



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE SEGURIDAD SOCIAL AL SERVICIO DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO

HOSPITAL REGIONAL 1° DE OCTUBRE

**EFFECTO DE LOS PRODUCTOS AVANZADOS DE LA GLUCOSILACIÓN (AGES) EN LAS
CÉLULAS MESOTELIALES DE PACIENTES SOMETIDOS A DIÁLISIS PERITONEAL.
AVANCES**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
SUBESPECIALISTA EN MEDICINA (NEFROLOGÍA)**

PRESENTA:

MARÍA ISABEL ROJAS MARTÍNEZ

TUTORES:

DRA. AMALIA GLORIA MOTA HERNÁNDEZ

DRA. EDITH RUBÍ LUIS OJEDA

ISSSTE

DR. LUIS MANUEL AMEZCUA GUERRA

DRA. MARÍA RASHIDI SPRINGALL DEL VILLAR

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA IGNACIO CHÁVEZ

Ciudad Universitaria Cd. Mx. Agosto 2020.



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.

DEDICATORIA

A mi familia:

A mi padre, José Pedro Rojas Tagle, que siempre ha sido mi fortaleza e impulso para seguir adelante y no dejarme caer. Por enseñarme a luchar siempre por nuestros sueños.

A mis queridos hermanos, Ara, por escucharme, aconsejarme y ser mi cómplice en todo momento. Por enseñarme a ver de otra manera la vida.

A Pedro, por protegerme siempre y enseñarme lo que sabes de la vida. Por ayudarme a entender la lecciones que no comprendía y ser mi compañero en todo momento.

A mi adorada nana, Guadalupe, por apoyarme y brindarme tu amor incondicionalmente, sin tu ayuda, no sería lo que soy hoy.

A mis tíos y primos que siempre me motivaron a seguir adelante con sus muestras de cariño.

A mis maestros:

A la Dra. Gloria Mota, por creer en mí y darme la oportunidad de seguir creciendo académicamente.

A la Dra. Ríos por enseñarme a tratar de una manera más humana a los pacientes, por brindarme su apoyo y amistad. Al Dr. López, quien siempre tenía una respuesta a mis preguntas y orientarme siempre que lo necesité. A la Dra. Luis, por transmitirme siempre lo mejor de sus conocimientos, por resolver mis dudas en todo momento. Al Dr. Rodríguez, por su apoyo y su gran amistad.

Al Dr. Vicente Rosas, por apoyarme en este proyecto, enseñarme más de investigación y por su amistad.

A mis compañeros:

Por exigirme y fomentar mi mejor desempeño, por enseñarme que es posible el trabajo en equipo en un ambiente laboral agradable y hacerme sentir en casa.

A Selene Rea y Manuel Gómez, por escucharme, brindarme su apoyo, paciencia y amistad incondicional.

A mis amigos:

A Maripaz Lara, mi hermana de vida, por estar incondicionalmente. A Alfredo Gómez, por ser mi amigo y confidente. A Jefté, por escucharme y alentarme siempre. A la Dra. Rashidi, por su valiosa amistad, su confianza y apoyarme siempre que la he necesitado. Al Dr. Luis Amezcua, por confiar en mí, apoyar este proyecto y por ser un excelente amigo.

A la Dra. Lourdes Téllez y Lic. Marco Antonio Rosas, por permitirme ser parte de su familia y brindarme su apoyo y cariño.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
JUSTIFICACIÓN	12
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	18
DISCUSIÓN	22
CONCLUSIONES	23
PROPUESTAS.....	23
BIBLIOGRAFÍA	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos propuestos de fibrosis peritoneal por AGEs.....	11
Figura 2. Concentración de TGF- β (A) y VEGF (B) en sobrenadante de cultivos de células Mesoteliales.....	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de pacientes con ERC previo y posterior a DP.....	21
--	----

EFFECTO DE LOS PRODUCTOS AVANZADOS DE LA GLUCOSILACIÓN (AGES) EN LAS CÉLULAS MESOTELIALES DE PACIENTES SOMETIDOS A DIÁLISIS PERITONEAL.

ANTECEDENTES

La diálisis peritoneal (DP) es la principal terapia de reemplazo renal en México. El 50% de los pacientes con ERC sometidos a diálisis desarrollan fibrosis peritoneal (FP), angiogénesis acelerada y degeneración vascular asociadas a disfunción peritoneal. La exposición de las células mesoteliales a soluciones dializantes con altas concentraciones de glucosa favorecen la producción de factores capaces de alterar la membrana peritoneal e inducir fibrosis.

OBJETIVO

Evaluar la respuesta de las células mesoteliales peritoneales de pacientes con ERC a la exposición de soluciones dializantes con diferentes concentraciones de glucosa en la producción de VEGF y TGF- β .

MATERIAL Y MÉTODOS

Se determinó la concentración de TGF- β y VEGF en sobrenadantes de cultivos de células mesoteliales obtenidas antes y después de 3 meses de DP al ser expuestos durante 48 horas a diferentes concentraciones de glucosa (1.5%, 2.5% y 4.25%). El análisis estadístico se realizó mediante pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis o Wilcoxon y se consideró una $p < 0.05$ para significancia estadística.

RESULTADOS

Las concentraciones de TGF- β y VEGF incrementaron proporcionalmente al porcentaje de glucosa del líquido dializante, con aumentos del 42% de los niveles basales de TGF- β y del 55% de VEGF por células mesoteliales antes de la DP, al haber sido expuestos a los niveles mayores de glucosa (4.25%) y del 28% y 50%, respectivamente por las células de pacientes dializados durante 3 meses, siendo mayormente respondedoras las células mesoteliales sin exposición a la DP.

