



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE ATENCIÓN MÉDICA
UMAE ESPECIALIDADES “DR. ANTONIO FRAGA MOURET”
CENTRO MEDICO NACIONAL “LA RAZA”**

**EFFECTO DEL LÍQUIDO DE DIÁLISIS EN LA EXPRESION DE LOS
TRANSPORTADORES DE GLUCOSA EN CELULAS MESOTELIALES DE
RATA**

T E S I S

P A R A O B T E N E R E L G R A D O D E :

E S P E C I A L I S T A E N N E F R O L O G I A

P R E S E N T A :



DR ARNULFO JESUS AVILA LEON
Asesor de la tesis:
D. en C. José Luis Reyes Sánchez.

MEXICO DF 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AUTORIZACIONES

Dr. Jesús Arenas Osuna
Jefe de Educación en Salud
Hospital de Especialidades CMN La Raza

Dr. Benjamín Vázquez Vega.
Jefe de Servicio de Nefrología
Hospital de Especialidades CMN La Raza

Arnulfo Jesús Ávila León

INDICE	Página
1 RESUMEN.....	4
2 ANTECEDENTES.....	6
3 METODOLOGIA.....	16
4 RESULTADOS.....	20
5 DISCUSION.....	31
6 CONCLUSIONES.....	34
7 BIBLIOGRAFIA.....	35

RESUMEN

Antecedentes: La diabetes y la hipertensión son las primeras causas de enfermedad renal crónica. La diálisis peritoneal es una terapia de sustitución de la función renal. La principal causa de pérdida de la cavidad abdominal para diálisis peritoneal es el deterioro de la ultrafiltración secundaria a esclerosis. Se dispone actualmente de soluciones de diálisis peritoneal con glucosa e icodextrina. Dentro de los cambios adaptativos que producen se incluyen: expresión de RNA mensajero para fibronectina y factor de crecimiento tumoral b1 (TGFb1), traslocación de acuaporina 1 (AQP-1) a la membrana plasmática, mayor producción de péptido C terminal de procolágeno tipo I (136%), y péptido terminal N de procolágeno tipo III (137%), producción de especies reactivas de oxígeno. En una etapa previa se presentan cambios en la expresión de los transportadores de glucosa. **Metodología:** Se obtuvieron células mesoteliales de rata Wistar por medio de pasajes celulares. Las células fueron divididas en grupos expuestos a medio de cultivo, solución de diálisis peritoneal con glucosa al 1.5% e icodextrina al 7.5 %. Se realizó inmunofluorescencia para transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2, SGLT1 y SGLT2. Se obtuvieron imágenes con microscopía confocal las cuales se analizaron con el programa Image proplus. **Resultados:** La solución glucosada incrementó la expresión de todos los transportadores a excepción de GLUT 1. La solución de icodextrina incrementó la expresión de únicamente SGLT2. **Conclusiones:** La solución de diálisis peritoneal con icodextrina al 7.5 % causa cambios menores en la expresión de transportadores de glucosa que la solución glucosada al 1.5 %.

ABSTRACT

Background: Diabetes and hypertension are the leading causes of chronic renal failure. Peritoneal dialysis is a for renal replacement function therapy. The main cause of cavity loss for PD peritoneal sclerosis. We dispose of glucose 1.5 % and icodextrin 7.5 % solutions for peritoneal dialysis. They cause adaptative changes like: RNA messenger expression for fibronectin and tumor growth factor, aquaporin traslocation and production of oxygen reactive species. A change in the expression of glucose transporters in a previous stage is needed. **Methods:** mesothelial cells of rat Wistar were grown. They were divided in groups exposed to peritoneal dialysis solutions (glucose 1.5 % and icodextrin 7.5 %) by thirty minutes. Immunofluorescence was done for GLUT 1, GLUT 2, SGLT 1 y SGLT 2. Images were obtained by confocal microscopy. The images were analyzed by the Image Proplus program. **Results:** The peritoneal dialysis solution with glucose caused overexpression in the glucose transporters, except GLUT1 which was underexpressed. The icodextrin solution increased the expression only in SGLT2. **Conclusions:** the icodextrin solution for peritoneal dialysis showed less biological effect in the glucose transporters expression.

ANTECEDENTES

El mesotelio cubre las cavidades peritoneal, pleural y pericárdica revistiendo los órganos internos y la pared torácica con capas visceral y parietal respectivamente. Comprende una capa de células similares a un epitelio la cual descansa en una membrana basal sostenida por tejido conectivo subseroso que contiene vasos sanguíneos, linfáticos, células inflamatorias y células similares a fibroblastos. La única función considerada tradicionalmente para el mesotelio es ofrecer una superficie lubricante protectora no adhesiva para facilitar el movimiento intracelómico. Sin embargo, actualmente se le considera una membrana con muchas funciones fisiológicas incluyendo el control de fluidos, transporte de solutos, vigilancia inmunológica y la producción de moléculas de matriz extracelular, proteasas, citocinas y factores de crecimiento¹.

El mesotelio peritoneal se encuentra bañado por fluido seroso parecido al ultrafiltrado del plasma y contiene proteínas, células de descamación, azúcares y varias enzimas incluyendo amilasa y lactato deshidrogenasa. El volumen y la composición del fluido de la serosa son indicativos de estados patológicos incluyendo la peritonitis y se conoce que la monocapa mesotelial responde como unidad única a la composición del fluido. Efectivamente, la reparación tisular comprende un incremento en la proliferación celular en sitios distantes a la lesión, sugiriendo una activación difusa del mesotelio en respuesta a los mediadores y células liberadas en el líquido seroso o por la vía de comunicación intercelular¹.

Embriológicamente el origen del mesotelio se observa a la final de la tercera semana de desarrollo fetal en el humano, cuando aparecen espacios en el mesodermo lateral. Se divide en dos partes: la capa intraembriónica somática o parietal y la capa intraembriónica esplácnica o visceral. Entre la semana 5 y 7, el celoma es subdividido en un proceso de septación en las futuras cavidades pericárdicas, pleural y peritoneal. En esta fase del desarrollo las capas mesoteliales y submesoteliales del celoma son nombradas pericardio, pleura y peritoneo respectivamente. Las células mesoteliales son originadas del mesodermo primitivo, pero comparten características de células epiteliales y mesenquimatosas.

En su estado plenamente diferenciado, estas células forman una monocapa de células predominantemente escamosas de 25 μm de diámetro con microvellosidades características y cilios ocasionales. Demuestran características epiteliales incluyendo forma poligonal, citoqueratina y filamentos intermedios y la habilidad de secretar componentes de la membrana basal. Sin embargo, también presentan características de células mesenquimales como la presencia de vimentina, desmina y α actina muscular. El análisis ultraestructural de células mesoteliales polarizadas muestra complejos de unión bien desarrollados incluyendo uniones estrechas, uniones adherentes, uniones gap y desmosomas. También expresan cadherinas E, N y P.

Además existen células mesoteliales cuboidales en algunas localizaciones que incluyen puntos “lechosos” del omento y la cara peritoneal del diafragma. Estas predominan al presentarse un daño o estímulo de la superficie serosa. A diferencia de las células escamosas, las células cuboidales presentan mitocondrias abundantes, retículo

endoplásmico rugoso, un aparato de Golgi bien desarrollado, microtúbulos y una mayor cantidad de microfilamentos que sugiere un metabolismo más activo¹.

El mesotelio provee una superficie epitelial resbaladiza y no adherente. Además participa en el mantenimiento de la homeostasis de serosas. Esto incluye el movimiento de fluidos y partículas a través de las cavidades serosas, la regulación de migración leucocitaria, síntesis de citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y moléculas de matriz extracelular, control de coagulación y fibrinólisis y presentación de antígenos¹.

