

11230

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
"DR. ANTONIO FRAGA MOURET"
CENTRO MEDICO "LA RAZA"

"OPTIMIZACIÓN EN EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN
DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES PERITONEALES
EN CULTIVO PRIMARIO DE PACIENTES EN
DIALISIS PERITONEAL CONTINUA AMBULATORIA (DPCA)"

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN NEFROLOGIA

P R E S E N T A :

DR. JESUS M. RAMOS GORDILLO

ASESOR: DR. ALFONSO LUIS GONZALEZ SANCHEZ



0342934



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

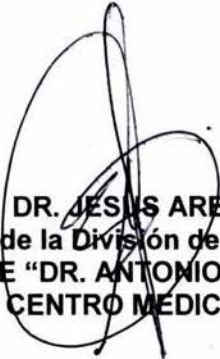
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

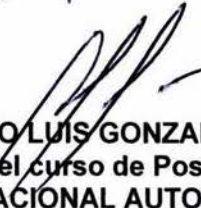
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

**“OPTIMIZACIÓN EN EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN
DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES PERITONEALES
EN CULTIVO PRIMARIO DE PACIENTES EN
DIALISIS PERITONEAL CONTINUA AMBULATORIA (DPCA)”**



DR. JESUS ARENAS OSUNA
Jefe de la División de Educación Médica
UMAE “DR. ANTONIO FRAGA MOURET”
CENTRO MEDICO “LA RAZA”



DR. ALFONSO LUIS GONZALEZ SANCHEZ
Profesor Adjunto del curso de Postgrado en Nefrología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DR. JESUS M. RAMOS GORDILLO
Médico Residente de Nefrología



**Número definitivo del protocolo:
2005-3501-051**

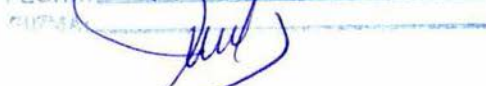
SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIZACIÓN
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
UNAM



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ramos Gordillo Jesús M

FECHA: 19/09/05



**Co-Asesores: Dr. José Luis Reyes Sánchez
Jefe del Laboratorio de Fisiología Renal
Cinvestav. IPN**

**Dr. Alejandro Pérez López
Médico Adscrito al Servicio de Nefrología
Hospital Central. PEMEX**

**Colaboradores: QFB. Elsa Sánchez Montes de Oca
M. en C. Dolores Martín Tapia
QFB. Carmen Namorado Tónix
T.L.Gerardo Sierra**

**SITIO DEL ESTUDIO
UMAE "DR. ANTONIO FRAGA MOURET"
CENTRO MEDICO "LA RAZA"**

**Centro de Investigación y Estudios Avanzados
CINVESTAV
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

I. INDICE

II. INTRODUCCION.....3

III. MATERIAL Y METODOS.....8

IV.
RESULTADOS.....11

V.
DISCUSION.....12

VI.
CONCLUSIONES.....13

VII.
BIBLIOGRAFIA.....14

XI.
ANEXOS.....16

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres: Porque con su confianza, cariño y comprensión, me señalaron el camino a seguir; gracias por su digno ejemplo y enseñanzas. Ustedes son los mejores padres que Dios pudo darme.

A Maria Elena: Con todo mi amor porque tu eres mi mejor ejemplo a seguir. Gracias por estar siempre conmigo.

Gracias a mis dos amores, mi esposa e hija, ustedes son la principal razón de mi vida. Gracias por apoyarme en los momentos difíciles y estar a mi lado todo este tiempo.

A Consuelito: Gracias por tu apoyo incondicional y tu gran cariño.

A mis compañeros y amigos (Sandro, Julio, Mónica, Lilia y Luis): Gracias a ustedes por apoyarme incondicionalmente a través de este tiempo. Sin ustedes el camino hubiera sido más difícil.

A mis maestros: Por la confianza, ayuda, ejemplo, enseñanzas y amistad, sin las cuales no hubiera sido posible alcanzar mi mayor anhelo.

Muy especialmente a mis dos queridos maestros:

Dr. Alejandro Pérez López y Dr. José Luis Reyes Sánchez: Insuperables maestros y hombres ejemplares, ya que gracias a sus enseñanzas, apoyo y orientación hicieron posible mi realización profesional, con profunda gratitud y cariño como testimonio de nuestra imperecedera amistad.

Gracias Dra. Calleja: Mujer extraordinaria, portadora de amplia experiencia profesional, gracias por enseñarme aspectos de la nefrología que no están en los libros.

Gracias a todos por su apoyo constante. Siempre los tenido presentes.

“OPTIMIZACIÓN EN EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES PERITONEALES EN CULTIVO PRIMARIO DE PACIENTES EN DIÁLISIS PERITONEAL CONTINUA AMBULATORIA (DPCA)”

RESUMEN

INTRODUCCION: La integridad anatómica y funcional de la célula mesotelial (CM) es fundamental para la estabilidad de la membrana peritoneal para la estabilidad de la membrana peritoneal. En la actualidad, existen métodos que permiten obtener, aislar y cultivar células mesoteliales, sin embargo algunos son invasivos y otros no obtienen un número suficiente de células mesoteliales.