CONCLUSIONES

La producción de VEGF y TGF- β por las células mesoteliales *in vitro* es proporcional de la concentración de glucosa contenida en el líquido dializante.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad Renal Crónica (ERC), Diálisis Peritoneal (DP), Fibrosis peritoneal (FP), Productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Factor de Crecimiento Transformante β (TGF β).

EFFECT OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS (AGES) IN THE MESOTHELIAL CELLS OF PATIENTS SUBJECTED TO PERITONEAL DIALYSIS.

BACKGROUND

Peritoneal dialysis (PD) is the main renal replacement therapy in Mexico. 50% of CKD (Chronic Kidney Disease) patients subjected to dialysis develop peritoneal fibrosis (PF), accelerated angiogenesis, and vascular degeneration associated with peritoneal dysfunction. Exposure of mesothelial cells to high glucose dialysis solutions favors the production of certain factors able to alter the peritoneal membrane, inducing fibrosis.

OBJECTIVE

To assess the response of the peritoneal mesothelial cells of patients with CKD to the exposure of dialysates with different glucose concentrations under the production of VEGF and TGF- β .

METHODS

The concentration of TGF- β and VEGF in supernatants of mesothelial cell cultures obtained from patients previous and after 3 months of DP, to be exposed for 48 hours to different glucose concentrations (1.5%, 2.5% and 4.25%) were determined. Statistical analysis was performed using non-parametric tests, Kruskal-Wallis or Wilcoxon considering $p < 0.05$ for statistical significance.

RESULTS

TGF- β and VEGF concentrations increased proportionally due to percentage of glucose in the dialysate, with increases of 42% in the basal levels of TGF- β and of 55% of VEGF by mesothelial cells before PD, when has been exposed exposed to highest levels of glucose (4.25%), and of 28% and 50% respectively, by cells of dialyzed patients, being mostly responsive to glucose effects those cells without PD exposure.

CONCLUSIONS

The production of VEGF and TGF- β by mesothelial cells *in vitro* is proportional to the glucose concentration contained in the dialysate fluid.

KEY WORDS

Peritoneal dialysis (PD), Chronic Kidney Disease (CKD), Peritoneal fibrosis (PF), Advanced glycation end products (AGEs), Vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor- β (TGF β).

ABREVIATURAS

AGEs: Advanced glycation end products (Productos finales de la glucosilación avanzada).

CM: Células mesoteliales.

DP: Diálisis peritoneal.

ERC: Enfermedad renal crónica.

FP: Fibrosis peritoneal.

FGF-2: Factor de crecimiento de fibroblastos 2.

IL-1: Interleucina 1.

IL-1 β : Interleucina 1 beta.

IL-6: Interleucina 6.

IL-8: Interleucina 8.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

RAGEs: Receptores específicos de los productos finales de la glucosilación avanzada.

RNA_m: Ácido Ribonucleico mensajero.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta.

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral α .

TRR: Terapia de reemplazo renal.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

INTRODUCCIÓN

La diálisis peritoneal (DP) es una terapia de reemplazo de la función renal (TRR) utilizada aproximadamente por el 10-15% de pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) a nivel global^(1,2). En México, este porcentaje asciende hasta el 80%, siendo el principal método de sustitución renal. ⁽³⁾ En el Hospital Regional 1º de Octubre se registraron 96 pacientes que iniciaron TRR mediante DP en los últimos 2 años (55 pacientes en 2018 y 41 pacientes hasta agosto de 2019), encontrando como principales etiologías de Enfermedad Renal Crónica: Diabetes Mellitus asociada a Hipertensión Arterial Sistémica en 48.7% de los casos, Diabetes Mellitus en el 30.4%, Hipertensión Arterial Sistémica en el 19.5% y 1.2% de etiología desconocida. La DP es una terapia de reemplazo renal útil en las fases terminales de la ERC, donde la preservación del transporte peritoneal y la capacidad de ultrafiltración suponen el mayor reto. ⁽⁴⁾

La membrana peritoneal es una membrana permeable formada por una capa de células mesoteliales que cubre una región submesotelial compuesta por tejido conectivo, fibroblastos, mastocitos, macrófagos y una densa red de capilares. Esta membrana es capaz de llevar a cabo la depuración de toxinas y la eliminación de agua que, con el tiempo, esta capacidad de transporte se va perdiendo. ⁽⁵⁾ Actualmente, se sabe que los principales factores que deterioran la función del peritoneo y que conllevan la falla de ultrafiltración y pérdida de la capacidad dializante son el tiempo en DP, la concentración de glucosa de las soluciones de diálisis y el número de episodios de peritonitis, ⁽⁶⁾ todos estos tienen en común la respuesta inflamatoria que desencadenan, siendo la responsable de las anomalías estructurales de la membrana peritoneal: pérdida de la monocapa de las células mesoteliales, la fibrosis submesotelial, angiogénesis y la vasculopatía hialinizante. ⁽⁷⁾

La fibrosis peritoneal (FP) es una complicación en los pacientes sometidos a largos periodos de DP, ⁽⁸⁾ la cual termina por retirar a los pacientes de esta modalidad de tratamiento. La FP está asociada a la disfunción de la membrana peritoneal (daño y pérdida de células mesoteliales), provocando falla importante en la ultrafiltración. En particular, el daño a las células mesoteliales es considerado la causa principal de la decadencia de la eficiencia de la diálisis por fibrosis como consecuencia de la exposición directa y continua del peritoneo al

líquido dializante que se caracteriza por tener un pH bajo, alto contenido de glucosa e hiperosmolaridad.⁽⁹⁾

