



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
“DR. ANTONIO FRAGA MOURET”
CENTRO MÉDICO NACIONAL “LA RAZA”

“AISLAMIENTO, CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS
MESOTELIALES PERITONEALES DE RATA ”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN NEFROLOGÍA

P R E S E N T A :

DR. PABLO OVANDO SEYMOUR

ASESORES:

DR. JOSÉ DANIEL SALAZAR EXAIRE

DR. JOSÉ LUIS REYES SÁNCHEZ

Q.F.B. ELSA IRENE SÁNCHEZ MONTES DE OCA



MÉXICO, D. F.

2010



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.

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

DR. BENJAMÍN VÁZQUEZ VEGA
Profesor Titular del curso de Postgrado en Nefrología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DR. PABLO OVANDO SEYMOUR
Médico Residente de Nefrología

Número definitivo del protocolo:
R-2009-3501-63

ÍNDICE

I.	RESUMEN	4
II.	SUMMARY	5
III.	ANTECEDENTES CIENTÍFICOS	6
IV.	MATERIAL Y MÉTODOS	13
V.	RESULTADOS	18
VI.	DISCUSIÓN	20
VII.	CONCLUSIONES	23
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	24

ANEXOS

RESUMEN.

Título : “ Aislamiento, cultivo y caracterización de células mesoteliales peritoneales de rata”.

Introducción: El cultivo de células mesoteliales constituye una excelente herramienta para el estudio de sus propiedades estructurales y funcionales en condiciones basales y condiciones estimuladas.

Objetivos: Desarrollar una técnica reproducible de cultivo de células mesoteliales de peritoneo de rata y caracterizar las células obtenidas por sus características morfológicas y por la presencia de los marcadores celulares para este tipo de células.

Material y Métodos: Estudio experimental, con obtención de células mesoteliales de rata , mediante la infusión a cavidad peritoneal de tripsina al 0.25% en solución amortiguadora de fosfatos. Se cultivaron en medio DMEM/F12, enriquecido con suero fetal bovino al 20%, que se reemplazó cada 48 horas . Las células se mantuvieron en incubadora a 37°C, con una atmósfera con CO₂ al 5% hasta confluencia celular. La caracterización celular se realizó por inmunofluorescencia con la utilización de un panel de anticuerpos y por microscopía electrónica .

Resultados: Las células mesoteliales de rata obtenidas presentaron su forma característica alargada, con tendencia a confluir en un promedio de 8 a 10 días y a la formación de una monocapa. En la microscopía electrónica se demostró la presencia de numerosas microvellosidades en la superficie de la célula mesotelial. En el estudio de inmunofluorescencia, las células mesoteliales de rata presentaron tinción positiva a claudinas 1, 2 y 3, así como a vimentina y acuaporina 1.

Conclusiones: Este modelo ofrece la oportunidad de realizar estudios de biología celular y de fármacos, que permitirán sustentar nuevas opciones terapéuticas en humanos.

Palabras clave: rata , célula mesotelial , cultivo celular, caracterización celular.

SUMMARY.

Title: “ Isolation, culture and characterization of rat peritoneal mesothelial cells”.

Introduction: Mesothelial cells culture provides an excellent tool for studying their structural and functional properties in basal and stimulated conditions.

Objectives: Develop a reproducible technique of mesothelial cell cultures of rat peritoneal mesothelial cells and cultured cells characterization by a panel of cell markers.

Material and Methods: Experimental study , was conducted to obtain mesothelial cells of rats , through infusion of peritoneal cavity to the 0.25% trypsin in buffer solution phosphates and their cultivation in DMEM/F12 enriched with fetal bovine serum 20%, replaced every 48 hours and holding cells in an incubator at 37 ° C under an atmosphere with CO₂ to 5% cell confluence. Cell characterization was performed by immunofluorescence using a panel of antibodies and the performance of electron microscopy.

Results: Mesothelial cells obtained from rats presented their characteristic elongated shape, with a tendency to converge at an average of 8 to 10 days and the formation of a monolayer. In electron microscopy showed the presence of numerous microvilli on the surface of mesothelial cells. In the study by immunofluorescence, rat mesothelial cells showed positive staining for claudins 1, 2 and 3, as well as vimentin and acuaporina 1.

Conclusions: This model offers the opportunity for studies of cellular biology and medicinal products, which will support new therapeutic options in humans.

Key words: rat, mesothelial cell, primary culture, celular characterization.

ANTECEDENTES CIENTÍFICOS.

Las células mesoteliales (CM) son células epiteliales especializadas que constituyen una población homogénea y recubren órganos internos y paredes corporales de la cavidad peritoneal, pleural y pericárdica. Ellas adoptan una morfología predominantemente elongada, aplanada y escamosa independiente de la especie animal (humano, murino, conejo o caballo) o sitio anatómico (1).

Embriológicamente, el mesotelio se desarrolla del tejido mesodérmico entre las 8 y 18 días de gestación dependiendo de las especies. En humanos, esto ocurre alrededor del día 14, cuando las células gradualmente se diferencian de células cuboideas a células alargadas y aplanadas (2).

Existen 2 morfologías del mesotelio: células mesoteliales cuboidales que tienen una superficie pequeña, abundante aparato de Golgi, retículo endoplásmico rugoso y vesículas con numerosos microvellosidades comparado con células mesoteliales escamosas (3).

Las CM contienen microtúbulos y microfilamentos, glucógeno, vesículas y vacuolas, pocas mitocondrias, un aparato de Golgi poco desarrollado y un pequeño retículo endoplásmico rugoso (2). Son células únicas y aunque son derivadas del mesodermo, expresan filamentos intermedios del mesénquima, que contienen vimentina y desmina. También expresan citoqueratinas, que son proteínas características de las células epiteliales (1).

Presentan abundantes microvellosidades y cilios que se encuentran en la superficie luminal de la célula mesotelial. Estas estructuras protegen la superficie mesotelial del daño por fricción al producir exudado seroso y agua (microvellosidades) y secreción de surfactante (cilios). Por lo que contribuyen a la homeostasis normal y fisiológica de las cavidades serosas. Son la primera línea de defensa durante el daño químico, bacteriano y quirúrgico (1).

Las CM secretan glucosaminoglicanos, proteoglicanos y fosfolípidos, que proveen un glicocáliz no adhesivo que protege la superficie serosa de la abrasión , de infecciones y diseminación tumoral (1).

Las CM pueden sintetizar una serie de citocinas, quimocinas , factores de crecimiento y componentes de matriz que regulan la inflamación e inician la proliferación celular, la diferenciación, la migración y reparación tisular. La secreción de quimocinas promueve la migración transmesotelial de neutrófilos y monocitos a sitios de lesión, así como de leucocitos del compartimento vascular al espacio seroso. Además de la importancia del papel activo en el depósito local de fibrina, su actividad fibrinolítica es esencial en la prevención y remoción de depósitos de fibrina, posterior a un daño mecánico e infección (1).

5 mesotelio está activamente involucrado en el transporte y movimiento de células a través de las cavidades serosas mediante vesículas pinocíticas y uniones intracelulares. Este transporte es por convección y difusión ya que la resistencia es limitada como barrera biológica. La presencia de sitios aniónicos sobre las células mesoteliales hacen que la membrana peritoneal con carga negativa actúe como una barrera permeable selectiva para el transporte de proteínas plasmáticas (1).

Las células mesoteliales peritoneales humanas (CMPH) aisladas de especímenes del omento, poseen características bioquímicas y morfológicas idénticas a las que se encuentran en células madre mesoteliales peritoneales (1) .

El cultivo de CM provee de una excelente herramienta para el estudio de sus propiedades estructurales y funcionales en condiciones basales y bajo estímulos diversos (1).

Bajo condiciones normales de homeostasis peritoneal, las células exhiben proliferación celular limitada. Sólo del 0.1%-0.5% de células en el mesotelio están en mitosis en cualquier momento, pero si se estimulan en forma apropiada, su actividad mitótica aumenta, dentro de 48 horas después de la lesión a la superficie serosa (2) .

El uso de células mesoteliales de roedores tiene ventaja sobre el uso de CMPH, debido que el tejido neonatal y fetal puede proveer de una población de células que se dividen rápidamente (1) .

El cultivo de CMPH de tejidos del omento está bien establecido y es reproducible. Los cuidados requeridos para obtener un cultivo de CMPH son : prevenir la contaminación de los cultivos con fibroblastos peritoneales y en menor grado la contaminación por células endoteliales. Los fibroblastos peritoneales pueden ser distinguidos de las células mesoteliales por su apariencia alargada y su tinción negativa para citoqueratina. El uso de un amplio panel de marcadores celulares y la microscopía de contraste de fase son los mejores métodos para distinguir las CMPH de las células endoteliales (1).

