



Universidad Nacional Autónoma de México

**Facultad de Medicina
División de estudios de Postgrado
Instituto Mexicano del Seguro Social
Unidad Médica de Alta Especialidad
“Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional “La Raza”**

**Efecto de la simvastatina sobre los mediadores inflamatorios: IL-1, IL6 y TNF-
alfa; y la expresión de Rho A, en el cultivo primario de células mesoteliales
peritoneales de pacientes en diálisis peritoneal continua ambulatoria y transporte
peritoneal alto**

Reporte preliminar

T E S I S

Para obtener el grado de especialista en:

MEDICINA INTERNA

PRESENTA:

Dr. José Manuel Hernández Barrera

ASESOR:

Dr. José Daniel Salazar Exaire



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.

**Instituto Mexicano del Seguro Social
Unidad Médica de Alta Especialidad
“Dr. Antonio Fraga Mouret”
Centro Médico Nacional “La Raza”**

(2006-3501-20)

Dr. Jesús Arenas Osuna
Jefe de la División de Educación en Salud.

Dra. Olga Lidia Vera Lastra
Jefe del Servicio de Medicina Interna.

Dr. José Manuel Hernández Barrera
Residente de 4to año de Medicina Interna.

ÍNDICE

1. Resumen.....
2. Introducción
3. Material y métodos
4. Resultados
5. Discusión
6. Conclusión
7. Bibliografía
Anexos

RESUMEN:

Título: Efecto de la simvastatina sobre los mediadores inflamatorios: IL-1, IL6 y TNF- α ; y la expresión de Rho A, en el cultivo primario de células mesoteliales peritoneales (CMP) de pacientes en diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) y transporte peritoneal alto (TPA).

Objetivo: Determinar el efecto de la simvastatina sobre la secreción de citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, y TNF- α ; y sobre la expresión de Rho A, por las CMP (cultivo primario) de pacientes en DPCA con TPA. El objetivo secundario fue cuantificar la trans migración de macrófagos peritoneales a través de un Sistema Transwell.

Material y Métodos: En pacientes de 18 a 55 años de edad, portadores de insuficiencia renal crónica (IRC) en programa de DPCA, se cultivaron CMP y se observó la trans migración de macrófagos con y sin Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Macrófagos recombinante humano (rhGM-CSF).

Resultados: El conteo celular se llevó a cabo por citometría de flujo mediante el anticuerpo anti-CD64, encontrándose una mayor migración con el uso de rhGM-CSF, $p = 0.0019$.

Conclusión: El rhGM-CSF aumenta la migración de macrófagos peritoneales de los pacientes en DPCA en un sistema Transwell con células mesoteliales.

Palabras clave: Peritoneal dialysis, mesothelial cells, IL-1, IL-6, TNF- α , rhGM-CSF

ABSTRACT:

TITLE: Effect from simvastatin on inflammatory mediators: IL-1, IL6, and TNF- α ; and expression of Rho A, in primary culture of peritoneal mesothelial cells (PMC) from patients with ambulatory continuous peritoneal dialysis (ACPD) and high peritoneal transport (HPT).

OBJECTIVE: To determine the effect from simvastatin on secretion of IL-1, IL-6, and TNF- α ; and expression of Rho A, by PMC (primary culture) from patients with ACPD. The secondary objective was quantifying transmigration of peritoneal macrophages by a Transwell system.

MATERIAL AND METHODS: In patients from 18 to 55 years old, carriers of chronic renal failure (CRF) in ACPD, PMC were cultured and transmigration of peritoneal macrophages, with and without recombinant human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulant Factor, was observed (rhGM-CSF).

RESULTS: The cellular quantification was made by cytometry using anti-CD64, finding larger migration with rhGM-CSF, $p = 0.0019$.

CONCLUSION: The rhGM-CSF increases the migration of peritoneal macrophages from patients in ACPD in a Transwell system with mesothelial cells.

KEY WORDS: Peritoneal dialysis, mesothelial cells, IL-1, IL-6, TNF- α , rhGM-CSF

INTRODUCCIÓN

La diálisis peritoneal es una de las terapias de reemplazo de la función renal más ampliamente utilizadas en el Instituto para el manejo del paciente urémico, representando el 25% de la población sometida a este tipo de terapia (1). Y aunque esta modalidad de tratamiento ha permitido que el paciente urémico mejore sustancialmente su calidad de vida, su uso ha sido limitado debido fundamentalmente a episodios de peritonitis y al deterioro morfológico y funcional progresivo que presenta el peritoneo después de varios años de diálisis (1;2), deterioro manifestado por un incremento progresivo del transporte de solutos de bajo peso molecular, por una reducción del gradiente de concentración y, eventualmente, por una insuficiencia en la capacidad de ultrafiltración peritoneal. De acuerdo a la prueba de equilibrio peritoneal (PEP), a este subgrupo de pacientes se les considera como transportadores altos (transportadores rápidos) y constituyen hasta un 50% de la población de los pacientes en diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) de larga evolución (3). Estos pacientes registran una mortalidad aproximada de 40 a 70%, a 5 años, cuando se les compara con los grupos de transportadores normal y bajo. Irremediamente, este grupo de pacientes pasará a hemodiálisis definitiva, lo cual incrementa el costo en su tratamiento (4).

