



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
FACULTAD DE MEDICINA

“ESTRUCTURA Y FUNCION DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES  
DE PACIENTES EN DIALISIS PERITONEAL CONTINUA AMBULATORIA  
(DPCA) CON TRANSPORTE PERITONEAL ALTO Y BAJO”

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA  
JESÚS MANOLO RAMOS GORDILLO

TUTORES  
DR. ALEJANDRO PÉREZ LÓPEZ  
DR. JOSE LUIS REYES SÁNCHEZ  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MEXICO. MAYO 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Investigadores Colaboradores:

Q.F.B. Elsa Sánchez Montes de Oca

Q.F.B. María del Carmen Namorado Tónix

Laboratorio de Fisiología Renal  
Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias  
Centro de Investigación y Estudios Avanzados  
Instituto Politécnico Nacional

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida. Le agradezco a mi esposa Nora y mis hijas Norita y Mariana así como a mis Padres y toda mi familia por estar siempre presentes.

Mi profundo agradecimiento a todas las autoridades y personal que laboran en el Laboratorio de Fisiología Renal del Centro de Investigación y Estudio Avanzados (CINVESTAV), EN ESPECIAL AL Dr. José Luis Reyes Sánchez y a las Químicas Elsa Sánchez Montes de Oca y Carmen Namorado Tónix, por confiar en mí, abrirme las puertas y apoyarme en todo lo que necesité. De igual manera mis agradecimientos a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto Mexicano del Seguro Social por ser pilares en mi formación académica. Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento al Dr. Alejandro Pérez López, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo

## **INDICE GENERAL**

|  |    |
|--|----|
| 1.- RESUMEN  | 6  |
| 2.- Introducción   | 7  |
| 3.- Hipótesis  | 12 |
| 4.- Objetivo General   | 13 |
| 4.1 Objetivos Específicos  | 13 |
| 5. Material y Métodos  | 14 |
| 5.1 Colección del líquido de diálisis y obtención de muestra   | 14 |
| 5.2 Optimización del método de cultivo   | 15 |
| 5.3 Identificación de las células mesoteliales   | 15 |
| 5.3.1 Inmunofluorescencia  | 16 |
| 5.3.2 Microscopia electrónica de barrido (MEB)   | 16 |
| 5.4 Determinación de la resistencia eléctrica transepitelial   | 17 |
| 5.5 Formación de Domos por las células mesoteliales  | 17 |
| 5.6 Análisis Estadístico   | 18 |
| 6.- Resultado  | 18 |
| 6.1 Identificación de las células mesoteliales por mes   | 19 |
| 6.2 Identificación de las células mesoteliales por inmunofluorescencia   | 19 |
| 6.3 La distribución de Claudina 2 en cultivos de transportadores altos esta localizada en los bordes celulares | 19 |
| 6.4 Análisis con microscopia electrónica de barrido (MEB)  | 20 |
| 6.5 La resistencia electrónica transepitelial fue diferente entre los transportadores altos y los bajos        | 20 |
| 6.6 La formación de domos es mayor en las células de transportadores bajos que en los de transportadores altos | 21 |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 7.- Discusión            | 22 |
| 8.- Conclusión           | 29 |
| 9.- Recursos Financieros | 29 |
| 10.- Bibliografía        | 30 |
| 11.- Tablas y Figuras    | 35 |

## 1.- RESUMEN

### ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES DE PACIENTES EN DIÁLISIS PERITONEAL CONTINUA AMBULATORIA (DPCA) CON TRANSPORTE PERITONEAL ALTO Y BAJO.

**Introducción:** La integridad anatómica y funcional de las células mesoteliales (CM) es esencial para una diálisis peritoneal adecuada. En este trabajo se estudiaron las características morfológicas y funcionales de las CM, obtenidas a partir de líquido de diálisis de pacientes en diálisis peritoneal ambulatoria continua (DPCA), con transporte peritoneal alto o bajo (TA) (TB). El estudio se centró en evaluar la distribución de las proteínas de las uniones estrechas (claudina 2) y su relación con la permeabilidad de las monocapas de CM.

**Material y métodos:** El líquido de diálisis obtenido de quince pacientes en DPCA se centrifugó, posteriormente se aislaron y cultivaron las células mesoteliales. Se identificó citoqueratina-8, vimentina, aquaporina-1 y claudina 2 en las células por inmunofluorescencia. Las microvellosidades y los cilios se identificaron mediante análisis de microscopía electrónica de barrido. También se midieron las resistencias eléctricas transepiteliales (RET). Así como, la formación de domos se evaluó para estimar el transporte agua.

**RESULTADOS** La expresión de claudina 2 (proteína observada en epitelios altamente permeables) se localizó claramente en los bordes de las CM de TA, mientras que en el TB se observó en el borde celular, con un patrón discontinuo, y también en el citosol. De acuerdo con la distribución diferencial de la claudina 2, la RET fue mayor en transportadores bajos que en altos. Los domos fueron más abundantes en las CM de transporte bajo que en los de alto transporte. El número de CM fue  $380 \times 10^3$  células / ml y  $160 \times 10^3$  células / ml ( $p > 0.02$ ) en soluciones de diálisis de transportadores bajos y altos, respectivamente. La presencia de citoqueratina 8, vimentina, aquaporina 1, cilios y microvellosidades confirmaron el fenotipo mesotelial de MC, en TA y TB.

**CONCLUSIONES.** Las CM en cultivo conservan sus características morfológicas y, funcionales. La presencia de claudina 2 en CM sugiere que podría estar participando en las diferencias de permeabilidad peritoneal observadas entre TA y TB.

**Palabras clave:** claudina, células mesoteliales, diálisis peritoneal, aquaporina 1, citoqueratina 8, resistencia eléctrica transepitelial.

## 2.- INTRODUCCIÓN:

La función principal del peritoneo es reducir la fricción entre las vísceras de la cavidad abdominal. Sin embargo, su capacidad de membrana semi-permeable es útil para el intercambio de líquidos y solutos como la urea, la creatinina y electrolitos entre los capilares peritoneales y la cavidad abdominal en el proceso de diálisis peritoneal en pacientes con enfermedad renal aguda o crónica<sup>1</sup>.

El peritoneo está formado por distintas estructuras: células mesoteliales (CM), tejido conectivo, macrófagos, fibroblastos, adipocitos, capilares, linfáticos y fibras nerviosas<sup>2</sup> que en conjunto juegan un papel importante en el mantenimiento de la anatomía y fisiología peritoneal, todas ellas a través de la liberación de múltiples sustancias como: fosfolípidos, colágeno, elastina, proteoglicanos, fibronectina, interleucinas, factores de crecimiento y prostaglandinas modifican continuamente las propiedades fisicoquímicas del peritoneo<sup>3</sup>.

La membrana peritoneal está recubierta por una monocapa de CM, que poseen características de células epiteliales, y actúan como barrera de permeabilidad entre la cavidad abdominal y los capilares peritoneales<sup>4</sup>. Por microscopia electrónica de barrido (MEB), las CM exhiben un núcleo alargado, citoplasma escaso, pocos organelos y abundantes micro vellosidades en su superficie, así como cilios, que incrementan el área de superficie de contacto en el peritoneo para facilitar el intercambio entre las células y el líquido peritoneal<sup>5</sup>. Además, las CM expresan proteínas como: citoqueratina-8 y vimentina que son componentes estructurales del citoesqueleto, y fibronectina, las cuales las distinguen de los fibroblastos; además de expresar acuaporina-1 entre otras<sup>6</sup>.

Aproximadamente el 15% de los pacientes con Enfermedad Renal Crónica en el Mundo utilizan la diálisis peritoneal como tratamiento sustitutivo de la función renal y desde hace más de 20 años Twardoski y col. desarrollaron una prueba para clasificar a los pacientes de acuerdo a las características de transporte de solutos y agua, a esta prueba se le conoce como prueba de equilibrio peritoneal<sup>7</sup> (PEP).



Con base en los resultados del PEP los pacientes se clasifican en pacientes con transporte peritoneal: alto (TA), promedio alto (PA), promedio bajo (PB) y bajo<sup>7</sup> (TB).

El TA funcionalmente se caracteriza por poseer una membrana peritoneal altamente permeable que permite el transporte rápido de solutos, pero tiene una capacidad limitada para mantener el gradiente osmótico generado por la glucosa para remover el líquido durante su permanencia en la cavidad abdominal. Es decir, este tipo de transporte peritoneal se distingue por una adecuada depuración de solutos con pobre ultrafiltración. En contraste, el peritoneo del transportador bajo es muy poco permeable a los solutos, la glucosa permanece en el líquido de diálisis y ejerce un gran poder osmótico, por lo que este tipo de peritoneo tiene una gran capacidad de ultrafiltración, pero una inadecuada depuración de solutos. El clasificar adecuadamente al paciente tiene dos implicaciones principales: es útil para adecuar la prescripción de diálisis de acuerdo con el tipo de transporte peritoneal y la otra es pronóstica, por ejemplo, los pacientes con TA tienen una supervivencia significativamente menor que los pacientes con otro tipo de transporte, mientras los pacientes con TB están más urémicos y necesariamente deben ser trasladados a hemodiálisis<sup>8</sup>.

