



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS



TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR, CELULAR  
Y GENÉTICA

---

Influencia de los líquidos de diálisis sobre la disfunción mitocondrial y  
respuesta inflamatoria en células mesoteliales. Efecto de la dieta.

Influencia dos líquidos de diálise sobre a disfunción mitocondrial e  
resposta inflamatoria das células mesoteliais. Efecto da dieta.

Influence of dialysis fluids on mitochondrial dysfunction and inflammatory  
response in mesothelial cells. Effect of diet.

Autora: Brígida Domínguez Alba

Tutora: Dra. María José López Armada

A Coruña, 24 de Julio de 2018

“A la Dra. María José López Armada por confiar en mí y por darme esta fantástica oportunidad. A las chicas del grupo, Olalla y Jennifer, por su paciencia infinita y por ser maravillosas conmigo. Gracias.”

“A mis padres, porque hoy soy una mujer libre gracias a ellos. Gracias de corazón”



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
FACULTAD DE CIENCIAS

***TRABAJO DE FIN DE MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR,  
CELULAR Y GENÉTICA.***

INFLUENCIA DE LOS LÍQUIDOS DE DIÁLISIS SOBRE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y  
RESPUESTA INFLAMATORIA EN CÉLULAS MESOTELIALES. EFECTO DE LA DIETA.

Autor

Director

Fdo. Brígida Domínguez Alba

Fdo. María José López Armada

En A Coruña, a 24 de Julio de 2018

Influencia de los líquidos de diálisis sobre la disfunción mitocondrial y respuesta inflamatoria en células mesoteliales. Efecto de la dieta.

## ÍNDICE

---

RESUMEN .....	6
ABSTRACT.....	7
RESUMO.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Insuficiencia renal crónica .....	9
Tratamientos para la insuficiencia renal crónica .....	9
Accesibilidad e impacto económico de la diálisis.....	10
Transición epitelio mesenquimal y disfunción mitocondrial.....	11
Mediadores inflamatorios de interés.....	12
Antioxidantes orales. Resveratrol.....	13
Soluciones de diálisis peritoneal.....	13
Composición de las soluciones de diálisis peritoneal.....	14
OBJETIVOS.....	16
MATERIAL Y MÉTODOS .....	17
Material biológico y condiciones de cultivo .....	17
Depleción y estimulación celular .....	17
Estimulación celular con LD .....	17
Estimulación celular con LD y RSV .....	18
Estimulación celular con LD, IL-1 $\beta$ y RSV .....	19
Análisis citométrico .....	20
Estudio del potencial de membrana mitocondrial .....	21
Medida de la cantidad de ROS mitocondriales .....	21
Análisis de la expresión génica .....	21
Lisis celular .....	21
Extracción de RNA .....	22
Cuantificación .....	23
Tratamiento con DNAsas .....	23
Retrotranscripción .....	23
PCR-q .....	24
Análisis estadístico .....	27

Influencia de los líquidos de diálisis sobre la disfunción mitocondrial y respuesta inflamatoria en células mesoteliales. Efecto de la dieta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
La solución de diálisis Extraneal produce una disminución del potencial de membrana mitocondrial .....	28
El RSV no proporciona un efecto protector significativo frente al daño producido por los líquidos de diálisis .....	29
La estimulación con las soluciones de diálisis no afecta a la cantidad de ROS mitocondriales en las células MeT5A .....	31
El tratamiento conjunto de IL-1 $\beta$ con LD Extraneal asevera el daño producido sobre las células MeT5A .....	32
CONCLUSIONES .....	37
BIBLIOGRAFÍA.....	38