OBJETIVO: Optimizar el número de células mesoteliales de líquido peritoneal y establecer un modelo de crecimiento *in vitro*, fácil, rápido y accesible en nuestro medio.

MATERIAL Y METODOS: Se obtuvo líquido peritoneal de once pacientes en diálisis peritoneal continua ambulatoria DPCA, el cual se centrifugó durante 10 minutos a 1500 r.p.m. para posteriormente realizar conteo celular y prueba de viabilidad celular con azul de tripano. Finalmente se sembraron las células en medio de cultivo DMEM-F12 y se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%.

RESULTADOS: La mediana de células mesoteliales fue de 260×10^3 en total. Seis pacientes se les clasificó como transportadores altos la mediana de células mesoteliales fue de 310×10^3 y para 5 pacientes transportadores bajos fue de 160×10^3 células. Se obtuvo marcaje positivo para citoqueratina-8, vimentina y acuaporina 1 en el cultivo primario e incluso hasta el pasaje celular número cinco.

CONCLUSIONES: En resumen, las CM liberadas al efluente peritoneal son accesibles para su estudio mediante cultivo. Con esta técnica se abre la posibilidad del seguimiento longitudinal de la biología de las CM de forma individual en los pacientes en DPCA.

Palabras clave: **Cultivo de células mesoteliales. Diálisis peritoneal.**

"OPTIMIZATION IN THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE MESOTHELIAL CELLS IN PRIMARY CULTURE OF PATIENT IN AMBULATORY CONTINUOUS PERITONEAL DIALYSIS (DPCA)"

SUMMARY

INTRODUCTION: The anatomical and functional integrity of the mesothelial cell (CM) it is fundamental for the stability of the peritoneal membrane. Actually, there are methods that allow to obtain, to isolate and to cultivate mesothelial cells, however some are invasives and others don't obtain or enough mesothelial cells numbers.

OBJECTIVE: To optimize the number of mesothelial cells of peritoneal liquid and to establish a model of growth in vitro, easy, quick and accessible in our means.

MATERIAL AND METHODS: Eleven patients' peritoneal liquid was obtained in ambulatory continuous peritoneal dialysis DPCA, which was centrifuged during 10 minutes to 1500 r.p.m. following to count the mesothelial cells and test of cellular viability with blue of tripano. Finally the cells were cultured in DMEM-F12 and they were incubated at 37°C with CO₂ to 5%.

RESULTS: The medium of cells mesothelial was of 260x10³ in total. Six patients were classified as high transporters the medium of mesothelial cells it was of 310 x 10³ and five patient low transporters it was of 160 x 10³ cells. The mesothelial cells was positive for itoqueratina-8, vimentin and aquaporin 1 in and primary cultivation and even until the passage cellular number five.

CONCLUSIONS: In summary, the liberated CM to the peritoneal effluent is accessible for their study by means of cultivation. This technique open the possibility of the longitudinal pursuit of the biology of the CM in an individual way opens up in the patients in DPCA.

Key words: Culture of mesothelial cells. Peritoneal dialysis.

II. INTRODUCCION

En 1730, James Douglas hizo la primera descripción moderna del peritoneo humano el cual es una fina capa de células mesoteliales sobre una membrana basal y tejido conectivo de diferente grosor, en el cual se encuentran macrófagos, fibroblastos, adipocitos, capilares, vasos linfáticos y fibras nerviosas¹. El peritoneo humano es muy delgado, y depende de la localización en la cavidad peritoneal, su principal función es la de reducir la fricción entre las vísceras de la cavidad abdominal, sin embargo también se ha aprovechado su capacidad para el intercambio de líquidos y solutos como la urea, la creatinina y electrolitos entre los capilares peritoneales y la cavidad peritoneal².

Desde hace tiempo se conoce que las distintas estructuras peritoneales juegan un papel importante en el mantenimiento de la anatomía y fisiología peritoneal, todas ellas a través de la liberación de múltiples sustancias entre ellas: fosfolípidos, colágeno, elastina, proteoglucanos, fibronectina, interleucinas, factores de crecimiento y prostaglandinas modifican continuamente las propiedades fisicoquímicas del peritoneo³.

La secreción de muchas sustancias demuestra la importancia que tiene el mesotelio, no solo como un epitelio de recubrimiento sino también como una estructura indispensable para formación de tejido conectivo peritoneal y para la regulación vasomotora⁴.

La membrana peritoneal está recubierta por una monocapa de células mesoteliales, que poseen características de células epiteliales, y actúan como barrera de permeabilidad entre la cavidad abdominal y los capilares peritoneales las cuales secretan diversas sustancias implicadas en la regulación en el tono vascular así como generar estímulos para la formación de nuevos vasos sanguíneos peritoneales y en la defensa inmune local^{4,5}.

Desafortunadamente en los pacientes con insuficiencia renal crónica en diálisis peritoneal, la exposición reiterada a soluciones de diálisis ácidas, hiperosmóticas e hiperglucémicas causa inflamación crónica y daño al peritoneo, que progresivamente se denuda de células mesoteliales y genera su

transdiferenciación mesenquimal hacia fibroblastos⁵. Estos cambios estructurales parecen ser la principal causa del fracaso en la ultrafiltración, que afecta al 20% de los pacientes sometidos a diálisis peritoneal. Estas alteraciones morfológico-funcionales pueden verse además aceleradas por episodios severos de peritonitis o hemoperitoneo^{6,7}.