En México, Cueto-Manzano y col. informaron en el 2008 los resultados de un estudio en 156 pacientes con ERC de cualquier etiología en diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) a quienes se les realizó la PEP con la siguiente proporción: TA: 37 (24%), PA: 53 (34%), PB: 50 (32%) y TB: 16 (10%) también demostraron que esta proporción varía en diferentes poblaciones de México e incluso en otros Países<sup>9</sup>. Las características del transporte peritoneal es una cualidad innata de cada uno de los pacientes y se puede explicar por la expresión génica de diversas proteínas que modifican las características del transporte trans y paracelular<sup>10</sup>. Sin embargo, el peritoneo puede modificar su permeabilidad como respuesta a otros estímulos como, por ejemplo: soluciones de diálisis ácidas, hiperosmóticas y con alto contenido de glucosa, episodios de peritonitis y hemoperitoneo entre otros<sup>11-12</sup>.

Las soluciones de diálisis tienen un pH de 5.5 (5.0-6.0) el cual previene la caramelización de la glucosa durante la esterilización por calor y disminuye, aunque no evita la generación de productos de degradación de la glucosa<sup>13</sup>, su osmolaridad varía de 345-511mOsm/l para favorecer el paso de agua desde el espacio extracelular del paciente hacia la solución de diálisis. La concentración de dextrosa en la solución de diálisis es mayor que en el plasma, al momento de la introducción de la solución en el peritoneo, la diferencia de concentración es máxima, pero a medida que el agua pasa desde el intersticio y la sangre hacia la cavidad peritoneal se diluye y la extracción de agua o ultrafiltración disminuye, y si el tiempo es prolongado o la membrana es muy permeable para la glucosa, la ultrafiltración cesa y más aún opera en sentido contrario, es decir, el agua se mueve desde la cavidad hacia el intersticio y a la circulación del paciente.

Estas circunstancias causan inflamación crónica y daño a la membrana peritoneal, que progresivamente se denuda de células mesoteliales y en ocasiones genera su transdiferenciación mesenquimatosa hacia fibroblastos<sup>14</sup>.

Las anormalidades morfológicas del peritoneo de estos pacientes se caracterizan por fibrosis intersticial, expansión variable de la matriz extracelular, daño a la microvasculatura peritoneal manifestado por engrosamiento y reduplicación de la membrana basal, fibrosis, hialinización de la capa media arterial y neovascularización importante, así como pérdida parcial o total de las células mesoteliales<sup>15-16</sup>.

Desde un punto de vista funcional las uniones estrechas son el componente más apical del complejo de uniones intercelulares y funciona como una barrera que separa los dominios apicales y basolaterales y tienen un papel muy importante en el mantenimiento del homeostasis y la polaridad en los tejidos. Las uniones estrechas (UE) se encuentran formadas por más de 40 diferentes moléculas, entre las que se encuentran: 1) proteínas citosólicas; que pueden servir como proteínas estructurales o de anclaje, como las zonula occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3); 2) proteínas de regulación del tráfico vesicular, involucradas en la señalización y la polaridad celular e incluso en la regulación de la expresión génica; y 3) proteínas trans-membranales, como las claudinas, ocludinas y las JAM<sup>17-20</sup> (human junctional adhesion molécula).

Las proteínas pertenecientes a la familia de las claudinas son los principales componentes de las UE. En la actualidad se han identificado 24 miembros en mamíferos cuyo peso molecular varía de 17 a 27 kDa.

El patrón de expresión de las claudinas es específico de cada tejido, lo que contribuye, junto con el perfil de interacciones homotípicas o heterotípicas entre dichas proteínas, a las funciones especializadas en los tejidos epiteliales y endoteliales<sup>21</sup>. Las claudinas cruzan cuatro veces la membrana plasmática, dejando expuestas dos asas en la región. Sus regiones amino (N-terminal) y carboxilo terminal (C-terminal) se encuentran expuestos al citosol, siendo el C-terminal importante para determinar la localización de estas proteínas. La región C-terminal de las claudinas puede ser fosforilada en residuos de serina y/o treonina, regulando su interacción con otras proteínas, su localización y su vida media. Los cambios en la fosforilación de las claudinas se han asociado con cambios en la permeabilidad paracelular y resistencia transepitelial de las células. La fosforilación de las claudinas puede darse gracias a la acción directa o indirecta de varias cinasas, entre las que destacan la proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC), la proteína Ras y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK)<sup>18-19,22</sup>. Algunas citocinas y factores de crecimiento pueden alterar selectivamente a las UE impidiendo o fortaleciendo la función de barrera de los epitelios. El interferón gama (INF  $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF  $\alpha$ ) inducen la internalización de claudina 1,4 y ocludina, así como la disminución de la expresión de ZO-1 y la redistribución de ZO-2, aumentando la permeabilidad paracelular de manera independiente a la cascada de señalización apoptótica inducida por citocinas en un modelo epitelial de intestino. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) también es capaz de regular de manera diferencial la localización de las claudinas 1,2, 4 y 7 en células epiteliales MDCK, aumentando la cantidad de claudinas 4 y 7 en las UE y relocalizando en el citosol a las claudinas 1 y 2, sin modificar a otras proteínas de las UE como ocludina, ZO-1 y ZO-3. La composición de las claudinas dentro de la UE determina las propiedades del epitelio, las claudinas 1,3,5,11,14 y 18 predominan en epitelios cerrados o poco permeables, mientras que las claudinas 2, 10a,10b,15 y 17 son formadores de canales y se encuentran en epitelios muy permeables o porosos<sup>23</sup>.

En particular, la claudina-2 es una proteína que se expresa en los epitelios de baja resistencia como por ejemplo el túbulo proximal y el intestino delgado, lo cual permite un alto transporte de agua y solutos a ese nivel.

Investigaciones recientes han confirmado que la claudina-2 es permeable al agua y no se ha podido comprobar la permeabilidad al agua de las otras claudinas formadoras de canales.<sup>24-25</sup>

En estudios actuales se ha demostrado que la Claudina-2 también es permeable a los cationes, como el sodio, pero no a los aniones ni tampoco a moléculas grandes sin carga, por ejemplo, manitol, lactulosa y el dextrano<sup>26</sup>. El canal o poro formado por la claudina-2 se explica bien en un modelo basado en la permeabilidad de cationes orgánicos de diversos tamaños. La parte más estrecha del canal tiene un diámetro de 6.5 a 7.0 Å y el residuo de aminoácido D65 cargado negativamente en esta región es esencial para la selectividad iónica. El poro es más pequeño que el diámetro de los iones de metales alcalinos hidratados (6.6-7.6 Å). El mecanismo de transporte paracelular a través del canal de la Claudina-2 se produce cuando los cationes monovalentes se separan de una molécula de agua para atravesar el poro de la Claudina-2 como cationes alcalinos deshidratados con un diámetro aproximado de 1.2 a 3.4 Å y por su parte la molécula de agua con un diámetro de 2.8 Å puede cruzar más fácilmente dicho poro<sup>27</sup>.

Muto y colaboradores demostraron una disminución de reabsorción transepitelial de sodio y agua en túbulos proximales aislados de ratones deficientes de claudina-2<sup>28</sup>.

Por lo tanto el objetivo principal de este trabajo fue analizar la expresión de Claudina-2 en las células mesoteliales de pacientes con TA y TB, para tratar de explicar las diferencias funcionales entre estos grupos de pacientes, ya que los pacientes con TA se caracterizan por una difusión rápida de solutos con pobre eliminación de agua, al contrario de lo que ocurre con los pacientes con TB que básicamente muestran una adecuada eliminación de líquido y una pobre difusión de solutos (urea, creatinina) de los capilares peritoneales al líquido de diálisis.

### **3- HIPOTESIS:**

**Alternativa:** La expresión de Claudina-2 de las células mesoteliales peritoneales humanas de cultivo primario será mayor en pacientes con transporte peritoneal alto.

**Nula:** La expresión de Claudina-2 de las células mesoteliales peritoneales humanas será igual en los dos tipos de transporte peritoneal

#### **4.- OBJETIVO GENERAL**

1. Determinar la expresión de la Claudina-2 en las células mesoteliales (CM) de pacientes en DPCA con alto y bajo transporte peritoneal.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Estudiar la expresión y la localización de la Claudina-2 en las CM de pacientes en DPCA con alto y bajo transporte peritoneal
2. Desarrollar y optimizar un método para aislar y cultivar CM de pacientes en DPCA con TA y TB.
3. Estudiar la expresión de vimentina, citoqueratina-8 y acuaporina-1 consideradas como marcadores de CM, en TA y TB.
4. Observar las microvellosidades y el cilio en CM por microscopia electrónica de barrido.
5. Estudiar el número de CM, la expresión y la localización de la Claudina-2 con microscopia confocal en TA y TB.
6. Determinar y comparar el D/P de sodio entre los pacientes con alto y bajo transporte peritoneal
7. Medir y comparar la resistencia trans-epitelial (RET) y la formación de domos en CM de pacientes con TA y TB.

## **5.- MATERIAL Y MÉTODOS**

Diseño del estudio: Experimental Básico.