Los pacientes que emplean diálisis peritoneal con solución glucosada presentan a largo plazo complicaciones tales como fibrosis peritoneal, hiperpermeabilidad de membrana y falla de ultrafiltración. En su estado basal las células peritoneales mesoteliales humanas tienen la capacidad de sintetizar varias proteínas de matriz extracelular como laminina, fibronectina, y colágeno tipo 1 y tipo 3. El alto contenido de glucosa estimula la expresión de RNA mensajero para fibronectina y factor de crecimiento tumoral $\beta 1$ (TGF $\beta 1$). También estimula la síntesis de novo de diacilglicerol, activación de la proteína cinasa C (PKC) y la generación de radicales libres de oxígeno².

Dentro de los cambios adaptativos de las células mesoteliales al ser expuestas a un ambiente con osmolaridad alta se presenta un incremento en la concentración intracelular de aminoácidos. Hasta un total de 20 diferentes tipos de aminoácidos incrementan su concentración intracelular, siendo los aminoácidos neutros los responsables del 81 % del mismo. Los principales aminoácidos de este grupo son glutamina, alanina, glicina, treonina y serina. Estos aminoácidos neutros incrementan su

concentración hasta 290 % tras 12 horas de exposición a hipertonidad³. El sistema A, un sistema importante de transporte de aminoácidos neutros, cambia su distribución celular encontrándose tanto a nivel apical como basal³.

Respecto a las acuaporinas, una alta concentración de glucosa genera una translocación de acuaporina 1 (AQP-1) a la membrana plasmática. El manitol causa el mismo efecto por lo que se sugiere la dependencia de la osmolaridad alta y no de la glucosa per se⁴.

Se han realizado experimentos con células mesoteliales peritoneales humanas expuestas a concentraciones de glucosa de 5.6 a 200 mmol/L. La concentración de 50 mmol/L activa de manera consistente a estas células, por lo que fue designada esta concentración como alta en glucosa. Comparada con la solución a 5.6 mmol/L, la solución a alta concentración de glucosa (50 mmol/L) causa una mayor producción de péptido C terminal de procolágeno tipo I (136%), y péptido terminal N de procolágeno tipo III (137%).

Asimismo, la solución alta en glucosa incrementó la expresión de RNA mensajero de TGFβ1 y fibronectina en 160% y 170% respectivamente. La expresión de RNAm para fibronectina en células mesoteliales de rata se incrementó 310 % frente al control al ser cultivadas por 6 días a concentración de 50 mmol de glucosa. Por su parte, Kumano reportó un incremento de la expresión de RNAm para TGFβ1 al 160 y 250% al ser cultivadas en concentraciones de 25 mmol/L y 50 mmol/L por 6 días. El uso de anticuerpos contra TGFβ1 anula la estimulación para la producción de fibronectina⁵.

También se ha reportado una mayor producción del péptido de procolágeno III N-terminal⁶.

El péptido quimiotáctico de monocitos 1 (MCP-1) es expresado por la mayoría de los tejidos y es responsable de la migración de monocitos a un tejido dado. La solución alta en glucosa incrementa la expresión de RNAm y la proteína de MCP-1 en células mesoteliales peritoneales humanas 140 y 150 % respectivamente².

Las especies reactivas de oxígeno (ROS: O₂, H₂O₂ y OH), son generadas por las células en respuesta a diversos estímulos. Actualmente se acepta que actúan como moléculas señaladoras activando proteína cinasas, factores de transcripción y expresión genética. La glucosa incrementa rápidamente la concentración de ROS de forma concentración dependiente. Los hallazgos sugieren que estas alteraciones son dependientes de la glucosa y su metabolismo directamente.

Los estudios sobre la electrofisiología y el transporte de glucosa transmesotelial han reportado un potencial de 0.54 ± 0.07 mV (positivo a nivel apical) y una resistencia de 20.4 ± 3.2 Ω cm². La permeabilidad para la D-glucosa reportada fue de 3.00 ± 0.26 cm/seg apical-basolateral y 3.25 ± 0.27 cm/seg basolateral-apical, sin diferencia importante frente al uso de L-glucosa. La mayoría del transporte de glucosa a nivel peritoneal es vía paracelular⁷.

Respecto a los transportadores de glucosa expresados en las células mesoteliales de células humanas, se conoce que son dependientes del grado de diferenciación celular. Se ha reportado la expresión de GLUT-1 y GLUT 3. La expresión del transportador SGLT-1 se observa tras la inducción de la diferenciación con bisacetamida de hexaetileno⁸. Respecto a la presencia de transportadores de glucosa en células de rata se han empleado la especie Sprague Dawley hallándose la presencia de

GLUT1 y GLUT 2 y la ausencia de SGLT. Asimismo, un ambiente alto en glucosa (a concentraciones de 75.5 y 214 mmol/L) disminuye la expresión de GLUT1 e incrementa la expresión de GLUT2⁹. Esta subregulación de la expresión de GLUT1 en ambiente con glucosa alta ha sido reportada en observaciones de otras poblaciones celulares¹⁰.

La glucosa sigue dos vías para su degradación durante el proceso de la diálisis: durante la esterilización por calor y el almacenamiento se forman los productos de degradación de glucosa (GDPs); la formación de productos de glucosilación avanzada (AGEs) por reacción no enzimática con grupos de aminoácidos. Algunos de los productos de degradación de glucosa relacionados son acetaldehído, glioxal, metilglioxal y furaldehído.¹¹ La glucosa junto con los productos de su degradación y los de glucosilación avanzada se han visto involucrados en el daño peritoneal asociado a la diálisis. Dentro de los receptores para productos de glucosilación avanzada expresados en células mesoteliales humanas se encuentran RAGE, AGE-R1, AGE-R2 y AGE-R3. Los GDPs incrementan la expresión de los receptores comentados de manera dependiente de su concentración. La interacción entre los receptores de GDPs y AGEs tiene relevancia biológica en la homeostasis intraperitoneal y la integridad de membrana¹². Algunos de los efectos celulares de estos GDPs son la inhibición del crecimiento celular, una menor viabilidad, la estimulación de la producción de IL-6 estimulada por IL-1¹¹, menor producción de proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), factores necesarios para montar una adecuada defensa a nivel mesotelial. La regeneración celular del mesotelio se ve afectada directamente por formaldehído y 3,4-desoxiglucosona-3-ene (3,4-DGE) de forma dosis dependiente (ambos GDPs)¹³. A nivel vascular, los GDPs favorecen un incremento en la producción de VEGF y en la angiogénesis¹⁴. El empleo de solución de diálisis baja en GDPs causa una menor

transferencia de masas de glucosa, menores niveles de TGF β , VEGF, menor grosor de matriz submesotelial y menor neoangiogénesis¹⁵. La forma de obtener solución peritoneal libre de GDPs es mediante la esterilización de la misma con filtración (a diferencia de esterilizar mediante uso de calor)¹⁶.

El incremento de la fibrosis mesotelial generada por alta concentración de glucosa puede verse disminuida con el uso de prednisona a concentraciones tan bajas como 1 μ mol (una reducción de la fibrosis del 83 %) como lo ha reportado Ogata¹⁷. Un efecto similar fue observado cuando el mismo investigador empleó un anticuerpo inhibidor selectivo de bFGF implicando directamente a esta citocina en el efecto fibroblástico. La solución glucosada, a diferencia de la solución con icodextrina, también genera una elevada producción del inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1) y del activador del plasminógeno tisular (t-PA), ambos implicados en la fibrogénesis en otros órganos¹⁸. El efecto es generado por la activación de la vía de la cinasa 1/2 regulada por señal extracelular (ERK 1/2). Otra vía para estos cambios es la vía PKC que involucra Rap1b y B-Raf, la cual es una nueva vía de señalización reportada¹⁹.