Según su clasificación en tratamientos sustitutivos, el costo de la atención de la insuficiencia renal crónica en diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA), en diálisis peritoneal intermitente (DPI) y en hemodiálisis (HD) son cada vez más elevados. Para los programas de diálisis peritoneal y hemodiálisis del IMSS, por ejemplo, en 2002 se registró un total de 22,914 pacientes, lo que significó un incremento del presupuesto para la atención de estos pacientes de un 75% más que en 1993, un 18% más que en 2000 y un 9%

más que en 2001. Este incremento continuo provocará que, en menos de 10 años, las instituciones hospitalarias ocupen más del 80% de su presupuesto para el manejo de pacientes con Insuficiencia renal crónica (IRC), mediante el uso de algún procedimiento dialítico. El inevitable y sombrío futuro déficit presupuestario destinado a la atención de estos pacientes justifica plenamente la búsqueda urgente de alternativas terapéuticas para estos padecimientos.

Las características de los pacientes con transporte peritoneal alto no son compartidas con el resto de grupos clasificados con transporte promedio o bajo, pues las anomalías morfológicas del peritoneo que presenta este grupo de pacientes se caracterizan por fibrosis intersticial, expansión variable de la matriz extracelular y daño a la microvasculatura peritoneal, manifestada por engrosamiento y duplicación de la membrana basal, fibrosis, hialinización de la media y neovascularización importante, así como pérdida parcial o total de las células mesoteliales (5).

Por otra parte, las anomalías funcionales de los transportadores altos se manifiestan en un aumento progresivo de la superficie efectiva peritoneal, en un transporte alto de solutos de bajo peso molecular debido a la desaparición progresiva del gradiente osmótico, y a una capacidad disminuida de la ultrafiltración, con la consiguiente retención de líquidos, hipertensión arterial, absorción aumentada de glucosa, hiporexia e hiperinsulinemia (2, 3).

Los mecanismos fisiopatológicos y moleculares involucrados en una ultrafiltración insuficiente asociados a la diálisis peritoneal crónica, los que ocurren aún en ausencia de episodios de peritonitis, no se conocen plenamente (2). Sin embargo, y de acuerdo a estudios

en animales y humanos a los que se les ha efectuado diálisis peritoneal, se ha asociado la exposición crónica del peritoneo a la glucosa del dializante, a la acumulación de productos finales de glucosilación avanzada (AGEs) y a sus precursores carbonilos, encontrados en el peritoneo, que estimulan la quimiotaxis de monocitos, la apoptosis y la secreción de citocinas pro-inflamatorias por los macrófagos, tales como la Interleucina 1 (IL-1) y el Factor de Necrosis Tumoral - alfa (TNF- α), citocinas que, a su vez, activan el factor nuclear kappa-beta (NF- κ B), considerado como una molécula que amplifica y perpetúa los mecanismos de inflamación a través de la activación coordinada de varios genes inflamatorios, además de la proliferación de células musculares lisas vasculares y la estimulación del factor de crecimiento vascular del endotelio (VEGF), el cual, cuando interactúa con la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), a nivel endotelial, ocasiona que el óxido nítrico (NO) estimule la angiogénesis e incrementa la permeabilidad vascular, todo lo cual aumenta el área de superficie efectiva peritoneal y deteriora la ultrafiltración peritoneal (6-8).

En 1730, James Douglas hizo la primera descripción moderna del peritoneo humano caracterizándolo como una fina capa de células mesoteliales adosada a una membrana basal y al tejido conectivo de diferente grosor, en el cual se encuentran macrófagos, fibroblastos, adipocitos, capilares, vasos linfáticos y fibras nerviosas (1).

El peritoneo humano es un órgano muy delgado, de 30 a 40 micras de grosor, su principal función es reducir la fricción entre las vísceras de la cavidad abdominal, aunque también hay que destacar su capacidad para el intercambio de líquidos y solutos como la urea, la creatinina y electrolitos, que se encuentran entre los capilares peritoneales y la cavidad peritoneal (2; 3).

Desde hace tiempo, se conoce que las distintas estructuras peritoneales juegan un papel importante en el mantenimiento de la anatomía y fisiología peritoneal actuando a través de la liberación de sustancias tales como fosfolípidos, colágeno, elastina, proteoglicanos, fibronectina, interleucinas, factores de crecimiento y prostaglandinas, cuyas interacciones modifican continuamente las propiedades fisicoquímicas del peritoneo (3; 5).

En los pacientes con IRC sometidos a diálisis peritoneal, frecuentemente la exposición reiterada a soluciones de diálisis ácidas, hiperosmóticas e hiperglucémicas, ocasiona inflamación crónica y daño al peritoneo, el que progresivamente se denuda de células mesoteliales y genera su transdiferenciación mesenquimal hacia fibroblastos (4). Estos cambios estructurales parecen ser la principal causa del fracaso en la ultrafiltración. Estas alteraciones morfológico-funcionales pueden verse aceleradas, además, por episodios severos de peritonitis o hemoperitoneo (5-8).

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 fosfolípidos (9). Estas técnicas han podido determinar que estas células ocupan el 5% de la población celular del peritoneo y que se caracterizan, tanto morfológica, histoquímica y ultraestructuralmente, por ser multipolares y con múltiples elongaciones, adquiriendo forma poligonal en cultivo cuando llegan a la confluencia. Mediante microscopía electrónica se ha visto que estas células poseen microvellosidades en su membrana celular, además de contar con múltiples vesículas citoplasmáticas. Se ha demostrado también, 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 mesodérmicas (10).

Se ha comprobado, asimismo, que estas células secretan citocinas pro-inflamatorias, como las IL-1, IL-6, IL-12; el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor de crecimiento transformante - beta (TGF- β) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), así como el VEGF. Estos elementos contribuyen a la inflamación crónica peritoneal y al incremento de la matriz extracelular y vasodilatación de los capilares peritoneales (11-14).