Las anomalías morfológicas del peritoneo de estos pacientes se caracterizan por fibrosis intersticial, expansión variable de la matriz extracelular, daño a la microvasculatura peritoneal manifestada por engrosamiento y reduplicación de la membrana basal, fibrosis, hialinización de la media y neovascularización importante así como pérdida parcial o total de las células mesoteliales^{8,9}.

La pérdida de la función del peritoneo se caracteriza por una morbimortalidad elevada, desnutrición progresiva, complicaciones cardiovasculares más severas, hospitalizaciones frecuentes, mayor atención médica, costo económico y apoyo familiar⁴, por ello es imperativo idear terapias que logren atenuar el daño peritoneal que se presenta en los pacientes en diálisis peritoneal⁹.

Las células mesoteliales peritoneales forman una capa simple que recubre la superficie parietal y visceral del peritoneo las cuales derivan del mesodermo, estas células actúan como una barrera permeable que regula el paso de líquido y solutos entre la circulación sistémica y la cavidad peritoneal. En la literatura se han descrito algunas técnicas para la caracterización de las células mesoteliales las cuales han proporcionado mucha información en cuanto a su fisiología. Las técnicas para su caracterización incluyen citometría de flujo, evaluación morfológica, evaluación bioquímica en donde se determinan proteínas del citoesqueleto, incluyendo el antígeno ligado al factor VIII, contenido celular de lípidos, producción de prostaglandinas y fosfolípidos¹⁰ por lo que se ha podido determinar que ocupan el 5% de la población celular del peritoneo, estas células se caracterizan morfológica, histoquímica y ultraestructuralmente por ser multipolares, con múltiples elongaciones y adquieren forma poligonal en cultivo cuando llegan a la confluencia, con microscopía electrónica se ha visto que estas células tienen

micro-vellosidades en su membrana celular además de contar con múltiples vesículas citoplasmáticas. Se ha demostrado mediante inmunohistoquímica que las células mesoteliales peritoneales poseen vimentina, citoqueratina y fibronectina con lo que se comprueba su origen compartido con las células endoteliales y mesodermales¹¹.

Así mismo se ha comprobado que estas células secretan citocinas pro-inflamatorias, como la IL-1, 6,12, el factor de necrosis tumoral alfa, y los factores de crecimiento transformante beta (FCT β), el factor de crecimiento de fibroblastos (FCF), así como factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE), los cuales todas en conjunto contribuyen, a la inflamación crónica peritoneal así como al incremento de la matriz extracelular y vasodilatación de los capilares peritoneales^{12,13,14}.

Debido a la complejidad del peritoneo, que está poblado por diferentes tipos celulares, algunos investigadores utilizan el cultivo celular para investigar la biología molecular y celular de las células mesoteliales peritoneales. Cada tipo de célula muestra un fenotipo específico que se caracteriza por su morfología, constituyentes de membrana (receptores hormonales, integrinas y ectoenzimas), proteínas intracelulares, síntesis y liberación de productos específicos (p. ej., proteínas de la matriz extracelular, prostanoïdes y citocinas) y actividad de transporte vectorial, siendo esta última característica de las células mesoteliales peritoneales. Este fenotipo puede verse influido por las condiciones del cultivo (p. ej., composición del medio, soporte utilizado para el cultivo y estadio del cultivo). Resulta por tanto esencial definir los parámetros del cultivo que originan una diferenciación celular óptima *in vitro* antes de realizar cualquier estudio en cultivos celulares¹⁵.

Los cultivos de poblaciones homogéneas permiten identificar características del fenotipo celular que no son fácilmente accesibles *in vivo*. Son útiles para estudiar los efectos de factores solubles o genes transfectados sobre diferentes propiedades celulares, tales como la proliferación, adherencia migración, contracción y actividad en el transporte. Además, las células cultivadas representan modelos valiosos para efectuar estudios bioquímicos

sobre las vías de transmisión de señales intracelulares estimuladas por interacciones específicas entre receptores de membrana y moléculas extracelulares. Los cultivos celulares también ofrecen la oportunidad de estudiar la comunicación entre dos tipos celulares diferentes mediante un método de co-cultivo. Por último, con la aparición de la tecnología de la transcriptómica y proteómica, actualmente es posible desenmarañar las redes de genes que se activan en un tipo de célula dada en cultivo y sus efectos sobre el transcriptoma y el proteoma celular en condiciones de cultivo concretas que pretenden reproducir estados fisiológicos ó patológicos¹⁶.

La capacidad para hacer crecer cultivo primarios y estirpes celulares establecidas obtenidas del peritoneo humano en medios de cultivo enriquecidos con suero fetal a altas concentraciones puede influir en el fenotipo de la célula cultivada. Los factores esenciales para el crecimiento y la diferenciación comprenden transferrina, insulina y dexametasona (ó hidrocortisona). Las concentraciones necesarias de insulina superan en gran medida las necesarias para una respuesta fisiológica, probablemente debido a que las células cultivadas degradan la insulina. Otras hormonas que han mostrado una función mitógena o trófica en cultivos de células mesoteliales peritoneales son la aldosterona, las hormonas tiroideas, la vasopresina, la toxina del cólera, la PGE2 y el factor de crecimiento epidérmico FCE¹⁷.

