



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Implicación del desequilibrio redox en los cambios estructurales de la membrana peritoneal durante la diálisis peritoneal

Implicación do desequilibrio redox nos cambios estruturais da membrana peritoneal durante a diálise peritoneal

Implication of redox imbalance in structural changes of the peritoneal membrane during peritoneal dialysis

Alumno: Patricia Mondelo Macía

Directora: María José López Armada

Fecha de presentación: Septiembre 2017

HOJA DE AUTORIZACIÓN

Trabajo de Fin de Máster presentado en la Facultad de Biología de la Universidad de A Coruña por Dña Patricia Mondelo Macía, como requisito para obtener el título de Máster Oficial Universitario en Biología Celular, Molecular y Genética, y que cuenta con la autorización y dirección de la Dra. María José López Armada para su presentación y defensa.

Fdo.:

M^a José López Armada

**MONDELO
MACIA,
PATRICIA
(FIRMA)**

Firmado digitalmente por
MONDELO MACIA, PATRICIA
(FIRMA)
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, serialNumber=342733965,
sn=MONDELO,
givenName=PATRICIA,
cn=MONDELO MACIA, PATRICIA
(FIRMA)
Fecha: 2017.08.31 22:24:34
+02'00'

Patricia Mondelo Macía

ÍNDICE

Resumen	3
Abreviaturas	4
Introducción	5
1. Enfermedad renal	5
1.1 Repercusión socioeconómica	6
2. Diálisis peritoneal	7
2.1 Características de la membrana peritoneal.....	8
2.2 Deterioro de la membrana peritoneal	8
3. Mitocondria, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial	10
3.1 La mitocondria	10
3.2 El estrés oxidativo celular y la disfunción mitocondrial	11
4. Antecedentes	13
Objetivo	15
Material y métodos	16
1. Cultivos celulares.....	16
2. Estudios de expresión de ARN	18
2.1 Extracción de ARNm y cuantificación	18
2.2 Tratamiento con ADNasa y retrotranscripción de ARN a ADNc.....	19
2.3 PCR cuantitativa en tiempo real con SYBER GREEN.....	20
2.4 PCR cuantitativa en tiempo real con SONDAS UPL	22
3. Análisis y representación de los datos	23
Resultados	24
1. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria en células mesoteliales en cultivo	24
1.1 Expresión de IL-8	25
1.2 Expresión de COX-2.....	27
2. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria inducida por Interleuquina-1 β (IL-1 β) en células mesoteliales en cultivo	28
1.1 Expresión de IL-8	29
1.2 Expresión de COX-2.....	32
Discusión	34
1. Importancia mediadores inflamatorios	34
2. Consideraciones metodológicas	34
3. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria en células mesoteliales en cultivo	35
4. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria inducida por Interleuquina-1 β (IL-1 β) en células mesoteliales en cultivo	36
Conclusión	37
Bibliografía	38

Resumen

La diálisis peritoneal es una de las terapias utilizadas como tratamiento contra la enfermedad renal crónica (ERC). Esta técnica se caracteriza por utilizar el propio peritoneo de los pacientes como una membrana semipermeable que realiza la función de filtrado que los riñones no pueden realizar. Cuenta con numerosas ventajas frente a la hemodiálisis pero, el fallo de membrana peritoneal de los pacientes tratados con ella es uno de sus grandes problemas de hoy en día. Se cree que este fallo se debe a una disfunción mitocondrial y desequilibrio redox, que deriva en un proceso inflamatorio y progresivamente en un cambio en el fenotipo de las células de la membrana. En el presente trabajo se ha querido profundizar en el estudio de este proceso, estudiando los mediadores inflamatorios COX-2 e IL-8 tras provocar una disfunción mitocondrial. Finalmente hemos concluido, que el fallo de membrana podría ser consecuencia de la disfunción mitocondrial junto con un estado inflamatorio inicial.

Palabras clave: Diálisis peritoneal, desequilibrio redox, mitocondria, respuesta inflamatoria.

Resumo

A diálise peritoneal é unha das terapias empregadas como tratamento contra a enfermidade renal crónica (ERC). Esta técnica caracterízase por empregar o propio peritoneo do paciente coma unha membrana semipermeable que realiza a función de filtrado que os riles non poden realizar. Conta con numerosas vantaxes fronte a hemodiálise pero, o fallo da membrana peritoneal é un dos seus grandes problemas a día de hoxe. Crese que dito fallo de membrana débese a unha disfunción mitocondrial debido a un desequilibrio redox, o cal deriva nun proceso inflamatorio e progresivamente nun cambio no fenotipo das células da membrana. No presente traballo, quíxose profundizar no estudo deste proceso, estudando os mediadores inflamatorios COX-2 e IL-8 tras provocar unha disfunción mitocondrial. Finalmente, se concluíu que o fallo de membrana peritoneal podería ser consecuencia dunha disfunción mitocondrial xunto cun estado inflamatorio inicial.

Palabras clave: Diálise peritoneal, desequilibrio redox, mitocondria, resposta inflamatoria.

Abstract

Peritoneal dialysis is one of the therapies used as a treatment for chronic kidney disease (CKD). This technique is based on the use of the peritoneum as a semipermeable membrane that performs the filtration function that the kidneys can not do. It has many advantages compared to hemodialysis, but the peritoneal membrane failure of the patients treated with it is one of its great problems today. It is believed that this failure is due to a mitochondrial dysfunction and redox imbalance, which results in an inflammatory process and progressively a change in the phenotype of peritoneum cells. In the present work we have tried to deepen the study of this process by studying the inflammatory mediators COX-2 and IL-8 after induce mitochondrial dysfunction. Finally, we concluded that membrane failure would be a consequence of mitochondrial dysfunction together with an initial inflammatory state.

Key words: Peritoneal dialysis, redox imbalance, mitochondria, inflammatory response.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

ADNmt: ADN mitocondrial

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATP: Adenosín trifosfato

COX-2: Ciclooxygenasa 2

CRM: Cadena respiratoria mitocondrial

DAMPS: *Damage-associated molecular pattern*

DMEN: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

DP: Diálisis peritoneal

EMT: Transición epitelio mesenquimal

EPIRCE: Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica en España.

ERC: Enfermedad Renal Crónica

GADPH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-8: Interleuquina 8

NF- κ B: Factor nuclear κ B

OLI: Oligomicina

PBGD: Porphobilinogen deaminase

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PQ: Paraquat

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o a tiempo real

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPL13A: Ribosomal Protein L13A

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa

SBF: Suero bovino fetal

SEN: Sociedad Española de Nefrología

SEM: Error estándar

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

TLRs: *Toll-like receptors*

T_m: Temperatura de *melting*

UPL: *Universal ProbeLibrary*

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad renal

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud pública importante que afecta a toda la población mundial. Su prevalencia está en aumento y tanto la edad como la hipertensión, la obesidad o la arterosclerosis se asocian con este incremento (Otero *et al.*, 2010).

En los últimos años, numerosos estudios epidemiológicos (Hallan *et al.*, 2006; Zhang y Rothenbacher, 2008) permiten conocer la prevalencia mundial de esta enfermedad, siendo esta de un 7,2% en personas de 30 años o más o de 15-25% en población mayor de 64 años. Recientemente, se ha llevado a cabo un estudio diseñado para conocer la prevalencia de la ERC en España promovido por la Sociedad Española de Nefrología (SEN) junto con el apoyo del Ministerio de Sanidad y Consumo. Este estudio, denominado EPIRCE (Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica en España), concluyó que el 9,16% de la población española mayor de 20 años presenta algún grado de enfermedad renal crónica (Otero *et al.*, 2010; Gayoso *et al.*, 2013), siendo estos datos similares a los europeos (Hallan *et al.*, 2006). Además, si solo tenemos en cuenta la población de más de 64 años, la prevalencia es mucho mayor (21,4%), siendo la edad un claro factor de riesgo de ERC.

En los estadios más avanzados de esta enfermedad, es necesario que se reemplace de alguna forma la función que realizan los riñones. La mejor opción para ello es la realización de un trasplante renal sin embargo, a pesar de que siguen aumentando los números de donantes de órganos, el trasplante renal solo se aplica a un 20% de los pacientes (Arrieta *et al.*, 2011), ya que no es una terapia viable para todos los pacientes y aún siendo viable, los tiempos de espera son muy prolongados. Como alternativa encontramos la diálisis, cuyo papel es la sustitución de la funcionalidad de los riñones sin necesitar un nuevo órgano.

Para el reemplazo de la función renal en la ERC existen dos métodos de diálisis: Hemodiálisis o diálisis peritoneal (DP).

La hemodiálisis consiste en el filtrado total de la sangre del paciente mediante una máquina externa al cuerpo, la cual realiza la función de los riñones y elimina las toxinas de la sangre. La diálisis peritoneal emplea el propio peritoneo del paciente para que actúe como membrana semipermeable y realice la función original de los riñones. Para ello se hace pasar

una solución no fisiológica por el peritoneo del paciente mediante un catéter colocado de forma permanente (Busnadiago *et al.*, 2015).

Comparando ambas técnicas, podemos destacar que la diálisis peritoneal presenta numerosas ventajas siendo más simple, permitiendo una mayor calidad de vida, menores costes y más independencia del paciente (López-Cabrera, 2014; Ponce *et al.*, 2017). Este tipo de diálisis permite que el tratamiento sea suministrado en la propia casa del paciente, un par de veces al día, acudiendo al médico sólo en revisiones periódicas. Otra de las ventajas destacables es que este tipo de diálisis se puede administrar tanto a niños, como a pacientes con fallos cardíacos o cirrosis (Ponce *et al.*, 2017), siendo esto inviable mediante hemodiálisis.

En términos de eficacia dialítica, ambas son equiparables (Arrieta *et al.*, 2011) pero estudios recientes, indican que puede existir un menor riesgo de muerte en pacientes tratados con diálisis peritoneal, que en los pacientes tratados con hemodiálisis, al menos en los primeros 4 o 5 años de tratamiento (Genovesi *et al.*, 2017). Además, la diálisis peritoneal produce un menor grado de inflamación en el paciente (Ponce *et al.*, 2017).

1.1 Repercusión socioeconómica

La sostenibilidad económica del sistema sanitario actual es un tema importante, teniendo siempre como objetivo final poder atender al mayor número de pacientes posibles. Los tratamientos para la ERC es uno de los más caros respecto a otras terapias, siendo el coste anual por paciente sometido a diálisis crónica seis o siete veces superior al tratamiento de un paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Se estima que en España el coste anual asociado al tratamiento de las fases más avanzadas de ERC es de más de 800 millones de euros (Arroyo *et al.*, 2008).

Concretamente, el tratamiento para la insuficiencia renal mediante diálisis supone que solo un 0,1% de la población consume el 2,5% del presupuesto total sanitario en España (Arrieta *et al.*, 2011).

Respecto a las dos modalidades de diálisis, se calcula que en España la hemodiálisis es un 47% más costosa que la diálisis peritoneal, con unos 12.000 euros de diferencia por paciente y año como mínimo entre ambas terapias. (Arrieta *et al.*, 2011).