Styszynski²⁰ realizó un estudio empleando solución glucosada y manitol para determinar si los cambios observados en el mesotelio expuesto a glucosa dependen de la osmolalidad o del metabolismo de la misma. Se realizó diálisis peritoneal en ratas Wistar macho inicialmente con solución glucosada al 1.36% y posteriormente con soluciones a base de manitol y glucosa a 250 mmol/L. Las adhesiones peritoneales fueron más severas con el uso de manitol. Se obtuvo también mayor vascularización en el grupo de manitol. La densidad de células mesoteliales fue mayor en el grupo de

manitol. Se concluyó que los cambios en el peritoneo expuesto crónicamente a diálisis peritoneal dependen de efectos osmóticos y metabólicos.

Los altos niveles de glucosa causan un efecto deletéreo en el proceso de cicatrización de heridas a nivel mesotelial mediante la alteración de la vía de la cinasa de adhesión focal (FAK). Esto causa una menor migración mesotelial sobre fibronectina y menor formación de adhesiones focales. Los mismos efectos fueron vistos con el uso de manitol sugiriendo una participación de osmolaridad alta en el proceso²¹.

La exposición in vivo de la monocapa de células mesoteliales a altas concentraciones de glucosa finalmente resulta en la presencia de una población celular escasa compuesta por células en senectud, cerca del final de su ciclo de vida. Esta senectud celular queda definida por hipertrofia, multinucleación, baja densidad de población, baja prevalencia de mitosis, escasa viabilidad, así como un incremento del número de células en apoptosis²².

Por lo que respecta al uso de icodextrina, se ha observado que tras una exposición prolongada a la misma (30 días), la monocapa de células mesoteliales se ve poblada por células senescentes con cambios nucleares atípicos y mitosis atípica sugiriendo daño a nivel del ADN. Estos cambios se asocian a peroxidación lipídica que sucede inmediatamente después de la introducción de icodextrina a la cavidad abdominal²³.

Para el estudio de la membrana peritoneal se han empleado modelos animales (ratas cepa Wistar, Sprague-Dawley y conejos). La rata urémica se obtiene tras la resección de un 85 % del tejido renal, mientras que el modelo de peritonitis se obtiene al inyectar *Staphylococcus aureus* en la cavidad peritoneal. Se han definido modelos

específicos empleándose el modelo Estocolmo para la fisiología del transporte peritoneal y para la biocompatibilidad de soluciones de diálisis, el modelo Amsterdam para el estudio de quimiocinas y regeneración celular peritoneal in vivo y el modelo Gent para diálisis peritoneal crónica en ratas urémicas²⁴.

Al emplear estos modelos animales para determinar los cambios asociados al uso de diálisis peritoneal se ha observado que se incrementa el grosor del tejido submesotelial así como la densidad vascular, ambos efectos mediados por VEGF y TGF β . Se demuestra un incremento del flujo linfático. Se induce la producción de fibrosis y células mesoteliales altas. Todos estos resultados determinan la presencia de daño mesotelial, fibrosis submesotelial y neoangiogénesis asociados al uso de soluciones de diálisis²⁵.

Los cambios morfológicos asociados a diálisis crónica en ratas incluyen: el incremento del tejido conectivo submesotelial, su compartimentalización, alteración en la morfología de los fibroblastos, alteración de la organización de las fibras de colágeno e incremento del número de mastocitos presentes²⁶. A nivel celular, los cambios morfológicos de la transición epitelio-mesenquimatoso incluyen un retículo rugoso prominente con cisternas dilatadas, miofilamentos de actina de músculo liso llamativos, uniones gap frecuentes, depósito activa de matriz extracelular y formación de fibronexos²⁷.

Dentro de las terapias sugeridas para evitar la transición epitelio-mesenquimatoso de las células mesoteliales se ha sugerido el uso de antioxidantes como la N-acetil cisteína, la cual disminuye la expresión de actina de músculo liso alfa (α -SMA). La proteína-7 morfogenética de huesos (BMP-7) disminuye la expresión de

proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y de Smad 2/3. La rapamicina, por su parte, inhibe la vía mTOR del TNF- β ²⁸.

A nivel mundial, la diabetes y la hipertensión son las primeras causas de enfermedad renal crónica. La diálisis peritoneal, junto con la hemodiálisis, es una terapia de sustitución de la función renal. La principal causa de pérdida de la cavidad abdominal para diálisis peritoneal es la pérdida de la ultrafiltración secundaria a esclerosis peritoneal²⁹. Esta complicación es dependiente del tiempo presentándose en el 60 % de los pacientes a los 5 años de haberse iniciado la diálisis peritoneal.

El análisis de imagen por programas especializados ha sido empleado para valorar estudios de inmunofluorescencia previamente publicados³⁰. En el presente estudio, el análisis de imagen fue realizado por medio del programa Image Pro Plus.

METODOLOGIA

Objetivo.

Los objetivos de este estudio fueron: determinar la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2, SGLT1 y SGLT2 en células mesoteliales de rata en medio de cultivo estándar DMEM/F12. Determinar los cambios en la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2, SGLT1 y SGLT2 en células mesoteliales de rata expuestas a solución glucosada al 1.5%. Determinar los cambios en la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2, SGLT1 y SGLT2 en células mesoteliales de rata expuestas a solución glucosada e icodextrina. Comparar los cambios en la expresión de transportadores de glucosa entre el medio de cultivo y tras la exposición a solución de diálisis al 1.5 %, icodextrina al 7.5% en células mesoteliales de rata.

La investigación fue realizada en un laboratorio de las instalaciones del área de fisiología celular del CINVESTAV, del Instituto Politécnico Nacional.

Tipo de Estudio.

Se trató de un estudio transversal, comparativo. Al realizarse la observación directamente en cultivos celulares, no aplicaron características de los sujetos de estudio ni criterios de selección o tamaño de la muestra.

La diferencia entre las distintas soluciones de diálisis peritoneal se debe a las concentraciones de glucosa. En este caso, se empleó solución glucosada al 1.5% y solución con icodextrina al 7.5 %.

Se dispuso de la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1, GLUT2, SGLT1 y SGLT2, tanto en intensidad como en distribución a nivel celular mediante el uso de microscopio confocal y un programa de análisis de imagen (Image Pro plus).

Técnicas.

Recubrimiento de cajas de Petri con colágeno.

Se parte de una solución de colágeno de 1 mg/ml. Se hace una dilución de 1:10. Se agrega a caja multipozos 0.5 ml en cada pozo. Se deja secar toda la noche con la campana de flujo laminar funcionando hasta secado total.

Pasaje de Células.

Se lava la caja de Petri con las células mesoteliales de rata en 3 ocasiones con PBS sin calcio. Se deja con PBS de 3 a 5 minutos en incubadora. Se prepara un tubo de centrifuga de 50 ml con 4 ml de medio de cultivo DMEM/F12 enriquecido con suero fetal bovino al 20%. Se esteriliza caja de Petri multipozos con colágeno en micro ondas con 2 pases de un minuto cada uno. Se lavan una vez las cajas de colágeno usando medio de cultivo. Cuando las células se encuentren disgregadas se retira el PBS y se agregan 2 ml de tripsina al 0.25% con EDTA 0.5% de 1 a 3 minutos. Se aplica medio de cultivo en cajas receptoras. Se centrifugan las células en tubo de centrifuga a 1500 rpm por 3 minutos. Se aspira el sobrenadante. Se agrega medio de cultivo para resuspender las células. Se cuentan las células y se siembran 50,000 células en cada pozo. Se mantienen las células con 0.5 ml de medio de cultivo DMEM/F12 enriquecido con SFB al 20% en incubadora a 37° C en medio húmedo con una atmósfera con CO₂ al 5 %.

Exposición a soluciones de diálisis peritoneal.