El potencial proliferativo de CMPH es limitado en cultivo. Las células pueden ser mantenidas en cultivo sin pérdida significativa en su morfología celular hasta el segundo o tercer pasaje, posteriormente las células se vuelven alargadas, aplanadas y con numerosos núcleos y vacuolas (1).

Otra de las funciones de las células mesoteliales es reducir la fricción por la expresión de numerosas microvellosidades que movilizan y facilitan la distribución de material surfactante que lubrica los órganos internos (3).

El cilio primario está presente en la superficie apical del mesotelio de todas las serosas, incluyendo la regiones parietales y viscerales. Ocupa la posición supranuclear de la superficie celular de la célula mesotelial en todas las especies estudiadas tanto en el humano como en las ratas (3).

El cilio primario tiene una función sensorial para detección de cambios en la composición del líquido seroso incluyendo reguladores hormonales y paracrinos que son liberados hacia este líquido y está estratégicamente localizado para mediar una respuesta celular rápida . Durante los cuadros de peritonitis, las células mesoteliales son activadas por la liberación de citocinas proinflamatorias que amplifican la respuesta de defensa y detección de fricción en la célula mesotelial (3).

El mejor método para distinguir las CMPH del omento, de las células endoteliales y fibroblastos , es mediante la caracterización con el uso de un panel de marcadores celulares, a los cuales las CM son positivos : E-cadherina, molécula de adhesión

intercelular-1 (ICAM-I), citoqueratinas, desmina , vimentina, calretinina y CA 125 principalmente (4).

Las células epiteliales poseen varios complejos funcionales muy bien organizados, que actúan como una barrera primaria a la difusión de solutos alrededor del espacio paracelular: las uniones estrechas, las uniones adherentes, las uniones comunicantes y los desmosomas. Se han identificado varias proteínas dentro del complejo de unión. Entre ellas proteínas de membrana integrales (como claudinas, ocludina, E cadherina), moléculas de señalización (proteína cinasa C, tirosina cinasas Src, proteínas G pequeñas y subunidades G heterotriméricas) y posibles proteínas estructurales de la zona de oclusión (ZO-1, ZO-2 y ZO-3) (5).

La ocludina es una fosfoproteína de 60 kD, considerada una proteína integral de membrana localizada en el interior de las fibrillas vistas por criofractura. Fue la primera proteína de membrana integral identificada en las uniones estrechas (5).

Se han identificado otras proteínas transmembranales, la familia de las claudinas. Son componentes integrales de las fibrillas de la unión estrecha y se han identificado 24 miembros de la familia de las claudinas, en ratones, ratas , conejos y seres humanos. Su función es participar directamente en la formación de las fibrillas de la unión estrecha y existen pruebas de que regulan directamente la selectividad de la vía paracelular. Se ha propuesto que le confieren a esta vía de transporte propiedades de permeabilidad iónica específicas de tejidos (5).

La E cadherina es una glucoproteína de 120 kD, el principal componente de las uniones adherentes de las células epiteliales y un miembro prototípico de la superfamilia de cadherinas. La E-cadherina también es importante como molécula de transmisión de señales en la células y, a través de ambas actividades, mantiene la integridad de los epitelios (5).

Las proteínas ZO-1, ZO-2 y ZO-3 desempeñan papeles relevantes en la organización y regulación de las uniones estrechas (5).

Por todo lo anterior las células mesoteliales mantenidas *in vitro* pueden ser una herramienta potencial para el estudio de la biología celular mesotelial y para estudiar la influencia de factores negativos asociados a la diálisis peritoneal. Ultraestructuralmente, cultivos de CM de conejos y de rata (primarios o subcultivos) son similares a las CM del roedor normal y de las células humanas serosas en vivo (6).

La preservación de la integridad estructural y función del peritoneo es esencial para mantener la eficacia de la membrana peritoneal. La constante exposición del mesotelio a componentes bioincompatibles de las soluciones de diálisis peritoneal, productos de degradación de la glucosa y productos finales de la glucosilación avanzada, peritonitis y la uremia contribuyen a la pérdida de la habilidad del cilio primario a transmitir señales intracelulares de manera efectiva y a la inflamación peritoneal que se caracteriza por el aumento de la permeabilidad vascular, activación y expansión de los macrófagos peritoneales, infiltración de células a los sitios de lesión, liberación de productos pro-inflamatorios e incremento de la síntesis de matriz proteica dan como resultado la pérdida de la capa protectora de la cavidad peritoneal (7).

El establecimiento de cultivos de células de mesoteliales humanas provee la base de un modelo para la investigación del papel del mesotelio en los mecanismos de defensa durante la peritonitis así como de una técnica de estudio *in vitro* de la fisiología de la célula mesotelial e importancia en el transporte de agua y solutos. (8).

La obtención de células mesoteliales normales puede ser difícil ya que éstas pueden perder o cambiar características funcionales y fenotípicas. Esto generalmente ocurren con pasajes de repetición o cultivos prolongados de las células. Por lo que es importante describir un método de corto plazo de crecimiento de células mesoteliales peritoneales en animales (9).

Otras posible aplicaciones de las células mesoteliales en cultivo son: implantación de células mesoteliales o su trasplante para preservar la estructura y función del peritoneo normal. Que puede tener implicaciones en la morbilidad y sobrevida de los pacientes con diálisis peritoneal (10).

MATERIAL Y MÉTODOS.

Estudio experimental, que se llevó a cabo en las instalaciones del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional La Raza, con el apoyo del Departamento de Fisiología del Centro de Investigación y de Estudios avanzados del IPN donde se realizaron las técnicas de inmunofluorescencia y microscopia electrónica.

Obtención de células mesoteliales de la rata:

Se incluyeron 3 ratas hembras (Wistar) con un peso promedio de 200 gramos, , los animales de experimentación del proyecto fueron sacrificados después de los procedimientos mediante dislocación cervical manual , usado como método físico de eutanasia. Se confirmó la muerte del animal por ausencia de signos vitales, todo lo anterior de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

TÉCNICA DE CULTIVO DE CÉLULAS MESOTELIALES.

- 1) La rata se anestesió con fenobarbital sódico vía intraperitoneal, con una dosis de 1 ml/kg/peso con una aguja de insulina. Una vez que se encontraba anestesiada, la rata se colocó en una cama con temperatura a 37° C y se sujetaron las cuatro extremidades.
- 2) Posteriormente se realizó la tricotomía con rasuradora y navaja en la región abdominal y antisepsia con solución de yodo 6% . Después, se procedió a disecar con bisturí en la línea media de la rata hasta visualizar el peritoneo.
- 3) Acto seguido, se realizó una incisión fina de 2 mm de longitud en el peritoneo en sentido cefalocaudal y se introdujo un catéter de diálisis peritoneal esterilizado en etanol, dirigiéndolo hacia el hueco pélvico.

- 4) Se fijó el catéter al peritoneo con seda 00 mediante una jareta, para evitar la fuga de líquido alrededor del orificio de inserción del catéter.
- 5) Se perfundieron 25 ml de solución de tripsina al 0.25% + EDTA al 0.02% y se dejaron en cavidad peritoneal por 30 minutos.
- 6) Se realizaron movimientos finos para reposicionar el catéter evitando desplazarlo más de 1 cm para evitar salida del líquido por el orificio.
- 7) Se colocó el catéter en dirección caudal y se drenó por gravedad hacia un vaso de precipitado de 50 ml, estéril.
- 8) El líquido obtenido se pasó a un tubo de centrífuga de 50 ml y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos.
- 9) Se eliminó el sobrenadante y se agregó 1 ml medio completo en donde las células se resuspendieron. Este procedimiento se repitió 2 veces más para lavarlas. Para contar las células se tomaron 10 µl de la suspensión de células y se les agregaron 90 µl de solución de azul tripano al 0.4% (dilución 1:10). De esta suspensión de células se tomaron 10 µl para llenar la cámara de Neubauer y se realizó el conteo de las células.
- 10) Las células se sembraron en una caja de 4 pozos, previamente cubiertos con colágeno. Se mantuvieron en DMEM/F12 con 20% de suero fetal bovino adicionado con: bicarbonato de sodio 1.2 g/l, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100mg/ml, transferrina 0.5 µg/ml, insulina 0.5 µg/ml, glutamina 2 mM. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en medio húmedo en una atmósfera de CO₂ al 5%. El cambio del medio se realizó cada tercer día.