Por todo ello, la utilización de la diálisis peritoneal supondría numerosos beneficios para el paciente y a su vez, un ahorro en el sistema sanitario, y por lo tanto la posibilidad de tratar a un mayor número de pacientes.

2. Diálisis peritoneal

Como ya se ha mencionado, la DP es una terapia en la cual el peritoneo del propio paciente actúa como barrera semipermeable para la ultrafiltración y el intercambio de solutos tóxicos y agua, con el fin de reemplazar la función de los riñones. A pesar de las numerosas ventajas que presenta (mayor movilidad y autonomía para el paciente, menores costes, etc.), a su vez presenta complicaciones que pueden llegar a impedir un correcto funcionamiento de la terapia y la imposibilidad de continuar con ella (Busnadiago *et al.*, 2015).

La exposición periódica a las soluciones de diálisis, que presentan un alto contenido en glucosa y pH ácidos (Busnadiago *et al.*, 2015), junto con posibles infecciones o sangrados locales que están relacionados con dicho tratamiento, pueden llegar a dañar las células del peritoneo provocando un fallo de la membrana peritoneal e impidiendo la continuación del tratamiento (Loureiro *et al.*, 2011; Busnadiago *et al.*, 2015). Se estima que este fallo de la membrana peritoneal afecta al 20% de los pacientes con diálisis peritoneal continua (Yañez-Mó *et al.*, 2003; Busnadiago *et al.*, 2015).

Se cree que numerosos factores como el alto contenido en glucosa del líquido de diálisis, la presencia de productos de degradación de glucosa y el bajo pH, pueden inducir a este fallo de la membrana debido a la producción de mediadores inflamatorios (Busnadiago *et al.*, 2015). La utilización de los líquidos de diálisis se relacionan además con efectos metabólicos como la hiperglucemia entre otros (Nataatmadja *et al.*, 2017).

En las últimas dos décadas se han realizados avances en la técnica, como la utilización de soluciones fisiológicas biocompatibles, con el fin de evitar los numerosos problemas que conlleva dicha terapia. Sin embargo, aunque estos avances reducen la incidencia de peritonitis, el fallo de membrana sigue siendo un problema (Devuyst *et al.*, 2010; Nataatmadja *et al.*, 2017).

Para permitir la continuidad de la diálisis peritoneal es crucial que la membrana peritoneal de los pacientes se encuentre en óptimas condiciones. Por ello, entender las bases

moleculares y los mecanismos que llevan a la degeneración de la membrana y la búsqueda de tratamientos y fármacos que mejoren su integridad es esencial para poder incrementar así el tiempo que los pacientes pueden ser sometidos a diálisis peritoneal y proporcionar acceso a dicha terapia a un mayor número de pacientes (Loureiro *et al.*, 2011; Pletinck *et al.*, 2012).

2.1 Características de la membrana peritoneal

La membrana del peritoneo está recubierta por una monocapa de células mesoteliales. Estas células presentan algunas de las características típicas de las células epiteliales ya que por un lado, actúan como una barrera permeable y por otro, secretan varias sustancias relacionadas con la regulación del peritoneo y la defensa local del tejido. Estas células mesoteliales son las células que entran en contacto con el líquido de diálisis (Yañez-Mó *et al.*, 2003; Busnadiego *et al.*, 2015).

Una continua exposición a las soluciones no fisiológicas causan inflamación en el peritoneo, la cual desemboca en fibrosis, angiogénesis y vasculopatía hialinizante. Estas alteraciones morfológicas parecen estar asociadas a un incremento de transporte de pequeños solutos, así como con el fallo de la membrana peritoneal (Aroeira *et al.*, 2009).

El fallo de membrana por lo tanto, se cree que se debe en un primer momento a un proceso inflamatorio crónico, que progresivamente deriva en un cambio estructural de las células mesoteliales hacia células fibrosas, denominado transición epitelio mesenquimal (EMT) (Loureiro *et al.*, 2011; Yañez-Mó, *et al.*, 2003).

2.2 Deterioro de la membrana peritoneal

Las células mesoteliales, tipo celular de carácter epitelial que recubre la cavidad peritoneal y los órganos que se alojan en ella, son las que se consideran que sufren los cambios anteriormente nombrados (Aroeira *et al.*, 2009). Así, se ha demostrado que en respuesta a la DP, la célula mesotelial peritoneal responde perdiendo su fenotipo epitelial y adquiere características miofibroblásticas mediante el ya mencionado proceso de EMT (Devuyst *et al.*, 2010; Aroeira *et al.*, 2009; Yañez-Mó *et al.*, 2003). Además, este proceso se ve agravado cuando existen episodios de peritonitis.

Concretamente, diversos estudios demuestran que la exposición a la solución de DP induce una pérdida de la línea de células mesoteliales, un incremento en el espesor de la membrana peritoneal, aumento en la presencia de fibroblastos y una disminución de la

capacidad de ultrafiltración (Busnadiago *et al.*, 2015; López-Cabrera, 2014; Loureiro *et al.*, 2011).

En la figura 1 se pueden observar esquemáticamente los cambios que sufre la membrana del peritoneo.

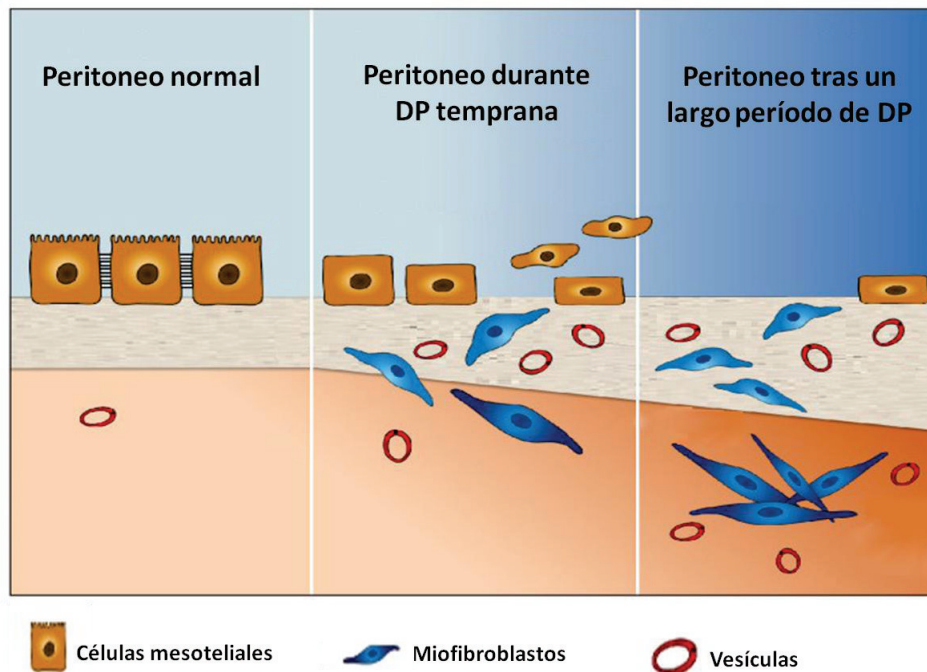


Figura 1. Representación esquemática de las alteraciones progresivas que sufre la membrana peritoneal durante la DP. (Modificado de López-Cabrera, 2014).

Además, con este cambio de fenotipo, las células adquieren capacidades invasivas y alcanzan el estroma submesotelial, donde producen gran cantidad de matriz extracelular y factores inflamatorios y angiogénicos. Ello amplifica la comunicación con las células vecinas y promueve la inflamación y la fibrosis peritoneal lo que a su vez, desemboca en un deterioro de la capacidad de filtración del peritoneo. Esta es considerada la principal causa del fallo de la membrana, el cual impide la continuación del tratamiento (Aroeira *et al.*, 2009; Loureiro, *et al.*, 2011; Kawka, *et al.*, 2014; Busnadiago, *et al.*, 2015).

Debido a que la presencia de las células mesoteliales con este aspecto *in vitro* se correlaciona con el fallo de la membrana, prevenir la EMT permitiría mejorar la fibrosis peritoneal y preservar la membrana durante la DP (Loureiro, *et al.*, 2013).

Por otro lado, es bien conocido que la fibrosis es la consecuencia final de una reacción crónica inflamatoria y que el incremento crónico de mediadores proinflamatorios como IL-1 β (Interleuquina 1 β), se debe a un desequilibrio del estado *redox* celular, que activa numerosas

vías de señalización proinflamatorias no solo en el caso de la DP sino también en fallos cardíacos crónicos, pancreatitis y cáncer (López-Armada *et al.*, 2013).

3. Mitocondria, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

3.1 La mitocondria

La mitocondria es un orgánulo celular citoplasmático presente en casi todas las células eucariotas cuya función por excelencia es ser la principal fuente de energía de la célula, produciendo adenosín trifosfato (ATP). Se caracteriza por poseer dos membranas:

- Una membrana externa: Permeable a pequeñas moléculas e iones que se mueven libremente a través de canales transmembrana.
- Una membrana interna: Impermeable a la mayoría de las moléculas pequeñas e iones, por lo que presenta transportadores específicos para las moléculas o iones que deben cruzarla. La membrana interna forma numerosas crestas que aumentan la superficie de esta.

Delimitada por la membrana interna se encuentra la matriz mitocondrial, en donde se encuentra embebido el ADN mitocondrial (ADNmt) y dónde se realizan reacciones metabólicas tan importantes como la oxidación de aminoácidos, la β -oxidación de ácidos grasos o el ciclo de Krebs.

En la membrana interna se encuentra la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), un conjunto de 4 complejos multiproteicos, en los que se realiza el proceso de transporte electrónico, y la ATP sintasa. Dicha cadena actúa de forma que, mediante el paso de iones a través de los diversos complejos, finalmente se reduce O_2 para formar H_2O y permite la síntesis de ATP, y por lo tanto, la obtención de energía para la célula. Este proceso se denomina fosforilación oxidativa (Nelson *et al.*, 2008).

La mitocondria juega un papel central en la síntesis del ATP y además representa la fuente más importante en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son moléculas derivadas del oxígeno las cuales son altamente reactivas pudiendo provocar daños por oxidación en la célula cuando son producidas en exceso.

Bajo condiciones fisiológicas, un 1-3% de moléculas de oxígeno no es completamente reducido durante las reacciones de la CRM y pasan a formar el anión superóxido (O_2^-). Bajo condiciones patológicas, un exceso de este O_2^- es producido, lo que causa la activación de factores de transcripción redox-sensibles, como el regulador clave para la inflamación, el factor nuclear κB (NF- κB). NF- κB incrementa así la expresión de citoquinas entre otros (López-Armada *et al.*, 2013).

El daño oxidativo producido por ROS, puede conducir a una disfunción celular e incluso llevar a la muerte celular, lo cual a su vez puede derivar en una aceleración del envejecimiento o de enfermedades asociadas al envejecimiento.

3.2 El estrés oxidativo celular y la disfunción mitocondrial

El estrés oxidativo está estrechamente relacionado con la inflamación, un proceso que constituye una respuesta adaptativa a cualquier condición percibida como potencialmente peligrosa y que pretende eliminar el peligro, reparar el tejido y restaurar el estado de homeostasis celular.