Los mecanismos que subyacen a la FP no están bien caracterizados, sin embargo, se sabe que la transición de las células mesoteliales peritoneales, de epiteliales a mesenquimales, la producción incrementada de matriz extracelular,⁽¹⁰⁾ la inflamación crónica con producción de diferentes citocinas (Factor de Necrosis Tumoral α TNF- α , IL-1, IL-8, Factor de Crecimiento Transformante β TGF- β , y Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 FGF-2)^(11,12) y la neo-angiogénesis acelerada (desencadenada por la producción local de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular VEGF por las células mesoteliales),⁽¹³⁾ son procesos estrechamente involucrados en la iniciación y progresión de la FP. Además, el engrosamiento peritoneal, el cual aumenta significativamente con el tiempo de tratamiento con DP (incrementando de 180 μ m- 700 μ m)⁽²¹⁾ y la diabetes mellitus no controlada son también condiciones significativas para la FP.⁽¹⁴⁾

Estudios recientes han descrito que los productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs, *advanced glycation end products*) contribuyen a la FP cuando interactúan con sus receptores específicos (RAGEs).⁽¹⁵⁾ Esta interacción induce la producción de factores angiogénicos como el VEGF, pro-fibrótico como el TGF- β ⁽¹⁶⁾ e inflamatorios como la IL-1 β y la IL-6,⁽¹⁷⁾ por las células mesoteliales⁽¹⁸⁾ promoviendo la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena tipo I.⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾ Así mismo los AGEs inducen la transición epitelio mesenquimal de las células mesoteliales. La intensidad de la acumulación de AGEs se asocian con fibrosis y disfunción de ultrafiltración.⁽¹³⁾

De manera interesante, se ha descrito que la infusión de soluciones con mayor concentración de glucosa en la cavidad peritoneal induce, a largo plazo, una formación acelerada de AGEs.⁽¹⁵⁾

ANTECEDENTES

Actualmente, se sabe que los principales factores que deterioran la función del peritoneo son el tiempo en DP, la concentración de glucosa de las soluciones de diálisis y el número de episodios de peritonitis,⁽⁶⁾ teniendo en común como responsable de la pérdida del injerto la

respuesta inflamatoria sistémica, la cual a su vez, mediante la producción de diferentes citocinas y sustancias pro-inflamatorias, principalmente TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-8 y FGF-2, que desencadenan entre otras respuestas, la transformación del epitelio mesenquimal de la células mesoteliales en fibroblastos, la producción incrementada de matriz extracelular⁽¹⁰⁾ y la producción de otros mediadores pro-angiogénicos como VEGF.⁽¹³⁾ Hoy día se sabe que VEGF junto con la IL-8 y FGF-2 inducen incremento en el número de capilares peritoneales y mayor permeabilidad, lo que sugiere su posible participación en la iniciación y progresión de la FP,^(11,12,13) limitando la terapia de DP.

Actualmente existe evidencia que propone que la FP se debe al daño de las células mesoteliales por la exposición continua y directa al líquido dializante, el cual tiene un pH bajo, con alto contenido de glucosa y alta osmolaridad.⁽⁹⁾

Estudios recientes han descrito que los productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs, *advanced glycation end products*) parecen contribuir a la FP cuando interactúan con sus receptores específicos (RAGEs),⁽¹⁴⁾ induciendo la producción de factores angiogénicos (VEGF), fibrogénicos (TGF- β)⁽¹⁵⁾ e inflamatorios (IL-1 β , IL-6),⁽¹⁶⁾ en las células mesoteliales⁽¹⁸⁾ (Figura 1).

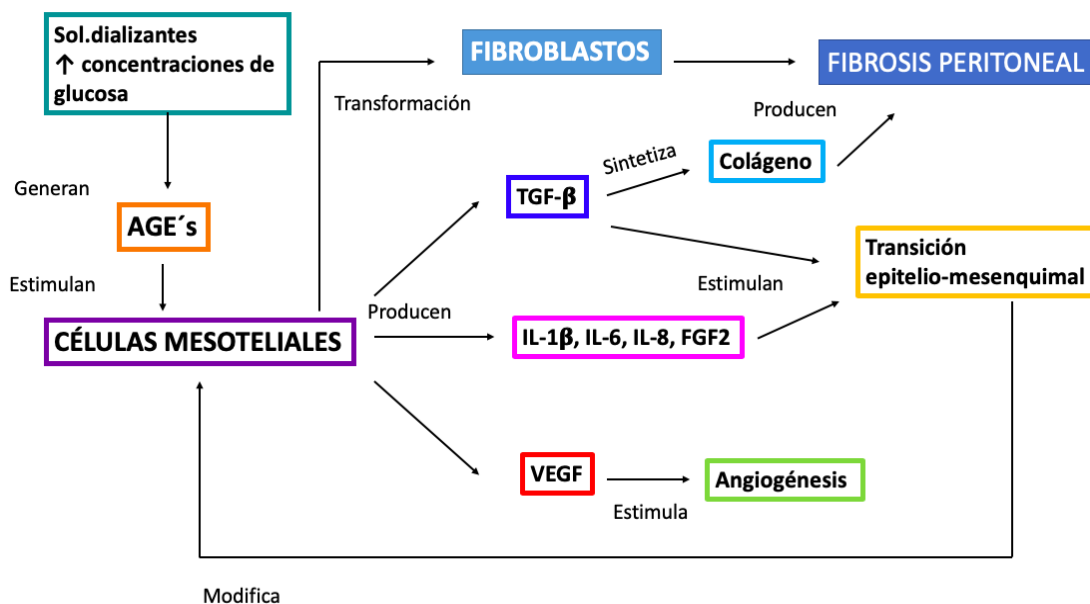


Figura 1. Mecanismos propuestos de fibrosis peritoneal por AGEs.