En el año 2000 R. Selgas describió una metodología para la obtención e identificación de células mesoteliales a través del líquido peritoneal de pacientes en diálisis peritoneal continua ambulatoria en la cual se logró obtener una población aproximada de 23 000 células por bolsa de diálisis con una viabilidad superior al 60% así mismo logró su identificación a través de citometría de flujo y pudo establecer las condiciones para realizar pasaje celular¹⁸. Sin embargo esta técnica tiene limitantes en función del número de células obtenidas por bolsa de diálisis así como el empleo de medios de cultivo y adyuvantes que no se encuentran disponibles en nuestro medio y su costo es mayor.

Por lo tanto nosotros con la evidencia encontrada hasta el momento en la literatura mundial realizaremos la obtención, aislamiento e identificación de las células mesoteliales peritoneales de pacientes en DPCA optimizando el número de células, y realizaremos su identificación mediante la expresión de citoqueratina 8, vimentina y acuaporina 1, así como establecer las condiciones ideales de cultivo para no alterar las características fenotípicas de dichas células^{19,20}.

III. MATERIAL Y METODOS

Diseño del estudio: Experimental Básico.

COLECCIÓN DEL LÍQUIDO DE DIÁLISIS Y OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

A once pacientes con insuficiencia renal crónica en diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) sin antecedente de peritonitis dos meses previos al estudio, sin evidencia de neoplasias de cualquier sitio; ni de consumo de medicamentos inmunosupresores, se les instruyó para que acudieran al Servicio de Nefrología ubicado en el Hospital de Especialidades del Centro Médico “La Raza”, en un sitio especial aislado y limpio donde se obtuvieron 2000 cc de líquido dializante de la primera bolsa de toda la noche del día previo, inmediatamente después se centrifugó el contenido de toda la bolsa de diálisis peritoneal de 2000 cc a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en PBS y nuevamente se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. Finalmente el sedimento se le agregó un ml. de solución salina al 0.9% y 1 ml. de azul de Tripano y se contabilizaron las células viables.

CULTIVO DE CELULAS MESOTELIALES

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. Se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 20 minutos y se lavan por 2 veces más con PBS.

Se contaron el número total de células y se verificó la viabilidad celular en una cámara de Neubauer con la técnica de azul de tripano previamente descrita.

El exceso de PBS se eliminó y se resuspendieron las células en 7 ml. de medio de cultivo DMEM-F12, enriquecido con HEPES 15 Mm, bicarbonato

de sodio 1.2 g/l, suero fetal bovino al 20%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100mg/ml, transferían 0.5µg/ml; insulina µg/ml, glutamina 2 mM, hidrocortisona 0.4µg/ml; selenito de sodio 5 ng/ml y factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml.

Las células fueron sembradas en frascos de 25 cm², e incubadas a 37°C en atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. El medio de cultivo se reemplazó cada tercer día.

IDENTIFICACIÓN DE LAS CELULAS MESOTELIALES

Las células mesoteliales fueron identificadas por su morfología característica es decir de forma alargada, multipolares, con núcleo central, retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado y vacuolas dispersas, además poseen filamentos intermedios como vimentina, citoqueratina-8 así como acuaporina-1 entre otros los cuales fueron evidenciados por inmunofluorescencia.

INMUNOFLURESCENCIA

Una vez que las células se encontraban en subconfluencia, se realizaron dos lavados rápidos a las células con PBS 5x filtrado, 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 1x 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 30µl de albúmina sérica bovina al 0.5% a 4°C durante 30 minutos. Se colocó 30 µl del primer anticuerpo diluido 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 2.5µl de vectashield y se sellaron los lados de cada cubreobjetos con barniz. La preparación se guardó a 4°C protegido de la luz hasta que se hizo su análisis al microscopio confocal.

IV. RESULTADOS

Las células mesoteliales se obtuvieron del líquido de diálisis de once pacientes seleccionados. Todos los pacientes estaban clínicamente estables y sin episodios de peritonitis en las ocho semanas previas al estudio. Del total de pacientes seis de ellos (54.4%) tenían características funcionales de transportador alto y cinco (45.6%) eran transportadores bajos. La mediana de células identificadas como células mesoteliales obtenidas fué 260×10^3 y rango intercuartilico (100×10^3 - 680×10^3). La mediana de células mesoteliales provenientes de pacientes transportadores altos fué 310×10^3 rango intercuartilico de (120×10^3 - 680×10^3), y la mediana de las células mesoteliales provenientes de transportadores bajos fué 160×10^3 rango de (100×10^3 - 310×10^3), con una viabilidad superior al 70%. Se realizó inferencia estadística con la prueba de U-Mann-Witney con una $p < 0.0823$ entre ambos grupos.

Morfológicamente las células mesoteliales tienen un diámetro aproximado de 20 μm con proyecciones multipolares, núcleo central grande, la relación núcleo/citoplasma es alta. Frecuentemente se observan formando pequeños nidos o agrupamientos (ver anexos).