Dicho estrés produce un desequilibrio redox celular, el cual surge como el efecto neto de un incremento en la producción de especies reactivas, como el ión superóxido, el radical hidroxilo, el peróxido de hidrógeno, el óxido nítrico y lípidos reactivos; y no menos importante, una debilidad de los sistemas de defensa, como las clásicas enzimas antioxidantes superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, así como otros secuestradores de especies reactivas, como la vitamina E o el caroteno (López-Armada, *et al.*, 2013).

Por otro lado, la presencia de alteraciones en la mitocondria está altamente relacionada con diversas enfermedades inflamatorias agudas y crónicas como por ejemplo, la DP (López-Armada *et al.*, 2013). Esto ocurre ya que una alteración de este orgánulo produce un aumento de ROS, el cual conduce a ese estado de estrés oxidativo que produce la oxidación de los lípidos de membrana, proteínas y ADNmt. Este daño oxidativo en el ADNmt podría ser la fuente principal de la inestabilidad genómica mitocondrial que conduce a la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial. A su vez, esta disfunción aumentaría ROS, estableciéndose un círculo vicioso de estrés oxidativo, capaz de perpetuar y propagar la respuesta inflamatoria (López-Armada *et al.*, 2013). Por ello, la importancia clínica de la disfunción mitocondrial en una amplia gama de enfermedades como las patologías inflamatoria y en este caso, la ERC, es evidente (Disatnik *et al.*, 2015; Maneiro *et al.*, 2003).

En la figura 2 podemos ver un esquema representativo de las relaciones que existen entre la disfunción mitocondrial y la inflamación.

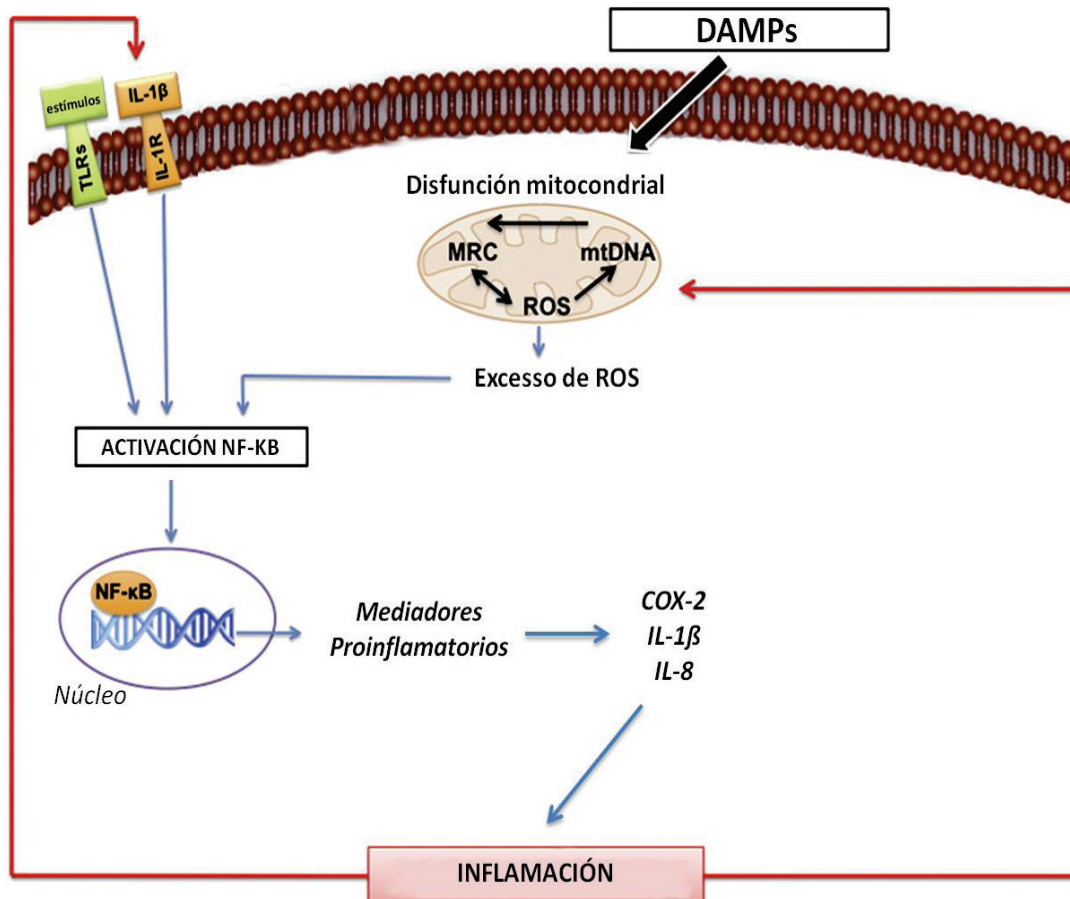


Figura 2. Representación esquemática de la relación entre la disfunción mitocondrial y la respuesta inflamatoria. La disfunción mitocondrial creada por la presencia de moléculas endógenas provoca un desequilibrio *redox* debido al exceso de ROS. Este exceso de ROS junto con la activación de receptores de membrana que activan la ruta de NF-κB, finalmente provoca la producción de mediadores inflamatorios como IL-8 o COX-2 entre otros, los que llevan a la célula a un estado inflamatorio. Este estado inflamatorio aumenta la disfunción mitocondrial y hace más sensibles a ciertos receptores de membrana, creándose una amplificación de la inflamación. (Modificado de López-Armada, *et al.*, 2013).

Son muchas las moléculas endógenas que pueden activar una respuesta inflamatoria, llamadas DAMPs (*damage-associated molecular pattern*). Estas moléculas crean un desequilibrio *redox* y activan rutas de señalización intracelular principalmente a través de los receptores de membrana *Toll-like receptors* (TLRs), que activan factores de transcripción proinflamatorios como el ya nombrado factor nuclear κB (NF-κB). Estos factores activan la transcripción génica de multitud de mediadores inflamatorios como la interleuquina 8 (IL-8) o

IL-1 β . Esto junto con la disfunción mitocondrial, crea un ciclo de amplificación progresiva de la respuesta inflamatoria inicial que puede constituir un importante mecanismo en el mantenimiento de la inflamación crónica en muchas enfermedades humanas.

El estrés oxidativo y la inflamación constituyen por lo tanto, dos procesos que se retroalimentan entre ellos, estableciéndose un ciclo vicioso capaz de perpetuar y propagar la respuesta inflamatoria. De hecho, la mayoría de las enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo tienen en común que presentan un componente inflamatorio. Existe una larga lista de enfermedades que han sido relacionadas con el estrés oxidativo, como son diversas enfermedades cardiovasculares o neurodegenerativas, el cáncer, la artritis o incluso el propio proceso de envejecimiento (Dhalla *et al.*, 2000; Klaunig *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2006).

Por otro lado, es importante señalar que las soluciones de diálisis tienen componentes capaces de estimular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como son la glucosa y sus productos de degradación (Chaudhary y Khanna, 2010). Todo ello sugiere que el proceso de oxidación puede representar una vía patogénica crucial en la EMT que finalmente conduce al daño peritoneal, con un gran potencial clínico.

Debido a esto, la lista de fármacos y moléculas para regular la función mitocondrial es cada vez mayor, permitiendo nuevas vías de tratamiento para enfermedades que no lo tienen en la actualidad (Andreux *et al.*, 2013).

4. Antecedentes

El papel que ejerce la disfunción mitocondrial sobre el daño peritoneal todavía no es bien conocido y existen muy pocos datos sobre este proceso.

A pesar de ello, si es bien conocido que el líquido de diálisis basado en glucosa es capaz de inducir ROS mitocondriales, además de causar daño en el ADNmt de células mesoteliales humanas *in vitro* (Hung *et al.*, 2014). Otros estudios han demostrado un incremento de los marcadores de estrés oxidativo en el suero y el efluente peritoneal de los pacientes sometidos a diálisis peritoneal, en correlación con la función peritoneal (Morinaga *et al.*, 2012; Xu, *et al.*, 2014).

Sin embargo, sobre la relación entre la disfunción mitocondrial y la EMT existen pocos estudios y ninguno de ellos se ha llevado a cabo en el contexto de la diálisis peritoneal

(Kinugasa *et al.*, 2015, Yuan *et al.*, 2012). No se conoce la manera en la que ambos procesos se relacionan, si presentan un efecto sinérgico o si son independientes. Todo parece indicar que la disfunción mitocondrial puede desempeñar un papel determinante en la patología del fallo de la membrana peritoneal al participar en la EMT, por medio de un incremento en el nivel de estrés oxidativo y mediadores inflamatorios sin embargo, hasta el momento son muy escasos los estudios publicados que señalen cual es su papel.

En relación con otras enfermedades, numerosos estudios en la última década han revelado que una disfunción mitocondrial continua puede conducir a un estado inflamatorio crónico, como en el caso de la artritis, enfermedades cardiovasculares o neurológicas (López-Armada, *et al.*, 2013). .

Estudios en otras células humanas, como los sinoviocitos y los condrocitos, han demostrado que la disfunción mitocondrial participa en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Esto se produce ya que la disfunción mitocondrial en estas células induce la producción de mediadores inflamatorios y amplifica el efecto de citoquinas (Vaamonde-García *et al.*, 2012, Valcárcel-Ares *et al.*, 2014). Se cree que este mismo mecanismo también puede estar presente en las células del mesotelio.

OBJETIVO

El objetivo final del presente trabajo consiste en analizar si la disfunción mitocondrial, en las células mesoteliales que se encuentran en la membrana peritoneal, participan en la transición epitelio-mesenquimal (EMT) que pueden sufrir estas células en pacientes tratados con diálisis peritoneal, a través de un incremento en el nivel de mediadores inflamatorios .

Este análisis podría ayudar a encontrar nuevas dianas terapéuticas y búsqueda de biomarcadores que puedan servir como tratamiento para patologías humanas relacionadas con el estrés oxidativo y la inflamación consecuencia de la disfunción mitocondrial y la EMT.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

El presente trabajo fue realizado mediante cultivos celulares, utilizando la línea celular MeT-5A (ATCC[®] CRL-9444[™]). Se trata de células mesoteliales pleurales humanas suministradas por la empresa *American Type Culture Collection* (ATCC).

El mantenimiento de la línea celular Met5a se realizó en placas petri de 8.8 cm² (NUNC[™], ThermoFisher Scientific) con Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEN) (Lonza, Basel, Suiza) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF), 100 U/ml de penicilina (Gibco, ThermoFisher Scientific) y 100 µg/ml de estreptomycin (Gibco, ThermoFisher Scientific). Cuando estas alcanzaban una confluencia alrededor del 80%, las células mesoteliales eran levantadas mediante 0,05% Trypsin-EDTA (Gibco). Tras realizar un conteo, estas se pasaron a placas de cultivo de 12 pocillos (NUNC[™], ThermoFisher Scientific) con medio de cultivo DMEN al 10% para la realización de los experimentos. La cantidad de células sembradas fue de 70.000 células por pocillo. Tras el paso de 72 horas aproximadamente, las células ya presentaban la suficiente confluencia para poder continuar con el experimento. En la imagen 1 se pueden observar las células MeT-5A en diferentes estadios de crecimiento. La imagen de la izquierda muestra una confluencia del 80%.

