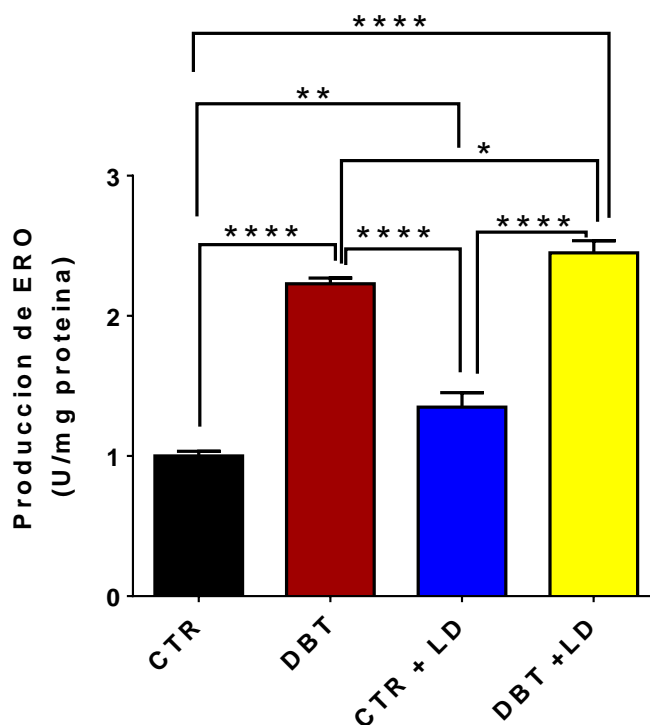
**Figura 34. La diabetes y el LD disminuyen la RET de cultivos de CMPR.** A) La RET desde el día 4 al día 10 es menor en el grupo DBT. B) La resistencia cae cuando se expone a LD en el grupo CTR y DBT. C) RET al día 10 y después de 1 hora de exposición a LD. Los valores son la media  $\pm$  DS. \* $p < 0.005$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

### 7.16. La exposición al LD incrementa el daño oxidante en la condición DBT

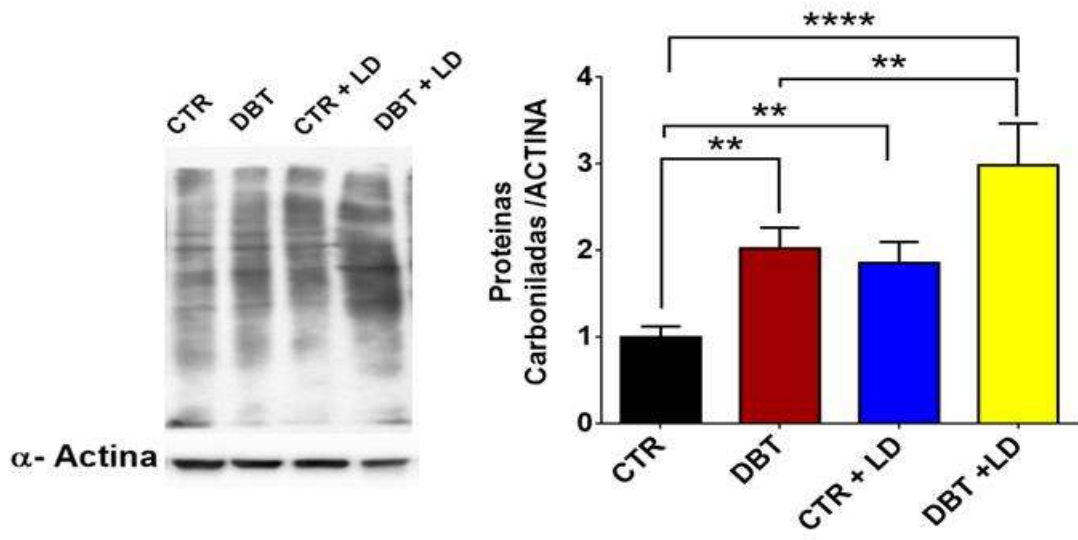
La condición diabética incrementa la producción de ERO y la carbonilación de proteínas. Cuando los cultivos se exponen al LD incrementa

la producción de ERO en los grupos CTR + LD y DBT + LD, en comparación con el grupo CTR, siendo mayor el incremento en el grupo DBT+ LD (Figura 35).

Este incremento en la producción de ERO en los grupos expuestos a LD es equiparable con el incremento de daño a proteínas que se observa en la carbonilación en los grupos CTR+LD y DBT+LD (Figura 36).



**Figura 35. El LD incrementa la producción de ERO en la condición DBT.** En la gráfica se muestran los niveles de ERO generados por la condición DBT y se observa una mayor producción de ERO cuando los cultivos se exponen al LD. Se representan la media  $\pm$  DS de 5 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

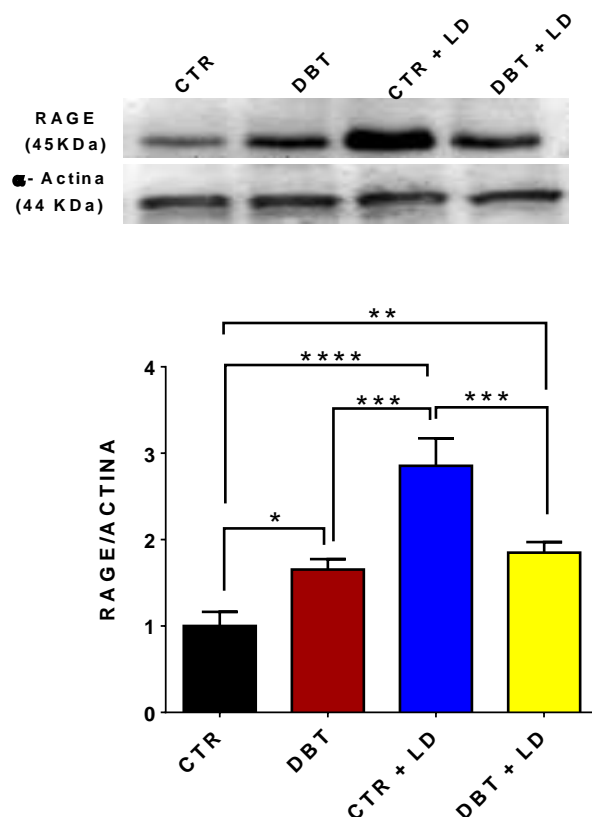


**Figura 36. El LD genera mayor carbonilación de proteínas en la condición DBT.** En la gráfica se muestra el nivel de carbonilación de proteínas normalizado con  $\alpha$ -actina en donde se observa un incremento con la exposición al LD. Se representan la media  $\pm$  DS de 5 experimentos independientes. \*\* $p < 0.01$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



### 7.17. El LD mantiene la expresión de los receptores de los productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) en la condición diabética

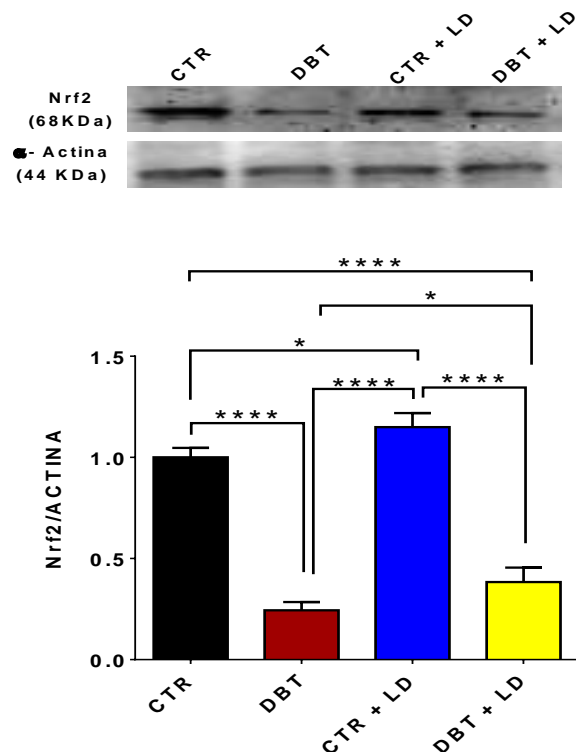
En la condición diabética hay una sobreexpresión de RAGE en comparación con el grupo CTR. Al agregar el LD se observa que la expresión de RAGE es similar a la condición diabética (Figura 37).