Los factores esenciales para el crecimiento y la diferenciación comprenden transferrina, insulina y dexametasona (o 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 prostaglandina E2 (PGE2) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (15).

La diálisis peritoneal (DP) es una de las terapias de reemplazo renal más ampliamente utilizadas en el manejo del paciente urémico, en donde hasta el 15% de la población mundial con insuficiencia renal crónica se encuentra sometida a este tipo de terapia (16). Esta modalidad de tratamiento ha tenido limitaciones en su uso, debido al deterioro morfológico y funcional progresivo que sufre la membrana peritoneal expuesta crónicamente a una solución dializante después de varios años (2), así como a episodios de peritonitis de repetición, todo lo cual conlleva los riesgos de un incremento progresivo del transporte de solutos de bajo

peso molecular, reducción del gradiente de concentración y, eventualmente, a insuficiencia en la capacidad de ultrafiltración peritoneal, caracterizada principalmente por retención de líquido, lo cual provoca incremento en el volumen intravascular e hipertensión arterial, así como deterioro de la función miocárdica. Los fagocitos mononucleares constituyen las células predominantes en el líquido de diálisis crónica (16).

Las anomalías morfológicas del peritoneo de los pacientes transportadores altos, se caracterizan principalmente por fibrosis intersticial, expansión variable de la matriz extracelular y daño a la microvasculatura peritoneal, manifestada por engrosamiento y reduplicación de la membrana basal, fibrosis, hialinización de la media y neovascularización importante, así como por pérdida parcial o total de las células mesoteliales (17). La pérdida de la función del peritoneo se caracteriza por morbi-mortalidad elevada, desnutrición progresiva, complicaciones cardiovasculares severas, hospitalizaciones frecuentes, mayor atención médica y costos elevados (3); siendo imperativo idear terapias que logren atenuar el daño peritoneal que se presenta en los pacientes sometidos a diálisis peritoneal (4).

No se conocen plenamente los mecanismos fisiopatológicos y moleculares involucrados en la ultrafiltración insuficiente asociados a la diálisis peritoneal crónica de pacientes transportadores altos, los que suceden incluso en ausencia de episodios de peritonitis (18). Sin embargo, tanto en estudios en animales como en humanos sometidos a diálisis peritoneal, han asociado este daño a la exposición crónica del peritoneo a la glucosa del dializante, a la acumulación de AGEs y a sus precursores carbonilos encontrados en el peritoneo; los cuales estimulan la quimiotaxis de monocitos, la apoptosis, la secreción de citocinas pro-inflamatorias por las células mesoteliales peritoneales y macrófagos, como IL-1, IL-6 y el TNF- α . Estas citocinas, a su vez, activan al NF- κ B, el cual se considera como

una molécula que amplifica y perpetúa los mecanismos de inflamación a través de la activación coordinada de varios genes que gobiernan los procesos de inflamación, incidiendo por ello en la proliferación de células musculares lisas vasculares y en la estimulación del factor de crecimiento endotelial y vascular (VEGF) el cual, al interactuar con la sintasa del óxido nítrico endotelial (eNOS), produce óxido nítrico (NO) estimulando la angiogénesis e incrementando la permeabilidad vascular, todo lo cual aumenta el área de superficie efectiva peritoneal y deteriora la ultrafiltración peritoneal (19; 20). En un estudio de Plum et al, los pacientes caracterizados como transportadores altos de acuerdo a las PEP tuvieron una capa fibrosa submesotelial aumentada en relación con otros pacientes con DP y con los sujetos control. Además, el grado de vascularización se correlacionó con el grado de fibrosis (21).

Las vías de señalización afectadas a través de la activación de la Rho GTPasa incluyen la regulación de la proliferación celular, expresión de genes, contracción de músculo liso, actividad de canales iónicos, permeabilidad endotelial, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), metabolismo de fosfolípidos y más. Los inhibidores de las vías de señalización Rho A y Rac 1, incluyendo inhibidores Rho Kinasa y estatinas tienen la capacidad de evitar la proliferación de los fibroblastos, disminuir la permeabilidad endotelial la migración celular, y la producción de citocinas. Además existen datos que indican que se requiere de las vías de señalización Rho A para la transformación, proliferación celular y apoptosis en diversos tipo celulares, incluyendo fibroblastos y músculo liso vascular, a través de la activación de NF- κ B (22; 23).

Los inhibidores de la 3-Hidroxil-3-metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA) reductasa, o estatinas, constituyen la clase más potente de fármacos para disminuir los niveles de lípidos. Investigación extensa, principalmente en la última década sugiere que los beneficios

clínicos de estos fármacos podrían estar relacionados a una mejoría en la disfunción endotelial, una reducción en la trombogenicidad de la sangre, propiedades anti-inflamatorias, y recientemente, acciones inmunomoduladoras (24).

Por otra parte, las estatinas han sido empleadas ampliamente para reducir los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y para prevenir la aterosclerosis (25; 28). Existen importantes aportaciones donde las estatinas mantienen propiedades anti-inflamatorias, como disminuir la proteína C-Reactiva (PCR), reducir la angiotensina II (Ang II) (27). Dunzendorfer y colaboradores demostraron que la pravastatina suprime la quimiotaxis de Neutrófilos y la trasmigración y la generación de superóxido en Neutrófilos en respuesta al tripéptido formil-Metionil-Leucina-Fenilalanina (f-MLP) (27-28).