PASAJE DE CÉLULAS

- 1.- Se retiró el medio de cultivo.

- 2.- Las células se lavaron 3 veces con PBS sin calcio.
- 3.- Se les agregó tripsina 0.25% + EDTA al 0.02% y se dejó 5 minutos a 37°C
- 4.- Las células se levantaron y se colocaron en un tubo de 50 ml estéril con 4 ml de medio de cultivo y se centrifugaron a 1500 rpm por 3 minutos
- 5.- Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo fresco.
- 6.- Se hizo conteo celular con azul de tripano y se sembraron en cajas nuevas.

La caracterización celular se realizó mediante inmunofluorescencia con la utilización de un panel de anticuerpos como: claudinas, E-cadherina, citoqueratinas, vimentina y acuaporina 1 y se realizó microscopía electrónica donde se observaron y se caracterizó la morfología de la superficie de las células mesoteliales peritoneales de rata.

INMUNOFLUORESCENCIA.

1. Se realizaron 2 lavados rápidos a las células con PBS filtrado.
2. La monocapa se fijó con metanol absoluto por 30 minutos a 4° C.
3. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos cada uno, con PBS 1X y con agitación suave.
4. Las células subconfluentes se permeabilización con 0.1% de triton X-100 en PBS y las confluentes con 0.25% de tritón X100 en PBS, durante 15 min.
5. Se realizaron 2 lavados rápidos y 3 de 5 minutos cada uno, con PBS.
6. Se bloquearon los sitios inespecíficos con 30 µl de albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5% durante 30 minutos y a 4° C.
7. Se colocaron 30 microlitros del primer anticuerpo diluído en BSA a la concentración marcada por el proveedor: ratón α citoqueratina 8-18 (1:50, Zymed Laboratories, Invitogen Immunodetection) y conejo α Claudina 1 (1:100,

Zymed Laboratories, Invitrogen Immunodetection), ratón α vimentina (1:100, Zymed Laboratories, Invitrogen Immunodetection) y conejo α Claudina 2 (1:82, Zymed Laboratorios Invitrogen Immunodetection..), ratón α E cadherina (1:50, Zymed Laboratories. Invitrogen Immunodetection) y conejo α Claudina 3 (1:10, Zymed Laboratories., Invitrogen Immunodetection), conejo α acuaporina (1:10, Chemicon Internacional), ratón α claudina 4 (1:50, Zymed Laboratories Invitrogen Immunodetection) y cabra α Claudina 8 (1:100, Zymed Laboratories, Invitrogen Immunodetection) y BSA para determinar unión inespecífica. Se incubaron toda la noche a 4° C.

8. Se lavaron 3 veces con PBS filtrado durante 5 minutos cada uno.
9. Se pusieron los segundos anticuerpos específicos α ratón, α conejo y α cabra, Alexa 488 y 594 (1:200, Molecular Probes) durante 60 minutos a temperatura ambiente, cubriendo la preparación con papel aluminio.
10. Se las células se lavaron 3 veces con PBS filtrado durante 5 minutos cada uno en agitación suave.
11. Se realizó lavado 2 veces con agua desionizada y filtrada durante 5 minutos cada uno.
12. Se montó la preparación en un portaobjetos con 2.5 microlitros de vectashield y se selló los lados de cada cubreobjetos con barniz.
13. Y se guardó a 4° C protegido de la luz hasta que se realizó la microscopia confocal.

MICROSCOPIA CONFOCAL

Las imágenes de microscopía confocal se tomaron en un microscopio confocal (Leica SP2) con un láser de krypton-argón.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA:

Las células mesoteliales cultivadas en cubreobjetos cubiertas con colágeno fueron procesadas para microscopía electrónica de barrido (SEM). Las células fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% en PBS pH= 4 por 1 hora a temperatura ambiente (RT, 20 a 22 °C). Después se lavaron profusamente con PBS y se post-fijaron con tetraóxido de osmio en PBS por 1 hora a RT. Las células fueron lavadas con PBS y deshidratadas con concentraciones cada vez más altas de etanol. Las muestras se secaron a punto crítico con un Sandri – 720A (Tousimis Rockville, MD. USA) y después cubiertas con oro en un Sputter-Etch (Dorton Vacuum Desk II, Cherry Hill, N.Y. USA) . Las células se observaron y microfotografiaron en un microscopio de electrones de barrido VEOL 35C (Veol , LTD Tokyo, Japan)

Análisis estadístico:

Se realizaron comparaciones mediante las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) que se obtuvieron de los resultados graficados por microscopía confocal, entre la presencia o no de cada marcador celular, con un intervalo de confianza del 95%, comparando las 2 variables cuantitativas empleando la prueba de t no pareada. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS.

Se utilizaron 3 ratas hembras Wistar , con un peso promedio 212 gramos, de las cuales se obtuvo un efluente peritoneal promedio posterior a la infusión de tripsina de 17.6 ml posterior a cada procedimiento. Posterior al cultivo de las células obtenidas y su mantenimiento en condiciones ya establecidas se vigiló cada 24 horas el crecimiento celular así como descartar contaminación del mismo, con recambio de medio de cultivo cada 48 horas.

Durante las primeras 48 a 72 horas, el crecimiento celular fue lento con características morfológicas celulares de tipo alargadas y elongadas (anexos 1 y 2) con tendencia a confluir en un promedio de 8 a 10 días y adquirir la característica de “empedrado” con la formación de una monocapa (anexos 3 y 4). La contaminación por fibroblastos fue mínima.

Una vez alcanzada dicha confluencia se realizaron 2 pasajes celulares para mantener la viabilidad celular y así realizar la caracterización celular con inmunofluorescencia y microscopia electrónica.

En el estudio de inmunofluorescencia, las células mesoteliales de rata presentaron tinción positiva a claudinas 1, 2 y 3 (anexos 5, 7 y 9) , vimentina (anexos 11 y 13) , núcleos (anexos 12 y 13) y acuaporina 1 (anexo 15).

En la microscopia electrónica se demostró la presencia de numerosas microvellosidades en la superficie de la célula mesotelial (anexos 17-20).

Mediante la medición de unidades arbitrarias de inmunofluorescencia de cada marcador celular en la microscopia confocal en comparación con células control se obtuvieron una $P < 0.001$ para claudinas 1 y 3 (ver anexos 6 y 10 respectivamente) y $P < 0.0001$ en claudina 2, vimentina, núcleos y acuaporina 1 (ver anexos 8, 14 y 16).

DISCUSIÓN.

La introducción de la diálisis peritoneal como modalidad de la terapia de reemplazo renal provocó el interés en el estudio de la biología de la célula mesotelial peritoneal. Los cultivos de las células mesoteliales a partir del tejido del omento humano proveen de un modelo *in vitro* para el estudio de esta membrana dinámica que juega un papel importante en la homeostasis de la cavidad peritoneal.

El estudio de las interacciones entre las células peritoneales, soluciones de diálisis y células inflamatorias requieren de un cultivo de células mesoteliales estables y diferenciadas y debido al lento crecimiento de los cultivos primarios en humanos y la necesidad de preparar un nuevo cultivo primario después de 4 a 6 pasajes celulares limita su uso, por lo anterior el presente proyecto describe una técnica reproducible para el aislamiento y cultivo de células mesoteliales peritoneales de rata y nos proporciona una técnica útil *in vitro* de la fisiología de las células mesoteliales.

Estructuralmente, el cultivo y el crecimiento de estas células fueron similares a las células obtenidas de conejo y ratón obtenidas en los estudios de Thomas Hjelle y Bot respectivamente. (8,9).

El método de aislamiento de células mesoteliales peritoneales en humanos está bien establecido como lo describe Fischereder *et al* (13) mediante la toma de tejido del omento, misma técnica usada en otros modelos animales, en este estudio describimos un nuevo método de aislamiento y obtención de células de la cavidad peritoneal de rata

mediante la inserción de un catéter con técnica estéril e infusión de tripsina que resultó en una contaminación mínima del efluente obtenido.

Las células mesoteliales demostraron tinción a vimentina, como filamento intermedio, característica de las células epiteliales y de origen mesodérmico, como lo demuestra el estudio de Yung *et al* (10) mediante análisis inmunohistoquímico de células mesoteliales peritoneales de humano positivas a vimentina y citoqueratina.