**Figura 37. El LD no modifica la expresión de los RAGE en la condición diabética.** En la gráfica se muestra el nivel de expresión de los RAGE. En los grupos CTR +LD y DBT +LD incrementó la expresión de RAGE en comparación con el grupo CTR. No hay incremento de la expresión de RAGE en el grupo DBT + LD en comparación con el grupo DBT. Se utilizó  $\alpha$ -actina como control de carga. Se representa la media  $\pm$  DS de 5 experimentos independientes. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  y \*\*\*\* $p<0.0001$

### 7.18. El líquido de diálisis aumenta la expresión del factor de transcripción nuclear eritroide 2 (Nrf2) en la condición diabética y disminuye la respuesta antioxidante

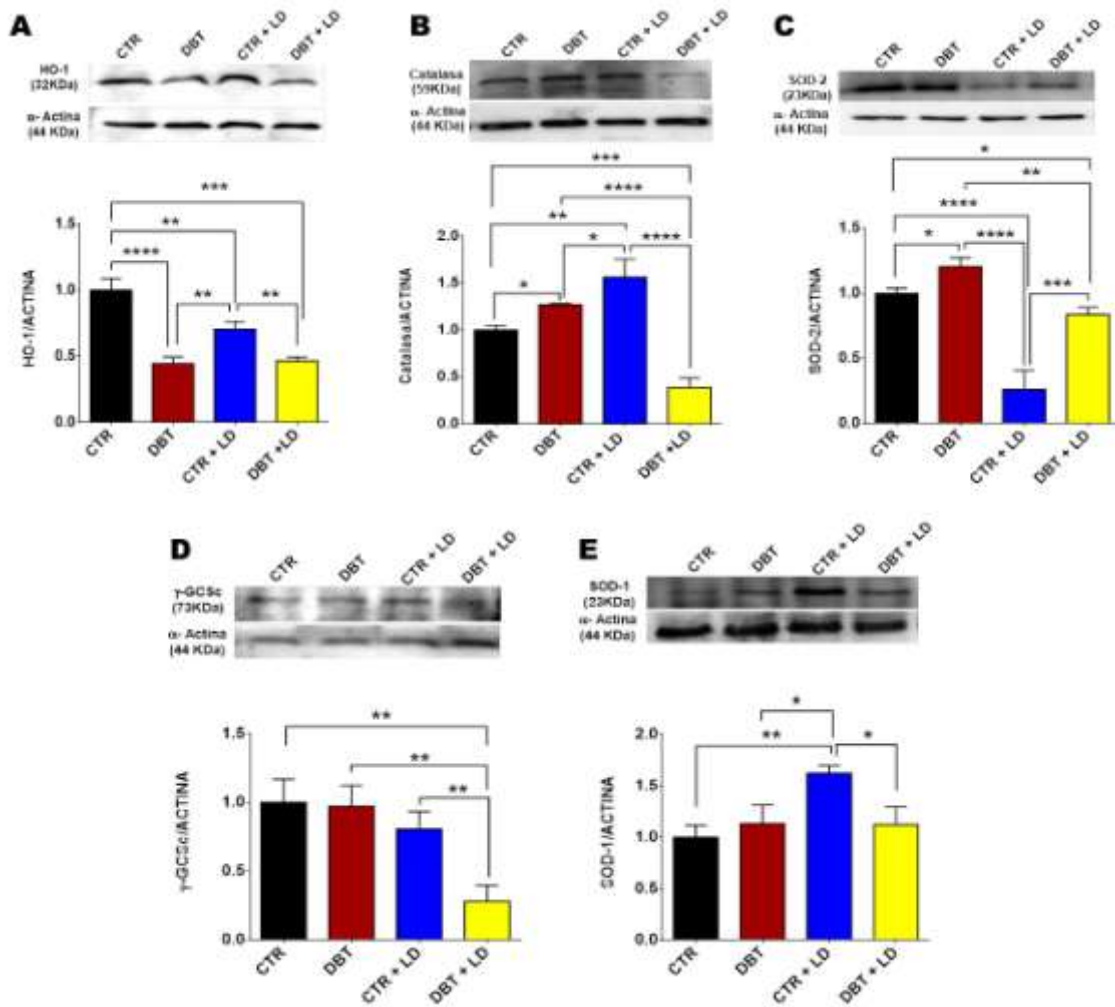
La expresión de Nrf-2 disminuye en el grupo DBT. La exposición al LD aumenta la expresión de Nrf-2 tanto en el grupo CTR como en el DBT (Figura 38).



**Figura 38. El LD modifica la expresión de Nrf-2 en la condición diabética.** Se muestra el nivel de expresión de Nrf-2; en el grupo CTR + LD incrementa la expresión de Nrf-2 en comparación con el grupo CTR. En el grupo DBT +LD aumenta también la expresión de Nrf-2 comparado con el grupo DBT. Se utilizó  $\alpha$ -actina como control de carga. Se representan la media  $\pm$  DS de 5 experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  y \*\*\*\* $p < 0.0001$

Se evaluó la respuesta antioxidante midiendo los niveles de HO-1, catalasa, SOD-2,  $\gamma$ -GCSc y SOD-1. En el grupo CTR+LD, disminuyeron HO-1 y SOD-2 pero aumentaron la catalasa y SOD-1 y no cambió  $\gamma$ -GCSc en comparación con el grupo CTR. Esto indica que en el grupo CTR se

expresaron las enzimas anti-oxidantes como catalasa y SOD1, en cambio en la condición diabética más líquido de diálisis disminuye su expresión. Lo que sugiere que en la condición DBT, la respuesta antioxidante no se activó ante el estrés oxidante que se genera con el LD (Figura 39).



**Figura 39.-El LD disminuye la expresión de las enzimas antioxidantes en la condición DBT. El LD no activa la respuesta antioxidante de las proteínas HO-1, catalasa, SOD-2, γGCSc y SOD-1. Se utilizó α-actina como control de carga. Se representa la media ± DS de 5 experimentos independientes. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 and \*\*\*\*p<0.0001**

## 8. Discusión

Se desconocían las características morfológicas y funcionales de las CMPR en la condición diabética antes de la etapa de insuficiencia renal y el efecto de la exposición al líquido de diálisis.

En esta tesis demostramos que la diabetes genera daño peritoneal, en una etapa previa al desarrollo de insuficiencia renal, lo que podría comprometer el funcionamiento adecuado de la DP.

Se observó reducción del tejido conectivo, engrosamiento del submesotelio con disminución del peritoneo parietal (Fig.14). A pesar de estos cambios, se conservó la monocapa de las células mesoteliales. Esto es importante porque a partir del mesotelio se obtuvieron las células para los cultivos primarios y para que estas células se puedan propagar deben estar en óptimas condiciones.

Varios autores han descrito la morfología de las CMPH en cultivos en condiciones normales y en pacientes en DP [14, 35, 56] sin embargo hasta el momento se desconocían si las células mesoteliales provenientes de una condición diabética presentaban un daño por la hiperglucemia que el organismo manejaba.

Es importante evaluar el estado de las células mesoteliales en la condición diabética ya que se ha reportado que cambios en la morfología de las CM, así como la pérdida de estas células, comprometen el intercambio de iones y solutos a través de la membrana [94]. Dando como resultado fallo en la terapia de diálisis peritoneal.

La investigación en CM ha indicado que la alta concentración de glucosa contenida en el LD, tiene un efecto perjudicial sobre las CM. Gotloib y cols., en 1999 [95] fue el primero en reportar que la exposición del mesotelio de ratón a una alta concentración de glucosa (4.25% de glucosa en el LD durante 30 días), disminuye la densidad celular y que la población celular se conforma en su mayoría por células más grandes y multinucleadas, generando disminución de la viabilidad celular. Él concluye que la alta concentración de glucosa, no induce únicamente un mecanismo

de citotoxicidad, sino también un cambio sustancial en el ciclo de vida de la población de células expuestas, llevándolas a la senescencia prematura y a la muerte por apoptosis.