Los efectos de “pleiotrópicos” de las estatinas, o independientes del colesterol, incluyen la suprarregulación y activación de la eNOS. Ya que las estatinas inhiben un paso temprano en la vía biosintética del colesterol, también inhiben la síntesis de isoprenoides, tales como el farnesilpirofosfato y el geranylgeranylpirofosfato, los cuales son importantes uniones lipídicas postranslacionales para las moléculas de señalización intracelular como las Rho GTPasas, lo cual incrementa la producción y biodisponibilidad de NO derivado del endotelio (29; 30).

Los isoprenoides activan la proteína-G Rho, llevando a su translocación desde el citoplasma hacia la membrana celular. La activación de Rho, Rho-kinasa, y proteínas-G relacionadas inhiben la actividad y la producción del NO, afectan la estructura celular, y promueven la inflamación (30).

Las estatinas bloquean la isoprenilación y por lo tanto la expresión membranal y la activación funcional de los miembros de la familia Rho. La inhibición de Rac 1 y Rho A por las estatinas reduce la expresión de marcadores hipertróficos tales como el factor natriurético auricular y la cadena ligera de miosina 2V en respuesta a la Ang II (32). También se ha investigado el efecto de las Rho GTPasas en las células mesangiales y el efecto de las estatinas sobre estas vías de señalización (31). No se ha estudiado la participación de éstas vías de señalización en las células mesoteliales del peritoneo humano.

Existen otros estudios sobre el efecto de las estatinas en cultivo de células mesoteliales de pacientes en diálisis peritoneal sobre algunos mediadores de la inflamación pero sin un estímulo bacteriano o sus productos (33).

Por lo anterior, es altamente probable que, la supresión en la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1, IL-2, IL-8, IL-10, TNF- α y VEGF) por las células mesoteliales peritoneales provenientes de líquido de diálisis en cultivo de pacientes transportadores altos, con fármacos in vitro, pueda reducir las alteraciones peritoneales y, con ello, disminuir estas alteraciones, responsables de muchos de los problemas que tienen lugar en el transporte peritoneal. De estas drogas sobresalen, por su acción, sobre el sistema inmune, en especial sobre los macrófagos, simvastatina y la atorvastatina, compuestos que forman parte de la misma superfamilia de modificadores de factores de la transcripción, regulando la expresión génica a nivel de la región promotora de muchos genes (34).

La simvastatina ha demostrado suprimir la expresión del factor tisular, además de incrementar la actividad fibrinolítica en células mesoteliales previamente estimuladas con TNF- α , (35), aun independiente de la disminución de los niveles de colesterol (36).

Se ha utilizado el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos para aumentar el número de células en la cavidad abdominal y para mejorar su función (37). Además para la diferenciación in vitro de cultivos de células mesoteliales.

Existen 4 factores estimulantes de colonias que han sido aislados y caracterizados: 1) factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF); 2) rhGM-CSF; 3) factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF); y 4) IL-3. Sólo dos, rhGM-CSF y G-CSF; son elaborados comercialmente de forma recombinante. Ambos factores son producidos por monocitos y macrófagos, por exposición a lipopolisacáridos bacterianos, los que sirven para activar la respuesta inflamatoria en caso de invasión de patógenos (38; 39).

MATERIAL Y MÉTODOS

El objetivo fue determinar el efecto de la simvastatina sobre la secreción de citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-6, y TNF- α ; y sobre la expresión de Rho A, por las CMP (cultivo primario) de pacientes en DPCA con TPA. El objetivo secundario fue cuantificar la trans migración de macrófagos peritoneales a través de un Sistema Transwell.

Realizamos un diseño experimental longitudinal, comparativo, con la determinación de los mediadores inflamatorios y expresión de la vía de señalización en cultivos primarios de CMP. Inicialmente también se midió el número de macrófagos peritoneales en el cultivo primario, antes y después de la administración de rhGM-CSF.

Se incluyeron un total de 10 pacientes en DPCA con TPA y 10 pacientes sin TPA (grupo control) de 18 a 55 años de edad, los cuales pertenecían al área de influencia de la UMAE "La Raza" del IMSS y que firmaron la carta de consentimiento informado. La toma de las muestras (líquido peritoneal) se realizó en el período comprendido de Enero a Marzo de 2007 en la Unidad de diálisis peritoneal de esta Unidad, utilizándose el líquido de la primera bolsa de diálisis de la mañana.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: 1) no ser portadores de infección por VHB, VHC o VIH; 2) no haber presentado peritonitis de cualquier etiología en los 3 meses previos al estudio; 3) no tener diagnóstico de enfermedad inflamatoria sistémica o de neoplasia maligna a cualquier nivel; 4) no haber ingerido esteroides, drogas inmunosupresoras o estatinas en los 3 meses previos.

Los macrófagos peritoneales fueron aislados, desde el efluente peritoneal nocturno de la solución de diálisis de glucosa al 1.5% 2000 ml, con permanencia de 10 h en cavidad libre de infección. El volumen completo fue recolectado y centrifugado a 1,500 r.p.m., por 10 minutos. Las células se resuspendieron en 1 ml de solución salina. Se valoró además morfología, con tinción de Turk utilizando una dilución de 1:2 y la viabilidad con técnica de exclusión de azul tripán, la cual, en todos los casos fue mayor al 90%, realizándose asimismo la técnica de esterasa no específica y la técnica de Diff-Quick (Stravigen, Uni-versal Kit, Bio Genex Laboratories).