Todas las proteínas de membrana de las uniones estrechas pueden mediar la adhesión célula-célula y la sobreexpresión o disrupción de éstas tiene efectos sobre la permeabilidad paracelular. Con este proyecto se demostró la presencia de claudinas (claudinas 1,2 y 3) en las células mesoteliales peritoneales de rata que explica que son células epiteliales interconectadas célula-célula y que determinan por su función la selectividad del transporte paracelular.

La integridad funcional de la membrana peritoneal juega un papel importante en la regulación de la ultrafiltración, y la falla de ultrafiltración es una complicación en la diálisis peritoneal y por lo tanto la monocapa de células mesoteliales proveen una gran superficie para el movimiento de líquido entre capilares peritoneales y la cavidad peritoneal. Neng *et al.* (11) confirmaron la expresión de acuaporina 1 en células mesoteliales peritoneales de humano. En este estudio nosotros demostramos que la acuaporina 1 esta presente en las células mesoteliales peritoneales de rata y su interés clínico en el mantenimiento de la ultrafiltración de la membrana peritoneal.

Por microscopia electrónica se observó la presencia de abundantes microvellosidades en la superficie de las células mesoteliales de rata, cómo lo demostró el estudio de Bird, *et al.* (12) con la presencia de numerosas microvellosidades sobre la superficie celular en cultivos de células mesoteliales humanas y explica la importancia de éstas células en la protección de la superficie y como línea de defensa contra el daño químico o bacteriano.

CONCLUSIONES.

Las ventajas en el uso de células mesoteliales de roedores son : disponer de una fuente accesible y económica de células peritoneales, que pueden ser mantenidas a largo plazo en cultivos y que son fáciles de replicar y controlar.

Las células mesoteliales de rata mantenidas *in vitro* proveen una herramienta potencial para el estudio de la biología celular mesotelial y permitir el estudio de la influencia de factores negativos asociados a la diálisis peritoneal.

Este modelo ofrece la oportunidad de realizar estudios de biología celular y de fármacos, que permitirán sustentar nuevas opciones terapéuticas en humanos, por ejemplo la implantación de células mesoteliales o trasplante para preservar un peritoneo estructural y funcionalmente normal y así mejorar la sobrevida y disminuir las morbilidades en los pacientes en terapia de sustitución renal con diálisis peritoneal.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Yung S and Chan T. Mesothelial cells. *Perit Dial Int*, 2007; 27: S110-S115.
- 2.- Mutsaers, Steven E. The mesothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* , 2004; 36 : 9 – 16.
- 3.- Bird Stephen. Mesothelial primary cilia of peritoneal and other serosal surfaces. *Cell Biology International*, 2004; 28 : 151-159.
- 4.- López Cabrera M, Aguilera A, Aroeira L, et al. Ex vivo Analysis of Dialysis Effluent- derived Mesothelial Cells as an Approach to Unveiling the Mechanism of Peritoneal Membrana Failure. *Perit Dial Int* , 2006; 26 : 26-34.
- 5.- Brenner y Rector. *El Riñon. Tratado de Nefrología. Vol. 2. 7ª. ed. pp: 203-205.*
- 6.- Hjelle J, Golinska B, Waters D, et al. Isolation and Propagation in vitro of Peritoneal Mesothelial Cells. *Peritoneal Dialysis International*, 1989; 9: 341-347.
- 7.- Yung S and Mao Chan T. Intrinsic Cells: Mesothelial Cells – Central Players In Regulating Inflammation and Resolution. *Perit Dial Int* 2009; 29 : S21-S27.
- 8.- Stylianou E, Jenner L, Davies M, et al. Isolation, culture and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney International*, 1990; 37 : 1563-1570.
- 9.- Bot J, Whitaker D, Vivian J, et al. Culturing Mouse Peritoneal Mesothelial Cells. *Pathol. Res. Pract.* 2003; 199: 341-344.

10.- Yung S, Li F.K., Chan T.M. Peritoneal Mesothelial Cell Culture and Biology. *Perit Dial Int*, 2006; 26: 162-173.

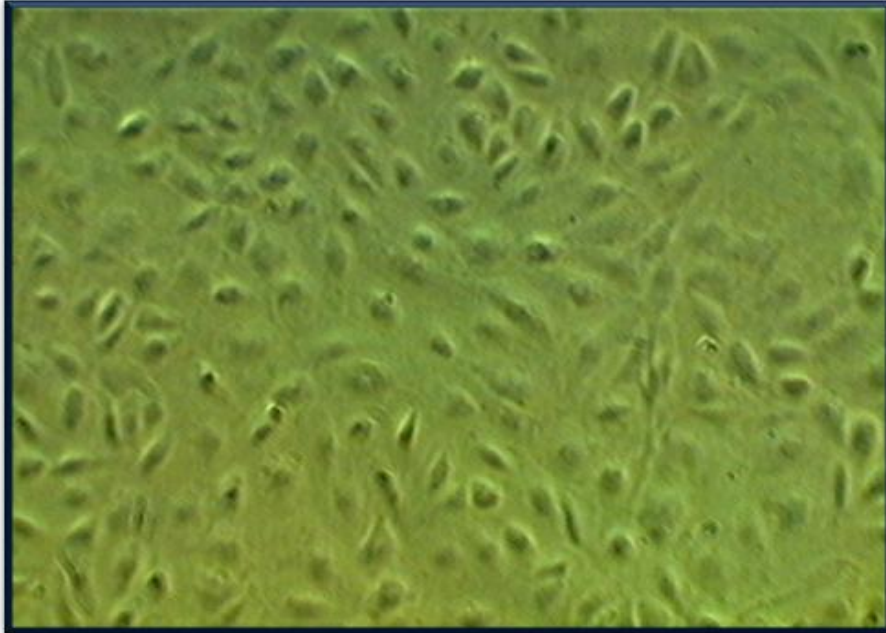
11.- Neng Lai, Keung Li, Yui Lan, et al. Expression of Aquaporin-1 in Human Peritoneal Mesothelial Cells and Its Upregulation by glucose *In Vitro*. *J Am Soc Nephrol* 2001;12: 1036-1045.

12.- Bird S, Legge M and Walker R. Cultured peritoneal mesothelial cells exhibit apical primary cilia. *Cell Biology International* 2004;28:79-92.

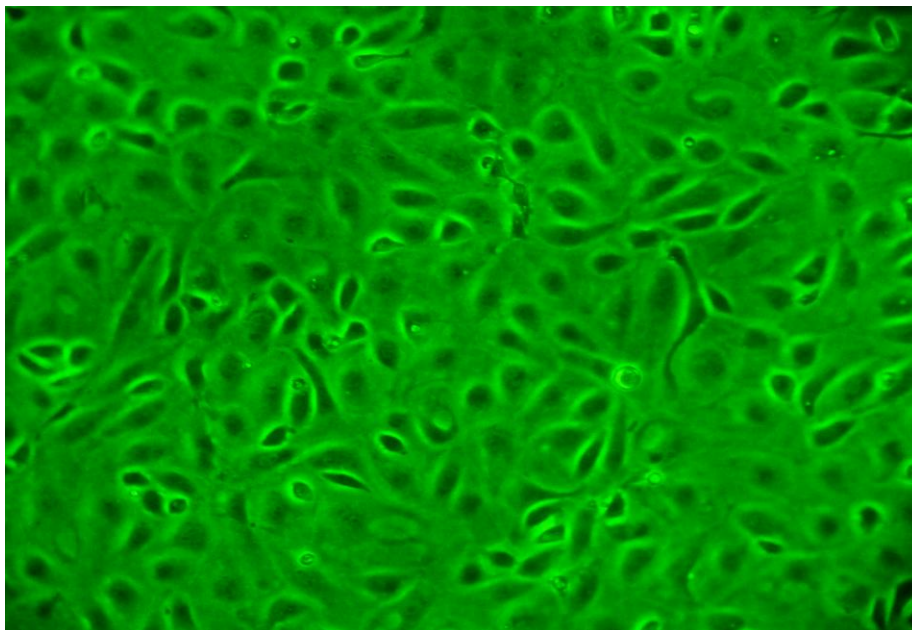
13.- Fishereder, Luckow, Sitter, et al. Inmortalization and characterization of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney International* 1997;51:2006-2012.

ANEXOS .