En esta tesis demostramos que los cultivos de las CMPR de la condición diabética mantiene la morfología uniforme de empedrado en forma de adoquines y la viabilidad es mayor que lo observado por Gotloib. Lo cual se podría deber a la concentración de glucosa que se maneja, ya que la concentración de glucosa que presentaban los animales diabéticos eran de 500 mg / dl, mientras que la concentración de glucosa utilizada por Gotloib en el líquido de diálisis es de 4500 mg/dl. Lo que demuestra que los niveles de glucosa son importantes para determinar los cambios en la viabilidad de las células mesoteliales.

Sin embargo no solo se muestran cambios en la viabilidad dependientes de la concentración de glucosa, sino también se han reportado cambios morfológicos en las estructuras de las CM como por ejemplo en las microvellosidades

Las microvellosidades son estructuras que responden a cambios en el microambiente celular. Dos características estructurales de las microvellosidades permiten su extensa competencia funcional. La primera es la localización específica de proteínas funcionales de la membrana, tales como transportadores de glucosa, canales de iones, y los intercambiadores de iones. Esto indica la diversidad de las funciones de las microvellosidades.

La segunda es la función del citoesqueleto, que actúa como barrera de difusión modulando el flujo de iones hacia el exterior de la célula [96, 97]. Por lo tanto, una reducción en el número de microvellosidades en las células mesoteliales tendrá un efecto negativo en la función del transporte peritoneal.

Fang y col. en 2004 [55] reportaron que pacientes sometidos a DP durante 15 meses mostraban pérdida de la mayor parte de las microvellosidades de mesotelio. Lo que indica que no solo las altas concentraciones del líquido de diálisis influyen para el deterioro de las

microvellosidades sino también el tiempo de exposición a los líquidos de diálisis.

Debido a que no había estudios en los que se analizaran las características del peritoneo del sujeto diabético, antes de que las células mesoteliales hayan sido dañadas por la insuficiencia renal terminal y de que sean expuestas a las soluciones de diálisis, se estudió si estaban presentes alteraciones estructurales en las microvellosidades de las CM, ya que las microvellosidades 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 la longitud de estas estructuras podría tener consecuencias negativas en la función peritoneal.

En las CMPR de la condición diabética, observamos la disminución de la longitud en la microvellosidad sin embargo no observamos cambios en la densidad de estas microvellosidades, como ya se mencionó esto puede deberse por el tiempo en que las células estuvieron en una condición de hiperglucemia, que fue de tan solo tres semanas y este tiempo no fue suficiente para presentar pérdida de la microvellosidad.

Sin embargo la formación de las microvellosidades en las células mesoteliales aún no ha sido descrita. Se ha reportado que el número de microvellosidades durante la regeneración de las células mesoteliales, puede variar y es dependiente de la carga aniónica del glicocalix [26]. Kultti y col. (2006) reportaron que la presencia de ácido hialurónico en el glicocalix de las MCF-7 (células de adenocarcinoma de mama humano) es esencial para la formación de las microvellosidades y que la longitud de éstas es dependiente de la actividad de las sintasa del ácido hialurónico y de la velocidad con que se sintetiza éste [98], por lo que se requieren estudios adicionales para definir el papel que tienen las microvellosidades de las células peritoneales en una condición diabética.

Otro mecanismo involucrado en la regulación peritoneal, es el proceso de transición mesotelio mesénquima (TMM), que durante la diálisis juega un papel importante en el desarrollo de la fibrosis peritoneal y el fracaso de la

ultrafiltración [99]. Durante este proceso, las células polarizadas adquieren un fenotipo fibroblástico que se acompaña de la capacidad de migrar y remodelar su matriz extracelular [31]. Modificando gradualmente la organización de su citoesqueleto y la expresión de los marcadores de tipo epitelial y sobreexpresan marcadores de tipo mesénquima [100].

En las células mesoteliales de la condición diabética se observó que se inicia el proceso de TMM, ya que pan-cadherina y ck 4,62, marcadores del fenotipo mesotelial, disminuyeron su expresión, mientras que  $\alpha$ -SMA, indicador de la TMM, aumentó. Asimismo, se observó la pérdida de las cadherinas en la condición diabética expuesta a LD, lo que sugiere que los LD están participando en la aceleración del proceso de la transición mesotelio-mesénquima.

Las células mesoteliales actúan como barrera de permeabilidad selectiva para regular el paso de solutos y de agua entre el compartimiento intravascular y la cavidad peritoneal, por lo que el daño a las células mesoteliales es considerada la principal causa de la generación de fibrosis peritoneal y/o hiperpermeabilidad.

Es importante mantener la monocapa de células mesoteliales en una condición íntegra ya que el transporte de solutos durante la diálisis en las células mesoteliales ocurrirá a través de la vía transcelular y de la vía paracelular. Por lo que el conocimiento de los mecanismos moleculares del transporte celular de glucosa es esencial para elucidar los efectos fisiológicos y fisiopatológicos del exceso de glucosa intraperitoneal. Razón por la cual fue de gran importancia conocer la expresión de los transportadores de glucosa

Describimos por primera vez la presencia del cotransportador SGLT-2 en las células mesoteliales peritoneales. La diabetes modifica de manera diferencial la expresión de los transportadores de glucosa. SGLT1, SGLT2 y GLUT2 aumentan su expresión, mientras que GLUT1 la disminuye, sin modificar su localización. En el grupo DBT + LD se observó una disminución en la expresión del transportador SGLT-2, pero no hubo cambio en los otros transportadores, en comparación con el grupo DBT, lo que sugiere que el LD

altera la eficiencia del transporte de glucosa. La expresión de estos transportadores puede ser regulada por su afinidad a la glucosa. Se ha descrito que un ambiente alto de glucosa de concentraciones de 75.5 y 214 mmol / L disminuye la expresión de GLUT-1 y aumenta la expresión de GLUT-2 [101-103].

Esto sugiere que las condiciones que afectan a la expresión de transportadores de glucosa en CMPR podrían alterar las concentraciones intracelulares de glucosa y, por tanto, afectar la función celular. Los cambios en la expresión de los transportadores de glucosa en CM pueden influir en la biología de estas células y modificar así una serie de procesos fisiológicos y fisiopatológicos, como la respuesta a la inflamación intraperitoneal, la regulación de la producción de proteínas de la matriz extracelular o la fibrosis peritoneal durante la diálisis peritoneal. Cabe mencionar que para elucidar claramente el papel del transporte de glucosa en las CM, en la fisiopatología de la diabetes, se necesita un estudio más amplio.

Las modificaciones en las proteínas de la unión estrecha, ocludina y claudinas 1 y 2 sugieren alteraciones en el transporte de agua y solutos. Las UE regulan el transporte paracelular por proteínas como las mencionadas, claudinas y ocludina [104, 105]. Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio en el que se exploraron las alteraciones iniciales de las proteínas de la UE en el peritoneo en individuos diabéticos.

Se ha reportado que la alta concentración de glucosa contenida en el LD, así como la generación de productos finales de glicosilación avanzada generados por su proceso de esterilización por calor, la hiperosmolaridad de esos líquidos y las ERO generadas en respuesta a la exposición a dichos líquidos, son factores que dañan a las UE de las CMPH en la DP [64, 65, 106, 107].

En este trabajo se exploró la expresión y la distribución de las claudinas 1 y 2 y la ocludina. Se observó incremento de la expresión de claudina 2 y disminución de la ocludina, sin un cambio de la claudina-1, lo que sugiere que en la condición diabética el peritoneo es más permeable, ya



que la claudina 2 es una proteína que forma un canal paracelular selectivo para cationes pequeños [108] y también un canal paracelular para agua [109, 110], lo que hace que los epitelios que expresan claudina 2 sean más permeables que los que no la expresan [111]. Además se ha reportado que la claudina 2 es una proteína característica de epitelios muy permeables como el túbulo proximal del riñón y el intestino delgado.