Se cultivaron 40 000 células mesoteliales en transwell de 3 mm, de tamaño del poro (Corning Incorporated N.Y. 14831 USA), con administración previa de gelatina al 1%, dejando 3 días para lograr confluencia, confirmada ésta con cristal violeta. Se administro 100,000 macrófagos por pozo y, como estímulo, rhGM-CSF a diferentes dosis (200, 100, 50, 25, 12.5 µg/ml), así como f-MLP, dejando transmigrar durante 4 horas. Se realizó además cuenta de células con citometría de flujo (FACScanRSystem : Becton-Dickinson), comparándolas con el testigo a 10 minutos. Todos los anticuerpos utilizados fueron de Dako, Glostrup, Dinamarca.

Para estandarizar la dosis-respuesta del rhGM-CSF, se empleó la línea tumoral de monocitos U 937, la cual fue mantenida por pasaje con RPMI y SFB al 10%, a dosis de 50, 100, 200, 300 ng/ml del rhGM-CSF.

En el análisis de la trans migración peritoneal no hubo diferencias en los grupos estudiados ya que cada sujeto fue su propio control (cuantificación antes y después). Se utilizó una t de Student para grupos dependientes para comparar las medias de las

concentraciones de macrófagos peritoneales antes y después de la administración de rhGM-CSF en el Sistema Transwell. Para el análisis estadístico se consideró un nivel de α de 0.05 y un valor de β 0.80. Se utilizó el paquete estadístico SPSS 12.0 para Windows.

RESULTADOS

Transmigración

Se cultivaron 40 000 células mesoteliales en transwell de 3 mm, de tamaño del poro (Corning Incorporated N.Y. 14831 USA), con administración previa de gelatina al 1%, dejando 3 días para lograr confluencia, confirmada con cristal violeta. Se administraron 100,000 macrófagos por pozo y, como estímulo, rhGM-CSF a diferentes dosis (200, 100, 50, 25, 12.5 µg/ml), así como f-MLP, dejando transmigrar durante 4 h. Se realizó además cuenta de células con citometría de flujo (FACScanRSystem: Becton-Dickinson), comparándolas con el testigo a 10 minutos. (todos los anticuerpos utilizados fueron de Dako, Glostrup, Dinamarca).

Los macrófagos aislados de los líquidos peritoneales nocturnos, de los pacientes en DPCA, fueron separados por adherencia al vidrio, comprobando su viabilidad mediante la tinción, por exclusión, de azul tripán de más del 90%, comprobada por la técnica de esterasa no específica. También estas células mostraron positividad para la tinción de Diff Quick (ver anexo).

El rhGM-CSF mostró cambios proliferativos, a una dosis de 100 ng/ml.

El rhGM-CSF aumenta la migración de macrófagos peritoneales de los pacientes en DPCA en un sistema Transwell con células mesoteliales.

Para comprobar si el rhGM-CSF provocaría un aumento en la migración de los macrófagos peritoneales simulando una membrana peritoneal con células mesoteliales se

empleo el sistema Transwell, alcanzando una diferencia significativa importante. El conteo celular se llevó a cabo por citometría de flujo mediante el anticuerpo anti-CD64, encontrándose una mayor migración significativa con el uso de rhGM-CSF (ver anexo), con una $p = 0.0019$.

Ahora sólo falta la segunda fase del estudio en el que utilizaremos la simvastatina para observar el cambio en la producción de los marcadores inflamatorios antes y después de su uso sobre las células mesoteliales.

DISCUSIÓN

Mediante el método de Transwell se demostró que mediante el rhGM-CSF aumentó en un 30% la migración de los macrófagos peritoneales. Estos resultados están en concordancia con los de otros autores (37; 38).

Recientemente, se demostró que la administración de rhGM-CSF guía a un marcado reclutamiento transitorio de macrófagos peritoneales, paralelamente con un incremento en las proteínas quimioatrayentes (37). Asimismo, el rhGM-CSF estimula la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células progenitoras de la línea monocito-macrófago y activa varias funciones anti-infecciosas o tumorocidas. Se comprobó, además, que los macrófagos peritoneales potencialmente liberan quimiocinas, sobre el estímulo de rhGM-CSF (40).

Debido a la complejidad del peritoneo, poblado por diferentes tipos celulares, algunos investigadores han utilizado el cultivo celular para investigar la biología molecular y celular de las células mesoteliales peritoneales. Es así como cada tipo de célula muestra un fenotipo específico, caracterizado por sus 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), así como por su morfología y actividad de transporte vectorial; siendo esta última, una actividad característica de las células mesoteliales peritoneales (14).

Esta técnica de cultivo celular presenta igual o mayor efectividad que otros propuestos en la literatura, con técnicas diferentes a la que se realizó en dicho estudio, con lo

que podemos proponerla una vez más para su utilización en la investigación de la función de las células mesoteliales peritoneales.

Las células mesoteliales han sido consideradas durante mucho tiempo, víctimas de la agresión peritoneal producida por la diálisis, y su posible participación en los procesos de fibrosis no ha sido examinada con detalle (11; 12). En este contexto, las células mesoteliales en cultivo tienen la capacidad de cambiar su morfología y de producir componentes de la matriz extracelular, en respuesta a distintos estímulos. Además, el tratamiento de las células mesoteliales *in vitro*, en medios con altas concentraciones de glucosa o citocinas proinflamatorias e induce la expresión de TGF- β (13;14).