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

---

Figura 1: Tratamiento de diálisis peritoneal.....	10
Tabla 1: Información sobre las características de los principales LDs utilizados en clínica actualmente.....	15
Tabla 2: Proceso de estimulación celular con distintos LDs.....	18
Tabla 3: Proceso de estimulación celular con tratamiento antioxidante.....	19
Tabla 4: Proceso de estimulación celular con LD, IL-1 $\beta$ y RSV.....	20
Tabla 5: Reactivos utilizados en la qPCR.....	25
Tabla 6: Programación del termociclador LightCycler 480 II.....	26
Figura 2: Cambios producidos en el potencial de membrana mitocondrial tras la exposición a distintos LDs.....	28
Figura 3: Cambios producidos en la membrana mitocondrial tras la estimulación con RSV y con LD.....	30
Figura 4: Cuantificación de ROS mitocondriales tras la exposición celular a los distintos LDs.....	31
Figura 5: Cambios producidos en la membrana mitocondrial tras la estimulación con LD, IL-1 $\beta$ y/o RSV.....	32
Figura 1: Efecto sinérgico de la IL-1 $\beta$ y la solución de diálisis Extraneal.....	33
Figura 2: Variaciones producidas en la expresión génica de IL-8 en respuesta a la acción de diversos estímulos celulares.....	35

## RESUMEN

---

La diálisis peritoneal se basa en la evidencia fisiológica de que el peritoneo es una membrana altamente vascularizada y semipermeable que, mediante difusión y mecanismos de transporte osmótico, permite la depuración sanguínea. Para ello, se bombea líquido de diálisis (LD) en la cavidad peritoneal a través de un catéter situado en el abdomen. El LD posee una composición concreta, de forma que gracias a él se genera el gradiente necesario para que las sustancias que se pretenden eliminar pasen de la sangre hasta el líquido dializado.

La exposición crónica del peritoneo al LD puede conducir en última instancia a un proceso de inflamación crónica, que a su vez afecta directamente a la estructura y funcionalidad de la membrana peritoneal. Se ha demostrado que la célula mesotelial peritoneal adquiere características miofibroblásticas en respuesta al contacto con el LD, a través del proceso de transición epitelio mesenquimal (EMT). Además, los LD contienen sustancias capaces de estimular la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los ROS pueden dañar los elementos mitocondriales, alterando su funcionalidad y perpetuando la respuesta inflamatoria. Todo ello, promueve finalmente el deterioro de la membrana peritoneal.

La presente investigación se centró en estudiar el efecto de los diferentes líquidos de diálisis sobre la disfunción mitocondrial y la expresión de mediadores inflamatorios en células mesoteliales humanas, así como su modulación por el tratamiento con un agente antioxidante denominado resveratrol. Para ello, se utilizó la línea celular MeT5A. En concreto, se realizaron diversos ensayos de estimulación con LD, interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y resveratrol (RSV). Se midió el potencial de membrana mitocondrial y los ROS mitocondriales, para evaluar el estado mitocondrial. Asimismo, también se analizó el perfil de expresión génica de mediadores inflamatorios.

A grandes rasgos, los resultados obtenidos permiten concluir que determinados LDs con características bioincompatibles, como el LD Extraneal, utilizados de forma crónica durante el tratamiento de diálisis peritoneal, pueden provocar daño mitocondrial a través del incremento de estrés oxidativo y de mediadores inflamatorios, dando lugar a la disfunción mitocondrial de las células mesoteliales.

## ABSTRACT

---

Peritoneal dialysis is based on the physiological evidence that the peritoneum is a highly vascularized and semipermeable membrane that, through diffusion and osmotic transport mechanisms, allows blood to be purified. In order to do this, dialysis fluid (LD) is pumped into the peritoneal cavity through a catheter located in the abdomen. The LD has a specific composition which is necessary to generate the gradient that allow the substances, that must be eliminated from the blood, to get through it to the dialyzed liquid.

A chronic exposure of the peritoneum to LD could end up in a chronic inflammation which affects the peritoneal membrane structure and functionality. It has been demonstrated that the peritoneal mesothelial cell acquires myofibroblastic characteristics in response to LD contact in the process of mesenchymal epithelial transition (EMT). In addition to this, LD contains substances that stimulate the generation of reactive oxygen species (ROS). ROS can damage the mitochondrial elements, altering their functionality and perpetuating the inflammatory response. This promotes the peritoneal membrane deterioration

This research focused on studying the effect of different dialysis fluids on mitochondrial dysfunction and the expression of inflammatory markers in human mesothelial cells, and the modulation by treatment with an antioxidant agent called resveratrol. For this, the MeT5A cell line was used. In particular, several stimulation tests have been experimented with LD, and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y resveratrol (RSV). The mitochondrial membrane potential and mitochondrial ROS were measured to evaluate the mitochondrial state. Likewise, the gene expression profile of inflammatory mediators was also analyzed.