Una forma de corroborar si la monocapa de CM era un epitelio permeable fue a través de la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (RET) La RET de la condición DBT es menor que la del control (DBT  $5.5 \pm 0.5 \Omega \cdot \text{cm}^2$  vs CTR  $14.01 \pm 0.03 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ), lo que indica que las monocapas de la condición DBT son más permeables. Esto concuerda con el incremento de la expresión de claudina 2 en la condición DBT.

Por otro lado observamos que el LD disminuyó la expresión de claudina 2 lo que sugiere que la unión estrecha se está haciendo menos permeable (cerrando), esto no correlaciona con la RET que observamos en el grupo expuesto a LD, ya que bajo esta condición disminuye la RET (DBT,  $5,5 \pm 0,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$  a DBT + LD,  $2,06 \pm 0,42 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ). Esto sugiere la posible expresión de otras claudinas que funcionan como poros para aniones y cationes como las claudinas 10 y 15 o por el contrario el silenciamiento de claudinas que funcionan como barrera claudina 3, -4, -5, -11, -14 y -19 [108, 112, 113]. Por lo que podemos sugerir que el LD podría estar modificando otras proteínas de la UE involucradas en la regulación de la permeabilidad.

Sin embargo en el grupo diabético expuesto a LD observamos que la claudina 1 no cambió; esto se puede explicar ya que la claudina 1 es constitutiva y se expresa en casi todos los epitelios [114, 115]. La reubicación de la claudina desde el borde de la célula sugiere que este cambio podría ser inducido por el incremento de ERO que activa a la proteína cinasa C (PKC), ya que la PKC regula la localización de las proteínas de la UE en el borde de la célula [116].

En este punto se ha demostrado que tanto la diabetes como la exposición al LD inducen lesión tisular que se manifiestan por inducción a la

TMM y disfunción peritoneal que se detecta por modificación de transportadores trans y para-celulares. Estos cambios pueden estar relacionados con la presencia del estrés oxidante.

Algunas evidencias demuestran que los LD de alto contenido de glucosa desencadenan la generación de ERO en CMPH, resultando en daño por estrés oxidante [60]. El estrés oxidante juega un papel importante en el inicio y en la progresión de la insuficiencia renal en la diabetes. En términos generales, el estrés oxidante disminuye la expresión de proteínas blanco ya que afecta a diversas macromoléculas modificando su estructura, función y promoviendo su degradación posterior. Debido a esto, se estudió el estado de estrés oxidante midiendo la producción de ERO.

Se encontró que la diabetes generó ERO y estas incrementaron aún más después de la exposición al LD. Esto se correlaciona con el aumento de proteínas carboniladas que nos indica un daño. Se ha reportado que entre mayor sea la producción de ERO habrá un mayor daño a nivel de proteínas y que la exposición de CMPH a altas concentraciones de glucosa incrementan la producción de ERO.

Otro factor clave que se relaciona con el aumento de la producción de ERO es la presencia de productos de glicosilación avanzada (AGEs), relacionados con la hiperglucemia. La formación intracelular de AGEs también puede causar disfunción celular generalizada. Además, los AGEs pueden mediar sus efectos a través de la activación del receptor de AGE (RAGE), la inducción de diversas cascadas de transducción de señales [34, 117-119]. La condición diabética incrementó la expresión de los RAGE y su expresión no cambió cuando las células DBT fueron expuestas al LD.

Al encontrar un incremento de ERO y daño a proteínas, evaluamos la activación de la respuesta antioxidante a través de Nrf-2, ya que se sabe que las ERO activan la transcripción de genes antioxidantes, mediante la activación de factores trasccripcionales como Nrf-2 (figura 24).

La diabetes disminuyó la expresión de Nrf-2 y ésta se mantuvo sin cambios cuando se expusieron las células al LD. Esta disminución se

relaciona con baja expresión de las enzimas antioxidantes en la condición DBT.

Las enzimas antioxidantes cambiaron su expresión de manera diferencial: disminuyó HO-1, aumentó la catalasa y la SOD-2. No observamos diferencias en SOD-1 y  $\gamma$ GCSc, Sin embargo esperábamos obtener un incremento de  $\gamma$ GCSc ya que esta enzima participa en la síntesis de novo del glutatión y se ha reportado que la primer línea de defensa ante el estrés oxidante depende de la acción de glutatión.

Esto nos sugiere que la función protectora ante el incremento de ERO la establece SOD-2 catalasa mediante la activación de otra vía diferente a la de Nrf-2. El aumento de la catalasa y la SOD-2 sugiere que el incremento de las ERO proviene de las mitocondrias al ser SOD-2 una enzima antioxidante de tipo mitocondrial y esto se relaciona con lo que se ha observado en animales diabéticos, en los cuales el incremento de ERO se da a través de la activación de la NADPH oxidasa. En el grupo expuesto al LD, observamos que todas las enzimas antioxidantes disminuyen su expresión, lo que sugiere que el sistema ya no genera una respuesta.

Sin embargo se esperaba que al haber un incremento de glucosa por el líquido de diálisis, las enzimas antioxidantes incrementaran su expresión y también que los transportadores de glucosa aumentaran su expresión, para regular las concentraciones de glucosa. Pero no se observó esta respuesta lo que puede sugerir que el sistema desarrolla una memoria metabólica como lo han descrito algunos autores.

Avshalom Shostak y col. informaron (1996) que los cultivos de células mesoteliales de rata tienen la capacidad de generar una mayor producción de  $H_2O_2$  en respuesta a la exposición a líquidos de diálisis y que esto podría estar implicado en el daño al peritoneo. Estudios en células epiteliales expuestas a alta glucosa durante 14 días incrementaron la producción ERO, y observaron que cuando a estos cultivos se les regresaba a niveles normales de glucosa durante 7 días, la sobreproducción de radicales libres persiste después de la normalización de la glucosa, y esto se acompaña de

una extensión de la inducción de PKC- $\beta$ , NADPH oxidasa, Bax, colágeno y fibronectina, lo que sugiere que el estrés oxidante puede estar implicado en el efecto de la memoria metabólica [120, 121].

Con todos los resultados que se obtuvieron podemos sugerir que el correcto funcionamiento de la diálisis peritoneal en pacientes diabéticos depende de las alteraciones de la membrana peritoneal previas a la diálisis peritoneal.

## 9. Conclusiones

- Las CM de una condición diabética, presentan alteraciones morfológicas y funcionales que permanecen durante la exposición al LD y podrían estar asociadas con el estrés oxidante.
- Se evidencio por primera vez la presencia del transportador SGLT-2 en CM y la diabetes aumenta su expresión.
- La diabetes tipo 1 modifica de manera diferencial la expresión de los transportadores de glucosa sin cambiar su localización en las CM.
- La diabetes tipo 1 en CM tiene la capacidad de inducir estrés oxidante, mientras que la respuesta antioxidante mediada a través de Nrf-2, no se induce
- La diabetes tipo 1 disminuye la resistencia eléctrica transepitelial en CM a través del incremento de claudina-2 pero en la exposición al líquido se sugiere la participación de otras proteínas de la unión estrecha ya que disminuye claudina-2 y disminuye aún más la resistencia eléctrica transepitelial
- Los cultivos de células obtenidos de una condición diabética son adecuados para realizar estudios futuros encaminados a disminuir el daño que se produce en las etapas iniciales de la diabetes.

## 10. Conclusión General

La diabetes tipo 1 altera la expresión de las proteínas de unión estrecha y los transportadores de glucosa, aumentando el proceso de transición epitelio mesénquima; el cual se acelera ante la exposición a los líquidos de diálisis.