### **5.1 COLECCIÓN DEL LÍQUIDO DE DIÁLISIS Y OBTENCIÓN DE LA MUESTRA**

Se incluyeron quince pacientes con enfermedad renal crónica en diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA), a los cuales se les realizó la prueba de equilibrio peritoneal (PEP) y que consistió en: instilar 2L de solución de diálisis con concentración de 2.5% de glucosa, y dejarla 4 horas en la cavidad abdominal, luego se drenó y se recuperó el líquido. En esta prueba, la relación líquida de diálisis/creatinina en suero ( $D/P_{\text{creat}}$ ), la relación glucosa en líquido de diálisis inicial/glucosa en líquido de diálisis a las 4 horas ( $D_t/D_0$ ) adicionalmente se obtuvo el cociente sodio del líquido de diálisis entre el sodio plasmático, lo que permitió establecer la permeabilidad para solutos de peso molecular pequeño. Con los resultados de los cocientes ( $D/P_{\text{creat}}$ ) obtenidos a las 2 y 4 horas de estancia del líquido en la cavidad, se clasificó a los pacientes en bajo y alto transporte peritoneal. Nueve (9) fueron transportadores altos (TA) y seis (6) fueron transportadores bajos (TB). Dentro del estudio se incluyeron pacientes sin antecedentes de peritonitis dos meses previos al estudio, sin evidencia de neoplasias; ni de consumo de medicamentos inmunosupresores, se les instruyó para que acudieran al Servicio de Nefrología, en un sitio especial aislado y limpio donde se obtuvieron 2000 ml de líquido dializante con glucosa al 2.5% de la primera bolsa de toda la noche del día previo, inmediatamente después se centrifugó el contenido de toda la bolsa de diálisis peritoneal a 1500 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en amortiguador de fosfatos (PBS) y nuevamente se centrifugó a 1500 rpm. durante 10 minutos. Finalmente, al sedimento se le agregó 1ml de solución salina al 0.9%.

### **5.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE CULTIVO**

Una vez obtenidas las células mesoteliales por centrifugación se resuspendieron y se transfirieron a tubos de 50 ml y se lavaron con PBS dos veces durante tres minutos. Después se centrifugaron a 1500 rpm durante 20 minutos y se lavaron 2 veces más con

PBS. Se contó el número total de células y se verificó la viabilidad celular en una cámara de Neubauer con la técnica de azul de tripano (solución salina 0.4%, Sigma T8154). Posteriormente se colocaron en medio de cultivo. Selgas y col. en el 2000 fueron los primeros en aislar las CMPH a partir del líquido de diálisis, sin embargo, el número de células era bajo<sup>29</sup>. En nuestro trabajo se modificaron algunos aspectos que a continuación se mencionaran: 1) en el trabajo de Selgas el líquido de diálisis de la noche previa se dejaba sedimentar durante 4 horas y después se centrifugaba, mientras que en este trabajo se centrifugó inmediatamente, 2) Selgas y col. (2000) utilizaron el medio M-199 mientras que para este estudio se utilizó el medio de cultivo DMEM-F12 (Gibco 12500-062, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA y además se enriqueció con suero fetal bovino al 20% y factor de crecimiento epidérmico (10 ng/ml), diferente al medio de cultivo M-199 enriquecido con Biogro-2 que se emplea con la técnica de Selgas y col. (2000).

En nuestro estudio al medio DMEM-F12, además se le adiciono: HEPES 1M, bicarbonato de sodio 1.2 g/l, antibiótico (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100µg/ml), 100µL de transferrina 0.5µg/ml; 100µL de insulina 5µg/ml, 1ml de glutamina 2 mM, 80µL de hidrocortisona 0.4µg/ml; selenito de sodio 5 ng/ml. Las células fueron sembradas en cajas Petri precubiertas con colágeno tipo II, e incubadas a 37°C en atmósfera humidificada y con CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo se reemplazó cada tercer día.

### **5.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS CELULAS MESOTELIALES**

La identificación de las células obtenidas a partir del líquido de diálisis fue por inmunofluorescencia y microscopia electrónica de barrido como a continuación se describe:

#### **5.3.1 INMUNOFLUORESCENCIA**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células/ml en cubreobjetos previamente cubiertos con colágeno tipo II. Una vez que las células se encontraban en confluencia, se retiró el medio de



cultivo y se realizaron dos lavados rápidos a las células con PBS más calcio (1mM). Posteriormente se fijó la monocapa con paraformaldehído durante 30 minutos a 4°C. Después se realizaron tres lavados de cinco minutos cada uno con PBS en agitación suave y se permeabilizó con Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 15 minutos. Los sitios inespecíficos de unión fueron bloqueados con 30  $\mu$ l de albúmina sérica bovina al 0.5% a 4°C durante 30 minutos. Se colocaron 30  $\mu$ l del primer anticuerpo (citoqueratina-8, vimentina o acuaporina-1) diluido (1:100) en albúmina sérica bovina al 0.5% a la concentración marcada por el proveedor. Se incubó toda la noche a 4°C. El segundo anticuerpo con fluoresceína se colocó después de realizar tres lavados durante 5 minutos con PBS, y se cubrió la preparación con papel aluminio durante 1 hora. Finalmente se realizaron lavados con PBS en agitación suave y con agua desionizada durante 10 minutos, y se colocó la preparación en un portaobjetos con 2.5  $\mu$ l de un protector de fluoresceína (Vectashield) y se sellaron los lados de cada cubreobjetos con barniz. La preparación se guardó a 4°C, protegida de la luz hasta que se hizo su análisis al microscopio confocal.

### **5.3.2 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)**

Se sembraron  $1 \times 10^5$  células/ml en cubreobjetos cubiertos previamente con colágeno tipo II. Una vez en confluencia las células fueron procesadas para MEB. Brevemente, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS y fijadas con tetraóxido de osmio en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas con PBS y entonces deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol 50, 60, 70, 80 y 90%, por 10 minutos cada uno, y con alcohol absoluto 3 veces por 10 minutos cada vez. Después se realizó el secado a punto crítico usando un Samdri 780-A (Tousimis Rockville, MD. USA) y entonces las células fueron cubiertas con oro en un Sputter-Etch (Denton Vacuum Desk 11, Cherry Hill, N.Y. USA). Posteriormente, las células fueron observadas usando un microscopio electrónico de barrido Jeol 35C (Jeol LTD, Tokio Japan). Se obtuvieron diversas microfotografías.

#### **5.4 DETERMINACION DE LA RESISTENCIA ELECTRICA TRANSEPITELIAL (RET).**

Para medir la RET se utilizaron filtros (Corning) con 0.33 cm<sup>2</sup> de área, con un tamaño de poro de 3 μm y cubiertos con colágeno. Estos filtros cuentan con una cámara interna (compartimento apical) y una externa (compartimento basolateral), las cuales, se llenaron con 0.2 mL y 1 mL, respectivamente, con medio de cultivo. En el compartimento apical se sembraron 1x10<sup>5</sup> células. La medición de la RET y el cambio del medio de cultivo se realizaron cada tercer día. La medición de la RET se realizó utilizando un voltímetro Millicell-ERS. La RET se expresó en Ω·cm<sup>2</sup>. La RET del filtro sin células fue restada de la RET total. (**Figura No. 1**)

#### **5.5 FORMACION DE DOMOS POR LAS CELULAS MESOTELIALES**

La permeabilidad y el transporte son diferentes en epitelios de alta o de baja resistencia. En general, los epitelios con alta permeabilidad tienen baja resistencia y en los de baja permeabilidad la resistencia es alta. En nuestro caso teníamos transportadores altos, con alta permeabilidad y transportadores bajos, con permeabilidad baja. Por lo tanto, era de interés documentar las diferencias en el paso de agua y solutos a través de las monocapas de estos pacientes. Este paso se estimó por medio de la cuantificación de los domos formados en esas monocapas. Esta metodología ha sido previamente descrita<sup>30</sup>.

De manera breve, se estudiaron las monocapas de pacientes con transporte alto (n=9) y de transporte bajo (n=6), sembradas en cajas Petri de plástico. El número de domos se midió en al menos cinco campos de cada caja, al microscopio y a bajo aumento.

#### **5.6 ANALISIS ESTADISTICO:**

Se utilizaron frecuencias absolutas y relativas. Para la inferencia estadística se utilizó de acuerdo con la distribución de los valores U- Mann-Whitney.

## **6.- RESULTADOS:**

Las CM fueron obtenidas de quince pacientes con enfermedad renal crónica en DPCA. Estos pacientes se encontraban clínicamente estables y sin evidencia clínica ni bacteriológica de peritonitis por lo menos ocho semanas previas al estudio. Nueve pacientes tuvieron características de transportador alto (60%) y seis pacientes tuvieron características de transportador bajo (40%). En cuanto al promedio de edad de los pacientes no hubo diferencias significativas entre los altos y bajos transportadores (27.9+/- 2.6 **vs** 33.2+/-3.9 años). Sin embargo, en relación con el tiempo de duración en diálisis peritoneal encontramos que los pacientes con transporte peritoneal alto tuvieron mayor tiempo de exposición a la diálisis peritoneal en comparación con los pacientes con transporte peritoneal bajo (39.7 +/- 5.9 **vs** 19.8 +/- 4.5 meses \*p<0.05) respectivamente. También se determinó el número de veces que se les recambió el catéter de Tenckhoff encontrando que a los pacientes con transporte alto se le recambió el catéter más veces (3.1+/-0.4 **vs** 1.2+/-0.2 \*\*p<0.05) en comparación con los transportadores bajos. Finalmente, los pacientes con transporte alto tuvieron más episodios de peritonitis en comparación con los transportadores bajos (1.4+/-0.4 **vs** 0.3+/- 0.2 ns) (Tabla No. 1). La mediana del número de CM obtenidas fue  $260 \times 10^3$  con un rango intercuartílico ( $100 \times 10^3$  -  $680 \times 10^3$ ).