Fuente: Elaboración propia.

Como se puede apreciar en la figura parte importante en el desarrollo de fibrosis se han propuesto a las soluciones dializantes como mecanismo generador, pero continua en incertidumbre el tiempo en que se genera la activación de los AGEs y su efecto sobre las células mesoteliales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DP es el principal tratamiento de reemplazo renal en nuestro país. Sin embargo, el 50% de los pacientes con DP presentan fibrosis progresiva, angiogénesis acelerada y degeneración vascular asociada con incremento del transporte de solutos y disminución de la ultrafiltración, lo que conlleva a la pérdida de función del peritoneo. Los mecanismos que subyacen a estos procesos patológicos no están bien dilucidados, por lo que no existen intervenciones dirigidas por patogénesis para evitarlos.

Es probable que una fuente importante de moléculas pro-angiogénicas y pro-fibróticas en este proceso sean las células mesoteliales, mediante la activación de vías de respuesta a los RAGEs. En este sentido, la exposición crónica y persistente del peritoneo a concentraciones elevadas de glucosa durante el proceso de diálisis peritoneal pudiera ser el inductor de la actividad de los RAGEs en las células mesoteliales, lo que en última instancia facilitaría la producción de mediadores solubles que promuevan inflamación, angiogénesis y fibrosis *in situ*. Por lo anterior, resulta necesario analizar si las células mesoteliales alteran diferencialmente la producción de factores angiogénicos y pro-fibróticos a la concentración de glucosa del líquido dializante.

JUSTIFICACIÓN

La pérdida progresiva de la eficacia de la DP en pacientes con ERC provocada por la FP está asociada a una falla en la ultrafiltración, que lleva al cambio de terapia de reemplazo renal. Además, la FP es un factor de riesgo mayor para el desarrollo de esclerosis peritoneal encapsulante, razón por la cual la DP es omitida (evitada) en una cantidad significativa de pacientes en fase terminal. A pesar de haberse realizado múltiples estudios (en ratas y en células mesoteliales de omento y líquidos de DP) tratando de entender los mecanismos por los cuales los AGEs producen fibrosis del peritoneo, muy poco se conoce acerca de los efectos de las distintas concentraciones de glucosa del líquido dializante en la síntesis de factores fibróticos, angiogénicos e inflamatorios por parte de las células

mesoteliales humanas. Ello resultaría en un primer acercamiento para diseñar medidas que disminuyan la inflamación y el daño del peritoneal, para prolongar la funcionalidad de la DP.

HIPÓTESIS

El Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y el Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) presentarán un incremento directamente proporcional a mayor concentración de glucosa de por lo menos el 50% con relación al basal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta de las células mesoteliales peritoneales, obtenidas de soluciones de diálisis peritoneal, provenientes de pacientes con ERC con exposición aguda y crónica a soluciones dializantes con diferentes concentraciones de glucosa, a través de la activación de los RAGEs, midiendo la producción de VEGF y TGF- β .

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar si la producción *in vitro* de VEGF y TGF- β por células mesoteliales peritoneales es diferente a la basal, después de la administración de diálisis peritoneal durante tres meses en pacientes con ERC.
- Evaluar si la exposición en agudo a diferentes concentraciones de glucosa (1.5% vs 2.5% vs 4.25%) modifica la producción *in vitro* de VEGF y TGF- β por células mesoteliales de pacientes con ERC que no han iniciado DP.
- Evaluar si la exposición en agudo a diferentes concentraciones de glucosa (1.5% vs 2.5% vs 4.25%) modifica la producción *in vitro* de VEGF y TGF- β por células mesoteliales de pacientes con ERC sometidos a DP durante tres meses.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experimental analítico.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Bolsas de producto de diálisis peritoneal proveniente de pacientes que iniciarán terapia de reemplazo renal mediante diálisis peritoneal continua ambulatoria del Hospital Regional 1º de Octubre y Hospital General Tacuba que cumplan las siguientes características:

- Mayores de 18 años
- Sin distingo de género
- Con ERC KDIGO V
- Sin diálisis peritoneal previa
- Firma de consentimiento informado
- Que sean sometidos a colocación de catéter de Tenckhoff percutáneo o quirúrgico.
- Inscritos al programa de diálisis peritoneal ambulatoria (DPCA).
- Reporte de citoquímico de líquido de diálisis con leucocitos < a 100 cel/ dl.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Bolsas de producto de diálisis peritoneal proveniente de pacientes que iniciarán terapia de reemplazo renal mediante diálisis peritoneal continua ambulatoria del Hospital Regional 1º de Octubre y Hospital General Tacuba que cumplan las siguientes características:

- Pacientes diabéticos
- Que hayan recibido glucocorticoides por cualquier vía en los últimos 3 meses.
- Con más de una cirugía abdominal previa por cualquier motivo.
- Con antecedente de proceso infeccioso intraperitoneal o de cavidad abdominal 3 meses previos.
- Neoplasia activa.
- Mujeres embarazadas o con endometriosis.