## 11.- Perspectivas

- Estudiar la permeabilidad a cationes y moléculas neutras de diferentes tamaños en cultivos de CMPR diabética y expuestos a líquido de diálisis.
- Evaluar el flujo de glucosa utilizando bloqueadores para los transportadores de glucosa.
- Medir la cantidad de potasio y sodio en las células de la condición diabética, así como la presencia de la bomba sodio potasio ATPasa
- Evaluar la respuesta antioxidante a través de la medición de glutatión.
- Realizar los estudios en un modelo animal de diabetes tipo1 controlando niveles de glucosa mediante la administración de insulina.
- Estudiar la expresión de claudinas formadoras de barrera (claudina-3,-4,-11,-14 ó 19) y de claudinas formadoras de canales (claudina-10,-15) en las CMPR, así como su participación en la regulación de la UE.
- Cuantificar los niveles de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs)

## 12. Referencias

1. Rorsman, P., et al., *The cell physiology of biphasic insulin secretion*. Physiology, 2000. **15**(2): p. 72-77.
2. Latorre, R., *Biofísica y fisiología celular*. 1996: Universidad de Sevilla.
3. Bertuzzi, F., et al., *Mechanisms of coordination of Ca<sup>2+</sup> signals in pancreatic islet cells*. Diabetes, 1999. **48**(10): p. 1971-1978.
4. Albert, L., *Bioquímica, las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular*. Ediciones Omega, SA Segunda Edición. Barcelona, 1995.
5. Kanwar, Y.S., et al., *A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2011. **6**: p. 395-423.
6. Mora-Fernández, C., et al., *Diabetic kidney disease: from physiology to therapeutics*. The Journal of physiology, 2014. **592**(18): p. 3997-4012.
7. Jiménez Murillo, L. and F. Montero Pérez, *Compendio de medicina de urgencias: guía terapéutica*. 2005: Madrid: Elsevier.
8. Daher, E.F., et al., *Acute kidney injury in an infectious disease intensive care unit--An assessment of prognostic factors*. Swiss medical weekly, 2008. **138**(9-10): p. 128-133.
9. Guyton, A.C., J.E. Hall, and A.C. Guyton, *Tratado de fisiología médica*. 2006: Elsevier Brasil.
10. Levey, A.S., et al., *National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification*. Annals of internal medicine, 2003. **139**(2): p. 137-147.
11. Blake, P.G. and J.T. DAUGIRDAS, *Fisiología da diálise peritoneal*. Daugirdas JT, Blake PG, Ing TS. Manual de diálise. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003: p. p287-303.
12. Ronco, C., R. Bellomo, and J.A. Kellum, *Critical care nephrology*. 2009: Elsevier Health Sciences.
13. Twardowski, Z.J., *Pathophysiology of peritoneal transport*, in *Peritoneal Dialysis: A Clinical Update*. 2006, Karger Publishers. p. 13-19.
14. Yung, S., F.K. Li, and T.M. Chan, *Peritoneal mesothelial cell culture and biology*. Peritoneal Dialysis International, 2006. **26**(2): p. 162-173.
15. Di Paolo, N., et al., *Morphological and morphometric changes in mesothelial cells during peritoneal dialysis in the rabbit*. Nephron, 1996. **74**(3): p. 594-599.
16. Di Paolo, N. and G. Sacchi, *Atlas of peritoneal histology*. Peritoneal Dialysis International, 2000. **20**(Suppl 3): p. S5-96.
17. Gotloib, L., et al., *Heterogeneous density and ultrastructure of rabbit's peritoneal microvasculature*. The International journal of artificial organs, 1984. **7**(3): p. 123-125.
18. Flessner, M.F., *Peritoneal transport physiology: insights from basic research*. Journal of the American Society of Nephrology, 1991. **2**(2): p. 122-135.
19. Flessner, M.F., *The transport barrier in intraperitoneal therapy*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2005. **288**(3): p. F433-F442.
20. Yung, S. and T.M. Chan, *Mesothelial cells*. Peritoneal Dialysis International, 2007. **27**(Supplement 2): p. S110-S115.
21. Mutsaers, S.E., *Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair*. Respirology, 2002. **7**(3): p. 171-191.

22. Bird, S.D., *Mesothelial primary cilia of peritoneal and other serosal surfaces*. Cell biology international, 2004. **28**(2): p. 151-159.
23. Bird, S.D., M. Legge, and R.J. Walker, *Cultured peritoneal mesothelial cells exhibit apical primary cilia*. Cell biology international, 2004. **28**(2): p. 79-92.
24. Andrews, P.M. and K.R. Porter, *The ultrastructural morphology and possible functional significance of mesothelial microvilli*. The Anatomical Record, 1973. **177**(3): p. 409-426.
25. Lindic, J., et al., *The Morphology of a Parietal Peritoneum: A Scanning Electron Micrograph Study*. ADVANCES IN PERITONEAL DIALYSIS, 1993. **9**: p. 36-36.
26. MUTSAERS, S.E., D. WHITAKER, and J.M. PAPADIMITRIOU, *Changes in the concentration of microvilli on the free surface of healing mesothelium are associated with alterations in surface membrane charge*. The Journal of pathology, 1996. **180**(3): p. 333-339.
27. Gotloib, L., A. Shostack, and J. Jaichenko, *Ruthenium-red-stained anionic charges of rat and mice mesothelial cells and basal lamina: the peritoneum is a negatively charged dialyzing membrane*. Nephron, 1988. **48**(1): p. 65-70.
28. Fedorko, M.E. and J. Hirsch, *Studies on transport of macromolecules and small particles across mesothelial cells of the mouse omentum: I. Morphologic aspects*. Experimental cell research, 1971. **69**(1): p. 113-127.
29. Fedorko, M.E., J. Hirsch, and B. Fried, *Studies on transport of macromolecules and small particles across mesothelial cells of the mouse omentum: II. Kinetic features and metabolic requirements*. Experimental cell research, 1971. **69**(2): p. 313-323.
30. Ohtani, O., Y. Ohtani, and R. Li, *Phylogeny and ontogeny of the lymphatic stomata connecting the pleural and peritoneal cavities with the lymphatic system--a review*. Italian journal of anatomy and embryology= Archivio italiano di anatomia ed embriologia, 2000. **106**(2 Suppl 1): p. 251-259.
31. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(6): p. 1420-1428.
32. Aroeira, L.S., et al., *Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions*. Journal of the American Society of Nephrology, 2007. **18**(7): p. 2004-2013.
33. Yung, S. and M. Davies, *Response of the human peritoneal mesothelial cell to injury: an in vitro model of peritoneal wound healing*. Kidney international, 1998. **54**(6): p. 2160-2169.
34. De Vriese, A.S., et al., *Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2006. **21**(9): p. 2549-2555.
35. Yáñez-Mó, M., et al., *Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells*. New England Journal of Medicine, 2003. **348**(5): p. 403-413.
36. Vargha, R., et al., *Ex vivo reversal of in vivo transdifferentiation in mesothelial cells grown from peritoneal dialysate effluents*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2006. **21**(10): p. 2943-2947.
37. Seo, J.Y., et al., *Antifibrotic effect of BMP-7 in the peritoneum and the mechanism*. Korean Journal of Nephrology, 2007. **26**(1): p. 34-44.
38. Anderson, J.M., *Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport*. Physiology, 2001. **16**(3): p. 126-130.