Las defensas innatas de la cavidad peritoneal, mediante su actividad celular, son sumamente importantes en los pacientes en DPCA. En este reporte se describe cómo los macrófagos peritoneales de pacientes en DPCA pueden ser manipulados *in vitro*, mejorando así su capacidad fagocítica oxidativa y no oxidativa, con variable intensidad mediante el rhGM-CSF.

El rhGM-CSG fue el primer factor, identificado como tal, que induce la proliferación y diferenciación de monocitos y granulocitos, estimulando también su función y su supervivencia *in vitro*, produciéndose en respuesta a la activación inmunológica e inflamatoria.

El rhGM-CSF previene la apoptosis y actúa en los neutrófilos, prolonga la supervivencia, incrementa la quimiotaxis y la muerte intracelular y, en precursores de monocitos-macrófagos, estimula su proliferación y diferenciación en la médula ósea, así como aumenta la citotoxicidad e incrementa la fagocitosis.

El rhGM-CSF tiene efectos especialmente en macrófagos. En su origen, tanto el G-CSF como el rhGM-CSF son similares: células endoteliales, monocitos, macrófagos, dendríticas y fibroblastos. La producción de ambos factores, por monocitos y macrófagos, es por exposición a lipopolisacáridos bacterianos, los que sirven para activar la respuesta inflamatoria en caso de invasión de patógenos.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados confirman la hipótesis de que los macrófagos peritoneales pueden modificar sus funciones, mediante el rhGM-CSF. Sólo falta la segunda parte del estudio en la cual administraremos simvastatina a los cultivos de CMP después de la medición basal de los niveles de mediadores inflamatorios y las vías de señalización intracelular de la familia Rho, para determinar el efecto de esta estatina como agente anti-inflamatorio a nivel peritoneal para el tratamiento de pacientes con TPA.

BIBLIOGRAFÍA

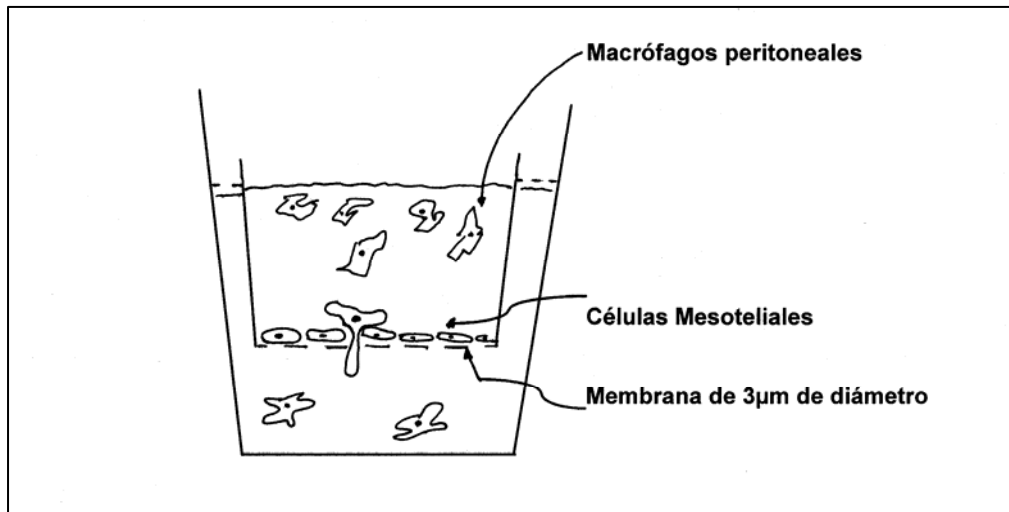
- (1) Gokal R, Mallick NP. Peritoneal dialysis. *Lancet* 1999; 353(9155):823-828.
- (2) Heaf J. Pathogenic effects of a high peritoneal transport rate. *Semin Dial* 2000; 13(3):188-193.
- (3) Heimbürger O, Wang T, Lindholm B. Alterations in water and solute transport with time on peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1999; 19 Suppl 2:S83-S90.
- (4) Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999; 55(1):341-356.
- (5) Nakayama M, Kawaguchi Y, Yamada K, Hasegawa T, Takazoe K, Katoh N et al. Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end-products in the peritoneum and its possible pathophysiological role in CAPD. *Kidney Int* 1997; 51(1):182-186.
- (6) Inagi R, Miyata T, Yamamoto T, Suzuki D, Urakami K, Saito A et al. 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(3):260-264.
- (7) Douvdevani A, Rapoport J, Konforty A, Argov S, Ovnat A, Chaimovitz C. Human peritoneal mesothelial cells synthesize IL-1 alpha and beta. *Kidney Int* 1994; 46(4):993-1001.
- (8) Combet S, Ferrier ML, Van Landschoot M, Stoenoiu M, Moulin P, Miyata T et al. Chronic uremia induces permeability changes, increased nitric oxide synthase expression, and structural modifications in the peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(10):2146-2157.
- (9) Plum J, Hermann S, Fuscholler A, Schoenicke G, Donner A, Rohrborn A et al. Peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis patients related to dialysis settings and peritoneal transport properties. *Kidney Int Suppl* 2001; 78:S42-S47.
- (10) Krediet RT, Zweers MM, van der Wal AC, Struijk DG. Neoangiogenesis in the peritoneal membrane. *Perit Dial Int* 2000; 20 Suppl 2:S19-S25.
- (11) Combet S, Miyata T, Moulin P, Pouthier D, Goffin E, Devuyst O. Vascular proliferation and enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase in human peritoneum exposed to long-term peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11(4):717-728.
- (12) Miyata T, Devuyst O, Kurokawa K, van Ypersele dS. Toward better dialysis compatibility: advances in the biochemistry and pathophysiology of the peritoneal membranes. *Kidney Int* 2002; 61(2):375-386.