- Infección previa por virus de hepatitis B o C, o VIH.
- Presenten lesión de víscera hueca o hemoperitoneo al momento de colocación de catéter de Tenckhoff.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Bolsas de producto de diálisis peritoneal provenientes de pacientes que iniciarán terapia de reemplazo renal mediante diálisis peritoneal continua ambulatoria del Hospital Regional 1º de Octubre y Hospital General Tacuba que presenten durante el tiempo de estudio o seguimiento, las siguientes características:

- Presenten hemoperitoneo.
- Presenten proceso inflamatorio local (tonelitos).
- Presenten peritonitis secundaria.
- Presenten proceso inflamatorio sistémico.
- Se les realice recolocación de catéter de Tenckhoff.
- Migren a otra modalidad de tratamiento sustitutivo de la función renal.
- Sean sometidos a cirugía durante el seguimiento por cualquier motivo.
- Uso de glucocorticoides durante el seguimiento.

CÁLCULO DE LA MUESTRA

El muestreo es por cuota, debido a que interviene el tiempo. Tomando en cuenta la capacidad de las placas de ELISA (método por el que se determinará la concentración de cada uno de los analitos), consideramos un número de 10 pacientes con seguimiento completo a los tres meses, según la capacidad de las placas de ELISA, sin embargo por situación médica actual, sólo se lograron reunir muestras en ambos momentos (pre y post-diálisis) de 3 pacientes con ERC.

TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS EMPLEADOS

La selección de las bolsas de diálisis provenientes de pacientes que reunieron los criterios de inclusión, se les informó sobre el protocolo de investigación y se solicitó firma de consentimiento informado para participar en estudio y para colocación de catéter de diálisis.

COLOCACIÓN DEL CATÉTER TENCKHOFF

Se procedió a realizar asepsia y antisepsia, posteriormente se infiltró lidocaína y realizó incisión en línea paraumbilical izquierda. Se disecó por planos hasta llegar a membrana peritoneal, perforando la membrana peritoneal. Se introdujo el catéter de diálisis mediante guía metálica en hueco pélvico. Se corroboró adecuada colocación con la introducción 40 ml de solución salina y verificó retorno de la solución, este líquido obtenido fue la primera muestra de líquido peritoneal a analizar. Una vez que se corroboró la adecuada colocación del catéter se infundió 2000 cc de solución dializante al 1.5% para corroborar adecuada permeabilidad y se drenó posteriormente. Se realizó túnel, y finalmente se cerró por planos la incisión.

OBTENCIÓN DE LÍQUIDO PERITONEAL

A todos los pacientes se les tomó una primera muestra de 40ml de solución salina con líquido peritoneal al momento de colocar el catéter de Tenckhoff (tiempo Basal), así como el líquido de diálisis drenado en el primer recambio 40ml. Además, se tomó una segunda muestra a los 3 meses de haber iniciado la DP. Para ambos tiempos de colección de muestras, se extrajeron 50ml del efluente del dializado en jeringa estéril bajo condiciones de asepsia.

TRASLADO DE MUESTRAS

Las muestras de líquido de diálisis y de líquido peritoneal se colocaron en frascos estériles con tapa hermética de goma o rosca (recipiente primario) debidamente etiquetados con los datos del paciente y se guardaron en un segundo envase hermético para proteger el envase primario. Estos dos envases fueron colocados en un tercer embalaje rígido con un material para amortiguar y proteger de daños físicos externos, así como también con un material absorbente en caso de rotura o fuga del material. Finalmente se colocaron estos en un recipiente refrigerado a 4°C para la mejor preservación de la muestra. Posteriormente fueron enviadas mediante transporte terrestre contratado de manera particular al Instituto Nacional de Cardiología, al laboratorio de inmunología.

OBTENCIÓN Y ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS MESOTELIALES

Las muestras de líquido peritoneal se centrifugaron a 500 g durante 15 minutos a 7°C. Las células se contaron, ajustaron y sembraron 5×10^5 cel/pozo en placas de cultivo celular de 24 pozos y se dejaron incubar en medio RPMI-1640 suplementado (10% de suero fetal bovino, 5% de aminoácidos esenciales, 5% de estreptomicina-gentamicina y 5% de HEPES). A las 2 horas de cultivo, las células mesoteliales se estimularon con soluciones dializantes a las siguientes concentraciones: 1.5%, 2.5% y 4.25% de glucosa. A las 48 horas de incubación se cosecharon los sobrenadantes y se almacenaron en alícuotas de 500 µL que se mantendrán congeladas a -70°C hasta su uso.

DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE BIOMARCADORES

Las concentraciones de TGF- β y VEGF fueron determinadas mediante la técnica de ELISA-Sándwich mediante el uso de kits comerciales (R&D Systems), siguiendo instrucciones del fabricante. Se procesaron las muestras en lector de ELISA marca BioTek, modelo ELx808. Se utilizó un anticuerpo monoclonal específico para cada uno de los analitos como anticuerpo de captura para la sensibilización de la placa de ELISA. Posterior al proceso de

lavado se añadió buffer de fosfatos con albúmina al 1% como solución de bloqueo para cubrir las superficies que no contuvieran el anticuerpo de captura y evitar pegados inespecíficos. Se lavaron y colocaron 100 µL de las muestras de sobrenadante a determinar y la curva de referencia correspondiente conformada por diluciones seriadas a partir de una concentración conocida. Se utilizaron anticuerpos policlonales como anticuerpo de detección y la estreptoavidina (enzima) y solución reveladora. La intensidad del color (densidad óptica) fue medida en lector de ELISA a 450 nm. Se calculó la concentración para cada densidad óptica detectada y se multiplicó por el factor de dilución que se haya utilizado para los sobrenadantes.