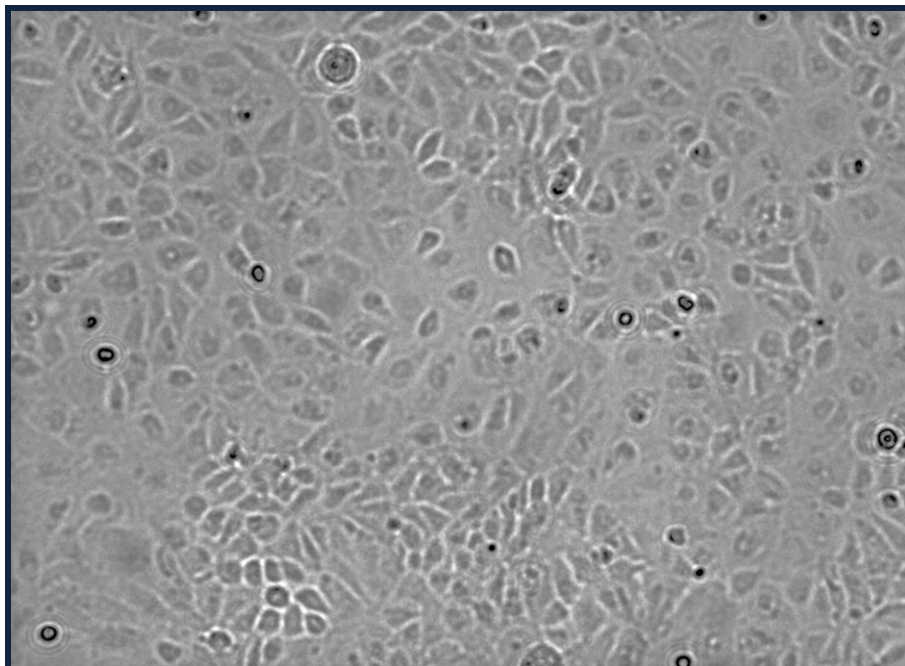
ANEXO 1



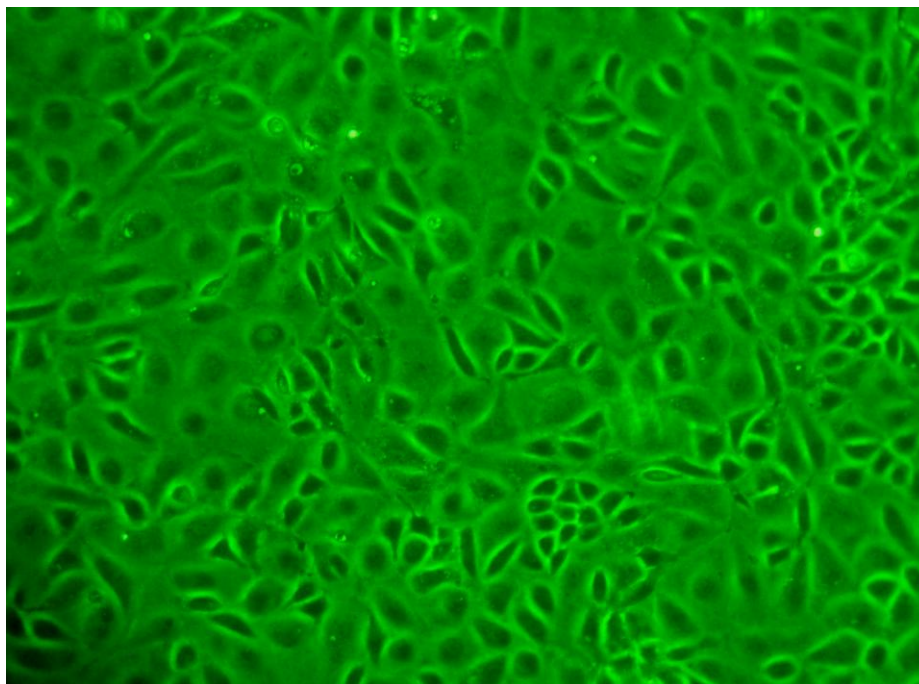
ANEXO 2



ANEXO 3

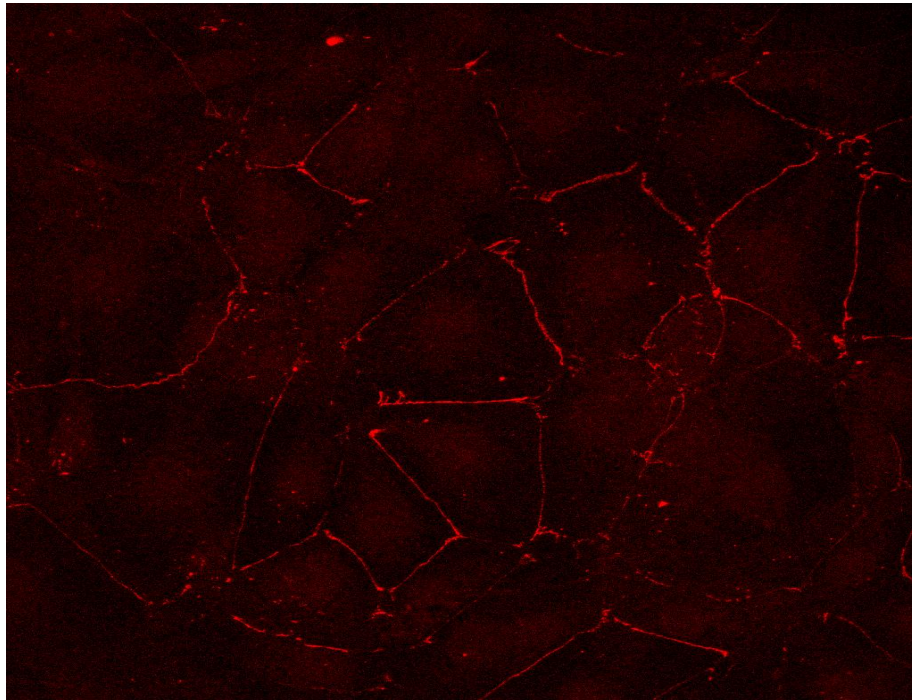


ANEXO 4



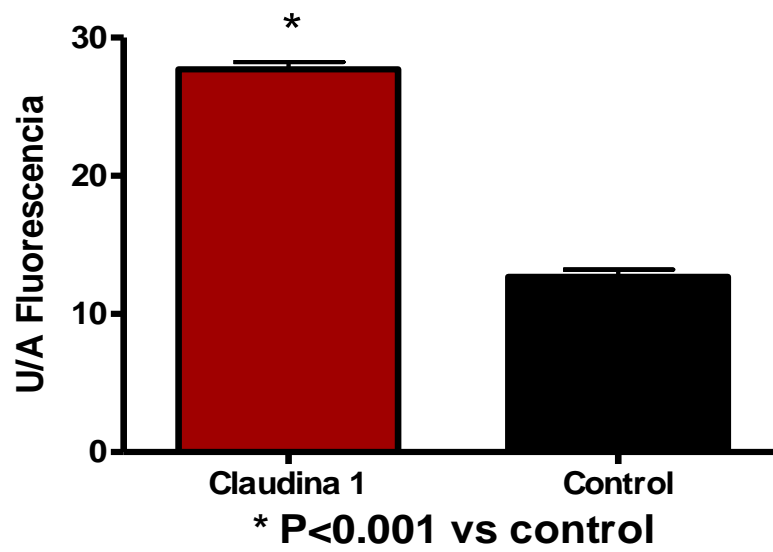
ANEXO 5

CLAUDINA 1



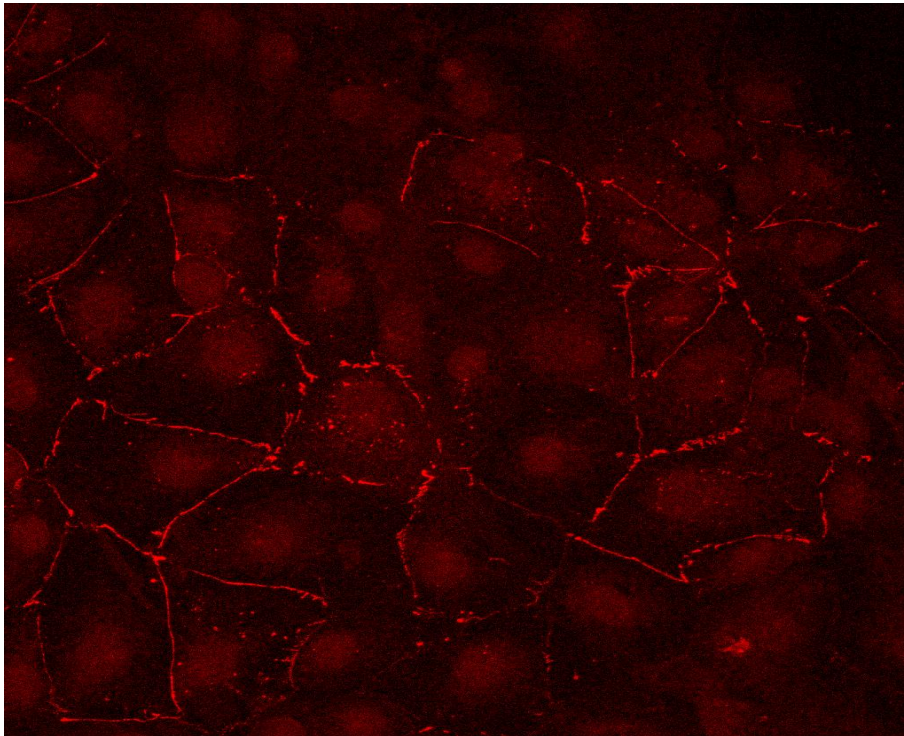
ANEXO 6

CLAUDINA 1



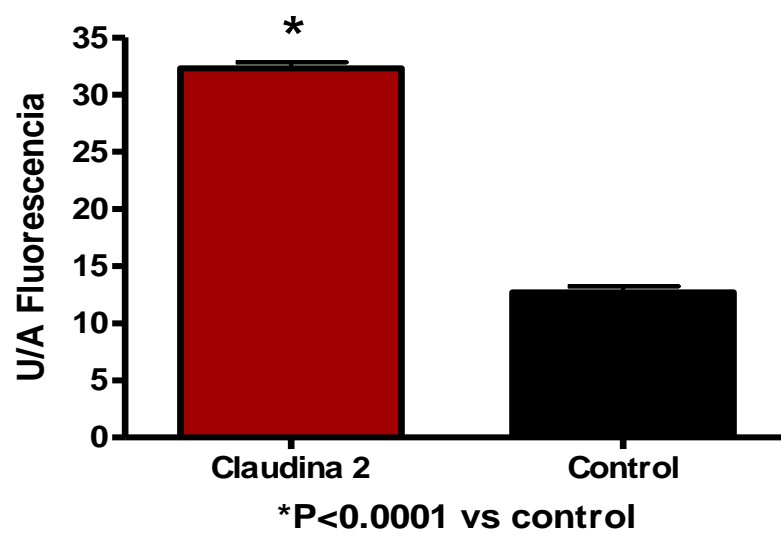