39. Castrejón, V., R. Carbó, and M. Martínez, *Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa*. REB, 2007. **26**(2): p. 49-57.
40. Turk, E. and E. Wright, *Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family*. The Journal of membrane biology, 1997. **159**(1): p. 1-20.
41. Wright, E.M., et al., *Regulation of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporters*. Journal of Experimental Biology, 1997. **200**(2): p. 287-293.
42. Wright, E.M., *Renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2001. **280**(1): p. F10-F18.
43. Hirayama, B.A., et al., *Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters (SGLT-1)*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 1996. **270**(6): p. G919-G926.
44. Loo, D.D., et al., *Cotransport of water by the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(23): p. 13367-13370.
45. Takata, K., H. Hirano, and M. Kasahara, *Transport of glucose across the blood-tissue barriers*. International review of cytology, 1997. **172**: p. 1-53.
46. Foster, L.J. and A. Klip, *Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2000. **279**(4): p. C877-C890.
47. Goodyear, L.J. and B.B. Kahn, *Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity*. Annual review of medicine, 1998. **49**(1): p. 235-261.
48. James, D.E., R.C. Piper, and J.W. Slot, *Targeting of mammalian glucose transporters*. Journal of Cell Science, 1993. **104**(3): p. 607-612.
49. Augustin, R., *The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all*. IUBMB life, 2010. **62**(5): p. 315-333.
50. KELLETT, G.L. and P.A. HELLIWELL, *The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane*. Biochemical Journal, 2000. **350**(1): p. 155-162.
51. Gonzalez-Mariscal, L., et al., *Tight junction proteins*. Progress in biophysics and molecular biology, 2003. **81**(1): p. 1-44.
52. Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh, *Multifunctional strands in tight junctions*. Nature reviews Molecular cell biology, 2001. **2**(4): p. 285-293.
53. Ikenouchi, J., et al., *Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells*. The Journal of cell biology, 2005. **171**(6): p. 939-945.
54. Himmele, R., et al., *A new neutral-pH low-GDP peritoneal dialysis fluid*. Peritoneal Dialysis International, 2012. **32**(4): p. 444-452.
55. Fang, W., et al., *Morphological changes of the peritoneum in peritoneal dialysis patients*. Chinese medical journal, 2004. **117**(6): p. 862-866.
56. López-Cabrera, M., et al., *Ex vivo analysis of dialysis effluent-derived mesothelial cells as an approach to unveiling the mechanism of peritoneal membrane failure*. Peritoneal Dialysis International, 2006. **26**(1): p. 26-34.
57. Retana, C., et al., *Alterations of intercellular junctions in peritoneal mesothelial cells from patients undergoing dialysis: effect of retinoic Acid*. Perit Dial Int, 2015. **35**(3): p. 275-87.
58. Retana, C., et al., *Retinoic acid improves morphology of cultured peritoneal mesothelial cells from patients undergoing dialysis*. PloS one, 2013. **8**(11): p. e79678.
59. Kaneda, K.-i., et al., *Intercellular localization of occludins and ZO-1 as a solute transport barrier of the mesothelial monolayer*. Journal of Artificial Organs, 2006. **9**(4): p. 241-250.



60. Zhu, X., et al., *Role of mitochondrial respiratory chain complex III in high glucose peritoneal dialysate-induced hyperpermeability of HPMCs*. *Renal failure*, 2010. **32**(9): p. 1103-1108.
61. Tarng, D.-C., et al., *Increased oxidative damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2002. **13**(5): p. 1321-1330.
62. Książek, K., et al., *Oxidative stress contributes to accelerated development of the senescent phenotype in human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007. **42**(5): p. 636-641.
63. Horiuchi, T., et al., *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*. *Peritoneal Dialysis International*, 2009. **29**(2): p. 217-226.
64. Ito, T., et al., *Effect of glucose on intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells*. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2000. **11**(11): p. 1969-1979.
65. Ito, T., et al., *Effect of glucose polymer on the intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells*. *Nephron Clinical Practice*, 2004. **93**(3): p. c97-c105.
66. Halliwell, B. and J. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*. NY: Oxford University Press.—1999.—968 p, 2011.
67. Davies, K.J., *Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems*. *IUBMB life*, 2000. **50**(4-5): p. 279-289.
68. Storey, K.B., *Oxidative stress: animal adaptations in nature*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1996. **29**: p. 1715-1733.
69. Chihuailaf, R.H., P.A. Contreras, and F.G. Wittwer, *Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal*. *Veterinaria México*, 2002. **33**(3).
70. Thérond, P., et al., *Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach*. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 2000. **3**(5): p. 373-384.
71. Therond, P. [*Oxidative stress and damages to biomolecules (lipids, proteins, DNA)*]. in *Annales pharmaceutiques francaises*. 2006.
72. Stadtman, E.R. and C.N. Oliver, *Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**(4): p. 2005-2008.
73. Stadtman, E.R. and B.S. Berlett, *Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease*. *Chemical research in toxicology*, 1997. **10**(5): p. 485-494.
74. Wiernsperger, N., *Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy*. *Diabetes & metabolism*, 2003. **29**(6): p. 579-585.
75. Nishikawa, T., et al., *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage*. *Nature*, 2000. **404**(6779): p. 787-790.
76. Tang, W., K.A. Martin, and J. Hwa, *Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus*. *Frontiers in pharmacology*, 2012. **3**: p. 87.
77. Nyström, T., *Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence*. *The EMBO journal*, 2005. **24**(7): p. 1311-1317.
78. Requena, J., R. Levine, and E. Stadtman, *Recent advances in the analysis of oxidized proteins*. *Amino acids*, 2003. **25**(3-4): p. 221-226.
79. Jin, Y. and A.M. Choi, *Cytoprotection of heme oxygenase-1/carbon monoxide in lung injury*. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2005. **2**(3): p. 232-235.

80. Otterbein, L.E. and A.M. Choi, *Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology, 2000. **279**(6): p. L1029-L1037.
81. Bang, K., et al., *Heme oxygenase-1 attenuates epithelial-to-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells*. Clinical and experimental nephrology, 2013. **17**(2): p. 284-293.
82. Itoh, K., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. Biochemical and biophysical research communications, 1997. **236**(2): p. 313-322.
83. Furukawa, M. and Y. Xiong, *BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase*. Molecular and cellular biology, 2005. **25**(1): p. 162-171.
84. Villeneuve, N.F., A. Lau, and D.D. Zhang, *Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases*. Antioxidants & redox signaling, 2010. **13**(11): p. 1699-1712.
85. Itoh, K., K.I. Tong, and M. Yamamoto, *Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles*. Free Radical Biology and Medicine, 2004. **36**(10): p. 1208-1213.
86. Eaton, P. and P. West, *Atomic force microscopy*. 2010: Oxford University Press.
87. Morris, V.J., A.R. Kirby, and A.P. Gunning, *Atomic force microscopy for biologists*. 2009: World Scientific.
88. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Analytical biochemistry, 1981. **112**(2): p. 195-203.
89. Lu, S., et al., *Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes*. Journal of pharmaceutical sciences, 1996. **85**(3): p. 270-273.
90. Myhre, O., et al., *Evaluation of the probes 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation*. Biochemical pharmacology, 2003. **65**(10): p. 1575-1582.
91. Rees, D. and J. Alcolado, *Animal models of diabetes mellitus*. Diabetic medicine, 2005. **22**(4): p. 359-370.
92. González-Reyes, S., et al., *Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2013. **2013**.
93. Yamagishi, S.-i., *Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes*. Experimental gerontology, 2011. **46**(4): p. 217-224.
94. Kanjanabuch, T., et al., *Overnight mesothelial cell exfoliation: a magic tool for predicting future ultrafiltration failure in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis*. Peritoneal Dialysis International, 2008. **28**(Supplement 3): p. S107-S113.
95. Gotloib, L., et al., *High glucose induces a hypertrophic, senescent mesothelial cell phenotype after long in vivo exposure*. Nephron, 1999. **82**(2): p. 164-173.
96. Lange, K., *Fundamental role of microvilli in the main functions of differentiated cells: outline of an universal regulating and signaling system at the cell periphery*. Journal of cellular physiology, 2011. **226**(4): p. 896-927.