En el análisis estadístico, las variables dicotómicas se expresaron como porcentajes, las variables dimensionales en promedios $\pm$ 1 desviación estándar y las variables nominales y ordinales como medianas y rangos intercuartilares. Las diferencias entre proporciones fueron procesadas con la prueba de χ^2 -cuadrada; las diferencias entre grupos se identificarán mediante la prueba de ANOVA de una vía o Kruskal-Wallis para comparaciones de más de 2 grupos, con análisis post hoc con la prueba de Tukey o de Dunnet para ANOVA y U Mann Whitney. Para encontrar la variación a lo largo del tiempo se usó la prueba de Wilcoxon. Se fijó un valor de $p < 0.05$ para significancia estadística. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico GraphPadPrism versión 7.0.

ACEPTACIÓN DEL PROTOCOLO

El presente trabajo fue aceptado por los comités de bioética e investigación del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

RESULTADOS

Los datos de la Tabla 1 muestran las características de los sujetos de estudio que conformaron el presente estudio. De los parámetros bioquímicos, únicamente los niveles de urea mostraron diferencia estadística ($p=0.0022$) entre las determinaciones realizadas antes

y después de la DP, sin embargo esto es de esperar por ser el objeto del inicio de la terapia de reemplazo renal, la eliminación de toxinas, dentro de ellas la urea.

Los resultados mostrados en la Figura 2A, describen una mayor producción de TGF- β (1.2 veces, 16.5%) por las células mesoteliales extraídas de pacientes sometidos 3 meses a diálisis peritoneal en comparación con las producidas por éstas mismas células antes de la DP (150 vs 125 pg/mL). De manera similar, la producción de VEGF (Figura 2 B) por las células mesoteliales expuestas 3 meses al líquido dializante también incrementó 1.2 (16%) la producción basal (98.6 vs 77.3 pg/mL).

La exposición de las células mesoteliales de pacientes con ERC antes de someterlos a DP que fueron expuestas a solución dializante con concentración de 1.5% de glucosa, incrementó 1.2 veces (19%) la producción de TGF- β , mientras que su exposición a una concentración de 2.5% de glucosa la incrementó 1.3 veces (23%), y con un líquido con 4.5% de glucosa la incrementó 1.7 veces (42%) (Figura 2A).

Las células mesoteliales obtenidas de pacientes con terapia dialítica durante 3 meses, cuando se expusieron a concentraciones de glucosa al 1.5%, la producción de TGF- β se incrementó 1.16 veces (14.4%), mientras que al exponerse a glucosa al 2.5% su producción incrementó 1.3 veces (20.7%) y la exposición al 4.25% de glucosa la incrementó 1.4 veces (28.2%).

La producción de VEGF de las células mesoteliales obtenidas de pacientes sin diálisis previa, cuando se expusieron a una concentración de 1.5% de glucosa incrementó los niveles basales 1.3 veces (22%), mientras que al exponerlas a una solución al 2.5% de glucosa incrementó su producción 1.6 veces (38.6%) y con solución al 4.25% incrementó 2.2 veces (55%). Las células mesoteliales que estuvieron expuestas durante 3 meses al líquido dializante, cuando se expusieron a la solución con un 1.5% de glucosa incrementaron 1.04 veces (45%) la producción de VEGF, con solución al 2.5% incrementaron 1.4 veces (30%) y al exponerlas a la mayor concentración de glucosa (4.25%) aumentaron su producción 1.8 veces (45%) (Figura 2B).

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de pacientes con ERC previo y posterior a DP.

		PRE-DIÁLISIS	POST-DIÁLISIS (3 meses)	VALOR DE <i>p</i>
Edad, mediana (IQR 25-75)		56 (41 - 63)	56 (41 - 63)	
Hombres/Mujeres		3/0	3/0	
Laboratorios, mediana (IQR 25-75)				
	Glucosa	82 (81 - 85.5)	83 (78 - 83.5)	0.8281
	Urea	258.9 (214.9 - 271.3)	70.8 (67.7 - 93.35)	0.0022*
	Creatinina	12.9 (11.3 - 12.9)	5.3 (5.1 - 9.3)	0.3939
	Albúmina	3.4 (3.35 - 3.5)	3.3 (3.25 - 3.85)	0.5887
	Leucocitos	9.02 (7.53 - 11.86)	8.32 (8.06 - 10.11)	0.8082