La mediana de células mesoteliales provenientes de pacientes con transporte peritoneal alto fue de  $380 \times 10^3$  con rango intercuartílico de ( $120 \times 10^3$ - $680 \times 10^3$ ), y la mediana de las células mesoteliales provenientes de transportadores bajos fue de  $170 \times 10^3$  rango de  $100 \times 10^3$  -  $310 \times 10^3$ , con una viabilidad superior al 97%. Se realizó inferencia estadística con la prueba de U-Mann-Whitney con una p<0.02 entre ambos grupos. **(Figura No. 2)**

### **6.1 IDENTIFICACIÓN DE LAS CELULAS MESOTELIALES POR MEB**

Las CM tienen un diámetro aproximado de 20  $\mu\text{m}$  con proyecciones multipolares, núcleo central prominente y la relación núcleo/citoplasma es alta. Frecuentemente estas células forman pequeños nidos y racimos. Las CM obtenidas de los pacientes (en DPCA mostraron las características morfológicas previamente descritas. Proliferaron adecuadamente en cultivo y ellas llegaron a la subconfluencia a los 11+/-3 días después de sembradas, en las fases iniciales de la proliferación celular observamos que las CM adoptaban ocasionalmente el aspecto fibroblastoide. En los días siguientes, las CM adoptaban una conformación poligonal con la apariencia característica de “empedrado”.

## **6.2 IDENTIFICACIÓN DE LAS CELULAS MESOTELIALES POR INMUNOFLUORESCENCIA**

Las CM expresan vimentina y citoqueratina-8 proteínas que constituyen los filamentos intermedios de las CM<sup>31-32</sup> (Stylianou, E. et al. 1990, López- Cabrera, M. et al. 2006). Los resultados obtenidos mostraron que estas dos proteínas están presentes en los cultivos primarios, tanto de TA como de TB, y que se conservaban hasta el pasaje celular número cinco, confirmando que el fenotipo de las CM fue preservado después de realizar varios pasajes (**Figura No. 3**). Del mismo modo, la expresión de acuaporinas 1 y 3 han sido reportadas en las CM<sup>33</sup> (Lai, K. N. et al. 2001).

En congruencia con lo reportado en la literatura el marcaje para acuaporina-1 fue fuertemente positivo en nuestros cultivos. Esta distribución fue difusa, excepto en el núcleo. (**Figura No. 3**)

## **6.3 LA DISTRIBUCION DE CLAUDINA 2 EN CULTIVOS DE TRANSPORTADORES ALTOS ESTA LOCALIZADA EN LOS BORDES CELULARES**

La Claudina 2 (CL-2) es una proteína de la unión estrecha, localizada principalmente en epitelios altamente permeables, como el túbulo proximal renal y las células MDCK de baja resistencia. Las células peritoneales, tanto de TA como de TB, expresaron la CL-2 (**Figura No. 4**). Sin embargo, en tanto que las células del TA mostraron un patrón bien definido en los bordes celulares (**Figura**

**4, inciso A)**, el patrón para claudina-2 en el TB fue puntiforme y discontinuo (**Figura 4, inciso B**) y además frecuentemente hubo marca fluorescente en el citoplasma, que se observó solo ocasionalmente en las células del TB.

#### **6.4 ANÁLISIS CON MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)**

Las monocapas de CM en confluencia fijadas con paraformaldehído fueron procesadas para el análisis con MEB. Las células fueron adheridas a un vidrio de superficie lisa formando una capa plana de células, dichas células claramente mostraron un patrón poliédrico. Algunas áreas de células se observaron desgarradas o bien con zonas de ruptura. La superficie apical de cada célula estaba cubierta con microvellosidades cortas aleatoriamente distribuidas con la presencia ocasional de pequeñas burbujas redondas. En el centro de cada célula se observó emergiendo de la superficie un filamento largo de aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  (**Figura No.5**). Dicha estructura es compatible con un cilio el cual está rodeado por un pequeño halo libre de microvellosidades (Figura No.5). Basados en datos estructurales previos obtenidos por análisis de MEB, nosotros sugerimos que estas monocapas de células cultivadas son formadas por CM.

#### **6.5 LA RESISTENCIA ELECTRICA TRANSEPITELIAL FUE DIFERENTE ENTRE LOS TRANSPORTADORES ALTOS Y LOS BAJOS**

La resistencia eléctrica transepitelial (RET) es un indicador de la permeabilidad paracelular de las monocapas crecidas sobre filtros permeables. En términos generales, mientras más alta es la permeabilidad, más baja es la RET. De acuerdo con estas características, se esperaba que los transportadores altos mostraran una RET más baja que los transportadores bajos. Esta circunstancia se confirmó como aparece en la (**Figura No 5**). Los hallazgos de la RET están de acuerdo con la distribución que observamos para la claudina 2, la cual estuvo presente en las células provenientes de los transportadores altos, que tienen una permeabilidad alta (entre paréntesis coloca el valor) y fue menos abundante en los transportadores bajos, que tienen una permeabilidad baja (entre paréntesis coloca el valor).

## **6.6 LA FORMACION DE DOMOS ES MAYOR EN LAS CELULAS DE TRANSPORTADORES BAJOS RESPECTO A LOS DE TRANSPORTADORES ALTOS**

Para que se realice la formación de domos se requiere que haya flujo vectorial de agua y solutos desde la superficie apical hacia la basolateral del epitelio y que las uniones intercelulares sean poco permeables. Como era de esperarse, en los cultivos provenientes de pacientes transportadores bajos cuya resistencia transepitelial es alta, hubo mayor formación de domos que en los de pacientes con permeabilidad elevada, como son los transportadores altos (Figura No. 6). Esta característica es compatible con la presencia de la claudina 2 en los transportadores altos.

## 7.- DISCUSIÓN

En este estudio confirmamos la presencia de CM vivas en el líquido peritoneal de pacientes con ERC en DPCA. Estas pueden ser cultivadas para el estudio morfológico y funcional del transporte peritoneal. A diferencia de R. Selgas y cols. en nuestro trabajo el líquido de diálisis obtenido se centrifugó de inmediato, en lugar de dejar sedimentar el líquido durante 4 horas y después centrifugarlo, además nosotros decidimos utilizar el medio de cultivo DMEM-F12 que se suplementó con factor de crecimiento epidérmico y suero fetal bovino. El medio sintético DMEM-F12 es uno de los más ricos y complejos, es una mezcla 1:1 de DMEM y F-12 de Ham utilizado ampliamente para propiciar el crecimiento de una amplia gama de tipos celulares: endotelio, células epiteliales (alveolares, intestinales), epitelio del cérvix, fibroblastos. Los cambios antes mencionados favorecieron la proliferación celular y mantuvieron las características fenotípicas de las CM al menos hasta el quinto pasaje celular. Sin embargo, observamos que al utilizar principalmente el factor de crecimiento epidérmico las células adoptaban un aspecto fibroblastoide lo que obligó a retirarlo del medio de cultivo una vez que había iniciado la fase de crecimiento exponencial de las células. También obtuvimos gran variabilidad en el número de células mesoteliales liberadas en el líquido de diálisis entre los pacientes. En los pacientes con transporte peritoneal alto la pérdida de células mesoteliales fue mayor en comparación con los pacientes con transporte peritoneal bajo. Diversos autores han comprobado que la exposición constante de la membrana peritoneal a soluciones de diálisis bioincompatibles induce inflamación peritoneal, mayor exfoliación de células mesoteliales y diversos cambios estructurales entre ellos: engrosamiento sub-mesotelial y vasculopatía lo que da como resultado pérdida progresiva de las funciones peritoneales y resultados desfavorables<sup>34-35</sup>. Todos estos cambios son exacerbados por los episodios de peritonitis, al uso de soluciones de diálisis hipertónicas, a los recambios de catéteres de Tenckhoff por disfunción mecánica y la uremia entre otros factores.

En nuestro estudio observamos que el tiempo en diálisis de los pacientes con transporte peritoneal alto fue de  $40 \pm 6$  meses comparado con  $20 \pm 5$  meses ( $p < 0.05$ ) de los

pacientes con transporte peritoneal bajo, lo cual podría estar relacionado con el mayor número de células encontrado en los líquidos de diálisis de pacientes con TA. No existieron diferencias en cuanto al número de episodios de peritonitis entre ambos tipos de transportadores, sin embargo, los pacientes con TA fueron sometidos a más recambios de catéteres de Tenckhoff comparados con los pacientes con TB (3 vs 1  $p < 0.05$ ).