Se obtienen 12 pozos de células mesoteliales. Los primeros 4 pozos se designan como grupo control. Los siguientes 4 pozos se destinan a exposición con solución de diálisis peritoneal con glucosa al 1.5%. Los últimos 4 pozos se destinan a exposición con solución de diálisis peritoneal basada en icodextrina al 7.5 %. Se aplican 0.5 ml del tratamiento comentado a cada grupo de estudio por una hora con incubación a 37° C en

medio húmedo a una atmósfera con CO₂ al 5 %. Al término del tratamiento se suministran 0.5 ml de medio de cultivo DMEM/F12 enriquecido con SFB al 20% y se dejan en incubadora a 37° C en medio húmedo con una atmósfera con CO₂ al 5 % hasta el inicio de la inmunofluorescencia.

Inmunofluorescencia.

Se incuban las multicámaras hasta que las células alcancen confluencia. Se hacen 2 lavados rápidos a las células con PBS filtrado. Se fija la monocapa celular a 4° C con metanol absoluto. Se lava 3 veces de 5 minutos cada uno con PBS en agitación suave. Se permeabilizan las células con 0.25 ml de Tritón X-100 en PBS por 15 minutos. Se hacen 2 lavados rápidos y 3 de 5 minutos en agitación suave con PBS. Se bloquean los sitios inespecíficos con 30 µl de albúmina sérica bovina al 0.5% a 4° C durante 30 minutos. Se aplican 30 µl del primer anticuerpo diluido en albúmina sérica bovina 1:100. Se deja incubar toda la noche a 4° C.

Se lava 3 veces con PBS filtrado durante 5 minutos cada uno en agitación suave. Se aplica el segundo anticuerpo, fluoresceinado, durante 60 minutos a 37° C cubriendo la preparación con papel aluminio. Se lava 3 veces con PBS filtrado durante 5 minutos cada uno en agitación suave. Se lava 3 veces con agua desionizada y filtrada durante 5 minutos cada uno en agitación suave. Se monta la preparación en un portaobjetos con 2.5 µl de vectashield y se sellan los lados de cada cubreobjetos con barniz. Se guardan las preparaciones a 4° C protegido de la luz hasta realizar la microscopia confocal.

Obtencion y analisis de datos

Las preparaciones se analizaron con el microscopio confocal Zeiss LSM510 empleando el ajuste estándar GFP y láseres para rojos lejanos. Se emplearán objetivos a 100 aumentos empleando aceite de inmersión. Las imágenes fueron adquiridas con un patrón en Z por etapas de 5 μm .

Se determinaron cambios en la distribución tanto nuclear como citoplásmica entre las distintas muestras.

Las imágenes fueron procesadas con el programa de análisis de imagen Image Pro Plus con lo que se obtuvo un análisis semicuantitativo. Se obtuvieron 3 valores: el primero correspondiente a pixeles activos (se considera al color negro de fondo de las imágenes como pixeles inactivos), el segundo corresponde al número de pixeles correspondientes a la marca de inmunofluorescencia específica para el transportador de glucosa analizado; el tercer valor corresponde al porcentaje de la marca positiva al transportador de glucosa analizado dentro de el número de pixeles positivos. Se presentaron los datos en tablas comparativas. Se realizó análisis estadístico con la prueba de la chi cuadrada.

RESULTADOS

Se obtuvieron las siguientes imágenes de inmunofluorescencia con marcadores específicos para los transportadores de glucosa:

Transportador de glucosa GLUT 1.

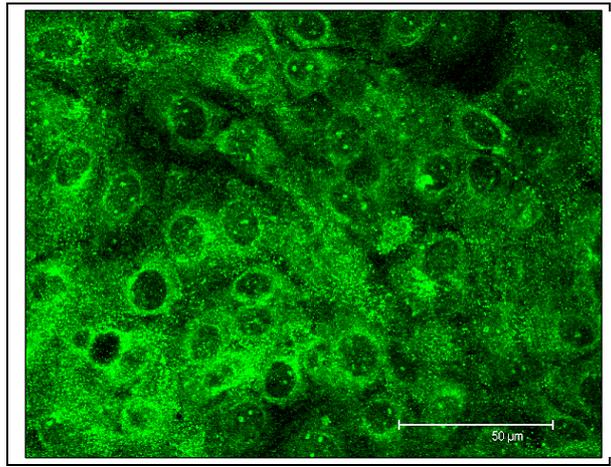


Figura 1. GLUT 1, células control.

Se puede observar fluorescencia específica para GLUT 1, con distribución homogénea membranal. No hay fluorescencia nuclear.

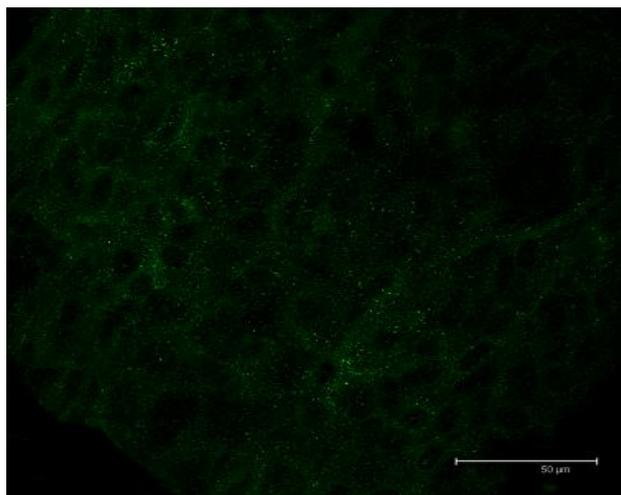


Figura 2. GLUT 1, células expuestas a solución para DP glucosa al 1.5%.

En este caso se puede observar una gran disminución de la fluorescencia y pérdida de su localización.

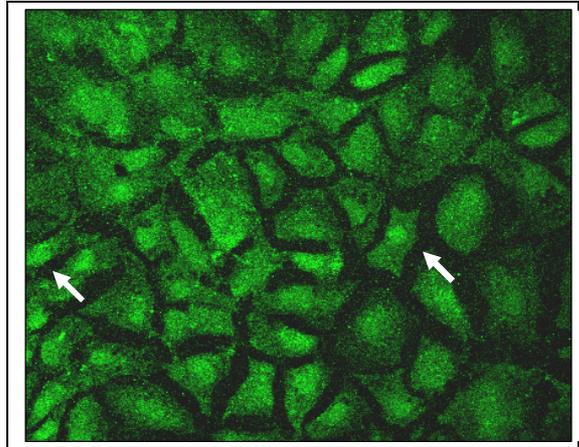


Figura 3. GLUT 1, células expuestas a solución para DP inodextrina al 7.5%.

Respecto al transportador estudiado, se conserva la distribución membranal y además aparece marca específica para GLUT 1 en núcleos (flechas). Al análisis de imagen se obtuvo un valor cercano al grupo control.

Transportador de glucosa GLUT 2.

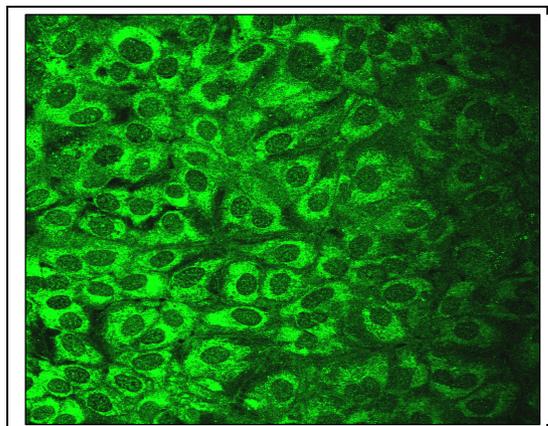


Figura 4. GLUT 2, células control.

La distribución de GLUT 2 es similar a la de GLUT 1. Está homogéneamente distribuida en la membrana y no hay marca nuclear.