Las células de once pacientes fueron capaces de proliferar en cultivo y alcanzaron la subconfluencia en 11 días \pm 3 días después de haber sido sembradas en el medio de cultivo. En este estado de cultivo, las células presentaban una apariencia heterogénea.

En las primeras etapas del crecimiento celular, las células muestran generalmente una morfología bipolar ó multipolar y ocasionalmente adoptan una forma similar a fibroblastos, observamos principalmente que este aspecto de transdiferenciación se asociaba con el uso del factor de crecimiento epidérmico por lo que se utilizaba en los primeros días para adyugar a la proliferación celular inicial posteriormente era retirado del medio de cultivo. En los días siguientes, las células adoptan una conformación poligonal y adquieren una apariencia de empedrado cuando llegan a confluencia.

La expresión de filamentos intermedios tales como citoqueratina-8 y vimentina es fuertemente positiva y específica en las células mesoteliales de

cultivo primario hasta el pase celular número cinco, lo que sugiere que se mantienen las características fenotípicas de las células.

Así mismo la expresión de acuaporina 1 en las células mesoteliales es fuertemente positiva y de distribución principalmente citosólica perinuclear y persiste al igual que para vimentina y citoqueratina-8 a través de los pases celulares (ver anexo).

V. DISCUSION

En este estudio confirmamos la presencia de células mesoteliales del líquido peritoneal de pacientes con insuficiencia renal crónica en DPCA que pueden ser obtenidas y cultivadas para su estudio. En el 2000 R. Selgas propuso una metodología para la obtención, aislamiento y cultivo de células mesoteliales provenientes del líquido de diálisis de pacientes en DPCA, sin embargo nosotros modificamos algunos aspectos que a continuación describimos: el líquido de diálisis de la noche previa inmediatamente se centrifugaba en lugar de dejarlo sedimentar durante 4 horas, utilizamos el medio de cultivo DMEM-F12 enriquecido con suero fetal bovino al 20% y factor de crecimiento epidérmico, diferente al medio de cultivo M-199 enriquecido con Biogro-2 que se emplea con la técnica del Dr. Selgas, lo que produjo una mayor proliferación 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. Finalmente para la identificación nosotros la realizamos mediante las características morfológicas y de expresión de filamentos intermedios como la citoqueratina-8 y vimentina las cuales son positivas para este tipo de células de naturaleza epitelial y que permiten fácilmente diferenciarlas de los fibroblastos que carecen de las mismas.

Por otro lado es importante señalar que realizamos la identificación del tipo de peritoneo desde el punto de vista funcional y observamos que existe tendencia a una mayor liberación de células mesoteliales comparado con los

pacientes con bajo transporte peritoneal aunque esta diferencia no fué significativamente estadística, sin embargo el tamaño de muestra probablemente haya influido en este resultado.

Es importante destacar que observamos mucha variabilidad en el número de células liberadas en el líquido de diálisis que puede estar influido por el tiempo que el paciente ha permanecido en diálisis peritoneal y a los eventos de peritonitis o hemoperitoneo que ha cursado. En nuestro estudio el 70% de los pacientes que analizamos tenían menos de un año de haber iniciado la diálisis peritoneal y solo el 30% había presentado por lo menos un episodio de peritonitis.

Consideramos que con la metodología expuesta se optimiza de manera sustancial el número de células mesoteliales así como el porcentaje de viabilidad de las mismas, de una manera más fácil, rápida y accesible a nuestros medios. Además de lograr establecer las condiciones ideales de cultivo y la preservación de sus características a través de cinco pasajes celulares.

VI. CONCLUSIONES

La diálisis peritoneal se está convirtiendo en una alternativa cada vez más común a la hemodiálisis. 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 aun poco esclarecidos por lo que nuestro modelo de estudio aporta una vía de investigación para la completa interpretación de la fisiología peritoneal.

El trabajo recibió financiamiento parcial del CONACYT (G34511M) a través del Laboratorio de Fisiología Renal del CINVESTAV.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Gokal R, Mallick NP. Peritoneal dialysis. *Lancet* 1999;353:823-28.
- 2.- Heaf J. Pathogenic effects of a high peritoneal transport rate. *Semin Dial* 2000;13:188-93.
- 3.- 4.- Heimbürger O, Wang T, Lindholm B. Alterations in water and solute transport with time on peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1999;19:83-87.
- 5.- Krediet R. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999;55:314-16.
- 6.- 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.
- 7.- Inagi R, Miyata T, Yamamoto T. Glucosa 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
- 8.- Douvdevani A, Rapaport J, Konfort A, Argov S, Ovnat A, Chaimovitz C. Human peritoneal mesothelial cells synthesize IL-1 α
- 9.- Combet S, Ferrier ML, Landschoot MV, et al. Chronic Uremia Induces Permeability Changes, Increased Nitric Oxide Synthase Expression, and Structural Modifications in the Peritoneo. *J. Am.Soc. Nephrol* 2001;12:2146-57.
- 10.- Plum J, Hermann S, Fuscholler A. Peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis patient related to dialysis settings and peritoneal transport properties. *Kidney Int* 2001;59:S42-S47
- 11.- Krediet RT, Zweers MM, Van der Wal AC, et al. Neoangiogenesis in the peritoneal membrane. *Perit Dial Int.* 2000;20:S19-S25.
- 12.- Combet S, Miyata T, Moulin P., et al. Vascular proliferation and enhanced expression nitric oxide synthase in human peritoneum exposed to long-term peritoneal dialysis. *J. Am Soc Nephrol* 2000;11:191-98.
- 13.- Miyata T., Devuyst O., Kurokawa K., et al. Toward better dialysis compatibility: Advances in the biochemistry and pathophysiology of the peritoneal membranes. *Kidney Int* 2002;61:375-86.