- (13) Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348(5):403-413.
- (14) Wu YJ, Parker LM, Binder NE, Beckett MA, Sinard JH, Griffiths CT et al. The mesothelial keratins: a new family of cytoskeletal proteins identified in cultured mesothelial cells and nonkeratinizing epithelia. *Cell* 1982; 31(3 Pt 2):693-703.
- (15) Castro MA, Diaz C, Bajo MA, Sanchez-Cabezudo MJ, Fernandez dC, del Peso G et al. [Methods to assess the ex vivo growth capacity of mesothelial cells obtained directly from peritoneal effluent]. *Nefrologia* 2000; 20(3):277-283.
- (16) Lamperi S, Carozzi S. Suppressor resident peritoneal macrophages and peritonitis incidence in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 1986; 44(3):219-225.
- (17) Twardowski ZJ, Nolph KD, Khanna R. Limitations of the peritoneal equilibration test. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10(11):2160-2161.
- (18) Tauer A, Zhang X, Schaub TP, Zimmeck T, Niwa T, Passlick-Deetjen J et al. Formation of advanced glycation end products during CAPD. *Am J Kidney Dis* 2003; 41(3 Suppl 1):S57-S60.
- (19) Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336(15):1066-1071.
- (20) Adequacy of dialysis and nutrition in continuous peritoneal dialysis: association with clinical outcomes. Canada-USA (CANUSA) Peritoneal Dialysis Study Group. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(2):198-207.
- (21) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344(8934):1383-1389.
- (22) Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998; 97(15):1440-1445.
- (23) Horne BD, Muhlestein JB, Carlquist JF, Bair TL, Madsen TE, Hart NI et al. Statin therapy, lipid levels, C-reactive protein and the survival of patients with angiographically severe coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(6):1774-1780.
- (24) Dunzendorfer S, Rothbacher D, Schratzberger P, Reinisch N, Kahler CM, Wiedermann CJ. Mevalonate-dependent inhibition of transendothelial migration and chemotaxis of human peripheral blood neutrophils by pravastatin. *Circ Res* 1997; 81(6):963-969.

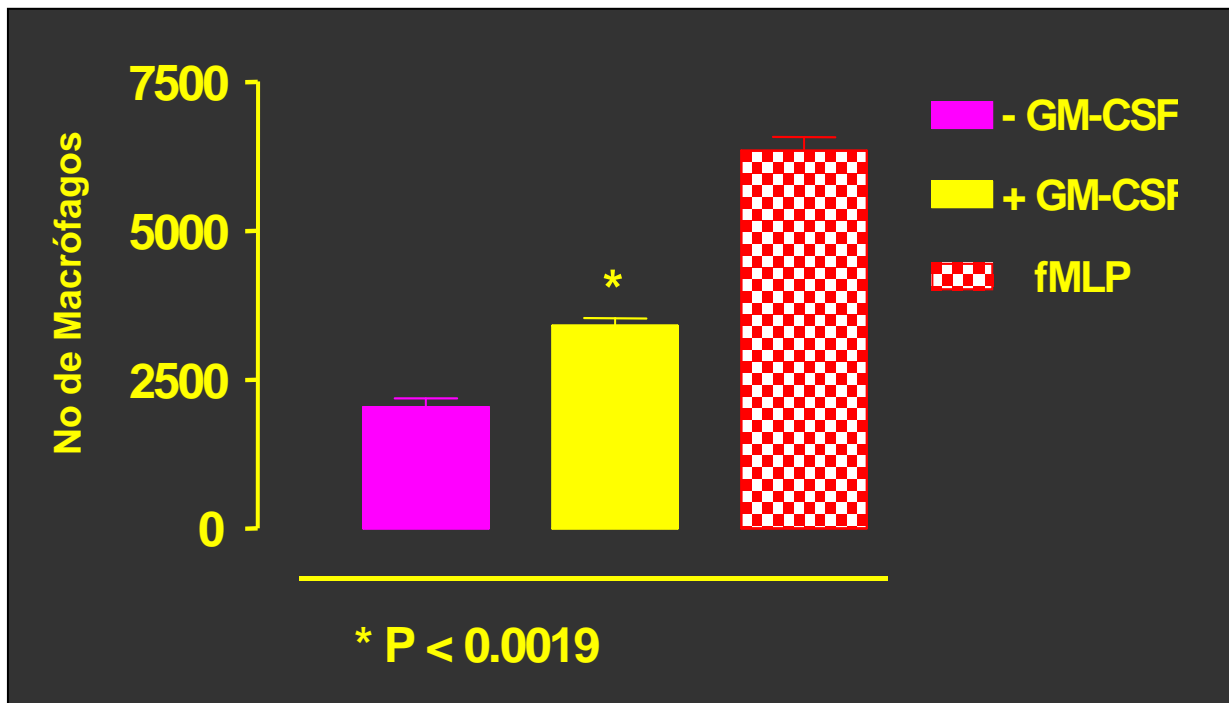
- (25) Choi M, Rolle S, Rane M, Haller H, Luft FC, Kettritz R. Extracellular signal-regulated kinase inhibition by statins inhibits neutrophil activation by ANCA. *Kidney Int* 2003; 63(1):96-106.
- (26) Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83(6):835-839.
- (27) Haslinger B, Kleemann R, Toet KH, Kooistra T. Simvastatin suppresses tissue factor expression and increases fibrinolytic activity in tumor necrosis factor-alpha-activated human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 2003; 63(6):2065-2074.
- (28) Haslinger B, Goedde MF, Toet KH, Kooistra T. Simvastatin increases fibrinolytic activity in human peritoneal mesothelial cells independent of cholesterol lowering. *Kidney Int* 2002; 62(5):1611-1619.
- (29) Seasholtz TM, Brown JH. RHO SIGNALING in vascular diseases. *Mol Interv* 2004; 4(6):348-357.
- (30) Rikitake Y, Liao JK. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* 2005; 97(12):1232-1235.
- (31) Brown JH, Del Re DP, Sussman MA. The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res* 2006; 98(6):730-742.
- (32) Khwaja A, Sharpe CC, Noor M, Hendry BM. The role of geranylgeranylated proteins in human mesangial cell proliferation. *Kidney Int* 2006; 70(7):1296-1304.
- (33) Choi M, Rolle S, Rane M, Haller H, Luft FC, Kettritz R. Extracellular signal-regulated kinase inhibition by statins inhibits neutrophil activation by ANCA. *Kidney Int* 2003; 63(1):96-106.
- (34) Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995; 83(6):835-839.
- (35) Haslinger B, Kleemann R, Toet KH, Kooistra T. Simvastatin suppresses tissue factor expression and increases fibrinolytic activity in tumor necrosis factor-alpha-activated human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 2003; 63(6):2065-2074.
- (36) Haslinger B, Goedde MF, Toet KH, Kooistra T. Simvastatin increases fibrinolytic activity in human peritoneal mesothelial cells independent of cholesterol lowering. *Kidney Int* 2002; 62(5):1611-1619.
- (37) Selgas R, Fernandez dC, Jimenez C, Carcamo C, Contreras T, Bajo MA et al. Immunomodulation of peritoneal macrophages by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in humans. *Kidney Int* 1996; 50(6):2070-2078.