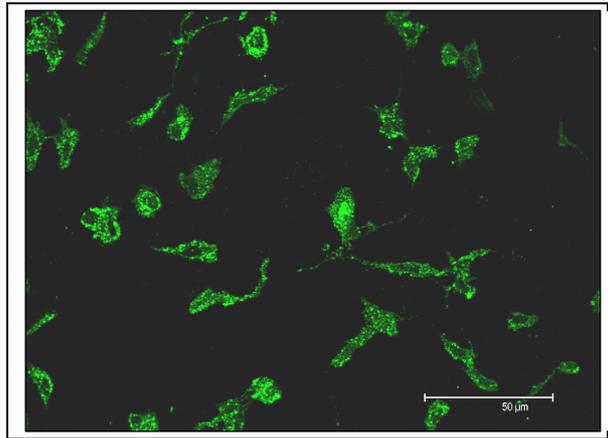


Figura 5. GLUT 2, células expuestas a solución para DP glucosa al 1.5%.

Hay cambio de la localización de la marca para GLUT 2, la distribución es irregular y la cantidad de marca está notablemente incrementada, ya que a pesar de su menor distribución y al espacio existente entre las células, la marca se encuentra más concentrada al análisis de imagen.

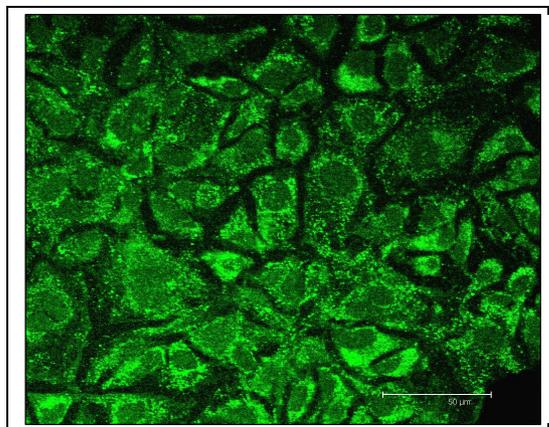


Figura 6. GLUT 2, células expuestas a solución para DP icodextrina 7.5%.

Se conserva la distribución membranal y a diferencia de GLUT 1 no se observa marca nuclear. Hay zonas de condensación de la marca para GLUT 2.

Transportador de glucosa SGLT 1.

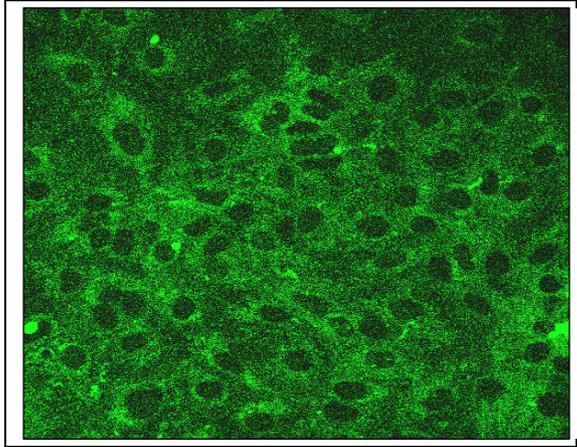


Figura 7. SGLT1, células control.

La marca para SGLT1 es similar que la marca para SGLT2.

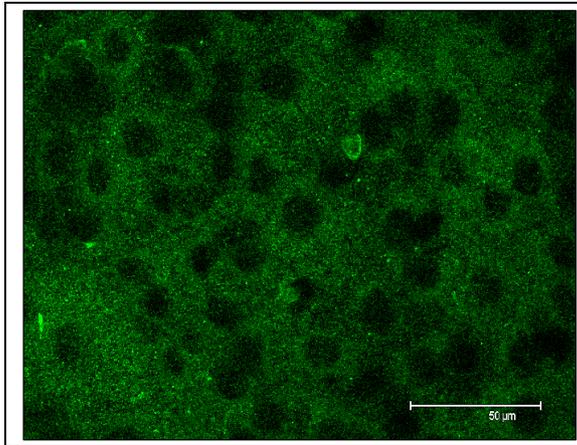


Figura 8. SGLT 1, células expuestas a solución para DP glucosa al 1.5%.

Se observa una disminución notable de la marca y las células aparecen edematosas.

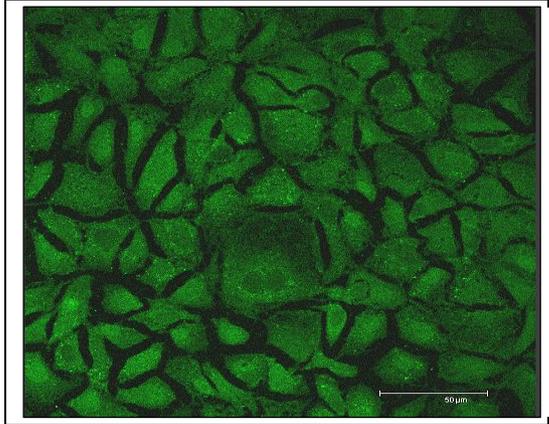


Figura 9. SGLT1, células expuestas a solución para DP icodextrina al 7.5%.

La marca es homogénea, a diferencia del control, en que aparecía puntiforme.

Además aparece en algunos núcleos.

Transportador de glucosa SGLT 2.

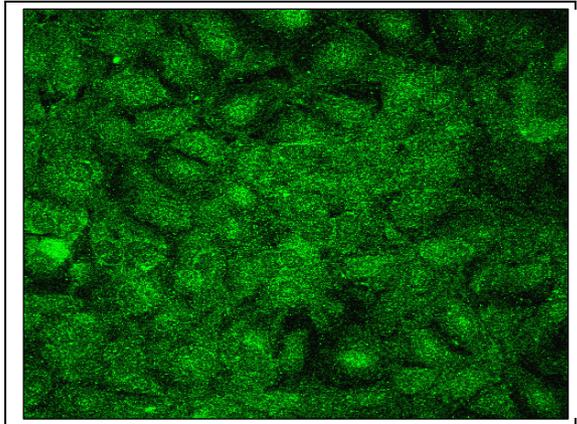


Figura 10. SGLT 2, células control.

Se presenta marca para SGLT2, con distribución homogénea puntual. Algunos núcleos muestran marca fluorescente.

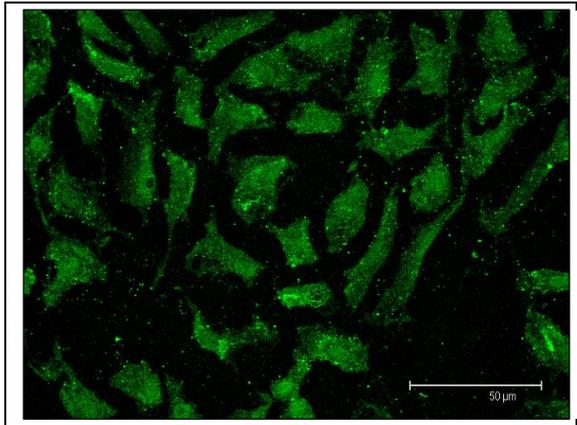


Figura 11. SGLT 2, células expuestas a solución para DP glucosa al 1.5%.

Se observa una redistribución de la marca fluorescente, la cual muestra un patrón menos puntiforme que en el control. Las células muestran separación entre ellas. Nuevamente, dada la concentración de la marca, aparece incremento de la misma al análisis de imagen.

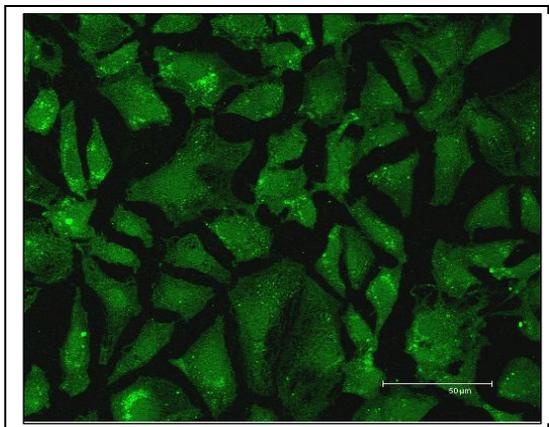


Figura 12. SGLT 2, células expuestas a solución de DP icodextrina al 7.5%.