97. Brown, J.W. and C.J. McKnight, *Molecular model of the microvillar cytoskeleton and organization of the brush border*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9406.
98. Kultti, A., et al., *Hyaluronan synthesis induces microvillus-like cell surface protrusions*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(23): p. 15821-15828.
99. Selgas, R., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition of the mesothelial cell—its role in the response of the peritoneum to dialysis*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2006. **21**(suppl 2): p. ii2-ii7.
100. Zeisberg, M. and E.G. Neilson, *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(6): p. 1429.
101. Schröppel, B., et al., *Expression of glucose transporters in human peritoneal mesothelial cells*. Kidney international, 1998. **53**(5): p. 1278-1287.
102. Lu, C., et al., *Gene expression of glucose transporters and its regulation by glucose in mesothelial cells*. Chinese medical journal, 2001. **114**(5): p. 477-480.
103. Klip, A., et al., *Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures*. The FASEB journal, 1994. **8**(1): p. 43-53.
104. Cereijido, M., et al., *Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2008. **1778**(3): p. 770-793.
105. González-Mariscal, L., R. Tapia, and D. Chamorro, *Crosstalk of tight junction components with signaling pathways*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2008. **1778**(3): p. 729-756.
106. Zhu, X., et al., *Role of mitochondrial respiratory chain complex III in high glucose peritoneal dialysate-induced hyperpermeability of HPMCs*. Ren Fail, 2010. **32**(9): p. 1103-8.
107. Leung, J.C., et al., *Glucose degradation products downregulate ZO-1 expression in human peritoneal mesothelial cells: the role of VEGF*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2005. **20**(7): p. 1336-1349.
108. Amasheh, S., et al., *Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells*. Journal of cell science, 2002. **115**(24): p. 4969-4976.
109. Rosenthal, R., et al., *Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel*. J Cell Sci, 2010. **123**(11): p. 1913-1921.
110. Oliver, J., *Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel*. Kidney International, 2010. **78**: p. 631-632.
111. Günzel, D. and S. Alan, *Claudins and the modulation of tight junction permeability*. Physiological reviews, 2013. **93**(2): p. 525-569.
112. Amasheh, S., et al., *Tight junction proteins as channel formers and barrier builders*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009. **1165**(1): p. 211-219.
113. Krug, S.M., et al., *Charge-selective claudin channels*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. **1257**(1): p. 20-28.
114. McCarthy, K., et al., *Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells*. Journal of Cell Science, 2000. **113**(19): p. 3387-3398.
115. Inai, T., J. Kobayashi, and Y. Shibata, *Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells*. European journal of cell biology, 1999. **78**(12): p. 849-855.
116. Molina-Jijón, E., et al., *Oxidative stress induces claudin-2 nitration in experimental type 1 diabetic nephropathy*. Free Radical Biology and Medicine, 2014. **72**: p. 162-175.

117. Goh, S.-Y. and M.E. Cooper, *The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2008. **93**(4): p. 1143-1152.
118. Schwenger, V., et al., *Damage to the peritoneal membrane by glucose degradation products is mediated by the receptor for advanced glycation end-products*. Journal of the American Society of Nephrology, 2006. **17**(1): p. 199-207.
119. Bierhaus, A., et al., *AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept*. Cardiovascular research, 1998. **37**(3): p. 586-600.
120. Roy, S., et al., *Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1990. **87**(1): p. 404-408.
121. Ceriello, A., M.A. Ihnat, and J.E. Thorpe, *The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications?* The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2009. **94**(2): p. 410-415.

## 13. ANEXOS

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

#### Preparación de 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 (Dd-MEM/F12) con 1.8 g de bicarbonato de sodio, 2 ml de HEPES, 15 ml de suero fetal bovino (SFB), 200  $\mu$ l de antibiótico (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 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 ( $\mu$ 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 4°C.

#### Preparación del amortiguador RIPA (Radio Immuno Precipitación 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 %

Añadir cada uno de los reactivos a 80 ml de agua desionizada en agitación y llevar a 100 ml con agua desionizada.

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

<b>Reactivos</b>	<b>Para preparar 100 ml</b>	<b>Concentración final</b>
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

Añadir cada uno de los reactivos a 80 ml de agua desionizada en agitación y llevar a 100 ml con agua desionizada.

### **Preparación de Laemmli 5x**

<b>Reactivos</b>	<b>Para preparar 100 ml</b>	<b>Concentración final</b>
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 %

Se añaden los reactivos a 10 ml de agua y se ajusta el pH a 6.8.

### **Preparación del buffer de corrida**

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

Se adicionan los reactivos a 1L de agua desionizada, en agitación. Posteriormente, de esta solución 5x, tomar 200 ml y llevar a 1L con agua desionizada (solución 1x). ajustar pH a 8.3.

### Preparación del buffer de transferencia

Reactivos	Para preparar 2L
Tris	6.05 g 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 e 1.8 L con agua desionizada, se ajusta el pH a 8.3 y se afora a 2L.

NOTA: Se debe proteger el buffer de la luz, utilizando un frasco ámbar o cubierto con aluminio. Mantener en refrigeración (4°C).

## SOLUCIONES PARA LA DETERMINACION DE CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS

- **Extracción de proteínas de tejido de pulmón**

Se homogenizo el tejido de pulmón, utilizando 250µl de buffer de fosfatos pH 7.4 conteniendo 2% de 2-mercaptoetanol y 40 µl de inhibidor de proteasa, mantener en hielo el homogenado hasta el momento de la centrifugación a 12000 rpm durante 25 min.

El sobrenadante se alícuota en varios tubos eppendorf y se guardaron en el REVCO. Dejar una alícuota de 5µl para la determinación de proteína.

- **Preparación del Buffer de fosfatos a pH 7.4**

Para un litro

NaCL	<b>8.0 g</b>
KCL	<b>0.2 g</b>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>1.44 g</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>0.24 g</b>

Ajustar el pH a 7.4 con HCL y mantener en refrigeración.

Inhibidor de proteasa: una pastilla complete Mini # de cat: 11836153001 Roche en 10 ml de Agua Milli Q, hacer alícuotas de 50 µl la solución stock es estable por 1-2 semanas de 2 a 8 °C y 12 semanas a -15 a -25 °C.

- **Determinación de proteína por Bradford.**

Biorad No. De catalogo (500-0006) diluido 1:5 con agua desionizada.

**BSA** (Albumina Serica Bovina) sigma # de catalogo A-9647 prepararla a 1mg/ml en agua desionizada.

<b>Curva de BSA</b>		
BSA (µl)	Buffer de fosfatos (µl)	Bradford diluido (µl)
0	100	900
2	98	900
4	96	900
6	94	900
8	92	900
10	90	900

- **Cuantificación de proteínas en las muestras**

Se tomaron 5µl del homogenado y se llevaron a 200µl con Buffer- mercapto (dilusión 1:40).



Muestra diluida ( $\mu$ l)	Buffer de fosfatos ( $\mu$ l)	Bradford diluido ( $\mu$ l)
10	90	900

- **Soluciones para electroforesis en geles de acrilamida**

- Solución acrilamida/bis-acrilamida

	Cantidad	Concentración final
Acrilamida	30 g	30% (Biorad)
N,N'-metilen-bisacrilamida	0.8 g	0.8% (Biorad)
Agua desionizada	100 ml	

Mezclar la acrilamida y la N,N'-metilen-bisacrilamida y aforar a 100 ml de agua, filtrar la solución a través de un filtro de 0.45  $\mu$ m (diámetro interno) y almacenar en refrigeración protegido de la luz.

- Upper buffer

	Cantidad	Concentración final
Tris base	30 g	0.5 % (Gibco)
SDS	0.8 g	0.4 % (Biorad)
Agua desionizada	200 ml	

Disolver el tris y ajustar el pH a 6.8 con HCL, agregar el SDS disolver y aforar a 200 ml. Filtrar la solución a través de un filtro de 0.45  $\mu$ m (diámetro interno) y almacenar en refrigeración.

- Lower buffer

	Cantidad	Concentración final
Tris base	36.33 g	1.5 % (Gibco)
SDS	0.8 g	0.4 % (Biorad)
Agua desionizada	200 ml	

Disolver el tris y ajustar el pH a 8.7 con HCL, agregar el SDS disolver y aforar a 200 ml. Filtrar la solución a través de un filtro de 0.45  $\mu$ m (diámetro interno) y almacenar en refrigeración.

- Buffer de corrida (10X)

Tris base	15.10 g (Gibco)
Glicina	72.05 g (USB)

SDS	5 g (Biorad)
Agua desionizada	1000 ml

Disolver el tris y la glicina, ajusta el pH a 8.3 con HCL, agregar el SDS, disolver y llevar a 1L. Almacenar en refrigeración.