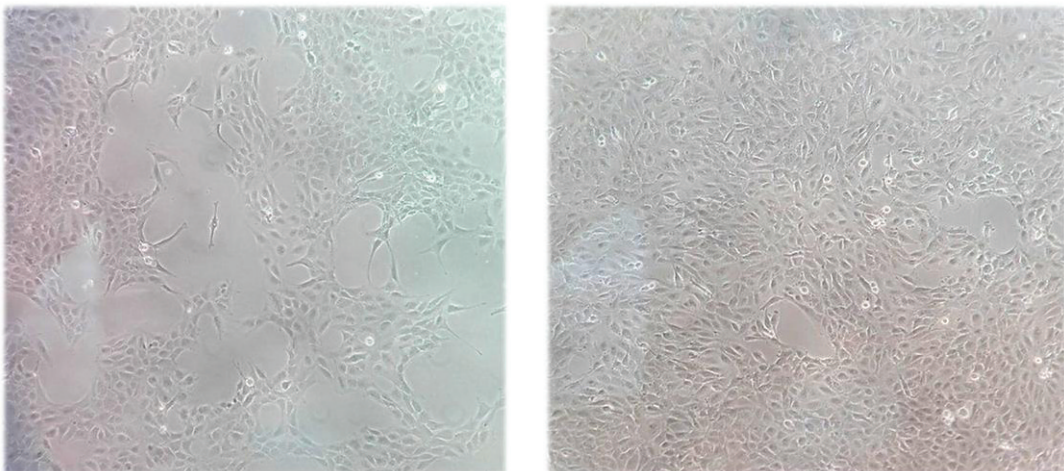


Imagen 1. Células de la línea Met5A con diferente grado de confluencia. Microscopio óptico invertido 200X. Cámara *smartphone* Huawei Lite.

Llegadas a este punto, se depleccionaron con medio DMEN al 0,5% SBF con el fin de conseguir una respuesta más intensa al añadir el estímulo, ya que se mantienen en estado quiescente debido a una menor cantidad de suero bovino fetal. La deplección de las células

tuvo una duración de 48 horas y durante ésta, las células siguen creciendo aunque en menor medida. Tras las 48 horas de deplección, las células fueron estimuladas con las sustancias objeto de estudio para poder evaluar el efecto modulador que estas presentan.

Uno de los estímulos fue la oligomicina (OLI; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), la cual se empleó como inhibidor de la ATP sintasa mitocondria o complejo V de la cadena respiratoria mitocondrial. El uso de OLI para inducir disfunción mitocondrial en distintos tipos celulares es comúnmente descrito en la literatura científica. Además, también se utilizó paraquat (PQ), un prooxidante mitocondrial comúnmente usado para inducir disfunción mitocondrial (Sigma-Aldrich). IL-1 β (Sigma-Aldrich) se utilizó para inducir la respuesta inflamatoria funcionando como control positivo.

Se realizaron además experimentos con estímulos combinados, con preincubaciones de 30 minutos. En la imagen 2 se puede observar las placas de 24 pocillos en las que se realizaron los experimentos, y un ejemplo de uno de ellos.



Imagen 2. Placas utilizadas para los experimentos realizados. En la imagen se muestra un ejemplo de uno de ellos. Cámara smartphone Huawei Lite

La estimulación de las células se realizó en diferentes tiempos (6-8 horas o 48 horas) atendiendo a los diferentes estudios de expresión de ARN que fueron realizados.

2. Estudios de expresión de ARN

A continuación se realizaron estudios de la expresión génica mediante la extracción de ARN, su posterior retrotranscripción a ADN complementario y finalmente una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). A continuación son explicados en detalle.

2.1 Extracción de ARNm y cuantificación

El ARN total se aisló a partir de las células de los pocillos estimulados. Para extraer el ARN celular, se empleó el reactivo Trizol (Ambion) siguiendo las indicaciones y el protocolo del fabricante. Este reactivo fue diseñado para aislar en gran cantidad el ARN celular de muestras celulares o tejidos de humanos, plantas, levaduras o bacterias en un corto período de tiempo (1 hora). Se trata de una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes, los cuales provocan la lisis celular mientras protege la integridad del ARN gracias a la inhibición efectiva de actividad ARNasa. Hay que tener en cuenta que el Trizol se trata de un reactivo tóxico, corrosivo e irritante por lo que su utilización se llevó a cabo en una campana de extracción de humos.

Tras la homogenización con Trizol y el lisado de las células, se añadió cloroformo. El cloroformo, tras una breve incubación (2-3 minutos) y una centrifugación durante 15 minutos a 12.000 rpm y 4°C, permite la separación de las muestras en una fase acuosa (en la que se encuentra el ARN), una interfase y en una fase orgánica de color rojizo (en la que se encuentra el ADN y las proteínas).

La fase acuosa se recuperó con cuidado a nuevos tubos, en donde se provoca la precipitación del ARN mediante una incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos con isopropanol y una centrifugación de 10 min a 4°C a 12.000 rpm. Tras este tratamiento con isopropanol se puede observar el ARN como un precipitado de color blanquecino en el fondo de los tubos. Seguidamente, se lavó el ARN con etanol 70% y otro lavado con etanol 100% y se dejó secar brevemente el precipitado hasta que no quedaran restos de etanol. Para finalizar, las muestras fueron disueltas en agua libre de ARNasas y se incubaron 10-15 minutos a 65 °C. Para que el vapor de agua producido precipitara se centrifugaron las muestras por última vez a 12.000 rpm 5 minutos.

El ARN obtenido de las muestras se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) a 260 nm. Para determinar la pureza del ARN se tuvo en cuenta el ratio entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm (A260/280). Este

ratio debe ser de aproximadamente 2. En el caso de obtener ratios menores, significaría una posible contaminación de nuestro ARN con proteínas, compuestos fenólicos u otros contaminantes que absorben a 280 nm. Un segundo indicador de la pureza del ARN lo constituye el ratio 260/230. Este segundo ratio debe ser ligeramente superior al anterior (entre 2.0 y 2.2). Un ratio por debajo de estos valores indica contaminación con compuestos que absorben a 230, típicamente fenol u otros compuestos provenientes del proceso de extracción.

Tras la cuantificación del ARN, fue necesario llevar a todas las muestras a una concentración similar mediante la adición de agua libre de ARNasas. Esto se realizó con el fin de posteriormente coger un volumen similar de todas las muestras para continuar con la PCR retrotranscriptasa (RT-PCR).

2.2 Tratamiento con ADNasa y retrotranscripción de ARN a ADNc

Con el fin de eliminar los posibles restos de ADN se trataron las muestras con Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (DNase I, Amp Grade; Invitrogen) siguiendo el protocolo y las indicaciones del fabricante. Este reactivo digiere el ADN de cadena simple o doble.

Para ello se añadió a 1 µg de ARN de cada muestra 1 µl de desoxirribonucleasa I 1U/µl (ADNasa I; Invitrogen). Se añadió también 1 µl de tampón de reacción 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl) y se completó hasta 10 µl con agua libre de ARNasas. Todo este procedimiento se realizó en frío con el fin de evitar la degradación del ARN.

La mezcla se incubó posteriormente durante 15 min a temperatura ambiente. Es importante no exceder este tiempo ni la temperatura ambiente debido a que altas temperatura o largos tiempos podrían permitir la hidrólisis dependiente de Mg⁺⁺ del ARN. La reacción se detuvo añadiendo 1 µl de EDTA 25 mM (pH 8.0) a cada muestra y finalmente todas las muestras fueron incubadas durante 10 min a 65 °C en un termociclador (Primus 96 Plus, MWG AG Biotech).

La síntesis y amplificación de ADNc a partir de las muestras de ARN tratada con ADNasa, se realizó usando Invitrogen SuperScript VILO MasterMix (Invitrogen, ThermoFisher) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este kit incluye:

- SuperScript III RT

- RNaseOUT inhibidor de ribonucleasas recombinantes
- Una proteína *helper*
- Cebadores
- MgCl₂
- Desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs)

Para que tuviera lugar la reacción, se añadió a cada muestra 2 µl de SuperScript VILO MasterMix, 3 µl de agua libre de ARNasas y 5 µl de muestra de ARN tratada con ADNasa (0,5 µg de ARN) y se mezcló muy bien.

Seguidamente se dejaron incubar las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente la mezcla (10 µl) se incubó a 42 °C durante 90 minutos, para permitir que tuviera lugar la reacción, seguida de otra breve incubación a 85 °C durante 5 minutos para inactivar la enzima. Ambas incubaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador (Primus 96 Plus, MWG AG Biotech) en el que se define previamente el programa a seguir.

Por último, a las muestras con ADNc se le añadieron 90 µl de agua libre de ADNasas y se guardaron a -20 °C hasta el momento de llevar a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

2.3 PCR cuantitativa en tiempo real con SYBER GREEN

Para continuar con los estudios de expresión de ARN, se realizó una qPCR en placas de PCR de 96 pocillos (LightCycler 4800, Roche Diagnostics). En estos pocillos se realizó la mezcla de 2 µl de ADNc con 5 µl de SYBR Green (LightCycler 4800 SYBR Green I Master kit, Roche Diagnostics), 0.25 µl de cada cebador 20 µM (sentido y antisentido) de interés y de referencia; y 2.5 µl de agua de PCR para completar hasta los 10 µl totales de cada pocillo. Con el fin de asegurar la fiabilidad de la PCR se realizaron 2 réplicas de cada muestra. Tras la carga de la placa, esta fue centrifugada durante 2 minutos a 2.000 rpm con el fin de mezclar bien los reactivos y las muestras de los pocillos cargados.

La PCR se llevó a cabo en el termociclador Real Time LightCycler (Roche Diagnostics) con las condiciones explicadas a continuación.

En primer lugar se realizó una primera etapa de incubación a 95 °C durante 10 min, la cual permite la activación de la *hot start* Taq ADN polimerasa.

Seguidamente tuvieron lugar de 45 a 55 ciclos de amplificación, con tres etapas cada uno. Una primera etapa de 10 segundos a 95 °C para la desnaturalización de las dobles cadenas de ADN. Una segunda etapa de 5 segundos en la que la temperatura disminuye hasta 60 °C para permitir el anillamiento de los cebadores con la secuencia diana del ADN de cadena única. Finalmente una etapa de extensión de 5 segundos a 72 °C, en la que la ADN polimerasa realiza la síntesis de la nueva hebra de ADN.

En el presente trabajo elegimos el SYBR Green como compuesto fluorescente ya que se intercala entre las bases de ADN de doble cadena. Este compuesto permite que a medida que aumenta el número de copias del producto de PCR, aumenta la fluorescencia emitida. Esta fluorescencia es cuantificada mediante el software LightCycler 48 y así se realizan comparaciones entre los grupos basales y tratados teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción y la normalización respecto al gen de referencia.