El patrón de distribución es similar al de la dextrosa y también se observa separación entre las células.

A la observación de las imágenes quedan evidentes las siguientes situaciones: alteraciones en la morfología celular y de la distribución de la marca. En todos los casos de exposición de las células a soluciones de diálisis peritoneal se muestra un cambio en

la arquitectura celular consistente en pérdida del patrón pavimentoso y agregado del grupo celular y cambios celulares específicos tales como elongación y/o retracción celular, aspecto edematoso, así como evidente pérdida de la unión intercelular demostrado por los espacios intercelulares. Sobre esto último, corresponde directamente a un menor número de pixeles activos que se demuestra más adelante en el análisis de imagen con el programa especializado.

Al comparar las imágenes, es aparente una menor alteración de la arquitectura celular en los casos en que se realizó exposición a solución de icodextrina. Sin embargo, ambas soluciones de diálisis causaron alteración en la distribución celular de la marca para los transportadores orientándose la misma hacia un patrón nuclear.

Resultados de análisis de imagen.

A continuación se presentan las tablas comparativas que muestran los pixeles activos, aquellos positivos a la marca y el porcentaje correspondiente a la marca dentro de los pixeles activos.

	GLUT1	GLUT 1	GLUT 1	GLUT 2	GLUT 2	GLUT 2
	Control	Glucosa	Icod	Control	Glucosa	Icod
Pixeles activos	28736	17343	29695	17404	3869	27948
Pixeles marca	2111	348	3801	1194	1052	1909
Porcentaje	7.43	2	12	6.86	27.19	6.83

Tabla 1. Transportadores de glucosa basolaterales.

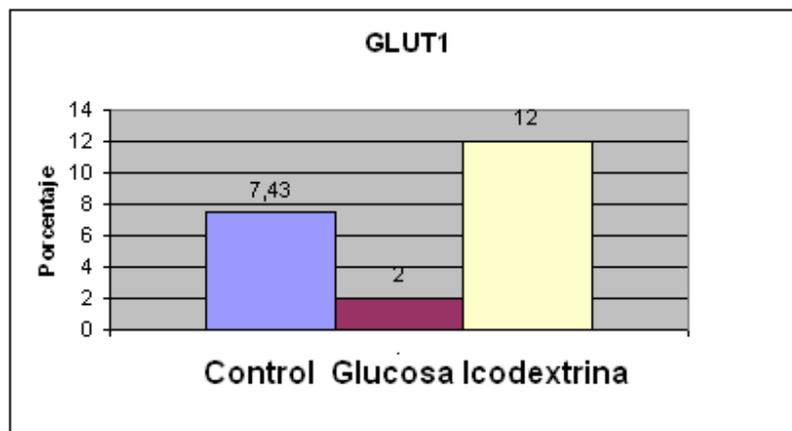
	SGLT1	SGLT 1	SGLT1	SGLT2	SGLT2	SGLT2
	Control	Glucosa	Icod	Control	Glucosa	Icod
Pixeles activos	31749	15069	28530	28291	19921	23595
Pixeles marca	1560	225	1468	753	1202	1646
Porcentaje	4.91	1.49	5.14	2.66	6.03	6.97

Tabla 2. Transportadores de glucosa apicales.

*Icod: icodextrina.

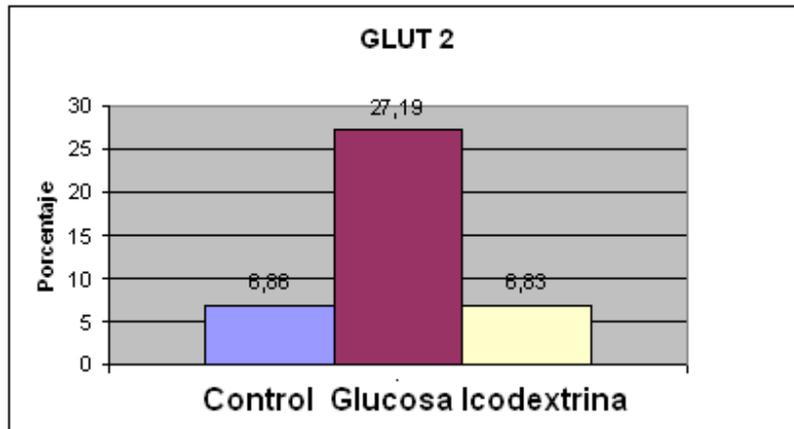
En todos los casos (a excepción de los valores obtenidos para GLUT 2) se observa una cifra similar entre la imagen control y la correspondiente a la exposición a solución con icodextrina.

Respecto a los porcentajes positivos para la marca, se presentan las siguientes gráficas comparativas:



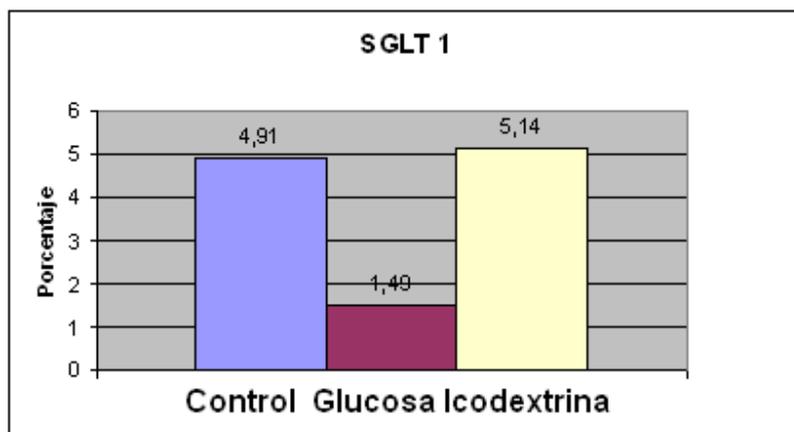
Gráfica 1. Transportador de glucosa GLUT1.

Se muestra una disminución importante de la expresión del transportador GLUT1 tras la exposición a solución glucosada. La cifra correspondiente a icodextrina es similar al grupo celular control, sugiriendo menor cambio en la expresión del transportador de glucosa estudiado.



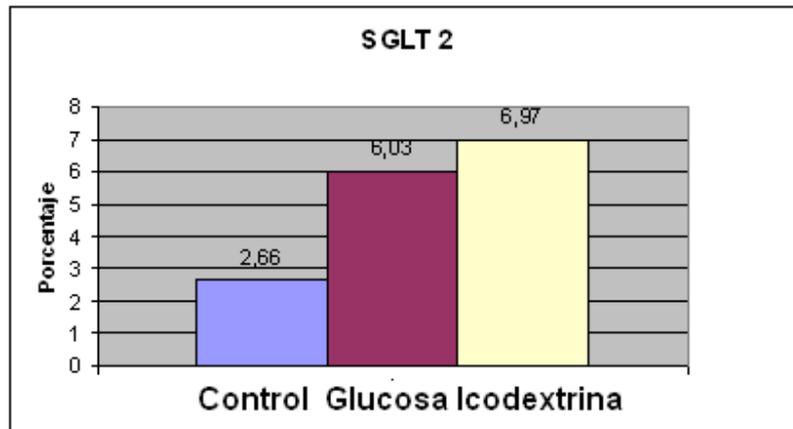
Gráfica 2. Transportador de glucosa GLUT 2.

Se observa una muy amplia diferencia positiva respecto al control en el grupo celular expuesto a solución glucosada, lo que se añade además al menor número de píxeles activos que corresponde a una amplia disgregación celular. Ambos datos muestran tanto una mayor expresión del transportador estudiado como mayor alteración en la morfología celular. Las cifras correspondientes al grupo control e icodextrina son muy similares.