In general, the results obtained allow us to conclude that certain LDs with bioincompatible characteristics, such as Extraneal LD, used chronically during peritoneal dialysis treatment, can cause mitochondrial damage through increased oxidative stress and inflammatory mediators, leading to mitochondrial dysfunction of mesothelial cells



## RESUMO

---

A diálise peritoneal baséase na evidencia fisiolóxica de que o peritoneo é unha membrana altamente vascularizada e semipermeable que, mediante difusión e mecanismos de transporte osmótico, permite a depuración sanguínea. Para elo, bombease líquido de diálise (LD) na cavidade peritoneal a través dun catéter situado no abdome. O LD posee una composición concreta, de forma que gracias a él xenérase o gradiente necesario para que as sustancias que se pretenden eliminar pasen do sangue ata o líquido dializado.

A exposición crónica do peritoneo ao LD pode conducir en derradeira instancia a un proceso de inflamación crónico, que a súa vez afecta directamente á estrutura e funcionalidade da membrana peritoneal. Demostrouse que a célula mesotelial peritoneal adquire características miofibroblásticas en resposta ao contacto co LD, a través dun proceso denominado transición epitelio mesenquinal (EMT). Ademáis, os LD conteñen sustancias capaces de estimular a xeneración de especies reactivas de osíxeno (ROS). Os ROS poden danar os elementos mitocondriais alterando a súa funcionalidade e perpetuando a resposta inflamatoria. Todo elo, promove finalmente o deterioro da membrana peritoneal

A presente investigación céntrase en estudar o efecto dos líquidos da diálise sobre a disfunción mitocondrial e a expresión de mediadores inflamatorios en células mesoteliais humanas, así como a súa modulación polo tratamento cun axente antioxidante denominado resveratrol. Para elo, utilizouse a línea celular MeT5A. En concreto, realizáronse diversos ensaios de estimulación con distintos LD, con interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e resveratrol (RSV). Mediuse o potencial de membrana mitocondrial e os ROS mitocondriais, para evaluar o estado mitondrial. Asimesmo, tamén se analizou o perfil de expresión xénico de mediadores inflamatorios.

A grandes rasgos, os resultados obtidos permiten concluir que determinados LDs con características bioincompatibles, como o LD Extraneal, utilizados de forma crónica durante o tratamento de diálise peritoneal, poden provocar dano mitocondrial a través do incremento do estrés oxidativo e de mediadores inflamatorios, dando lugar a disfunción mitocondrial das células mesoteliais.

## INTRODUCCIÓN

---

### 1. INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA.

La insuficiencia renal crónica es una enfermedad asociada al envejecimiento en la mayoría de los casos, que se define como daño renal continuado por más de 3 meses, provocado por anomalías estructurales o funcionales del riñón y que puede cursar con o sin disminución del filtrado glomerular renal [1][2]. Actualmente, se está produciendo un aumento de la esperanza de vida del ser humano debido al avance de la investigación biomédica. Como consecuencia, se ha conseguido erradicar un gran número de enfermedades y la edad media de la población española ha aumentado de forma considerable. Desgraciadamente, a medida que la población envejece, prevalecen todas aquellas enfermedades y patologías clínicas que se encuentran directamente relacionadas con el proceso de envejecimiento [2][3].

#### 1.1. Tratamientos para la insuficiencia renal crónica

Conforme evoluciona la enfermedad renal crónica y alcanza estadios avanzados, es necesario proporcionar al paciente algún tipo de tratamiento que se adecue de manera eficaz a sus características clínicas y biológicas [4]. Lo ideal sería realizar trasplantes renales siempre que se requiriera, pero desafortunadamente existen ciertas limitaciones, como la incompatibilidad donante-paciente o los prolongados periodos de espera por falta de donantes, que obstaculizan en gran medida el proceso [5][4]. Por este motivo, la diálisis crónica se considera el tratamiento principal para enfermos renales crónicos, a pesar de que este supone un 2,5% del gasto sanitario total anual en nuestro país [6].