- 14.- Yañez-Mó M, Pezzi-Lara E, Selgas R, Huesca R M, Domínguez-Jiménez C, Heffernan-Jimenez J, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003;348:403-13.
- 15.- Kuriyama S, Nakayama M, Tomonari H. Tranexamic Acid increases peritoneal ultrafiltration volume in patients on CAPD. *Perit Dial Int* 1999;19:38-44.
- 16.- Tauer A, Zhang X, Schaub TP, Niwa T, Passlick-Deetjen J, Pischetsrieder M. Formation of advanced glycation end products during CAPD. *Am J Kidney Dis* 2003;42:S57-S60.
- 17.- 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 nonkeratinizing epithelia. *Cell* 1982;31:693-703.
- 18.- 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.
- 19.- 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.
- 20.- Niedbala M, Crickard K, Bernack J, Adhesión, growth and morphology of human mesothelial cells on extracellular matrix. *Cell Sci* 1986;85:133-147.

ANEXO 1

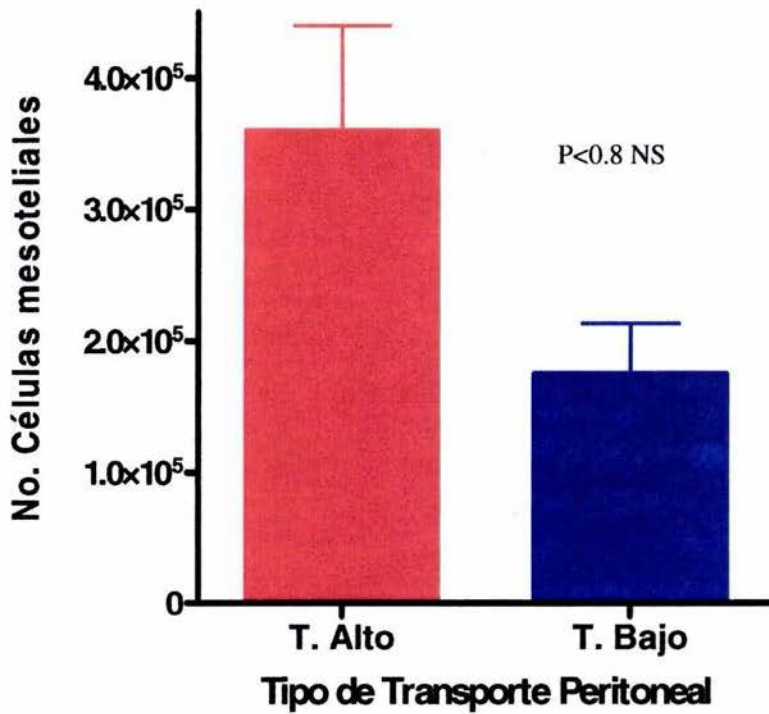
Características de los pacientes en DPCA

EDAD	28.27 años
GENERO	M=4(34%) H=7(66%)
TIEMPO EN DIALISIS	30 meses
TIPO DE TRANSPORTADOR	T. alto 6 (54%) T.bajo 5 (46%)

Número de células mesoteliales obtenidas del líquido de diálisis

Número total de células	Med= 260,000
No. de células T. alto	Med= 310 000
No. De células T. bajo	Med= 160 000