*significancia estadística, IQR= rango intercuartilar

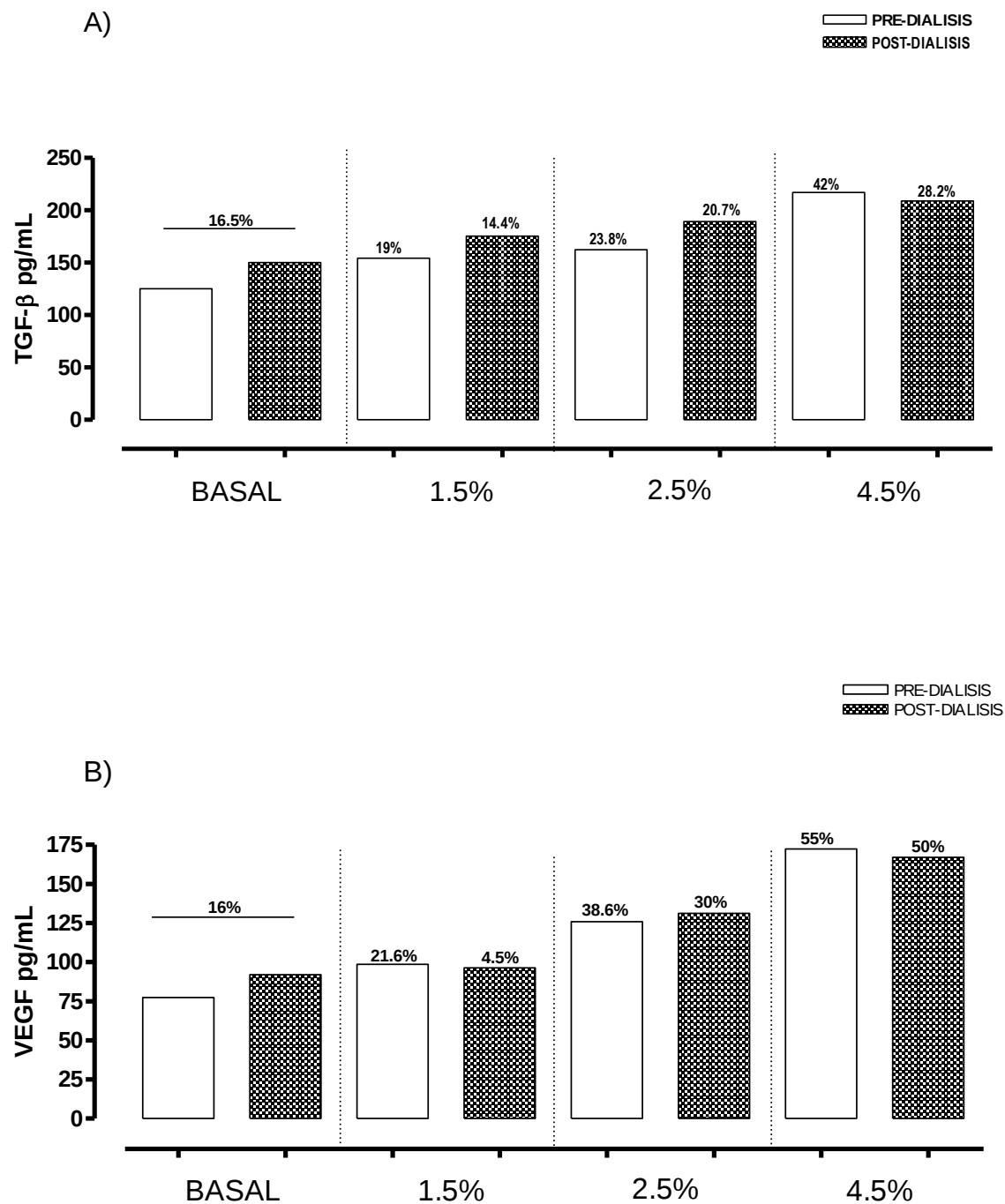


Figura 2. Concentración de TGF- β (A) y VEGF (B) en sobrenadante de cultivos de células mesoteliales obtenidas de pacientes con ERC previo y posterior a la diálisis peritoneal (DP) (3 meses) expuestas a diferentes concentraciones de glucosa en el líquido dializante. % vs concentración basal.

DISCUSIÓN

Actualmente es bien conocido que las soluciones dializantes tienen como agente osmolar la glucosa, capaz de alterar la producción de factores inflamatorios, angiogénicos y pro-fibróticos. Sin embargo, no se ha dilucidado el patrón de producción de VEGF y TGF- β por las células mesoteliales antes de ser expuestas a soluciones dializantes (vírgenes), de aquellos pacientes cuya etiología de su nefropatía es distinta a la derivada por la diabetes.

En este estudio se demuestra que las células mesoteliales cuando se exponen al líquido dializante, independientemente de la concentración de glucosa que éste tenga, presentan un marcado incremento en la producción de factores prototipo que subyacen a los procesos de fibrosis y angiogénesis como son el TGF- β y el VEGF, respectivamente.

Nuestros datos demuestran un incremento proporcional en la síntesis/secreción de TGF- β y VEGF, esto es, a mayor concentración de glucosa en el líquido dializante, mayor el incremento en su producción. De manera que, la producción incrementada de ambos factores al ser dependientes de la concentración de glucosa que contenga el líquido dializante sugiere un aumento en el riesgo de desarrollar fibrosis peritoneal en los pacientes sometidos a diálisis peritoneal. Por otro lado, las células mesoteliales (vírgenes) mostraron ser mayormente respondedoras a los efectos de las distintas concentraciones de glucosa de los líquidos dializantes a las cuales fueron expuestas en comparación con las células mesoteliales previamente expuestas a diálisis. Una posible explicación pudiera ser la saturación de los receptores de AGE'S, que conllevan a la disminución en la síntesis de ambos factores por estas células.

Estos hallazgos tendrían como implicación clínica la toma de decisiones más cuidadosas con respecto al uso de las soluciones dializantes para cada paciente, desde el inicio de su terapia dialítica, estando conscientes que desde ese momento se estará induciendo la activación de las vías fibróticas y angiogénicas que pudieran conducir a la falla temprana de la membrana peritoneal debido al desarrollo de los procesos pro-fibróticos y angiogénicos que ellos supone.

CONCLUSIONES

La producción de VEGF y TGF- β por las células mesoteliales *in vitro* es proporcional a la concentración de glucosa contenida en el líquido dializante. El uso de soluciones dializantes con concentraciones altas de glucosa podría favorecer la falla de la membrana peritoneal por el incremento en la síntesis de factores fibróticos y angiogénicos que las soluciones dializantes con menor concentración de glucosa.