ANEXO 7

CLAUDINA 2



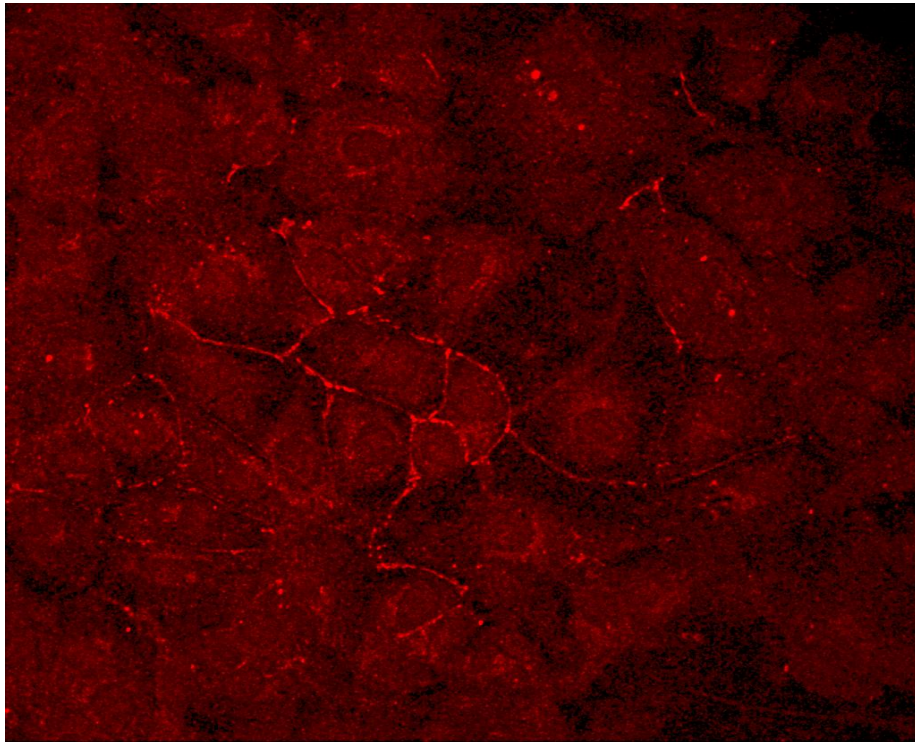
ANEXO 8

Claudina 2

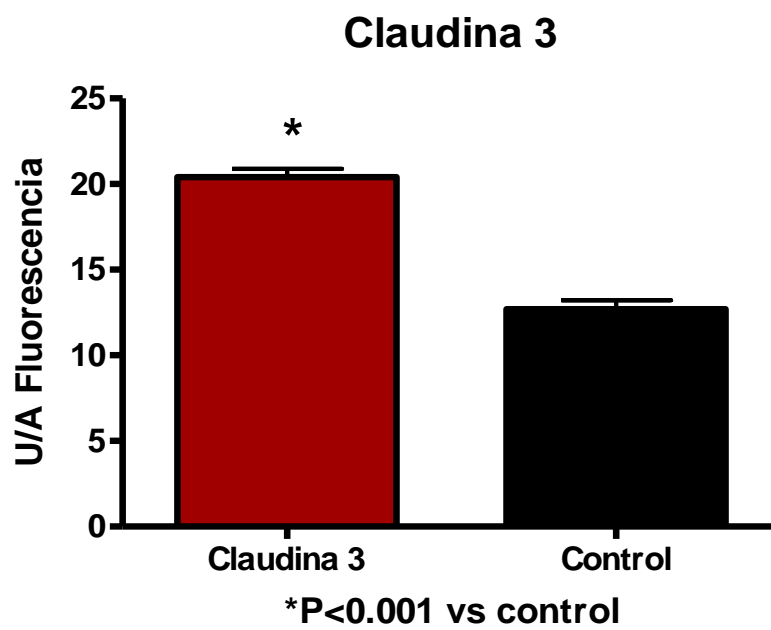


ANEXO 9

CLAUDINA 3

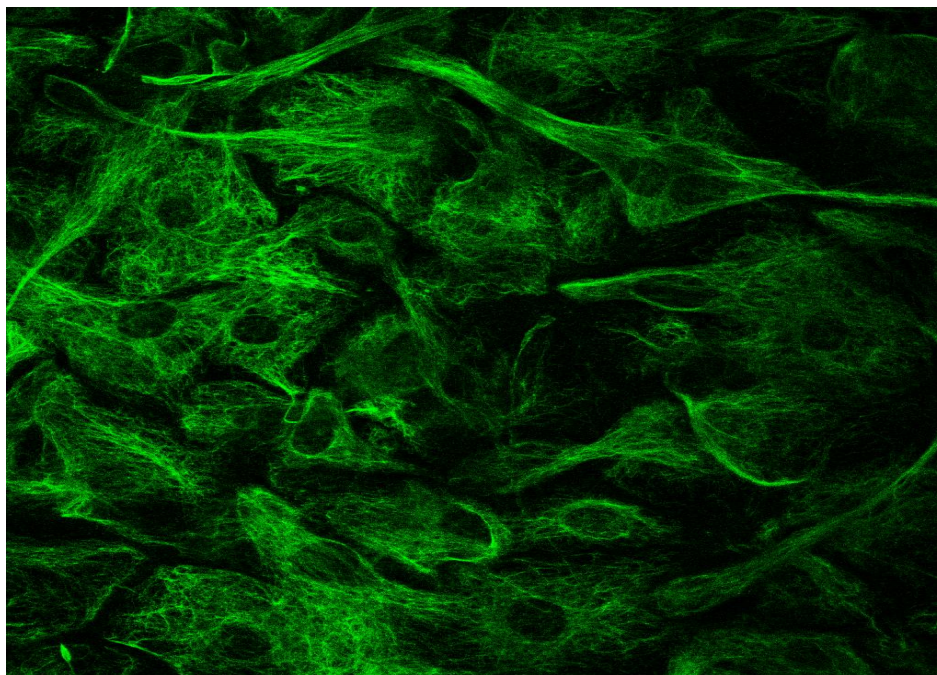


ANEXO 10



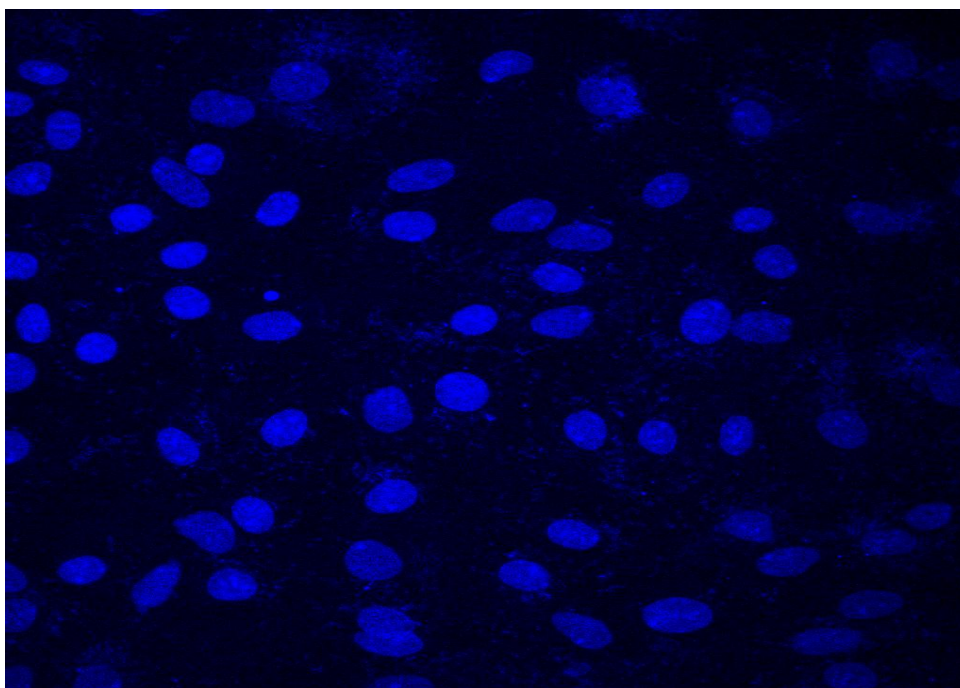
ANEXO 11

VIMENTINA



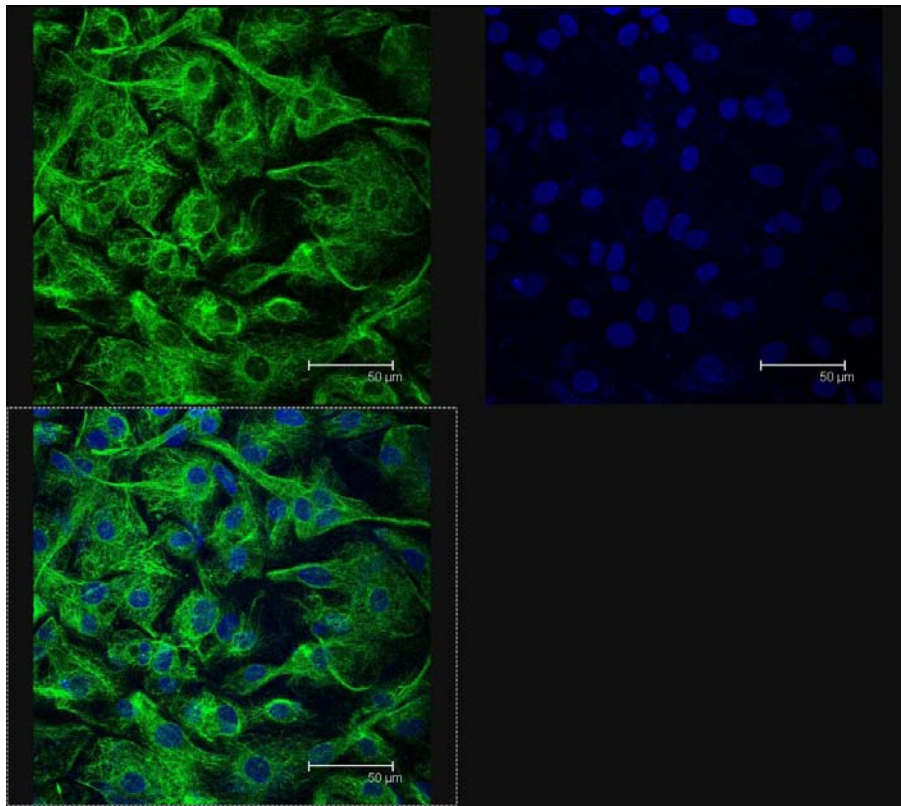
ANEXO 12

NÚCLEOS