Obtención de células mesoteliales de acuerdo al tipo de transporte



ANEXO 2

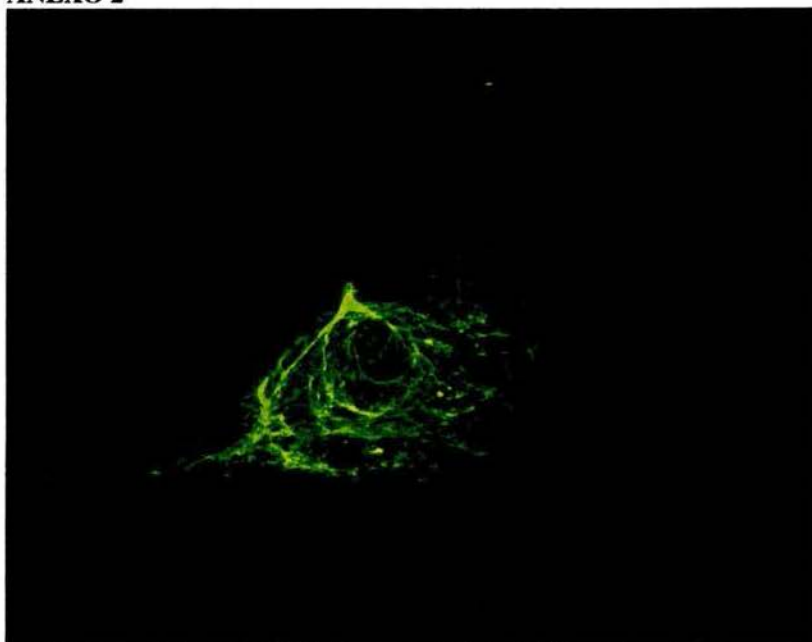


Fig. No. 1 Célula mesotelial de cultivo primario.
Expresión de citoqueratina-8

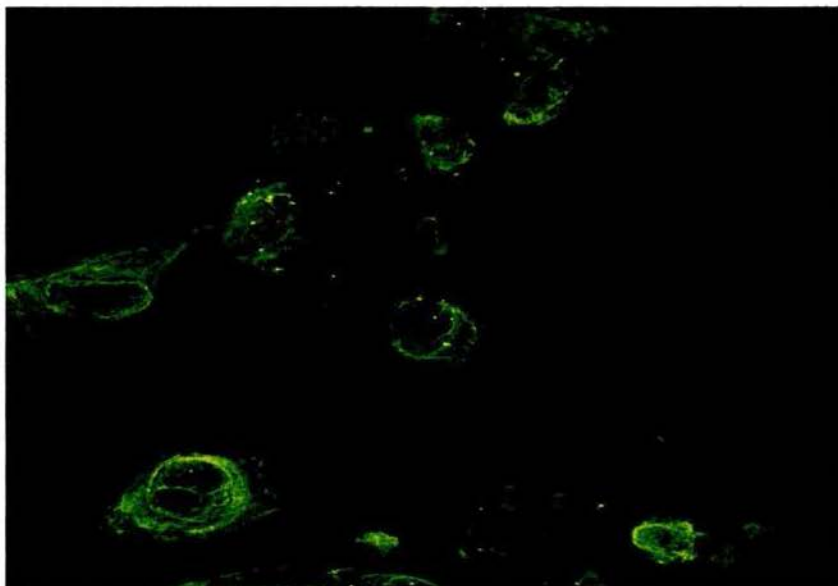


Fig. No. 2. Células mesoteliales formando grupos. Expresión de citoqueratina-8

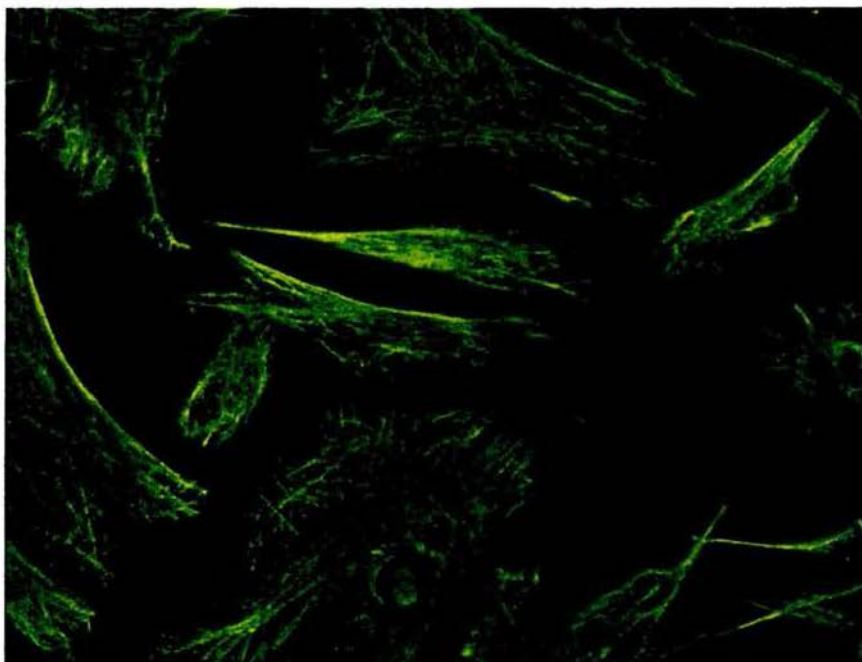


Fig. No. 3. Células mesoteliales subconfluentes de aspecto multipolar pase 2.
Expresión de vimentina