PROPUESTAS

Fomentar el uso racional de diálisis peritoneal en conjuntos con el cuidado nutricional de los pacientes, para que no requieran dosis altas de un agente osmótico como para una ultrafiltración efectiva.

Encontrar el agente osmótico idóneo para diálisis nutricional, en funcionalidad efectiva, sin efectos adversos, de bajo costo, y de disponibilidad para todos...

BIBLIOGRAFÍA

1. Jain AK, Blake P, Cordy P, et al. Global trends in rates of peritoneal dialysis. *J Am SocNephrol*. 2012; 23:533-544.
2. Li PK, Chow KM, Van de Luitgaarden MW, et al. Changes in the worldwide epidemiology of peritoneal dialysis. *NatRevNephrol* 2017; 13:90-103.
3. Venice Chávez Valencia, Citlalli Orizaga de la Cruz, Héctor Leonardo Pazarin Villaseñor, Francisco Fuentes Ramírez, Renato Parra Michel, YuritomoAragaki, Isela Márquez Magaña, Mario Alberto García Cárdenas y Rojas Campos Enrique; Frecuencia de los tipos de transporte peritoneal en la población del Hospital General Regional N.º 46 del Instituto Mexicano del Seguro Social.
4. Alexandra Helmke, Johannes Nordlohne, Michael S. Balzer, Lei Dong, Song Rong, Marcus Hiss, NelliShushakova, Hermann HallerandSibylle von Vietinghoff; CX3CL1–CX3CR1 interaction mediates macrophage mesothelial cross talk and promotes peritoneal fibrosis; *Kidney International* (2019).
5. Davies SJ. Peritoneal solute transport and inflammation. *Am J KidneyDis*. 2014; 64:978-986.
6. Williams JD, Carig KJ, Topley N, et al. Morfphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am SocNephrol* 2002, 13:470-479.
7. Di Paolo N, Sacchi G: Atlas of peritoneal histology. *Perit Dial Int* 20[Suppl 3]: S5–S96, 2000.

8. Zhou Q, Bajo MA, Del Peso G, et al. Preventing peritoneal membrane fibrosis in peritoneal dialysis patients. *KidneyInt.* 2016; 90:515-524.
9. Lee HY, Park HC, Seo BJ, Do JY, Yun SR et al. Superior patient survival for continuous ambulatory peritoneal dialysis patients treated with a peritoneal dialysis fluid with neutral pH and low glucose degradation product concentration (Balance). *Perit Dial Int.* 2005; 25:248-255.
10. R. Selgas, M.^a A. Bajo, A. Aguilera, J. A. Sánchez-Tomero, A. Cirugeda, G. del Peso, V. Álvarez, J. A.; Jiménez-Heffernan, C. Díaz y M. López-Cabrera; Transición epitelio-mesénquimal en procesos fibrosantes. Células mesoteliales obtenidas ex vivo de pacientes tratados con diálisis peritoneal como modelo de transdiferenciación; *NEFROLOGÍA*. Vol. XXIV. Número 1. 2004.
11. Maksic D, Vasilijic S, Colic M, Stankovic-Popovic V, Bokanjic D. Systemic and intraperitoneal proinflammatory cytokine profiles in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *AdvPerit Dial.* 2009; 25:50-55.
12. Bellon T, Martínez V, Lucendo B, et al. Alternative activation of macrophages in human peritoneum: implications for peritoneal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26:2995-3005.
13. Aroeira LS, Aguilera a, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, Gloria del Peso, Jiménez-Heffernan JA, Selgas R, and López-Cabrera M; Epithelial to Mesenchymal Transition and Peritoneal Membrane Failure in Peritoneal Dialysis Patients: Pathologic Significance and Potential Therapeutic Interventions; *J Am SocNephrol*2007; 18: 2004–2013.
14. Honda K, Hamada C, Nakayama M, Miyazaki M, Sherif AM, et al. Impact of uremia, diabetes and peritoneal dialysis itself on the pathogenesis of peritoneal sclerosis: a quantitative study of peritoneal membrane morphology. *Clin J Am SocNephrol* 2008; 3:720-728.
15. Schwenger V, Morath C, Salava A, Amann K, Seregin Y et al. Damage to the peritoneal membrane by glucose degradation products is mediated by the receptor for advanced glycation end products. *J Am SocNephrol.* 2006; 17:199-207.
16. Kumano K, Shimoda M, Hyodo T, Sakai T. The role of TGF- β in growth inhibition of peritoneal mesothelial cells in high glucose dialysate. *Perit Dial Int.* 1995; 15:S93-S95.
17. Fielding CA, Jones GW, McLoughlin RM et al. Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. *Immunity.* 2014; 40:40-50.
18. Kim CD, Kwon HM, Park SH, OH EJ, Kim MH et al. Effects of low glucose degradation products peritoneal dialysis fluid on the peritoneal fibrosis and vascularization in a chronic rat model. *TherApher Dial.* 2007; 11:56-64.
19. Aroeira LS, Loureiro J, González-Mateo GT, Fernandez Millara V, del Peso G et al. Characterization of epithelial to mesenchymal transition of mesothelial cells in a

mouse model of chronic peritoneal exposure to high glucose dialysate. *Perit Dial Int* 2008;28 (Suppl 5);29-33.

20. Park MS, Lee HA, Chu WS, Yang DH, Hwang SD. Peritoneal accumulation of AGE and peritoneal membrane permeability. *Perit Dial Int.* 2000; 20:452-460.

21. Williams JD, Craig KJ, Topley N et al. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am SocNephrol* 2002; 13: 470–479.