El peritoneo de los pacientes que se encuentran en diálisis peritoneal durante mucho tiempo muestra reduplicación de las membranas basales del mesotelio y del endotelio por incremento en la síntesis y depósito de proteínas de la matriz dentro del submesotelio y hialinización subendotelial progresiva con estrechamiento u obliteración de los capilares peritoneales<sup>36</sup>. Los cambios vasculares e intersticiales llegan a ser más aparentes con el uso progresivo de las soluciones de diálisis, lo que demuestra una relación temporal entre la fibrosis peritoneal, la vasculopatía y el tiempo en diálisis peritoneal. Algunos autores han sugerido que la fibrosis peritoneal se desarrolla aproximadamente hasta en 50% y 80% de los pacientes en diálisis peritoneal entre un año y dos años respectivamente de permanecer en tratamiento sustitutivo<sup>37</sup>. Los cambios observados en las CM una vez que son expuestas a las soluciones de diálisis incluyen: activación e hipertrofia celular, incremento en la vacuolización, pérdida completa o disminución de microvellosidades, variaciones en el número de retículos endoplásmicos y vesículas micropicnócíticas, así como alteraciones en las uniones intercelulares<sup>38</sup>. Tomando en consideración esto último es posible que los pacientes con TA presenten mayor número de células desprendidas debido a que tienen más tiempo en diálisis y como consecuencia las uniones intercelulares se ven afectadas de una manera importante resultando en el desprendimiento de las células.

Actualmente se desconoce el papel que juegan las CM que son exfoliadas, en realidad no se sabe si son células que la cavidad abdominal las elimina o bien se desprenden y mantienen viabilidad y en alguna circunstancia podrían ocupar otras zonas del peritoneo desnudas.



Los fenotipos de estas células son diversos y consisten en células con una morfología epitelial normal, células senescentes grandes que contienen múltiples núcleos y multivacuolas, y ocasionalmente con un fenotipo fibroblástico<sup>39</sup>.

En la peritonitis los cambios peritoneales observados son más pronunciados en la CM y la exfoliación celular es más prominente, también existe pérdida de microvellosidades y alteraciones en las uniones estrechas. La peritonitis también induce la pérdida de la membrana basal subyacente y promueve fibrosis intersticial extensa atribuida a una mayor síntesis de proteína de la matriz y una pérdida concomitante de decorina<sup>40</sup>.

Los cambios vasculares inducidos en la membrana peritoneal son comúnmente observados en pacientes que han permanecido en diálisis por largo tiempo y también acentuados en cada episodio de peritonitis<sup>41</sup>. Mateijssen y cols, observaron un incremento en la densidad de vasos sanguíneos, dilatación capilar y engrosamiento de la pared de los vasos sanguíneos entre el submesotelio de pacientes en DP con esclerosis peritoneal cuando los compararon con sujetos controles<sup>42</sup>. Recientemente se informó que el incremento en la síntesis del factor de crecimiento vascular endotelial VEGF puede al menos en parte contribuir a la neoangiogénesis e incremento en la vasodilatación y la permeabilidad vascular en los pacientes en DP. El incremento del VEGF en el líquido de diálisis se asoció con un aumento de la permeabilidad de pequeños solutos y a pérdida de la ultrafiltración, este incremento en la síntesis del VEGF es a expensas del endotelio vascular y de las CM<sup>43</sup>. Aroeira y cols, demostraron que CM aisladas de líquido de diálisis con fenotipo fibroblastoide sintetizaban cantidades significativamente mayores VEGF que CM de morfología normal<sup>44</sup>.

Un estudio reciente de Szeto demostró que al inicio de un episodio de peritonitis las concentraciones de VEGF se incrementaron y estos niveles correlacionaron con el grado de disminución de la ultrafiltración<sup>45</sup>. Por otra parte, Davies y cols, confirmaron que un solo episodio de peritonitis no es suficiente para producir un efecto significativo

sobre la función peritoneal, mientras que los episodios de peritonitis recurrentes y graves ocasionaban alteraciones en la permeabilidad de los solutos y disminución de la ultrafiltración<sup>46</sup>.

Aunque las CM se originan del mesodermo, estas poseen muchas características de células epiteliales, estas incluyen: morfología poligonal, la apariencia en cultivo de “empedrado”, polarizarse, establecer contacto estrecho con otras CM y descansar sobre una membrana basal. Las CM también poseen abundantes microvellosidades y expresan filamentos intermedios del citoesqueleto como la citoqueratina, en particular el número 8. Además, estas células también tienen características mesenquimales como: expresión de vimentina, desmina, y  $\alpha$ -actina de músculo liso y bajo ciertas circunstancias pueden adquirir características del fenotipo fibroblástico hasta llegar a una transdiferenciación mesenquimatosas<sup>47</sup>. Esta capacidad de la CM para experimentar cambios fenotípicos bajo condiciones fisiológicas y patológicas prueba la propiedad de plasticidad de estas células.

Una vez que se obtuvieron las células se prosiguió a caracterizarlas. La identificación se realizó mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra vimentina, citoqueratina-8 acuaporina-1 y también se realizó la observación y análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB). En los cultivos de ambos transportadores se observó la expresión de citoqueratina-8 y la vimentina las cuales son filamentos intermedios, las cuales son positivas para este tipo células de naturaleza epitelial que permiten fácilmente diferenciarlas de los fibroblastos que carecen de las mismas. En nuestros cultivos observamos el marcaje disponerse alrededor del núcleo celular y formar una red hacia la periferia.

Sin embargo, apreciamos que las monocapas de las CM de pacientes con TA no llegaron a realizar contacto estrecho y por ello adquirieron formas alargadas con algunas elongaciones a diferencia de las CM de los transportadores bajos (TB) que adquirieron formas casi redondas y estrechamente unidas. Esta disposición de los filamentos intermedios podría explicar la diferencia de permeabilidad entre ambos

transportadores. Del mismo modo, la expresión de acuaporinas 1 y 3 han sido reportadas en las CM (Lai, K. N. et al. 2001). En congruencia con lo anterior reportado en la literatura el marcaje para acuaporina-1 fue fuertemente positivo en nuestros cultivos, los cuales conservan la capacidad de transporte transcelular de agua. Esta distribución fue difusa, excepto en el núcleo.

La superficie luminal de las CM posee numerosas microvellosidades y cilio, inicialmente se consideraba que la función principal de estas estructuras era mecánica, proporcionando protección contra la fricción entre los órganos de la cavidad abdominal. Actualmente se sabe que dentro de sus funciones están: la regulación de microfilamentos subcorticales para incrementar el área de superficie peritoneal para optimizar el transporte de solutos, como protección de la superficie serosa de daños por sustancias tóxicas y además sirven como mecanismos de defensa contra infecciones por lo que las CM son la principal línea de defensa peritoneal contra lesiones por bacterias o sustancias químicas. Esta protección es posible por la presencia del glicocáliz, que es una fina capa de glucosaminoglucanos que le proporciona una carga negativa. La carga negativa viene dada por la presencia de sialoconjugados, proteoglicanos y glicoproteínas ácidas organizadas en una microred fibrosa. En condiciones normales, proteínas plasmáticas aniónicas tapizan el glicocáliz, al cual se fijan mediante un mecanismo de adsorción. La existencia de este revestimiento determina que la red de fibras glicoproteicas se haga menos accesible para el agua y otras moléculas hidrosolubles. Por otra parte, esta red fibrosa electronegativa ofrece una superficie no trombogénica a polinucleares, eritrocitos y plaquetas también provistos de glicocalix electronegativo.

Por lo tanto, el glicocalix se comporta como una barrera que regula el paso de solutos pequeños y grandes a través de la pared microvascular, mediante un proceso selectivo basado en tamaño, forma y carga molecular. Así mismo, el glicocáliz también tiene un papel importante para mantener el contacto entre células, la hidratación tisular, como regulador de la inflamación, en la regulación del remodelado tisular y el flujo de nutrientes y factores de crecimiento que atraviesan la membrana peritoneal<sup>48</sup>. En

cuanto a las microvellosidades y cilios, tanto TA y TB presentaban estas estructuras en su superficie. En los cultivos de CM de TA distinguimos una densidad de microvellosidades menor e incluso algunas zonas denudadas en comparación con las CM de los TB. En ambas poblaciones de CM nos percatamos de la presencia de un cilio central, sin embargo, la longitud del cilio en los TA fue significativamente más corto que el del TB.

Retana y cols, en 2013 demostraron diferencias en la densidad y longitud del cilio de pacientes en DPCA con TA y TB, ellos observaron disminución en el tamaño y en el número de cilios en los TA en comparación con los TB y los controles. Además, informaron que el ácido retinoico revirtió los cambios morfológicos de la transición epitelio-mesenquimal de las CM, y disminución del factor de crecimiento transformante  $\beta_1$ <sup>49</sup>.

Furuse y cols, demostraron en 2001 que la expresión de CL-2 en células MDCK tipo II se correlacionaba con una disminución de la resistencia transepitelial. Lo anterior fue posible al comparar dos cepas de células MDCK tipo I y tipo II. Los autores comprobaron en un modelo de células MDCK tipo I transfectadas con CL-2 que su expresión disminuía la resistencia trans-epitelial en comparación con las células MDCK tipo I controles<sup>50</sup>. En nuestro trabajo se evidenció la expresión de la CL-2 en las monocapas de los pacientes en diálisis peritoneal continua ambulatoria.