Gráfica 3. Transportador de glucosa SGLT 1.

En este caso, a semejanza de lo que ocurrió en el caso de GLUT 1, se observa una menor expresión del transportador estudiado al ser expuesto a solución glucosa 1.5%. Nuevamente las cifras correspondientes a la expresión del transportador son similares en los casos del grupo control e icodextrina.



Gráfica 4. Transportador de glucosa SGLT 2.

En este caso se observa una mayor expresión del transportador con ambos tipos de solución para DP, sugiriendo la misma capacidad para ambas soluciones ya que las cifras obtenidas son similares.

De lo anteriormente expuesto, no cabe duda que, a excepción de los resultados obtenidos con el transportador SGLT 2, se presentó una alteración numérica pronunciada del porcentaje de las imágenes positivo a la marca con las células expuestas a las soluciones de DP con solución gluocsa al 1.5% respecto al grupo control, no así en el caso de las células expuestas a icodextrina.

Análisis estadístico.

Se realizó el análisis estadístico con la prueba de la chi cuadrada.

Transportador	Control	Glucosa 1.5 %	Icodextrina 7.5%	P
GLUT 1	7.43	2	12	0.010
GLUT 2	6.86	27.19	6.83	0.00001
SGLT 1	4.91	1.49	5.14	0.0001
SGLT 2	2.66	6.03	6.97	0.0001

Tabla 3. Análisis estadístico. Prueba de la Chi cuadrada.

Se observa diferencia significativa para todos los transportadores, excepto para GLUT 1.

DISCUSION

Se han comentado anteriormente los eventos celulares observados tras la exposición de las células mesoteliales a soluciones altas en glucosa, todos ellos desencadenantes de procesos inflamatorios y profibróticos con un desenlace común: esclerosis peritoneal con pérdida de la cavidad para su empleo en la diálisis peritoneal. Pero poco se ha estudiado del evento que precede a los anteriores: el cambio en la expresión de los transportadores de glucosa. Asimismo, se han publicado diversos artículos que refieren la mayor biocompatibilidad que presenta la solución de icodextrina dado el menor daño que causa a la membrana peritoneal.

El presente estudio sugiere que, efectivamente, existen cambios en la expresión de los transportadores de glucosa tras la exposición de las células mesoteliales a las soluciones de diálisis peritoneal, especialmente en el caso de la solución glucosa al 1.5%. Dichos cambios son menos pronunciados tras la exposición de las células a solución de icodextrina.

En todos los casos se observó la expresión, junto con cambios de la misma, de los cuatro transportadores de glucosa estudiados determinándose la presencia de los mismos en las células mesoteliales de la rata de laboratorio raza Wistar.

En el caso del transportador GLUT 1, se observó una expresión a la baja tras la exposición a solución con glucosa. Este resultado se encuentra de acuerdo con lo anteriormente publicado en la literatura. También las publicaciones han comentado una expresión a la baja del transportador de glucosa GLUT 2 tras la exposición a glucosa, información consistente con los resultados obtenidos en este experimento.

Respecto a los transportadores apicales (SGLT 1 y 2), la información obtenida en la literatura es aún más escasa, indicando que solo tras la inducción con compuestos

químicos se observa la expresión de los mismos en las células humanas. Sin embargo, en el presente estudio se observó su expresión, así como cambios biológicos, de ambos transportadores de glucosa. En el caso de SGLT 1, los cambios obtenidos fueron similares a lo que aconteció con GLUT 1: una expresión a la baja. En el caso de SGLT 2 hubo una mayor expresión del transportador independiente del tipo de la solución de diálisis empleada.

Debemos tener en cuenta que la solución de diálisis peritoneal con icodextrina presenta características especiales. A pesar de ser un polímero de glucosa no presenta la misma estructura y, por lo tanto, no necesariamente la misma actividad biológica. Así pues no debemos esperar (como se demostró en el presente estudio) una misma actividad biológica, ni siquiera en los cambios esperados en la expresión de los transportadores de glucosa. Dicha información sugiere que los escasos cambios de la expresión de transportadores de glucosa son uno de los pilares que sostienen la mayor biocompatibilidad de la solución con icodextrina. Este es uno de los principales hallazgos de este estudio.

Por lo tanto, los mayores cambios en la expresión de transportadores de glucosa tras la exposición de los grupos celulares a solución con glucosa al 1.5% tal vez sean la base de su menor biocompatibilidad con la membrana peritoneal y el evento desencadenante de los cambios proinflamatorios y profibróticos comentados en secciones anteriores.

Otro elemento muy importante a tener en cuenta en las soluciones de diálisis peritoneal es el efecto independiente de la existencia de glucosa en las soluciones de diálisis: el efecto osmolar. Tenemos que cualquier solución glucosada es hiperosmolar frente a la osmolaridad sérica, caso contrario el de la icodextrina la cual es isoosmolar.

Se sabe que la icodextrina causa ultrafiltración por sus efectos coloides (ultrafiltración coloide). Por lo tanto, se sospecha que en el caso del transportador de glucosa SGLT 2, cuya expresión fue superior con ambas soluciones de diálisis peritoneal, sea consecuencia del efecto osmolar (de ambas soluciones) y/o coloide (de la solución de icodextrina). Se observan mayores efectos en 3 de los 4 transportadores de glucosa con la solución a base de glucosa. Por otra parte, con ambas soluciones se observan cambios en la morfología celular quedando el camino libre para la obtención de una solución de diálisis más biocompatible que ambas.

CONCLUSIONES

La solución de diálisis peritoneal con glucosa al 1.5 % causó una expresión a la baja del transportador de glucosa GLUT 1.

La solución de diálisis peritoneal con glucosa al 1.5 % causó una expresión a la alza del transportador de glucosa GLUT 2.

La solución de diálisis peritoneal con glucosa al 1.5 % causó una expresión a la baja del transportador de glucosa SGLT 1.

La solución de diálisis peritoneal con glucosa al 1.5 % causó una expresión a la alza del transportador de glucosa GLUT 2.

La solución de diálisis peritoneal con icodextrina al 7.5% no causó cambios en la expresión del transportador de glucosa GLUT 1.

La solución de diálisis peritoneal con icodextrina al 7.5% no causó cambios en la expresión del transportador de glucosa GLUT 2.

La solución de diálisis peritoneal con icodextrina al 7.5% no causó cambios en la expresión del transportador de glucosa SGLT 1.

La solución de diálisis peritoneal con icodextrina al 7.5% causó una expresión a la alza del transportador de glucosa SGLT 2.

BIBLIOGRAFIA

1. Sarah E. Herrick , Steven E. Mutsaers. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (2004) 621–642.
2. Hunjoo Ha and Hi Bahl Lee. Effect of high glucose on peritoneal mesothelial cell biology. *Peritoneal Dialysis International*, Vol. 20, Suppl. 2. S-15-S18.
3. Masaru Horio, Atsushi Yamauchi, Yasuko Matsuoka, Toshiki Moriyama, Megumu Fukunaga, Enyu Imai, and Yoshimasa Orita. Effect of hypertonic stress on amino acid levels and system A Activity in rat peritoneal mesothelial cells. *Peritoneal Dialysis International*, Vol. 19, pp. 124–130.
4. Shingo Kuboshima, Goichi Ogimoto, Tsutomu Sakurada, Tomoya Fujino, Takeo Sato, Takashi Yasuda, Teruhiko Maeba, Shigeru Owada, Masashi Ishida. Hyperosmotic Stimuli Induces Recruitment of Aquaporin-1 to Plasma Membrane in Cultured Rat Peritoneal Mesothelial Cells. *Adv Perit Dial.* 2001; 17:47- 52.
5. James F. Medcalf, Jhon Walls, Izabella Z. A. Pawluczyk, Kevin P. G. Harris. Effects of glucose dialysate on extracellular matrix production by human peritoneal mesothelial cells (HPMC): the role of TGF β . *Nephrology Dialysis Transplantation* (2001) 16: 1885-1892.
6. Hunjoo Ha, Mi Kyung Cha, Hoo Nam Choi, and Hi Bahl Lee. Effects of peritoneal dialysis solutions on the secretion of growth factors and extracellular matrix proteins by human peritoneal mesothelial cells. *Peritoneal Dialysis International*, Vol. 22, pp. 171–177.