Los genes de expresión estudiados fueron COX-2 e IL-8 a tiempos cortos (6 horas), y fibronectina en tiempos largos (48 horas). Con el fin de comparar los resultados, se usó como referencia un gen constitutivo que se expresa sin modulación para normalizar la expresión de COX-2 e IL-8. Este gen de referencia fue elegido de entre una batería de genes candidatos por la similitud de sus niveles de expresión con los de los genes diana y por no verse modulados bajo ninguna de las condiciones estudiadas. El diseño de los cebadores utilizados para cada gen de interés y de referencia fue realizado directamente utilizando un software de Sigma. En la Tabla 1 se detallan las características de todos los cebadores utilizados.

Tabla 1. Características de los cebadores empleados en la PCR a tiempo real.

Gen	Cebador Sentido (5' → 3')	Cebador Antisentido (5' → 3')
COX-2	TGGGAAGCCTTCTCTAACCTC	TCAGGAAGCTGCTTTTTACCTT
IL-8	GAGCACTCCATAAGGCACAAA	ATGGTTCCTTCCGGTGGT
Fibronectina	CTGGCCGAAAATACATTGTAAA	CCACAGTCGGGTCAGGAG
GADPH	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC
PBGD	AGCTATGAAGGATGGGCAAC	TTGTATGCTATCTGAGCCGTCTA
RPL13A	CAAGCGGATGAACACCAAC	TGTGGGGCAGCATACTC

El SYBR Green es un fluoróforo inespecífico, el cual se une a cualquier molécula de ADN de doble cadena. Por ello, fue necesaria una tercera etapa de *melting* en la cual se obtienen las curvas de *melting* o fusión que son características del producto de la PCR, ya que dependen del tamaño y de la composición del amplicón. Dicha etapa se compone de otras tres, la cual comienza a 95 °C durante 5 segundos que separa todas las hebras. Seguidamente ocurre una bajada de temperatura a 70 °C durante 1 minuto la cual permite que todas las hebras hibriden de nuevo, alcanzando así el máximo de fluorescencia y formando los picos de las curvas de *melting*. Finalmente se elevó de nuevo la temperatura hasta 95 °C.

La temperatura a la que la mitad de las hebras de ADN se encuentran disociadas es la temperatura de *melting* o temperatura de fusión (T_m). Esta T_m debe ser la misma en cada gen analizado, por lo que este dato permite descartar aquellas muestras en donde se haya amplificado algo distinto a nuestro amplicón, ya que la T_m sería distinta debido a que se trata de uniones inespecíficas.

Como última etapa de la qPCR tiene lugar una etapa de enfriamiento de 20 segundos a 40 °C. Los resultados obtenidos de cada qPCR se expresaron como ratio de incremento respecto al basal, el cual es normalizado a 1 y corregidos por el gen de referencia utilizado.

2.4 PCR cuantitativa en tiempo real con SONDAS UPL

Con el fin de comprobar la veracidad de nuestros resultados, y concluir que la señal obtenida mediante el SYBER Green era señal específica y no *primers dimers*, se decidió realizar alguna qPCR de prueba mediante la utilización de sondas de *Universal ProbeLibrary* (UPL) de Roche. Las sondas UPL están diseñadas exclusivamente, a partir de los cebadores anteriormente utilizados, para marcar regiones específicas del gen de interés. En nuestro caso, solo realizamos qPCR con sondas para el gen de interés IL-8 y como gen de referencia usamos RPL13A.

Las sondas UPL son sondas fluorescentes de 8-9 nucleótidos de tipo *taqman*. Este tipo de sondas poseen en uno de sus extremos un fluoróforo y en el otro extremo un *quencher* que evita que el fluoróforo emita la señal. Cuando la sonda reconoce la secuencia del ADN específica del gen de interés, la actividad exonucleasa de la taq polimerasa elimina uno de los extremos, permitiendo que se separen el fluoróforo y el *quencher*, permitiendo la emisión de fluorescencia por parte de la sonda.

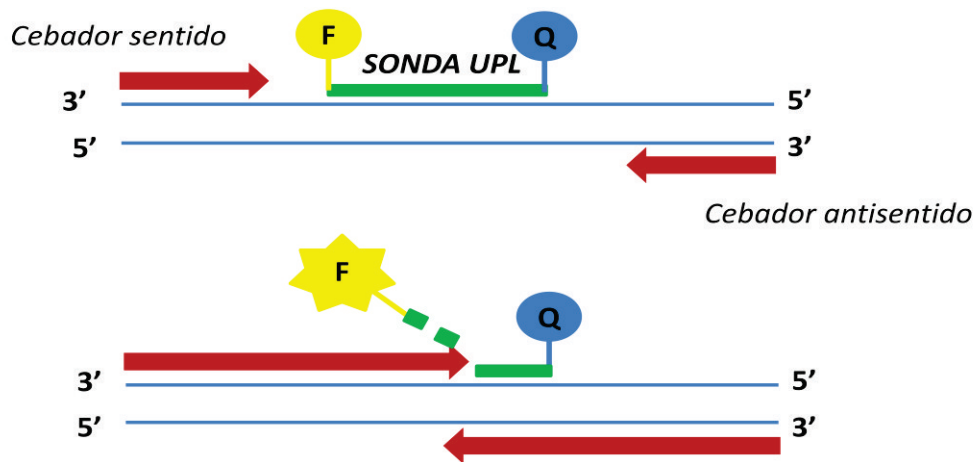


Figura 3. Funcionamiento de las sondas taqman UPL. La sonda consta de un fluoróforo (F) y un *quencher* (Q) que inactiva al fluoróforo. Cuando estos dos elementos se separan, se produce la emisión de fluorescencia por parte de la sonda, la cual es captada por el termociclador Real Time LightCycler.

3. Análisis y representación de los datos

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico GraphPad PRISM versión 5 (GraphPad Software, San Diego, CA), realizándose análisis para muestras independientes. El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó usando un test dos a dos de tipo *unpaired* de una cola. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P \leq 0.05$. Los datos se expresaron como las medias \pm SEM.

RESULTADOS

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria de células mesoteliales *in vitro* evaluando la expresión de los mediadores inflamatorios IL-8 y COX-2 a tiempos cortos de 6 horas. Para ello, se indujo una deficiencia en la mitocondria de las células mediante una exposición a OLI, un inhibidor químico que interacciona con la subunidad delta u OSCP de la ATP sintasa e impide el flujo de H⁺ de regreso a la matriz mitocondrial y con ello, la síntesis de ATP. También fue utilizado PQ, un prooxidante mitocondrial comúnmente usado para inducir disfunción mitocondrial. Este compuesto un herbicida ampliamente utilizado y altamente tóxico, el cual genera un incremento en el flujo del radical O₂, especialmente a nivel del complejo I de la CRM y produce, por tanto, un aumento del daño oxidativo mitocondrial.

Ya que el transporte electrónico en la CRM y la síntesis de ATP son dos procesos acoplados, uno no tiene lugar sin el otro (salvo excepciones como los procesos de termogénesis), la inhibición de la ATP sintasa conlleva al bloqueo del transporte electrónico, provocando el colapso de la mitocondria.

También se ha estudiado el efecto de la disfunción mitocondrial sobre la expresión de fibronectina a tiempos largos (48 horas) pero no ha sido posible obtener resultados concluyentes, por lo que se decidió no profundizar más en el tema y centrarse en la producción de mediadores inflamatorios (IL-8 y COX-2).

El gen de referencia elegido finalmente para analizar la expresión de los mediadores inflamatorios fue RPL13A tras realizarse varias qPCRs con otros genes como GADPH o PBGD.

1. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria en células mesoteliales en cultivo

En primer lugar, en el presente trabajo se valoró el efecto de OLI y PQ en la respuesta inflamatoria de las células mesoteliales *in vitro* mediante la cuantificación de dos de los mediadores inflamatorios más comunes: IL-8 y COX-2.

1.1 Expresión de IL-8

IL-8 es una quimioquina que juega un papel determinante en la atracción de células inmunes durante el proceso de inflamación, por lo que su estudio resulta de gran importancia.

Tras la realización de diversos experimentos se concluyó que los tratamientos con OLI durante 6 h no indujeron un aumento dosis dependiente de la expresión de ARN de IL-8 respecto al basal.

Fueron estudiadas diferentes dosis de OLI (5 μ g/ml y 10 μ g/ml) siendo ambos estímulos no suficientes para inducir un aumento en la expresión de IL-8. En la figura 4 se muestran los resultados obtenidos, donde se puede observar que únicamente IL-1 β , como era de esperar, indujo un incremento significativo de la expresión de IL-8.

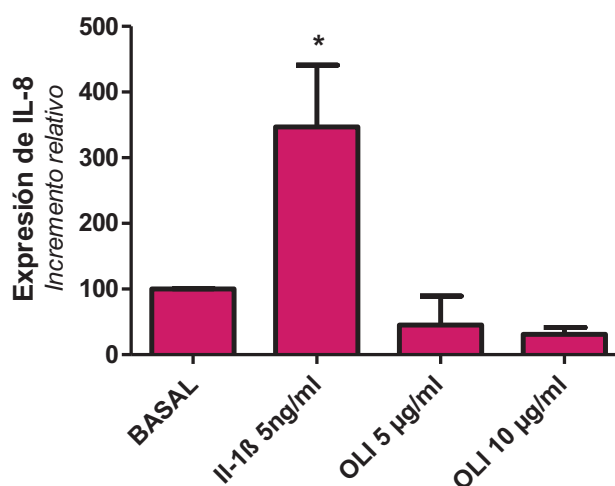


Figura 4. Expresión de ARNm de IL-8 en células mesoteliales humanas *in vitro* expuestas a OLI. La expresión de ARNm de IL-8 se cuantificó tras 6 h de estimulación con IL-1 β 5 ng/ml (control positivo) o con dosis crecientes de OLI (5 μ g/ml y 10 μ g/ml). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de incremento relativo a la condición basal normalizada a 100 (n=5; *P \leq 0, vs. basal).

En el caso del PQ algunos de los resultados obtenidos señalan mayor expresión de IL-8 que en el basal tras la incubación, aunque en muy poca cantidad, sin llegar nunca a superar los datos obtenidos con la incubación del control positivo. Debido a las altas variaciones de los datos obtenidos con PQ, solo se tuvo significancia (P \leq 0,05) entre el control positivo y el basal. En la figura 5 se muestra la representación de los datos obtenidos.

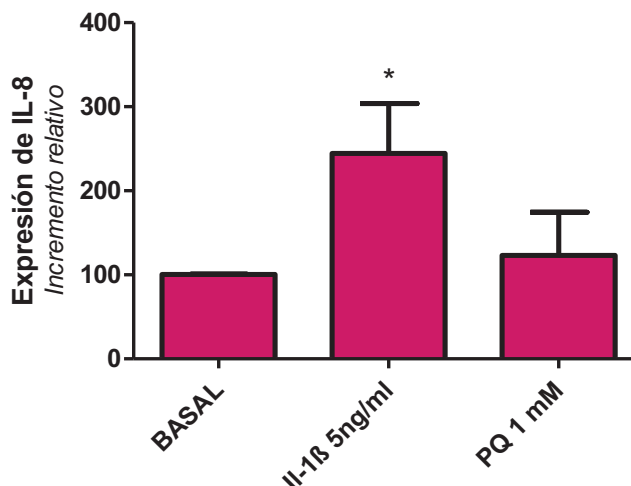


Figura 5. Expresión de ARNm de IL-8 en células mesoteliales humanas *in vitro* expuestas a PQ. La expresión de ARNm de IL-8 se cuantificó tras 6 h de estimulación con IL-1 β 5 ng/ml (control positivo) o con PQ 1 mM. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de incremento relativo a la condición basal normalizada a 100 (n=4; *P \leq 0,05 vs. basal).