La presencia de esta proteína se aprecia en el borde celular de las células mesoteliales de los pacientes con características funcionales de transportador alto, mientras que en los pacientes con transporte bajo se observa la fluorescencia de CL-2 en el citoplasma y parcialmente en el borde celular, lo cual podría estar relacionado con que tengan un valor de resistencia mayor que el de los TA. En cuanto al transporte de sodio a través de la membrana peritoneal observamos que el D/P de sodio de los TA fue muy cercano a la unidad al final de las 4 horas con una diferencia significativa con el D/P de sodio de los TB (.975 vs .890 p<.001), y este hallazgo fue congruente con la expresión de CL-2

con la disminución de la resistencia transepitelial y con la ausencia de domos en dichos pacientes.

## **8.- CONCLUSIÓN**

La diálisis peritoneal es una alternativa eficaz para el tratamiento sustitutivo de la función renal. Sin embargo, durante el procedimiento de diálisis las células mesoteliales están sometidas a diferentes factores exógenos derivados de las soluciones de diálisis e infecciosos que producen cambios morfológicos, funcionales y de secreción de múltiples mediadores de la inflamación que conllevan a la pérdida de la funcionalidad de la membrana peritoneal. Estos mecanismos fisiopatológicos permanecen aún poco esclarecidos por lo que nuestro trabajo sugiere que la expresión de claudina 2 podría explicar las diferencias en el transporte de solutos a través de la membrana peritoneal

## **9.- RECURSOS FINANCIEROS**

El trabajo recibió financiamiento parcial del CONACYT (G34511M) a través del Laboratorio de Fisiología Renal del CINVESTAV y de Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) FOFOI-2005/1/I-117.

## 10. - BIBLIOGRAFIA

1. Nagy J. Peritoneal membrane morphology and function. *Kidney Int.* 1996;50(S-56):50-52.
2. Gokal R, Mallick NP. Peritoneal dialysis. *Lancet* 1999;353:823-28.
3. Heaf J. Pathogenic effects of a high peritoneal transport rate. *Semin Dial* 2000;13:188-93.
4. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:9-16.
5. Yung S, Chan TM. Mesothelial cells. *Perit Dial Int.* 2007;27(S-2):S110-S115.
6. Wu Y, Parker L, Binder N, Bekett M, Sinard J, Griffiths T, et al. The mesothelial keratins: A new family of cytoskeletal proteins identified in cultured mesothelial cells and non keratinizing epithelia. *Cell* 1982;31:693-703.
7. Twardoski Z, Nolph K, Khanna R, Prowant B, Ryan L, Moore H. Peritoneal equilibration test. *Perit Dial Bull.* 1987;7 :138-147.
8. Brimble S, Walker M, Margetts P, Kundhal K, Rabbat CH. Meta-analysis peritoneal membrane transport, mortality, and technique in peritoneal dialysis. 2006;17:2591-2598.
9. Rojas-Campos E, Martínez-Ramírez H, Cortés-Sanabria L, González L, Martín del Campo F, Monteón-Ramos F. El tipo de transporte peritoneal puede ser diferente en las distintas poblaciones de pacientes en diálisis peritoneal en México. *Rev Inves Clin.* 2008;60(4):284-291.
10. Van Itallie C, Anderson J. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev. Physiol.* 2006;68:40-429.
11. Heimbürger O, Wang T, Lindholm B. Alterations in water and solute transport with time on peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1999;19:83-87.
12. Krediet R. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999;55:314-16.
13. Nakayama M, Kawaguchi Y, Yamada K. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in the peritoneum and its possible pathophysiological role in the CAPD. *Kidney Int* 1997;51:182-86.

14. Inagi R, Miyata T, Yamamoto T. Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: Role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. *FEBS Lett* 1999;463:206-64
15. Combet S, Ferrier ML, Landschoot MV, et al. Chronic Uremia Induces Permeability Changes, Increased Nitric Oxide Synthase Expression, and Structural Modifications in the Peritoneum *J. Am.Soc. Nephrol* 2001;12:2146-57.
16. Plum J, Hermann S, Fusholler A. Peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis patient related to dialysis settings and peritoneal transport properties. *Kidney Int* 2001;59:S42-S47
17. Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junction structure and function: lesson from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279:250-254.
18. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junctions proteins. *Prog biophys Mol biol.* 2003;81:1-44.
19. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;286:1213-1228.
20. Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc.* 1999;10:1337-1345.
21. Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strand. *J Cell Biol.* 1999;147:891-903.
22. Denker BM, Nigam SK. Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol.* 1998;274:1-9.
23. Günzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Compr Physiol.*2012;2:1819-1852.
24. Reyes J.L, Lamas M., Martin D, Namorado C, Islas S, Luna J, Tauc M, and González-Mariscal L. The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int.* 2002;62:476-487.
25. Yu A.S. Claudins and the Kidney. *J Am Soc.* 2015;26:11-19.



26. Amasheh S, Meiri N, Gitter A, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke J. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002;115(24):4969-4976.
27. Rosenthal R, Günzel D, Theune D, Czichos, Schulzke J, Fromm M. Water channels and barriers formed by claudins. *Ann NY Acad Sci.* 2017;1397:100-109.
28. Muto S, Hata J. Taniguchi L. Claudin-2 deficient mice are defective in the leaky and cation selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107:8011-8016.
29. Castro M.C, Díaz C, Bajo M. A, Sánchez-Cabezudo M.J, Fernández de Castro M, Selgas. Metodología para evaluar la capacidad de crecimiento *ex vivo* de las células mesoteliales obtenidas directamente del efluente peritoneal. *Nefrología* 2000;20:277-283.
30. Castillo A.M, Reyes J.L, Sanchez E, Mondragon R, and Meza I. 2,3-butanedione monoxime (BDM), a potent inhibitor of actin-myosin interaction, induces ion and fluid transport in MDCK monolayers. *J. Muscle Res. Cell Motil.*2002;23:223-234
31. Stylianou E, Jenner LA, Davies M, Coles GA, Williams JD. Isolation, culture, and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* 1990;37(6):1563-1570.
32. López-Cabrera M, Aguilera A, Aroeira LS, Ramírez-Huesca M, Pérez-Lozano ML. Ex vivo analysis of dialysis effluent derived mesothelial cells as an approach to unveiling the mechanism of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int.* 2006;26:26-34.
33. Lai K, Li f., Lan H., Tang S., Tsang A., Chan D., et al. Expression of aquaporin-1 in human peritoneal mesothelial cells and its upregulation by glucose *in vitro*. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1036-1045
34. Combet S, Ferrier ML, Landschoot MV, et al. Chronic Uremia Induces Permeability Changes, Increased Nitric Oxide Synthase Expression, and Structural Modifications in the Peritoneum *J. Am.Soc. Nephrol* 2001;12:2146-57.
35. Plum J, Hermann S, Fusholler A. Peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis patient related to dialysis settings and peritoneal transport properties. *Kidney Int* 2001;59:S42-S47

36. Williams JD, Craig KJ, Topley N. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(2):470-479.
37. Garosi G, Di Paolo N. Morphological aspects and peritoneal sclerosis. *J of Nephrol*. 2001;14(4):30-38.
38. Dobbie JW. Morphology of the peritoneum in CAPD. *Blood purif*. 1989;7(2):74-85.
39. Kanjanabuch T, Siribamrungwong M, Khunprakant R, Kanjanabuch S, Jeungsmarn P, Achavanuntakul B. Overnight mesothelial cell exfoliation: a magic tool for predicting future ultrafiltration failure in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*. 2008;28(S-3):107-113.
40. Yung S, Chen X.R, Tsang C, Zhang Q, Chan T. Reduction of perlecan synthesis and induction of TGF- $\beta$  in human peritoneal mesothelial cells due to high dialysate glucose concentration: implication in peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(5):1178-1188.
41. Krediet RT, Zweers MM, Van der Wal AC. Neoangiogenesis in the peritoneal membrane. *Perit Dial Int*. 2000;20:S19-S25.
42. Mateijssen M, Van Der Val A, Hendriks P. Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int*. 1999;19(6):517-525.
43. Combet S, Miyata T, Moulin P., et al. Vascular proliferation and enhanced expression of nitric oxide synthase in human peritoneum exposed to long-term peritoneal dialysis. *J. Am Soc Nephrol* 2000;11:191-98.
44. Aroeira L, Aguilera A, Selgas R. Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis role of vascular endothelial growth factor. *Am J Kidney Dis*. 2005;46(5):938-948.
45. Szeto C, Wong T, Lai K, Chow K, Li T. The role of vascular endothelial growth factor in peritoneal hyperpermeability during CAPD-related peritonitis. *Perit Dial Int*. 2002;22(2):265-267.
46. Davies S, Bryan J, Phillips L, Russell G. Longitudinal changes in peritoneal kinetics: the effects of peritoneal dialysis and peritonitis. *Nephrol dial trans*. 1996;11(3):498-506.