7. Fu Keung Li, Chi Ho To, Jack Kok Hung Leung, Tak Mao Chan, and Ka Neng Lai. Electrophysiology and glucose transport of human peritoneal mesothelial cells: implications for peritoneal dialysis. *Peritoneal Dialysis International*, Vol. 21: 115–121.
8. Schröppel B, Fischereder M, Wiese P, Segerer S, Huber S, Kretzler M, Heiss P, Sitter T, Schlöndorff D. Expression of glucose transporters in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney International*. 53 (1998): 1278-1287.
9. Lu C, Ye R, Yang Q, Yang X, Li H, Li Y. Gene expression of glucose transporters and its regulation by glucose in mesothelial cells. *Chinese Medical Journal*; 114(5): 477-480.
10. Amira Klip, L Theodoros Tsakiridis, S Andre Marette, And Phillip A. Ortiz. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEBJ*. 8: 43-53.
11. Janusz Witowski, Katarzyna Korybalska, Justyna Wisniewska, Andrzej Breborowicz, Gerhard M. Gahl, Ulrich Frei, Jutta Passlick-Deetjen, And Achim Jorres. Effect of Glucose Degradation Products on Human Peritoneal Mesothelial Cell Function. *J Am Soc Nephrol* 11: 729–739.
12. K. N. Lai, J. C. K. Leung, L. Y. Y. Chan, F. F. K. Li, S. C. W. Tang, M. F. Lam, K. C. Tse, T. P. Yip, T. M. Chan, A. Wieslander† & H. Vlassara. Differential expression of receptors for advanced glycation end-products in peritoneal mesothelial cells exposed to glucose degradation products. *Clin Exp Immunol* 2004; 138:466–475.
13. Llinos W. Morgan, Anders Wieslander, Malcolm Davies, Takashi Horiuchi, Yuji Ohta, M. Janine Beavis, Kathryn J. Craig, John D. Williams, Nicholas Topley.

Glucose degradation products (GDP) retard remesothelialization independently of d-glucose concentration. *Kidney International*, Vol. 64 (2003), pp. 1854–1866.

14. Sun-Hee Park, Eun-Gyui Lee, In-San Kim, Yong-Jin Kim, Dong-Kyu Cho, and Yong-Lim Kim. Effect of glucose degradation products on the peritoneal membrane in a chronic inflammatory infusion model of peritoneal dialysis in the rat. *Peritoneal Dialysis International*, 24, pp. 115–122.

15. Chan-Duck Kim, Hyeog-Man Kwon, Sun-Hee Park, Eun-Joo Oh, Mi-Hyung Kim, Soon-Youn Choi, Min-Jeong Choi, In-San Kim, Min-Sun Park, Yong-Jin Kim, and Yong-Lim Kim. Effects of Low Glucose Degradation Products Peritoneal Dialysis Fluid on the Peritoneal Fibrosis and Vascularization in a Chronic Rat Model. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 11(1):56–64.

16. Janusz Witowski, Thorsten O. Bender, Gerhard M. Gahl, Ulrich Frei, Achim Jörres. Glucose degradation products and peritoneal Membrane function. *Peritoneal Dialysis International*, Vol. 21: 201–205.

17. Satoshi Ogata, Noriaki Yorioka, Nobuoki Kohno. Glucose and Prednisolone Alter Basic Fibroblast Growth Factor Expression in Peritoneal Mesothelial Cells and Fibroblasts. *J Am Soc Nephrol* 12: 2787–2796, 2001.

18. Masahira Katsutani, Takafumi Ito, Takao Masaki, Nobuoki Kohno, and Noriaki Yorioka. Glucose-Based PD Solution, But Not Icodextrin-Based PD Solution, Induces Plasminogen Activator Inhibitor-1 and Tissue-Type Plasminogen Activator in Human Peritoneal Mesothelial Cells via ERK1/2. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 11(2):94–100.

19. Sun Lin, Atul Sahai, Sumant S. Chugh, Xiaomin Pan, Elisabeth I. Wallner, Farhad R. Danesh, Jon W. Lomasney, and Yashpal S. Kanwar. High Glucose Stimulates

Synthesis of Fibronectin via a Novel Protein Kinase C, Rap1b, and B-Raf Signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277, No. 44, Issue of November 1, pp. 41725–41735, 2002.

20. Arkadiusz Styszynski, Beata Kwiatkowska, Katarzyna Wieczorowska–Tobis, Andrzej Breborowicz, Dimitrios G. Oreopoulos. Glucose and Mannitol Have Different Effects on Peritoneal Morphology in Chronically Dialyzed Rats. *Advances in Peritoneal Dialysis*, Vol. 19, 2003: 15-27.

21. Masahito Tamura, Akihiko Osajima, Shingo Nakayamada, Hirofumi Anai, Narutoshi Kabashima, Kaori Kanegae, Takayuki Ota, Yoshiya Tanaka, Yasuhide Nakashima. High glucose levels inhibit focal adhesion kinase-mediated wound healing of rat peritoneal mesothelial cells. *Kidney International*, Vol. 63 (2003), pp. 722–731.

22. Lazaro Gotloib, Avshalom Shostak, Valery Wajsbrot. Effects of osmotic agents upon the *in vivo* exposed mesothelial monolayer. *Peritoneal Dialysis International*, Vol. 20, Suppl. 2. S11-S14.

23. Lazaro Gotloib, Valery Wajsbrot, Avshalom Shostak. Icodextrin-Induced Lipid Peroxidation Disrupts The Mesothelial Cell Cycle Engine. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 34, No. 4, pp. 419–428, 2003.

24. Norbert Lameire, Wim Van Biesen, Tao Wang, Jonas Bergström. Experimental models in peritoneal dialysis: a European experience. *Kidney International*. 54 (1998): 2194-2206.

25. Barbara Musi, Magnus Braide, Ola Carlsson, Anders Wieslander, Ann Albrektsson, Markus Ketteler, Ralf Westenfeld, Jürgen Floege, and Bengt Rippe. Biocompatibility of peritoneal dialysis fluids: Long-term exposure of nonuremic rats. *Peritoneal Dialysis International*, Vol. 24, pp. 37–47.

26. Katarzyna Wieczorowska-Tobis, Renata Brelinska,¹ Andrzej Breborowicz, Dimitrios G. Oreopoulos². Morphologic Aspects Of Chronic Peritoneal Dialysis In A Rat Model. *Peritoneal Dialysis International*, Vol. 21 (2001), Supplement 3. S-342-S344.
27. An Hang Yang, Jinn Yang Chen, And Jen Kou Lin. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney International*, Vol. 63 (2003), pp. 1530–1539.
28. Hi Bahl Lee, Hunjoo Ha. Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition of Peritoneal Mesothelial Cells During Peritoneal Dialysis. *Korean Med Sci* 2007; 22: 943-5.
29. Wang T, Qureshi AR, Heimbürger O, Waniewski J, Bergström J, Lindholm B. *Perit Dial Int*. Daily exposure to dialysis fluid results in changes in peritoneal transport. 1997 Jul-Aug;17(4):379-86.
30. Ogawa T, Hayashi T, Kyoizumi S, Kusunoki Y, Nakachi K, MacPhee DG, Trosko JE, Kataoka K, Yorioka N.. Anisomycin downregulates gap-junctional intercellular communication via the p38 MAP-kinase pathway. *Journal of Cell Science*. 2004. 117, 2087-2096.