Tras la obtención de estos resultados y con el fin de comprobar que estos fueran verídicos, se empleó la utilización de sondas UPL tanto para OLI como para PQ, obteniéndose los resultados mostrados en la figura 6. En ella se puede observar como la exposición a OLI no induce un aumento de la expresión de IL-8 respecto al basal. En el caso del PQ, los resultados nos parecen indicar que este sí aumenta de forma moderada (aproximadamente un 50%) la expresión de IL-8 aunque no llega a superar el dato obtenido por el control positivo (IL-1 β).

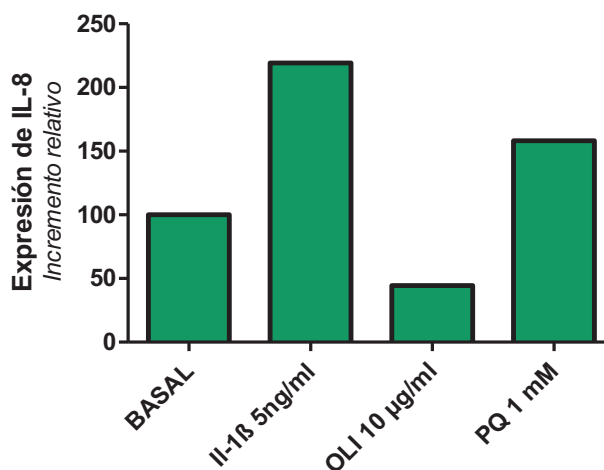


Figura 6. Expresión de ARNm de IL-8 mediante sondas UPL en células mesoteliales humanas *in vitro* expuestas a OLI y PQ. La expresión de ARNm de IL-8 se cuantificó tras 6 h de estimulación con IL-1 β 5 ng/ml (control positivo), con OLI 10 μ g/ml o con PQ 1mM. En este caso la qPCR fue realizada mediante la utilización de sondas UPL para una mayor fiabilidad de los resultados (n=1) Los resultados se expresan como incremento relativo a la condición basal normalizada a 100 (n=1).

1.2 Expresión de COX-2

COX-2 es un mediador inflamatorio inducible que se encuentra envuelto en un gran número de procesos patológicos como la inflamación, la angiogénesis y el crecimiento tumoral (Aroeira *et al.*, 2009).

En este apartado se esperaban resultados similares a los de IL-8, ya que ambos mediadores inflamatorios actúan de forma comparable. Por este motivo, los resultados de este apartado se basan únicamente en 2 experimentos.

Como resultados, hemos obtenido que de la misma forma que hemos observado con la expresión de IL-8, los tratamientos con OLI durante 6 h no indujeron un de la expresión de ARNm de COX-2 respecto al basal (Figura 7). En el caso del PQ, se observa una mayor expresión del mediador inflamatorio, aunque no de manera significativa.

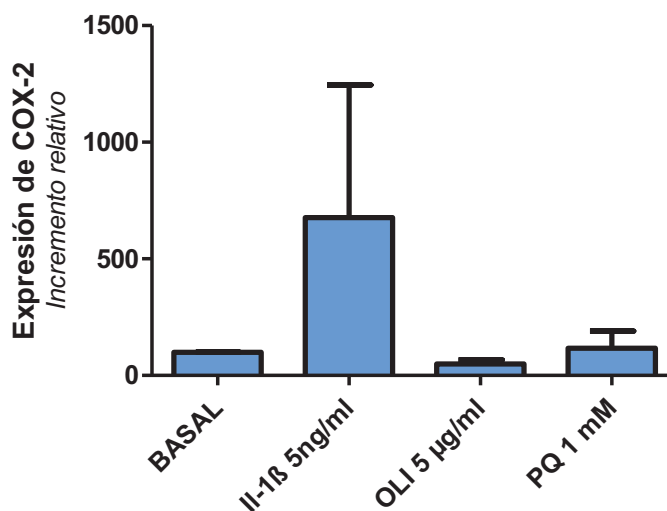


Figura 7. Expresión de ARNm de COX-2 en células mesoteliales humanas *in vitro* expuestas a OLI y PQ. La expresión de ARNm de IL-8 se cuantificó tras 6 h de estimulación con IL-1 β 5 ng/ml (control positivo), con OLI 10 μ g/ml o con PQ 1 mM. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de incremento relativo a la condición basal normalizada a 100 (n=2)

En conjunto, los resultados de este primer apartado nos hacen pensar que OLI no es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en las células mesoteliales MeT-5A, en términos de producción de COX-2 e IL-8. PQ sería capaz de inducir dicha respuesta aunque de una manera muy leve. Por dicho motivo, se estudió el efecto que produce una estimulación en combinación de estos inhibidores junto con IL-1 β y evaluar si la disfunción mitocondrial puede potenciar la respuesta inflamatoria inducida por IL-1 β .

2. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria inducida por Interleuquina-1 β (IL-1 β) en células mesoteliales en cultivo

La presencia de citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 β , induce en las células una activación del estado inflamatorio. Anteriormente no se ha podido observar una gran respuesta inflamatoria mediante la disfunción mitocondrial inducida, pero teniendo en cuenta datos bibliográficos hipotetizamos que el efecto en conjunto si podría producir una alta respuesta inflamatoria.

Por ello, se estudió el efecto conjunto de la disfunción mitocondrial (preincubación con OLI 10 μ g/ml o PQ 1mM) y la presencia de dosis subóptimas de IL-1 β (0.1 ng/ml o 1 ng/ml) en relación con la expresión de los mediadores inflamatorios COX-2 e IL-8. La concentración final de IL-1 β en cada grupo de resultados fue elegida tras ir variándola y se eligió la más conveniente para cada caso. El esquema del procedimiento experimental común para estos estudios se muestra en la Figura 8.



Figura 8. Esquema experimental para estudiar la expresión de mediadores inflamatorios por IL-1 β en células con disfunción mitocondrial. Este abordaje se realizó tras inducir la disfunción mitocondrial mediante OLI o PQ durante 30 min. A continuación, se añadió IL-1 β y se incubaron las células durante 6 horas para realizar la extracción de ARN y los estudios de expresión génica de IL-8 y COX-2 mediante qPCR.

2.1 Expresión de IL-8

Para estudiar la expresión de IL-8 bajo condiciones de disfunción mitocondrial en un ambiente proinflamatorio, en primer lugar se preincubaron las células durante 30 min con OLI 10 μ g/ml o PQ 1mM, provocando la disfunción mitocondrial.

En el caso del estudio con OLI, tras la preincubación, se añadió IL-1 β 0.1 ng/ml y se dejó desarrollar la respuesta inflamatoria. Para la exposición de estímulos combinados, se utilizó una menor dosis de IL-1 β , concretamente 0,1 ng/ml ya que la hipótesis que planteamos es que la disfunción mitocondrial puede potenciar la respuesta inflamatoria inducida por dosis subóptimas de IL-1 β .

En la figura 9 podemos observar los resultados obtenidos. En este caso se ve una clara tendencia de un aumento de la expresión del mediador inflamatorio IL-8 tras ser expuestas las células a un estímulo combinado de OLI más IL-1 β . Este estímulo además genera una respuesta de expresión de IL-8 que supera a los otros estímulos, siendo casi este la suma del efecto de IL-1 β 0,1ng/ml y OLI 10 μ g/ml.

Sin embargo, la expresión de IL-8 no llega a superar la expresión del control positivo (IL-1 β 5 ng/ml).

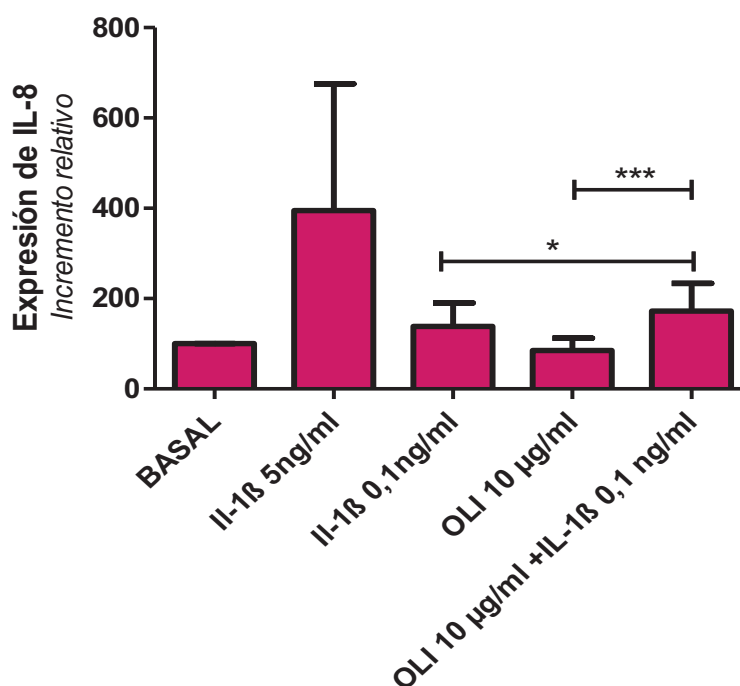


Figura 9. Expresión de ARNm de IL-8 en células mesoteliales humanas *in vitro* expuestas a diferentes estímulos con OLI. La expresión de ARNm de IL-8 se cuantificó tras 6 h de estimulación con IL-1 β 5 ng/ml (control positivo), con OLI 10 μ g/ml, con IL-1 β 0,1 ng/ml y una combinación de estos dos últimos. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de incremento relativo a la condición basal normalizada a 100 (n=3; *P \leq 0,05 ***P \leq 0,001).

En el caso del PQ, el otro productor de disfunción mitocondrial, la concentración de IL-1 β elegida a la que se mostraban más diferencias fue de 1 ng/ml. Por ello, tras la preincubación con PQ, se añadió IL-1 β 1 ng/ml y se dejó desarrollar la respuesta inflamatoria.

Los resultados obtenidos, mostrados en la figura 10, nos indican que hay una tendencia en la cual el estímulo combinado produce una expresión de IL-8 mayor que los estímulos por separado. Además, esta expresión producida por la exposición a PQ 1mM + IL-1 β 1 ng/ml produce una expresión que supera a la producida por el control positivo de IL-1 β 5 ng/ml.