47. Yañez-Mó M, Pezzi-Lara E, Selgas R, Huesca R M, Domínguez-Jiménez C, Heffernan-Jimenez J. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003;348:403-13.
48. Mutsaers S, Whitaker D, Papadimitriou J. Changes in the concentration of microvilli on the free surface of healing mesothelium are associated with alterations in surface membrane charge. *J Pathol.*1996;180:333-339.
49. Retana C, Sánchez E, González S, Pérez-López A, Cruz A, Lagunas-Muñoz J. Retinoic Acid improves morphology of cultured peritoneal mesothelial cells from patients undergoing dialysis. *Plos one* 2013;8(11):1-13.
50. Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Conversion of Zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby Canine Kidney 1 cells. *J Cell Biol.* 2001;153(2):263-272.

## 11.- TABLAS Y FIGURAS.

Tabla No. 1. Características de los pacientes en DPCA

| Variable                                      | Transportador alto<br>n=9 | Transportador bajo<br>n=6 |
|---|---------------------------|---------------------------|
| Edad  | 28±3.0                    | 33±4.0                    |
| Género<br>Mujer/Hombre                        | 4/5                       | 3/3                       |
| Etiología                                     |                           |                           |
| Glomerulonefritis                             | 3                         | 2                         |
| Etiología desconocida                         | 5                         | 3                         |
| Hipertensión arterial                         | 1                         | 1                         |
| Duración de la diálisis<br>(meses)            | 40±6*                     | 20±5                      |
| Número de catéteres de<br>Tenckhoff cambiados | 3*                        | 1                         |
| Episodios de peritonitis                      | 2                         | 1                         |
| D/P creatinina 4 hr                           | .860±.056**               | .326±.040                 |
| D/P sodio 4 hr                                | .975±.030 **              | .890±.020                 |

En la tabla se muestra la media ± desviación estándar  
\*p<0.05, \*\*p>0.001.

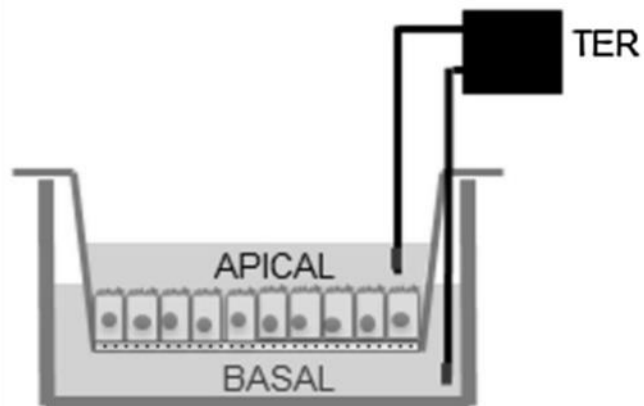


Figura No. 1 Representación esquemática de la resistencia trans-epiteliales en monocapa de células mesoteliales.

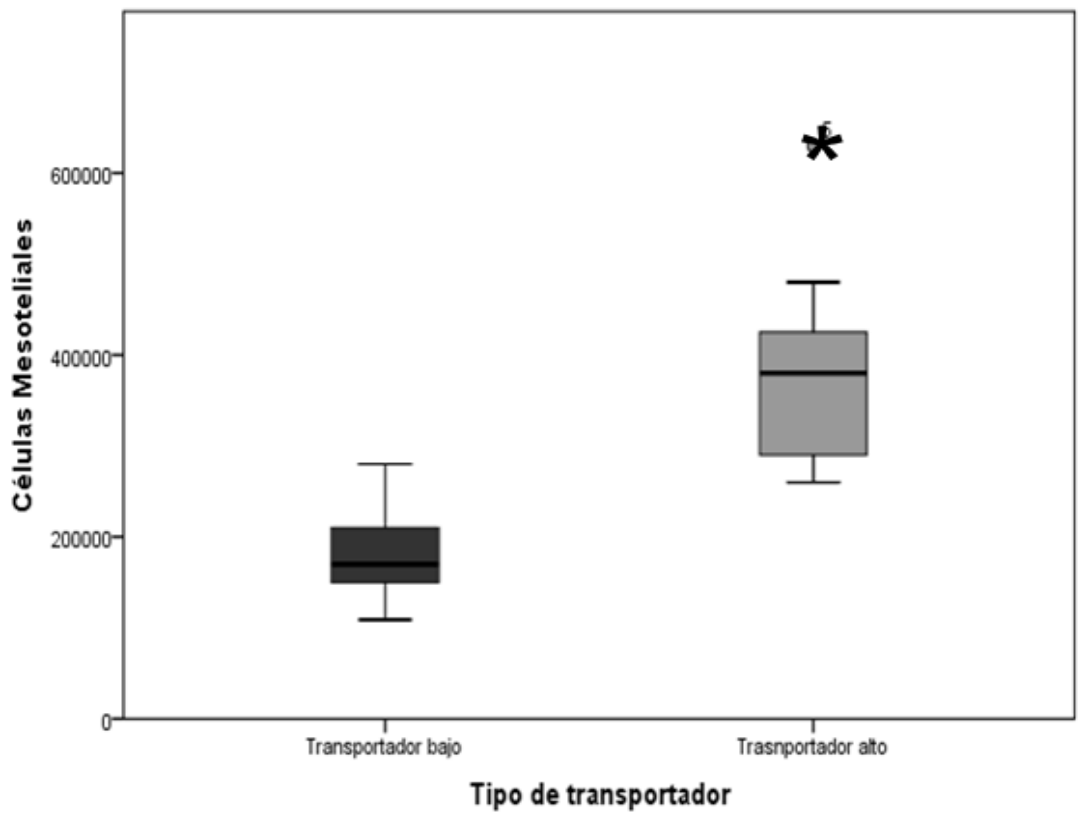


Figura No.2 Grafica comparativa del número de CMPH obtenidas de los transportadores altos y bajos \*p<0,05

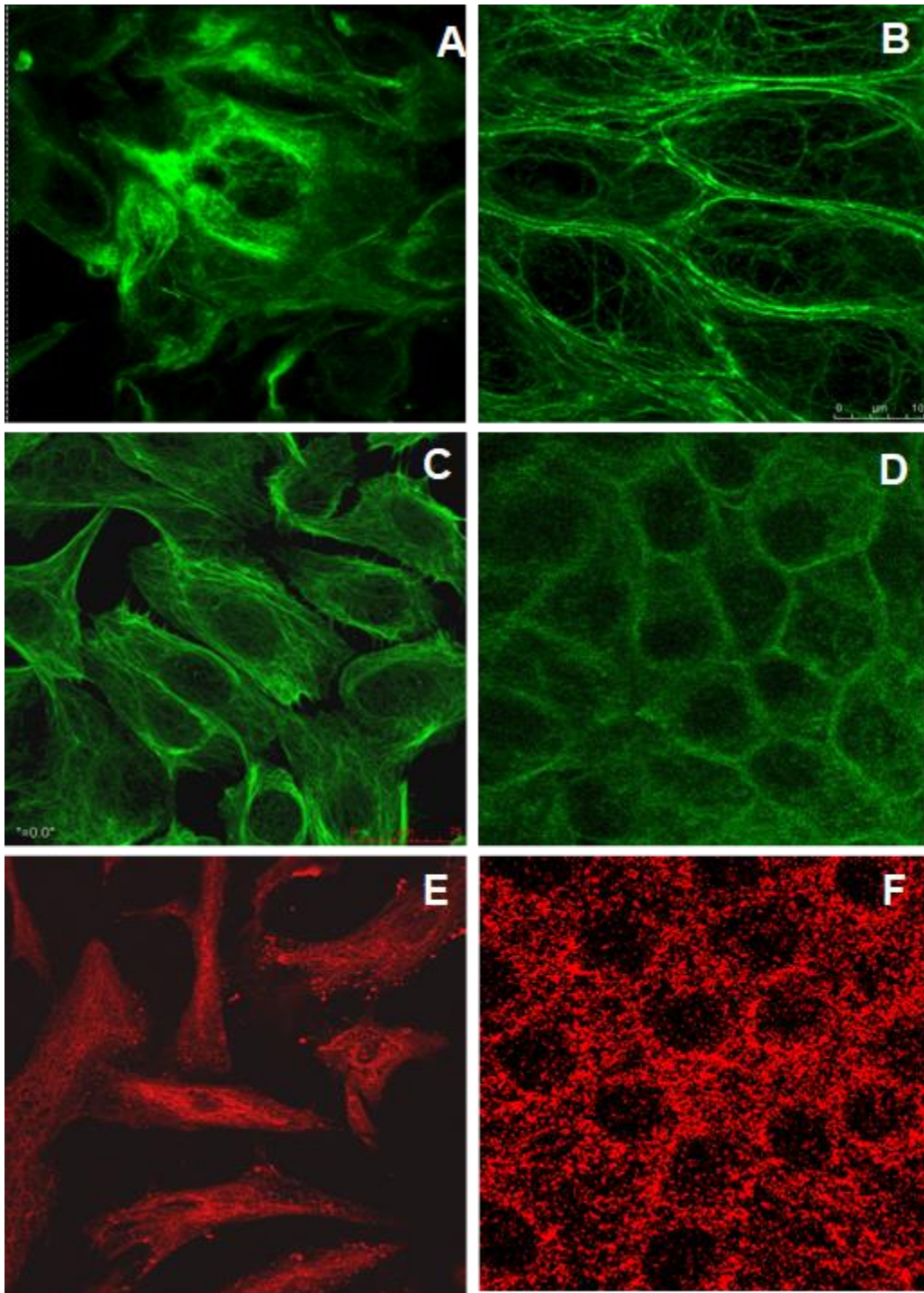


Figura No. 3. Células peritoneales mesoteliales humanas. Panel A. Imagen de inmunofluorescencia con marca para citoqueratina 8, en un cultivo de un paciente transportador alto (TA). Panel B. Imagen de fluorescencia para citoqueratina 8 en un cultivo celular proveniente de un paciente transportador bajo (TB). Panel C. Imagen de fluorescencia para vimentina en un cultivo proveniente de un TA. Panel D. Imagen para vimentina en un TB. Panel E. Imagen de fluorescencia para acuaporina 1, en un cultivo celular proveniente de un paciente TA. Panel F. Imagen de fluorescencia para acuaporina 1, en un cultivo proveniente de un paciente TB.