La diálisis es un tratamiento médico de depuración sanguínea extrarrenal, que consiste en eliminar de forma artificial las toxinas, las sustancias nocivas y el exceso de agua que permanece en la sangre a causa de una insuficiencia renal. Como ya se ha comentado, la diálisis crónica se utiliza como terapia de reemplazo renal en determinados casos, en los cuales los pacientes carecen de función renal total o parcialmente. En la actualidad, en los hospitales se llevan a cabo dos modalidades de diálisis distintas, las cuales son conocidas comúnmente como hemodiálisis y diálisis peritoneal [7].

La hemodiálisis clásica se caracteriza porque la sangre corporal se extrae del interior del organismo para, posteriormente, introducirla en el interior del dializador, en el cual se eliminan, sustancias tóxicas producidas como consecuencia del metabolismo celular, exceso de líquidos, etc. Posteriormente, La sangre limpia se devuelve al interior del organismo a través de un sistema de tubos estériles que permiten su transporte [8]. La hemodiálisis se realiza en centros hospitalarios y resulta de vital importancia la supervisión médica por parte de especialistas, lo que provoca la total dependencia del paciente a los cuidados clínicos necesarios [7].

La diálisis peritoneal se basa en la evidencia fisiológica de que el peritoneo es una membrana semipermeable y vascularizada que, mediante mecanismos de transporte osmótico y difusión, permite que las sustancias que se desean extraer de la sangre pasen desde ésta, a través de los capilares sanguíneos, hasta el líquido dializado. Para ello, se bombea líquido de diálisis (LD) en la cavidad peritoneal a través de un catéter situado en el abdomen, donde tiene lugar el proceso de separación, mediado por la fuerza osmótica del medio. El LD tiene una concentración concreta de determinados compuestos, de forma que se genera el gradiente necesario para que las sustancias que se quieren eliminar de la sangre pasen desde ella hasta el seno del LD. Finalmente, el dializado se elimina de la cavidad abdominal [9].

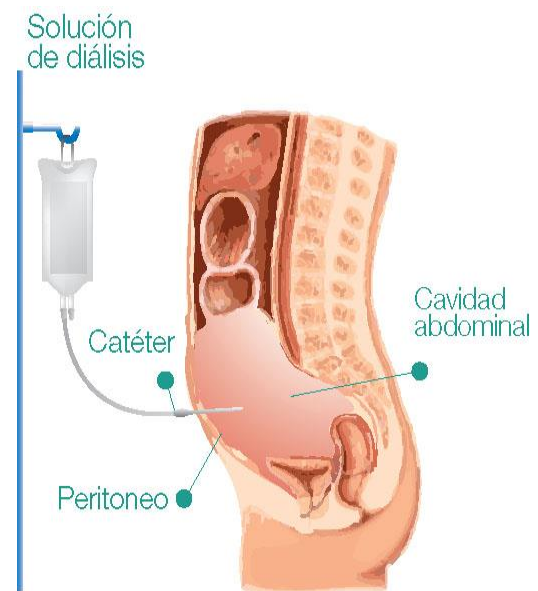


Figura 3: Tratamiento de diálisis peritoneal. La solución de diálisis se introduce en la cavidad peritoneal a través de un catéter. El peritoneo funciona como una membrana semipermeable, que actúa como filtro y es el responsable de la limpieza de la sangre [43].

## 1.2. Accesibilidad e impacto económico de la diálisis

Por otro lado, la diálisis supone un coste considerable del gasto sanitario en España. Esta situación ha promovido la realización de estudios económicos sobre las distintas modalidades de diálisis, concluyéndose que la diálisis peritoneal es mucho menos costosa que la hemodiálisis, siendo ambas equivalentes en términos de eficacia dialítica y morbimortalidad [6]. Debido a tales evidencias, es de vital importancia mejorar la integridad de la membrana peritoneal durante el proceso dialítico, ya que incrementaría el periodo de tiempo que los pacientes pueden estar sometidos al tratamiento de diálisis peritoneal. Paralelamente, se

Influencia de los líquidos de diálisis sobre la disfunción mitocondrial y respuesta inflamatoria en células mesoteliales. Efecto de la dieta.

proporcionaría acceso a dicho tratamiento a un mayor número de pacientes que, debido a ciertas características clínicas, actualmente no pueden acceder a él [10]. Por último, establecer el uso estandarizado de la diálisis peritoneal permitiría ahorrar gran cantidad de dinero, lo cual repercutiría positivamente sobre el balance de gastos sanitarios de nuestro país.