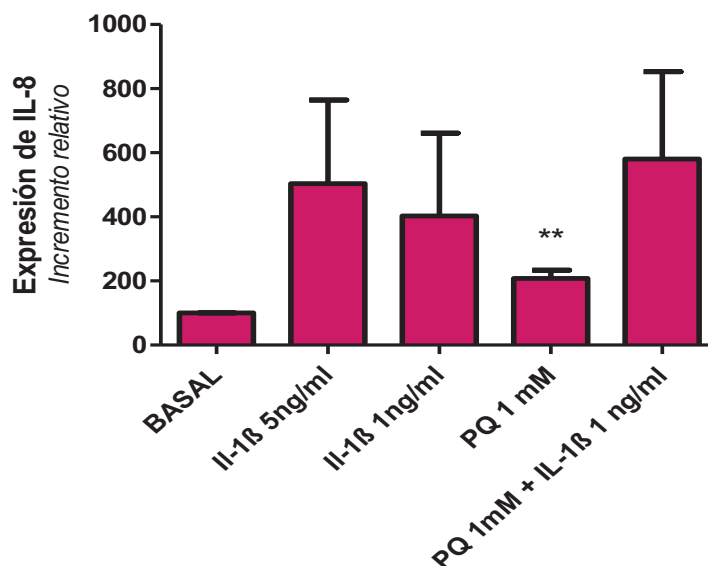


Figura 10. Expresión de ARNm de IL-8 en células mesoteliales humanas *in vitro* expuestas a diferentes estímulos con PQ. La expresión de ARNm de IL-8 se cuantificó tras 6 h de estimulación con IL-1 β 5 ng/ml (control positivo), con PQ 1mM, con IL-1 β 1 ng/ml y una combinación de estos dos últimos. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de incremento relativo a la condición basal normalizada a 100 (n=3; *P \leq 0,05 vs. basal).

Finalmente, como se realizó anteriormente, se comprobó la veracidad de estos resultados mediante qPCR con sondas UPL (Figura 11). De nuevo se muestra como la exposición del estímulo combinado con OLI 10 μ g/ml + IL-1 β 0,1ng/ml aumenta la expresión de IL-8, actuando estos dos estímulos como sinérgicos. Para el caso del PQ, la expresión de IL-8 tras la exposición al estímulo combinado es mucho mayor, produciéndose también un efecto sinérgico en comparación con la expresión de los estímulos por separado.

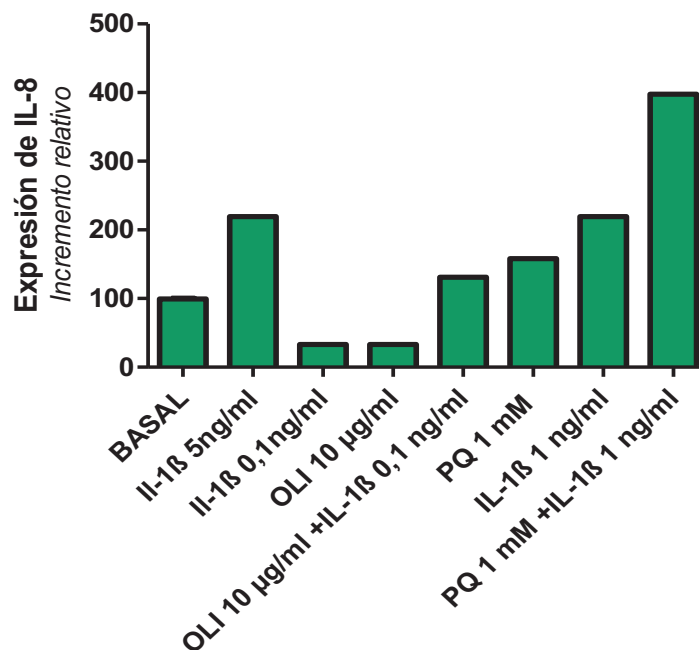


Figura 11. Expresión de ARNm de IL-8 mediante sondas UPL en células mesoteliales humanas *in vitro* expuestas a diversos estímulos. La expresión de ARNm de IL-8 se cuantificó tras 6 h de estimulación. En este caso la qPCR fue realizada mediante la utilización de sondas UPL para una mayor fiabilidad de los resultados (n=1) Los resultados se expresan como incremento relativo a la condición basal normalizada a 100 (n=1).

Los resultados obtenidos parecen indicar que la disfunción mitocondrial sensibiliza a las células mesoteliales de manera que responden de una forma exacerbada a la citoquina proinflamatoria IL-1 β , y por ello se observa una mayor expresión de IL-8.

2.2 Expresión de COX-2

Para estudiar la expresión de COX-2 bajo condiciones de disfunción mitocondrial en un ambiente proinflamatorio, se utilizó el mismo esquema que el descrito para IL-8. En primer lugar se preincubaron las células durante 30 min con OLI 10 μ g/ml o PQ 1 mM provocando la disfunción mitocondrial. A continuación, se añadió IL-1 β (0.1 ng/ml o 1ng/ml) y se dejó desarrollar la respuesta inflamatoria.

En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos para los estímulos de IL-1 β y OLI. Se observa, igual que para IL-8, una tendencia de mayor expresión de COX-2 tras la exposición al estímulo combinado.

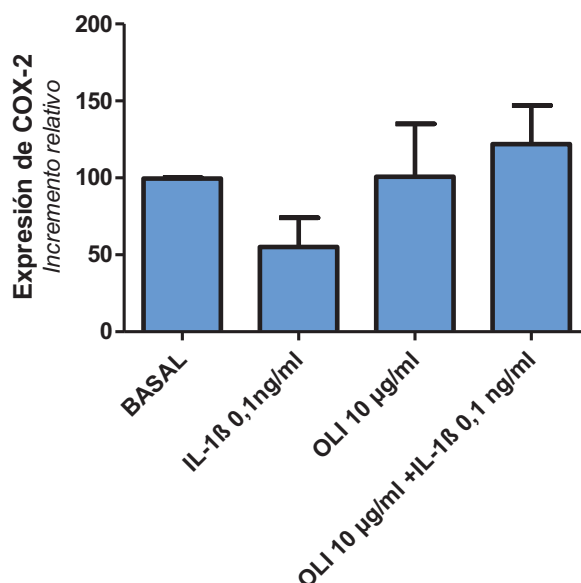


Figura 12. Expresión de ARNm de COX-2 en células mesoteliales humanas *in vitro* con estímulos de OLI. La expresión de ARNm de IL-8 se cuantificó tras 6 h de estimulación con IL-1 β 0,1 ng/ml, con OLI 10 μ g/ml y una combinación de estos dos últimos. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de incremento relativo a la condición basal normalizada a 100 (n=2).

En relación con los experimentos realizados con PQ, el estímulo combinado produce una expresión de COX-2 mayor, teniendo un efecto sinérgico la combinación de los estímulos.

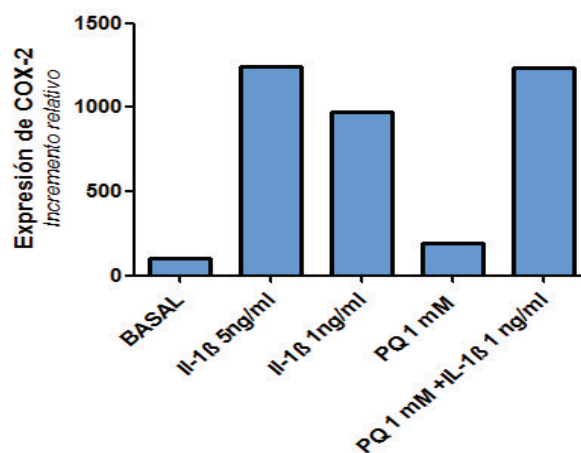


Figura 13. Expresión de ARNm de COX-2 en células mesoteliales humanas *in vitro* con estímulos de PQ. La expresión de ARNm de IL-8 se cuantificó tras 6 h de estimulación con IL-1 β 5 ng/ml (control positivo), con IL-1 β 1 ng/ml, con OLI 10 μ g/ml y una combinación de estos dos últimos. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de las veces de incremento relativo a la condición basal normalizada a 100 (n=2).

De nuevo, los resultados obtenidos parecen indicar que la disfunción mitocondrial sensibiliza a las células mesoteliales de manera que responden de una forma exacerbada a la citoquina proinflamatoria IL-1 β .

DISCUSIÓN

1. Importancia mediadores inflamatorios

En el presente trabajo han sido estudiados la expresión de dos mediadores inflamatorios, COX-2 e IL-8, con el fin de poder profundizar cómo se produce el fallo de la membrana peritoneal, la cual hace imposible la continuidad de la DP en los pacientes tratados con dicha técnica.

COX-2 e IL-8 son dos mediadores inflamatorios que se producen principalmente por la activación de NF- κ B. Esta vía de señalización de NF- κ B, desempeña un papel importante en la respuesta inflamatoria general y la muerte celular (Yang *et al.*, 2011). La producción de ambos mediadores inflamatorios crean un estado inflamatorio, el cual a su vez produce una disfunción en la membrana mitocondrial anteriormente explicada.

En concreto, IL-8 es una quimioquina que juega un papel determinante en la atracción de células inmunes durante el proceso de inflamación y COX-2 es una ciclooxigenasa inducible que está presente en numerosos procesos patológicos como la inflamación, la angiogénesis o el crecimiento tumoral (Aroeira *et al.*, 2009). Es importante señalar que ambos mediadores actúan de un modo similar, produciendo resultados comparables.

2. Consideraciones metodológicas

Es muy importante señalar que para dicho estudio ha sido utilizada la línea celular de células mesoteliales pelurales humanas, MeT-5A (ATCC[®] CRL-9444[™]). Es bien conocido que las células mesoteliales son altamente activas metabólicamente y pueden llegar a producir numerosas citoquinas (McGuire *et al.*, 2017), sin embargo la utilización de células mesoteliales de una línea celular ha llevado consigo numerosos problemas.

En dicho trabajo, no ha sido posible el análisis de todos los experimentos realizados, ya al tratarse de una línea celular, el porcentaje de estimulación en general ha sido menor al esperado. Además, al ser las variaciones producidas más discretas, ha sido difícil encontrar resultados significativos. En algunos de los experimentos, las células no respondían a todos los estímulos expuestos, como por ejemplo, al control positivo, siendo tratadas totalmente igual que los experimentos en los que sí respondían. Estos experimentos eran rechazados para

el análisis. Debido a esto, el número muestral se ha visto disminuido, y no se han podido obtener grandes datos significativos.

Esta misma limitación ha sido observada en otros estudios. En el estudio de McGuire *et al.*, de este mismo año, los resultados obtenidos con esta misma línea celular, MeT-5A, eran comparados con los obtenidos en cultivos primarios de células mesoteliales humanas, tras la exposición a los mismos tratamientos. Los resultados obtenidos diferían altamente. Por este motivo, creemos que la utilización de otra línea celular o principalmente células mesoteliales de cultivo primario, nos permitiría una mayor relevancia de los resultados.

3. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria en células mesoteliales en cultivo

Los datos obtenidos en los experimentos *in vitro* de células mesoteliales, en concreto en la línea celular Met5A, nos indican que la disfunción mitocondrial producida por OLI, por sí sola no es capaz de desarrollar un aumento en la producción de mediadores inflamatorios (IL-8 y COX-2) y por lo tanto, no es capaz de producir inflamación. Esto nos indicaría que el fallo de membrana que ocurre en los pacientes tratados con diálisis peritoneal, no solo se debe a una disfunción mitocondrial.

Los datos obtenidos con OLI en el presente trabajo no coinciden con los resultados obtenidos en otros tipos celulares, como por ejemplo en los sinoviocitos (Valcárcel-Ares *et al.*, 2014). En este trabajo, OLI fue utilizado como inhibidor de la función mitocondrial y en este caso si se mostraba que este inhibidor por si solo era capaz de inducir un aumento en la expresión de los mediadores inflamatorios IL-8 y COX-2.