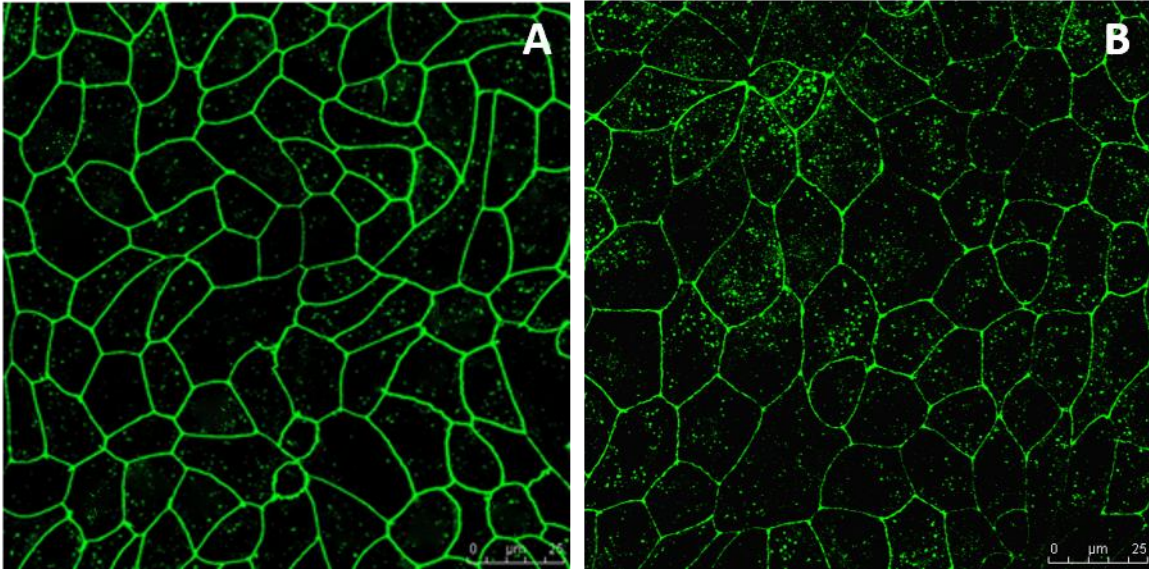


Figura No. 4 Expresión de Claudina-2 (CL-2) en células mesoteliales del peritoneo humano CM. Cultivos de CMFH fueron marcados por inmunofluorescencia con un anticuerpo para CL-2. A) Cultivo de células mesoteliales de un paciente transportador alto (TA). La fluorescencia de CL-2 muestra un patrón lineal bien definido localizado en los bordes celulares (flechas). B) Cultivo de células mesoteliales de un paciente transportador bajo (TB). Se observó marca para CL-2 en el borde celular y en el citoplasma (cabezas de flechas).

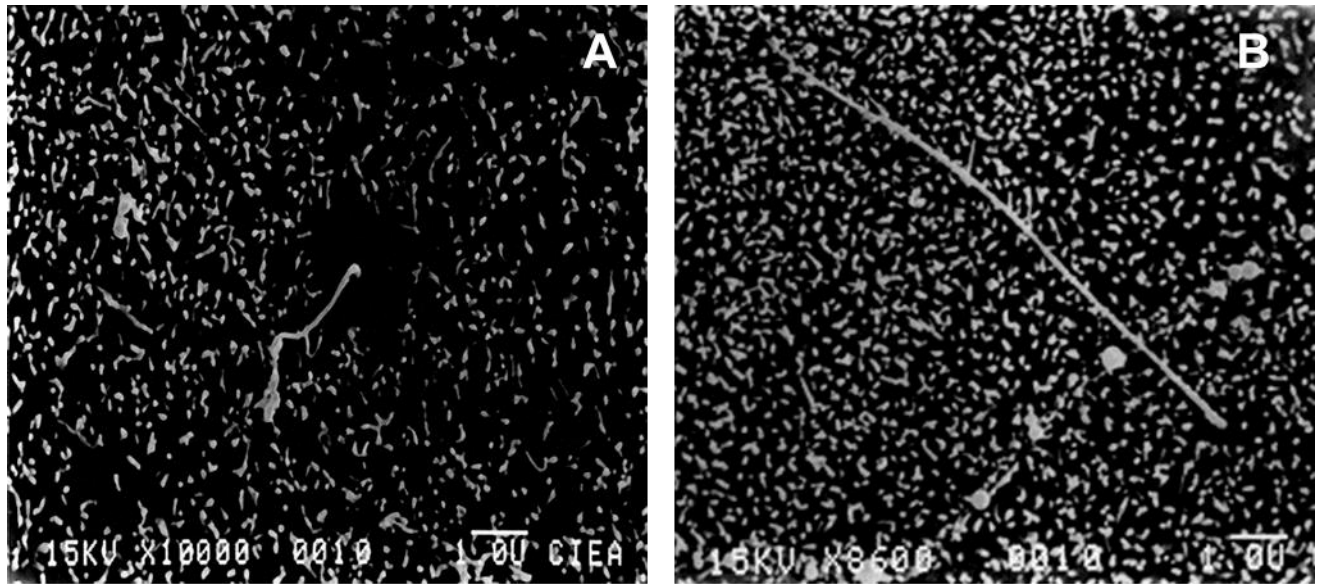


Figura No.5 Monocapa de CM. A. MEB de CM de TA Se observan microvellosidades con zonas desnudas y cilio central corto. B MBE de CM de TB Se observan numerosas microvellosidades y cilio central de aspecto normal.

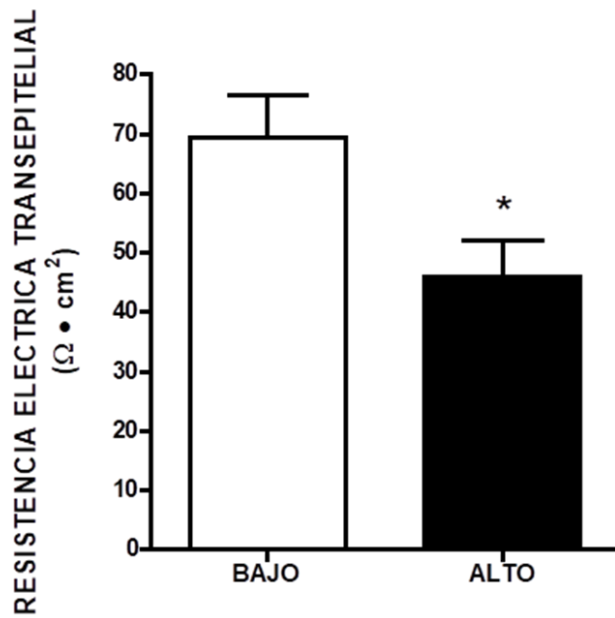


Figura 6. Resistencia eléctrica transepitelial en monocapas de células peritoneales de mesotelio humano. La resistencia eléctrica transepitelial fue mayor en los cultivos provenientes de pacientes con TA, que en los de pacientes con TB. P < 0.05.



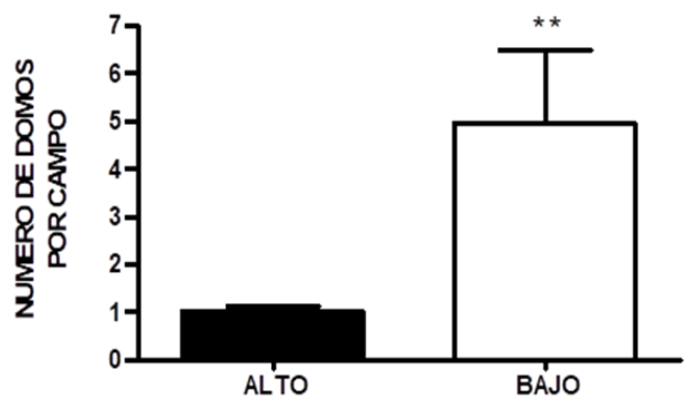


Figura 7. Presencia de domos en monocapas provenientes de pacientes transportadores altos (barra llena) o de pacientes transportadores bajo (barra vacía)