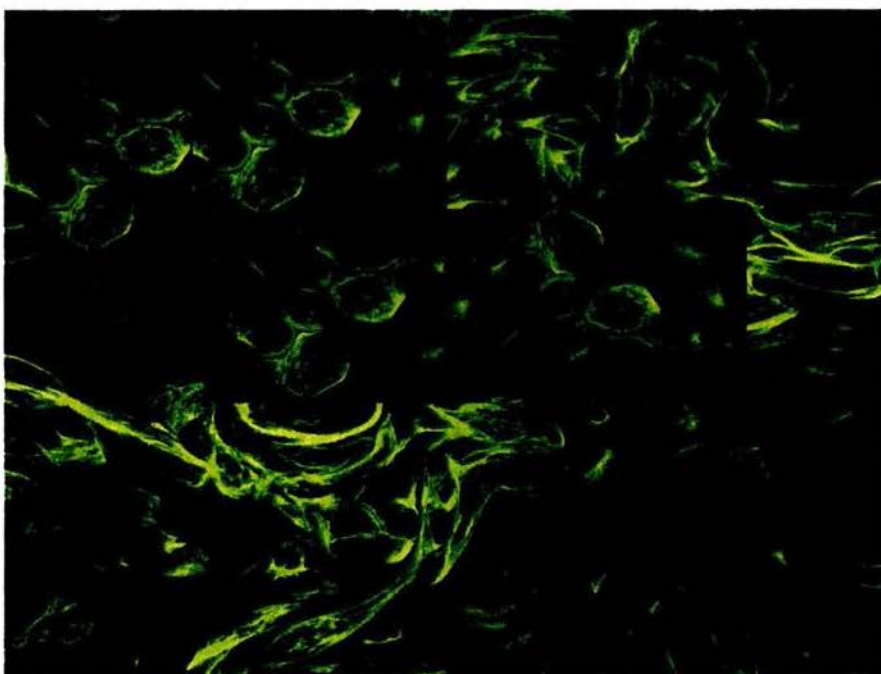


Fig. No. 4. Células mesoteliales en subconfluencia pase-4. Expresión de vimentina.

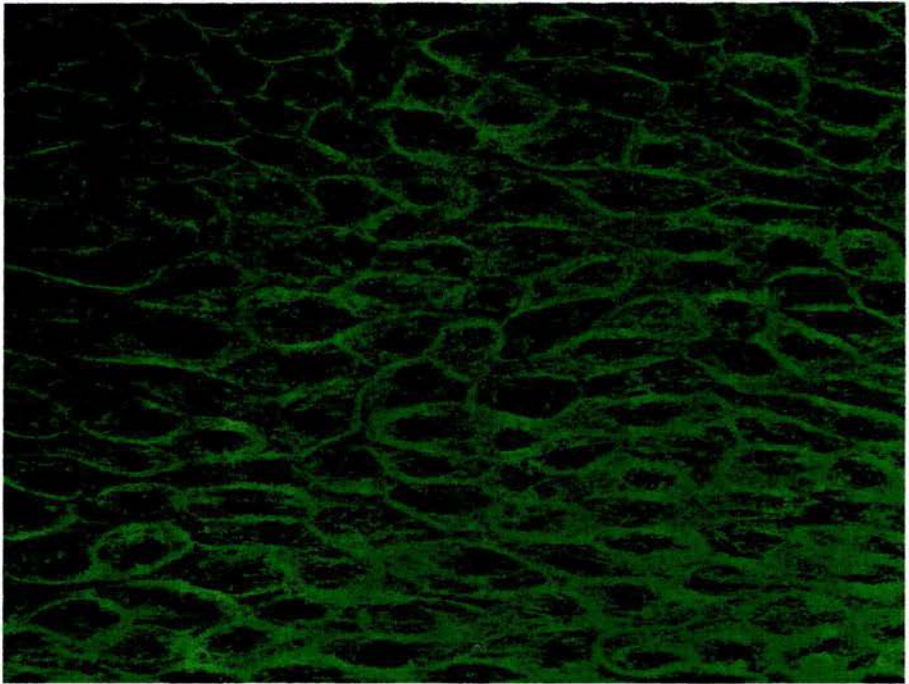


Fig. No. 5. Células mesoteliales confluentes, pase-4. Expresión de vimentina

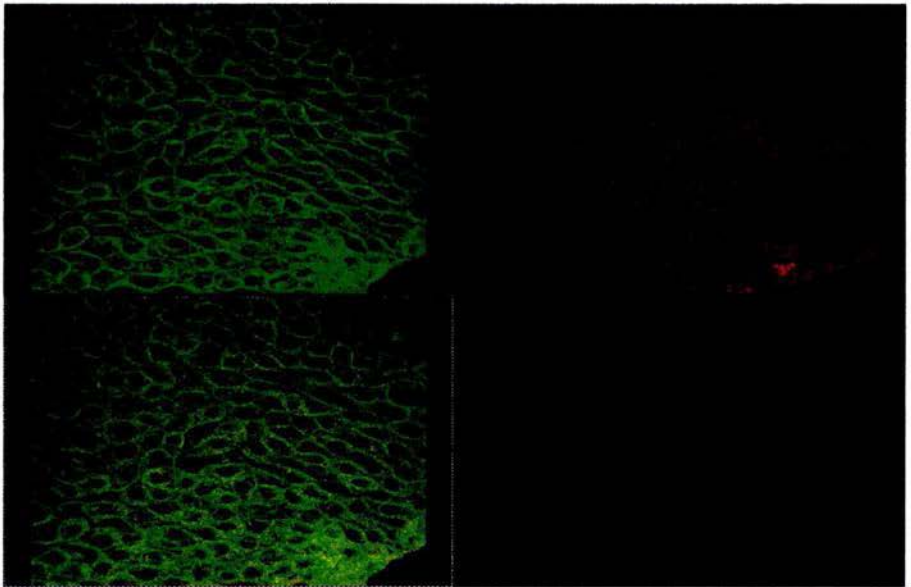


Fig. No. 6. Células mesoteliales confluentes pase-3. Expresión de vimentina y acuaporina-1