Por otro lado, una exposición a PQ si induciría un incremento en la expresión de los mediadores inflamatorios, tanto para COX-2 como para IL-8, aunque sea de bajo nivel. Este resultado indicaría que el fallo de membrana que ocurre en los pacientes tratados con diálisis peritoneal, sí se podría deber a la disfunción mitocondrial, aunque no en gran medida.

Los datos obtenidos de OLI y PQ de esta forma nos indican resultados opuestos. Esta diferencia entre ambos experimentos puede deberse al ya mencionado problema de las Met5A. Las células no responderían al estímulo de OLI y si al estímulo de PQ al deberse a un producto más agresivo, pero por lo tanto en células del cuerpo humano sí que responderían.

Por ello, se concluye que, aunque de una manera muy leve, el fallo de membrana que ocurre en los pacientes tratados con diálisis peritoneal, podría ser consecuencia de la disfunción mitocondrial.

4. Efecto de la disfunción mitocondrial sobre la respuesta inflamatoria inducida por Interleuquina-1 β (IL-1 β) en células mesoteliales en cultivo

En el segundo apartado de resultados, hemos estudiado la producción de los mediadores inflamatorios tras la inducción de disfunción mitocondrial con los inhibidores químicos OLI o PQ. Los resultados obtenidos demuestran por primera vez que la disfunción mitocondrial amplifica la respuesta inflamatoria inducida por citoquinas en células mesoteliales humanas *in vitro*, reforzándose la hipótesis de que un daño en la función mitocondrial puede participar activamente en el fenotipo inflamatorio observado en la célula mesotelial de la membrana peritoneal de pacientes con fallo de membrana peritoneal.

En concreto, los tratamientos de estímulos combinados permiten una mayor expresión de los mediadores inflamatorios, tanto COX-2 e IL-8, tanto en el caso de los experimentos preestimulados con OLI como en el caso de PQ.

Por otro lado, cabe destacar que los datos obtenidos, concuerdan con los resultados obtenidos en otros estudios con diferentes tipos celulares como los sinoviocitos (Vaamonde-García *et al.*, 2012; Valcárcel-Ares *et al.*, 2014).

En resumen, una incubación con IL-1 β produce un primer estado inflamatorio, que junto con la previa disfunción mitocondrial producida por OLI como por PQ, llevan a las células mesoteliales a un estado inflamatorio mayor, el cual podría conducir posteriormente al cambio fenotípico de las células mesoteliales (EMT) y desembocar en el fallo de la membrana peritoneal.

CONCLUSIÓN

El presente trabajo nos ha permitido profundizar cómo se produce el fallo de membrana peritoneal de los pacientes con enfermedad crónica renal sometidos a diálisis peritoneal. Finalmente podemos concluir que una disfunción mitocondrial, junto con un previo estado inflamatorio, puede contribuir a un aumento en la expresión de los mediadores inflamatorios analizados (IL-8 y COX-2), los cuales provocan un mayor estado inflamatorio. Este estado inflamatorio derivaría en la transición epitelio-mesenquimal (EMT), fenotipo típico de las de las membranas peritoneales que han sufrido dicho fallo.

Este estudio además permite ayudar a encontrar nuevas dianas terapéuticas centrándose en la disfunción mitocondrial que desencadena dicho fallo de membrana.

BIBLIOGRAFÍA

- Andreux, P. A., Houtkooper, R. H., Auwerx, J. (2013). Pharmacological approaches to restore mitochondrial function. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12(6): 465.
- Aroeira, L. S., Lara-Pezzi, E., Loureiro, J., Aguilera, A., Ramírez-Huesca, M., González-Mateo, G., Sánchez-Tomero, J. A. (2009). Cyclooxygenase-2 mediates dialysate-induced alterations of the peritoneal membrane. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20(3): 582-592.
- Arrieta, J., Rodríguez-Carmona, A., Remón, C., Pérez-Fontán, M., Ortega, F., Tornero, J. A. S., Selgas, R. (2011). Peritoneal dialysis is the most cost-effective alternative for economic sustainability of dialysis treatment. *Nefrología.* 31(5): 505-13.
- Arroyo, R. A., Martínez, L. O., & González, A. O. (2008). Enfermedad renal crónica avanzada. *Nefrología. Supl.* 3: 3-6.
- Busnadiego, O., Loureiro-Álvarez, J., Sandoval, P., Lagares, D., Dotor, J., Pérez-Lozano, M. L., Rodríguez-Pascual, F. (2015). A pathogenetic role for endothelin-1 in peritoneal dialysis-associated fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26(1): 173-182.
- Chaudhary, K., Khanna, R. (2010). Biocompatible peritoneal dialysis solutions: do we have one? *J. Am. Soc. Nephrol.* 5(4): 723-732.
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.* 18(6): 655-73.
- Devuyst, O., Margetts, P. J., Topley, N. (2010). The pathophysiology of the peritoneal membrane. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21(7): 1077-1085.
- Disatnik, M. H., Hwang, S., Ferreira, J. C., Mochly-Rosen, D. (2015). New therapeutics to modulate mitochondrial dynamics and mitophagy in cardiac diseases. *J. Mol. Med.* 93(3): 279-287.
- Gayoso-Diz, P., Otero-González, A., Rodríguez-Álvarez, M. X., García, F., González-Quintela, A., Martín de Francisco, Á. L. (2013). Strategy to estimate risk progression of chronic kidney disease, cardiovascular risk, and referral to nephrology: the EPIRCE Study. *Nefrología.* 33(2): 223-230.
- Genovesi, S., Porcu, L., Luise, M. C., Riva, H., Nava, E., Contaldo, G., Gallieni, M. (2017). Sudden Death in End Stage Renal Disease: Comparing Hemodialysis versus Peritoneal Dialysis. *Blood Purif.* 44(1): 77-88.
- Hallan, S. I., Coresh, J., Astor, B. C., Åsberg, A., Powe, N. R., Romundstad, S., Holmen, J. (2006). International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17(8): 2275-2284.

- Hung, K. Y., Liu, S. Y., Yang, T. C., Liao, T. L., Kao, S. H. (2014). High-dialysate-glucose-induced oxidative stress and mitochondrial-mediated apoptosis in human peritoneal mesothelial cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2014.
- Kawka, E., Witowski, J., Fouquet, N., Tayama, H., Bender, T. O., Catar, R., Jörres, A. (2014). Regulation of chemokine CCL5 synthesis in human peritoneal fibroblasts: a key role of IFN- γ . *Mediators Inflamm.* 2014.
- Kinugasa, H., Whelan, K. A., Tanaka, K., Natsuizaka, M., Long, A., Guo, A., Yamamoto, K. (2015). Mitochondrial SOD2 regulates epithelial-mesenchymal transition and cell populations defined by differential CD44 expression. *Oncogene.* 34(41): 5229.
- Klaunig JE, Kamendulis LM. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44:239-67.
- Lin MT, Beal MF. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 443(7113): 787-95.
- López-Armada, M. J., Riveiro-Naveira, R. R., Vaamonde-García, C., Valcárcel-Ares, M. N. (2013). Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response. *Mitochondrion.* 13(2): 106-118.
- López-Cabrera, M. (2014). Mesenchymal conversion of mesothelial cells is a key event in the pathophysiology of the peritoneum during peritoneal dialysis. *Advances in medicine.* 2014.
- Loureiro, J., Aguilera, A., Selgas, R., Sandoval, P., Albar-Vizcaíno, P., Pérez-Lozano, M. L., Borrás-Cuesta, F. (2011). Blocking TGF- β 1 protects the peritoneal membrane from dialysate-induced damage. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22(9): 1682-1695.
- Maneiro, E., Martín, M. A., de Andres, M. C., López-Armada, M. J., Fernández-Sueiro, J. L., del Hoyo, P., Blanco, F. J. (2003). Mitochondrial respiratory activity is altered in osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism.* 48(3): 700-708.
- McGuire, A. L., Mulrone, K. T., Carson, C. F., Ram, R., Morahan, G., Chakera, A. (2017). Analysis of early mesothelial cell responses to *Staphylococcus epidermidis* isolated from patients with peritoneal dialysis-associated peritonitis. *PloS one.* 12(5): e0178151.
- Morinaga, H., Sugiyama, H., Inoue, T., Takiue, K., Kikumoto, Y., Kitagawa, M., Asanuma, M. (2012). Effluent free radicals are associated with residual renal function and predict technique failure in peritoneal dialysis patients. *Perit. Dial. Int.* 32(4): 453-461.
- Nataatmadja, M., Cho, Y., Johnson, D. W. (2017). Evidence for Biocompatible Peritoneal Dialysis Solutions. *Contrib. Nephrol.* 189: 91-101.
- Nelson DL, Cox MM, Lehninger ALPob. *Lehninger principles of biochemistry.* (2008) 5th ed. Ed. New York. Basingstoke: W.H. Freeman.

- Otero A, De Francisco A, Gayoso P, Garcia F. (2010) Prevalence of chronic kidney disease in Spain: Results of the EPIRCE Study. *Nefrología*. 30: 78-86.
- Pletinck, A., Vanholder, R., Veys, N., Van Biesen, W. (2012). Protecting the peritoneal membrane: factors beyond peritoneal dialysis solutions. *Nat. Rev. Nephrol.* 8(9): 542-550.
- Ponce, D., Gobo-Oliveira, M., Balbi, A. L. (2017). Peritoneal Dialysis Treatment Modality Option in Acute Kidney Injury. *Blood purif.* 43(1-3): 173-178.
- Vaamonde-García, C., Riveiro-Naveira, R. R., Valcárcel-Ares, M. N., Hermida-Carballo, L., Blanco, F. J., López-Armada, M. J. (2012). Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 64(9): 2927-2936.
- Valcárcel-Ares, M. N., Riveiro-Naveira, R. R., Vaamonde-García, C., Loureiro, J., Hermida-Carballo, L., Blanco, F. J., López-Armada, M. J. (2014). Mitochondrial dysfunction promotes and aggravates the inflammatory response in normal human synoviocytes. *Rheumatology.* 53(7): 1332-1343.
- Xu, Q., Xu, F., Fan, L., Xiong, L., Li, H., Cao, S., Mao, H. (2014). Serum potassium levels and its variability in incident peritoneal dialysis patients: associations with mortality. *PloS one.* 9(1): e86750.
- Yáñez-Mó, M., Lara-Pezzi, E., Selgas, R., Ramírez-Huesca, M., Domínguez-Jiménez, C., Jiménez-Heffernan, J. A., Castro, M. A. (2003). Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N. Engl. J. Med.* 348(5): 403-413.
- Yuan, Y., Chen, Y., Zhang, P., Huang, S., Zhu, C., Ding, G., Zhang, A. (2012). Mitochondrial dysfunction accounts for aldosterone-induced epithelial-to-mesenchymal transition of renal proximal tubular epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 53(1): 30-43.
- Zhang Q, Rothenbacher D. (2008). Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: Systematic review. *BMC Public Health.* 8(1):117.