- (38) Topley N, Alobaidi HM, Davies M, Coles GA, Williams JD, Lloyd D. The effect of dialysate on peritoneal phagocyte oxidative metabolism. *Kidney Int* 1988; 34(3):404-411.
- (39) Mahiout A, Matata BM, Brunkhorst R. Effect of glucose and pyruvate in acidic and non-acidic peritoneal dialysis fluids on leukocytes cell functions. *Kidney Int* 1997; 51(3):860-867.
- (40) Le Meur Y, Fixe P, Aldigier JC, Leroux-Robert C, Praloran V. Macrophage colony stimulating factor involvement in uremic patients. *Kidney Int* 1996; 50(3):1007-1012.

ANEXOS



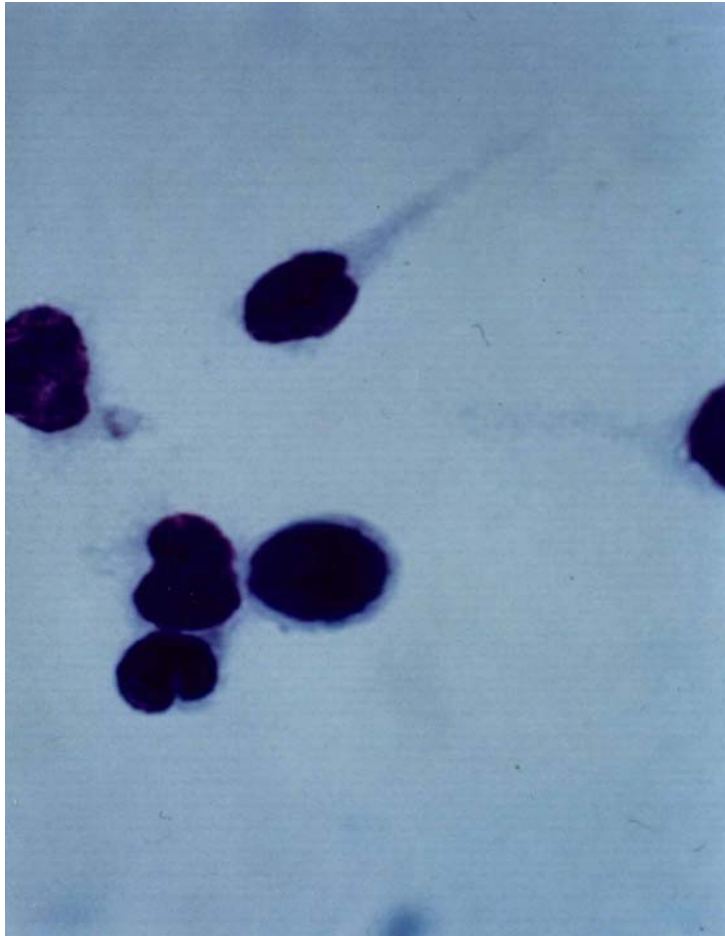
Esquema del Sistema Traswell. Este sistema asemeja una membrana peritoneal humana, donde se siembran las células mesoteliales de los pacientes en DPCA.



Transmigración. Transmigración de macrófagos peritoneales a través de un Sistema Transwell de células peritoneales



Microscopía de contraste de fases. Macrófagos peritoneales de pacientes en DPCA con más de 90% de viabilidad (60x).



Microscopía óptica con tinción de esterasa no específica. Macrófagos peritoneales de pacientes en DPCA con viabilidad del 92% (60x).