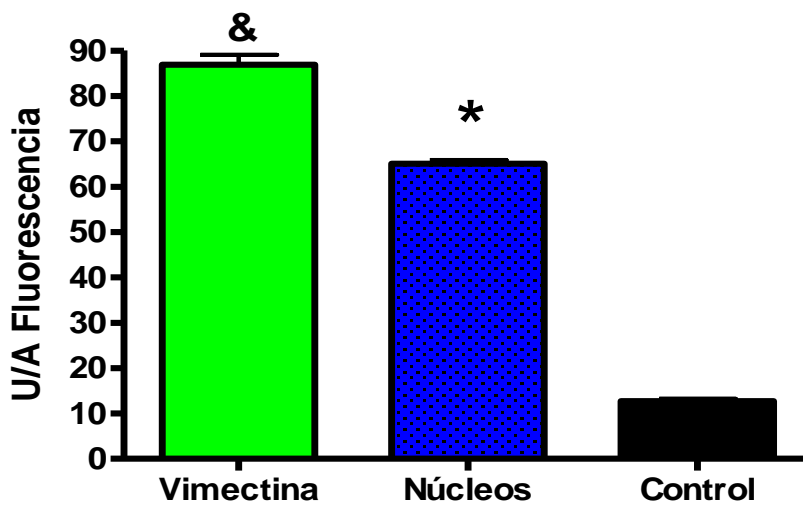
ANEXO 13

VIMENTINA Y NÚCLEOS



ANEXO 14

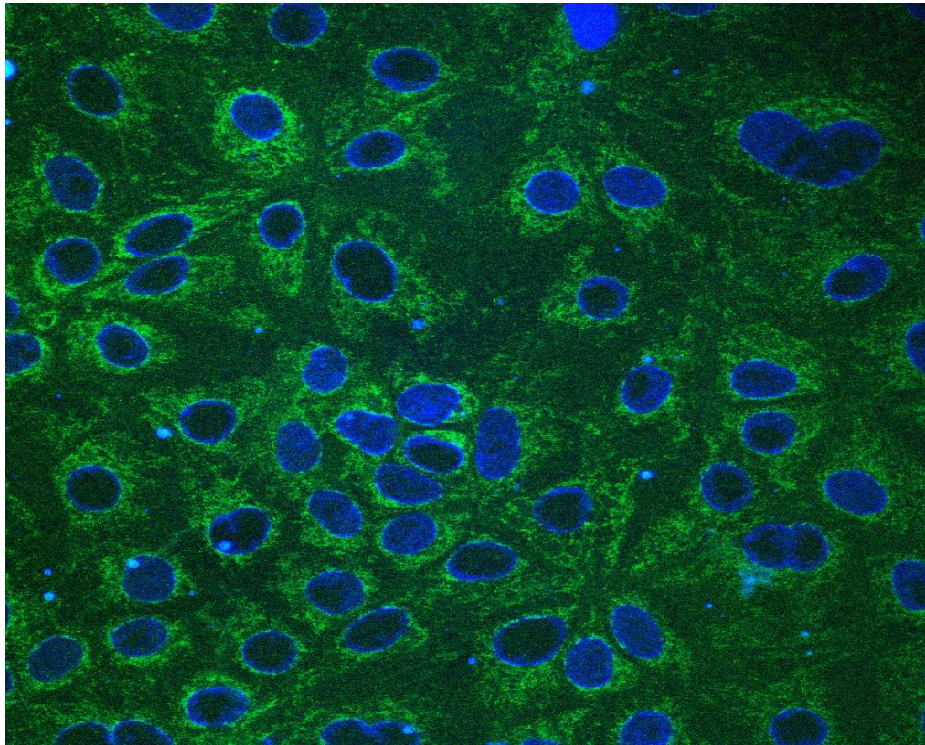
Vimentina



* $P < 0.0001$ vs control
& $P < 0.0001$ vs control

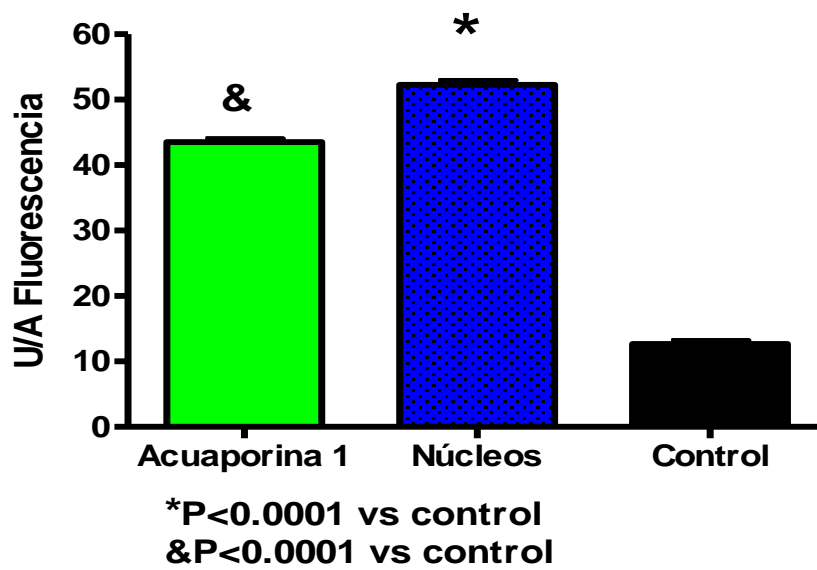
ANEXO 15

ACUAPORINA 1



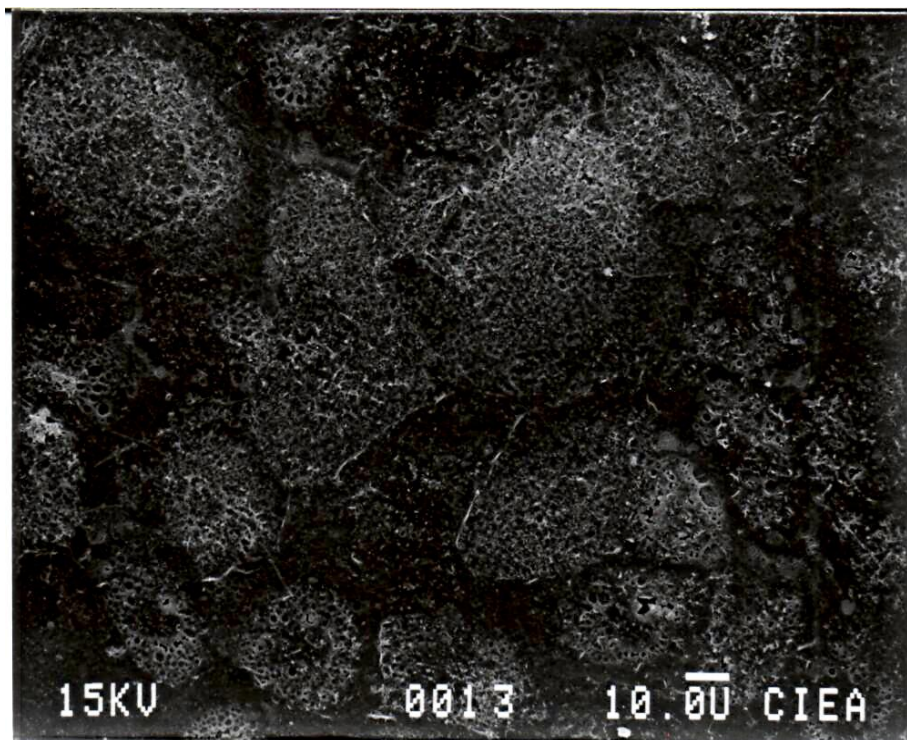
ANEXO 16

Acuaporina 1