➤ Buffer de transferencia (10X)

Tris base	7.25 g
Glicina	36 g
Agua desionizada	500 ml

Ajustar el pH a 8.3 usando HCl. Tomar 100ml del buffer 10X y agregarle 200 ml de metanol y llevar a 1L.

➤ PBS (10X)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O fosfato monobásico monohidratado (PM 138)	26 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O fosfato bibásico (PM 142)	115 g
NaCl	85 g

Ajustar el pH a 7.2 – 7.5 usando NaOH o HCl, llevar a 1L.

➤ Solución de lavado PBS – Tween (0.05%)

PBS 10X	100 ml
Tween 20	0.5 ml
Agua desionizada	899.5 ml

Ajustar el pH a 7.2 – 7.4.

➤ Buffer de dilución y bloqueo

PBS –Tween 1X	1000ml
BSA	10 g

Ajustar el pH a 7.2 – 7.4

➤ Loading buffer 1X (para preparar 8 ml)

Tris – HCL 0.5 M, pH 6.8	1 ml
Glicerol	0.8 ml

2-mercaptoethanol 14.3 M	0.1 ml
SDS 10%	1.6 ml
Azul de bromofenol 0.05%	0.32 ml
Agua desionizada	4.18 ml

Guardar alícuotas de 1 ml de -25 a 15°C

➤ DNPH (1X)

Diluir 100 µl de DNPH (10X) en 900 µl de agua desionizada. Esta puede guardarse por 6 meses de 2 a 8°C.

➤ Solución control de derivatización (1X)

Diluir 100 µl de la solución control de derivatización (10X) en 900 µl de agua desionizada. Esta puede guardarse por 6 meses de 2 a 8°C.

➤ Solución de persulfato de amonio (Biorad) al 10%

Se pesa 100 mg y se diluye a un volumen final de 1 ml en agua desionizada, almacenar en refrigeración y protegido de la luz.

➤ TEMED N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina (Biorad)

➤ Membrana de difluoruro de polivinil (PVDF), immobilion-P Transfer, Millipore.

• **Preparación de los geles de acrilamida**

➤ Lavar los vidrios con jabón, secarlos bien con papel y pasarle papel swiper para quitar la pelusa que les queda.

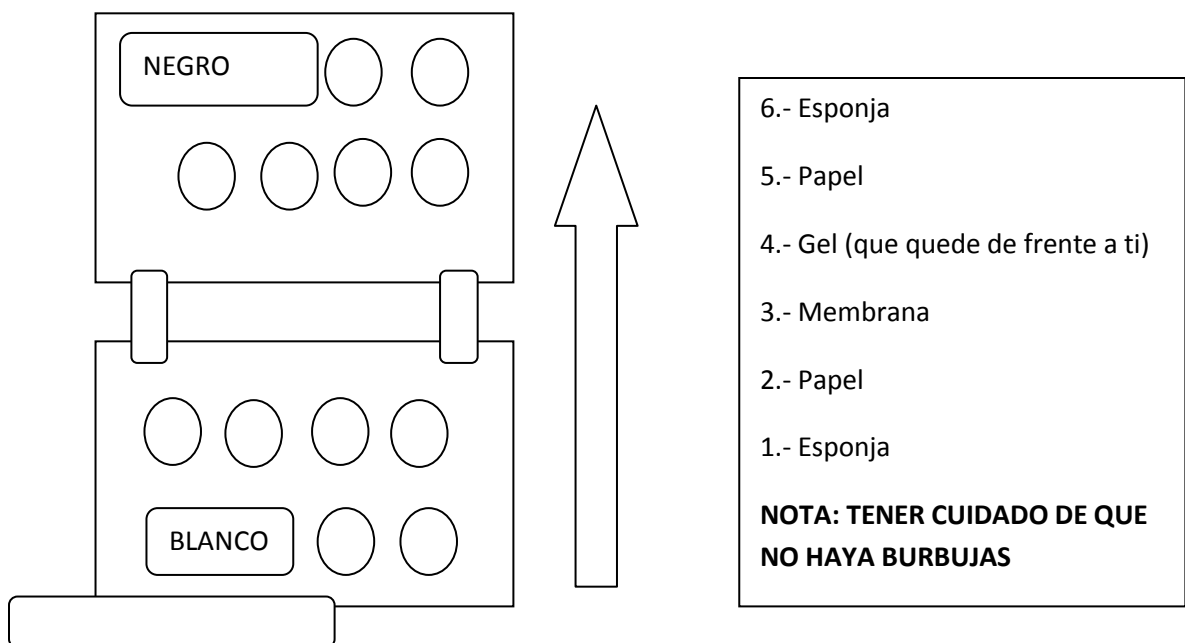
➤ Limpiar los peines y vidrios con etanol absoluto y secarlos con el papel swipes

➤ Montar los vidrios en el cassette, se pone el peine y se marca una línea de 0.5 cm de bajo del peine y se coloca el gel separador hasta la línea.

Reactivos	Gel separador (12.5%)	Gel concentrador (12.4)
-----------	-----------------------	-------------------------

	2 geles	2 geles
Agua	6.25 ml	4.0 ml
Acrilamida	7.5 ml	1.2 ml
Buffer	Lower 4.75 ml	Upper 1.775 ml
APS	280 $\mu$ l	112 $\mu$ l
Temed	12.5 $\mu$ l	20 $\mu$ l

- El gel separador se coloca en los vidrios, se pone un poco de isopropanol y se deja 20 min a que gelifique.
- Se quita el isopropanol, se pone el gel concentrador y se coloca el peine, dejar 20 min a que se gelifique.
- Una vez gelificado se quita el peine y se limpian bien los pozos con agua desionizada.
- Se monta en la cámara y se le coloca el buffer de corrida (1X) que cubran bien los pozos y se cargan las muestras, se deja correr a voltaje constante (100) por aproximadamente 2 horas.
- Cuando termina la electroforesis se le hace una muesca en la parte superior del gel para identificarlo, se coloca 20 min en el buffer de transferencia para equilibrarlo.
- Después de este tiempo el gel se coloca en la sandwichera de transferencia de la siguiente forma.



- 
- Cerrar la sandwichera y colocar el lado negro con la parte negra del soporte, colocar un gel congelado en la cámara y llenar toda la cámara con buffer de transferencia (1X) este tiene que estar frío (Guardarlo en el congelador a -2 °C), correr la transferencia a voltaje constante de 96 durante 2 horas.
- Al terminar la transferencia se corta la membrana al tamaño del gel y se tiñe con rojo de ponceau, se lava con PBS hasta que se destiña y se incuba por 1 hora con agitación con el buffer de dilución y bloqueo.
- Diluir el Anticuerpo primario 1:150 en buffer de dilución y bloqueo (preparar 3 ml para que la membrana quede bien inmersa, dejar incubar toda la noche a 4°C).
- Lavar la membrana 3 veces con solución de PBS-Tween 0.05% por 5 min.
- Diluir el anticuerpo secundario 1:300 en buffer de dilución y bloqueo (preparar 3 ml para que la membrana quede bien inmersa, dejar incubar por 2 horas a una temperatura de 25°C con agitación).
- Lavar la membrana 3 veces con solución de PBS-Tween 0.05% por 5 min.
- Eliminar el exceso de lavado y colocar la membrana en una bolsa de plástico con el lado donde están las proteínas hacia arriba, añadir 1ml de la mezcla de luminol e incubar por 2 min, tapanlo con la otra parte de la bolsa eliminando todas las burbujas y quitando el exceso de luminol.
- Colocar la membrana en el cassette y colocar una placa encima de la membrana por 20 min. Este tiempo puede variar dependiendo de las muestras.
- Sumergir la placa en la solución reveladora aprox 30 seg. sacarla y detectar el bandeo, (si no se detecta sumergirla nuevamente).
- Una vez detectado el bandeo se sumerge en agua para quitar el exceso de revelador.
- Finalmente sumergirla en la solución fijadora aproximadamente 3 min, enjuagarla y dejarla secar.