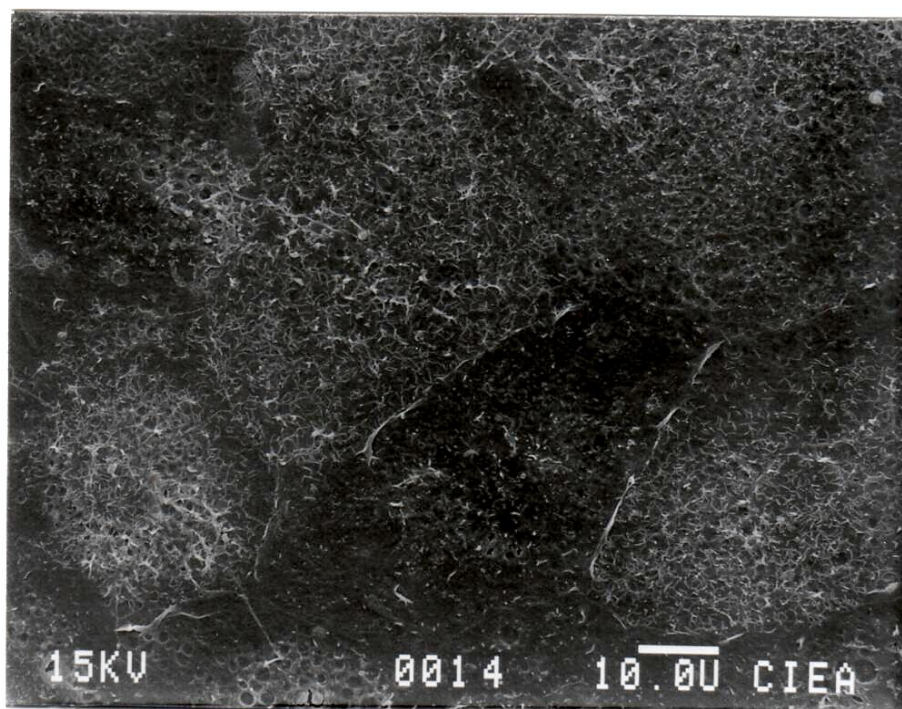
ANEXO 17

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA



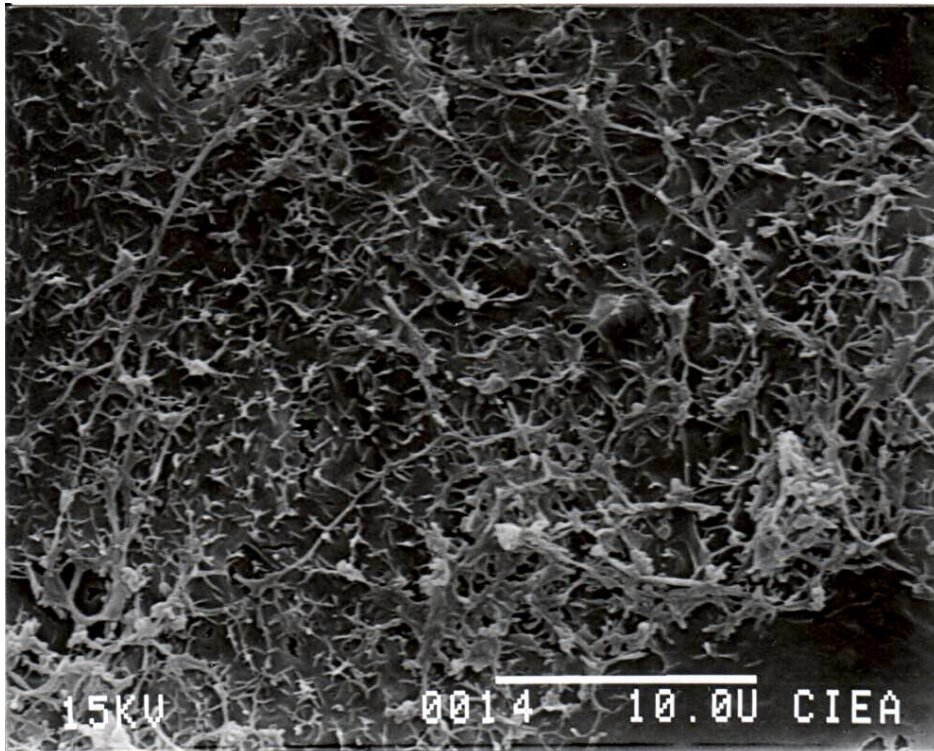
ANEXO 18

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA



ANEXO 19

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA



ANEXO 20

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