## 2. TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL Y DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

Durante el proceso de diálisis peritoneal el peritoneo se expone al LD, una solución no fisiológica, debido principalmente a su potencial glucotóxico. Generalmente, el componente principal de los líquidos de diálisis es la glucosa, ya que este se utiliza como agente osmótico. Para generar un gradiente efectivo, su concentración debe superar de 15 a 40 veces las concentraciones fisiológicas [11]. Dicha concentración de glucosa y la presencia de productos de degradación de la glucosa (GDPs), unido a la exposición continua a esta solución, hace que sea dañina. Además, tanto la glucosa como los GDPs pueden unirse a los grupos amino libres de las proteínas o lípidos y formar productos finales de glicación (AGEs). La exposición de forma crónica al LD está asociada a la aparición de lesiones tales como sangrado local o infecciones, las cuales pueden conducir a un proceso de inflamación crónico, que a su vez provoca cambios morfológicos que afectan directamente a la estructura y funcionalidad de la membrana peritoneal. Como consecuencia, se produce el deterioro progresivo de la capacidad dializante y filtradora de la membrana, haciendo totalmente inviable el proceso de diálisis peritoneal [12]. En este sentido, se ha demostrado que la célula mesotelial peritoneal se ve afectada en respuesta a la diálisis peritoneal, perdiendo su fenotipo epitelial y adquiriendo características miofibroblásticas a través de un proceso conocido como transición epitelio mesenquimal (EMT). Con este cambio de fenotipo, las células adquieren capacidad de invadir el estroma submesotelial, lugar donde producen gran cantidad de matriz extracelular, factores angiogénicos e inflamatorios. Todo ello, promueve la inflamación y la fibrosis peritoneal, provocando finalmente el deterioro de la membrana peritoneal. [13]

La fibrosis se produce en última instancia como consecuencia de una reacción crónica inflamatoria, debida a la alteración del equilibrio redox celular. Tal desequilibrio es el principal responsable del aumento crónico de los mediadores inflamatorios, como el factor de necrosis tumoral, la interleuquina 1(IL-1) o la interleuquina 8 (IL-8), y de la activación de numerosas vías de señalización proinflamatorias. A su vez, el desequilibrio redox celular surge por efecto

del incremento neto de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por la debilidad del sistema celular antioxidante, compuesto por enzimas antioxidantes, secuestradores de especies reactivas de oxígeno, etc. [14]. Paralelamente, estudios previos evidencian un incremento de los marcadores de estrés oxidativo en el suero y en el efluente peritoneal de los pacientes sometidos a diálisis peritoneal. En este sentido, las soluciones de diálisis tienen en su composición sustancias capaces de estimular la generación de ROS, como son la glucosa y sus productos de degradación. Todo ello sugiere que el proceso de oxidación puede encontrarse estrechamente relacionado con la EMT, la cual conduce al daño y al deterioro peritoneal.

La mitocondria juega un papel fundamental en el proceso de estrés oxidativo, debido a que esta representa la principal fuente de producción de ROS, siendo al mismo tiempo diana para estas moléculas. Así, el daño oxidativo producido por la aparición de ROS mitocondriales daña a los elementos que componen la propia mitocondria, como los lípidos de membrana mitocondrial, sus proteínas y su ADN (ADNmt). A su vez, el daño oxidativo en el ADNmt conduce a la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial, lo que provoca la aparición de más ROS. Se establece de esta forma un círculo vicioso oxidativo, el cual propaga y perpetúa la respuesta inflamatoria [14]. Por ello, la disfunción mitocondrial toma gran importancia clínica, debido a su relación con el desarrollo de numerosas enfermedades, incluida la patología inflamatoria. Sin embargo, en relación con el daño peritoneal, existen pocos datos sobre el papel que desempeña la disfunción mitocondrial en este proceso. Se conoce que el LD basado en glucosa es capaz de inducir cierto incremento de ROS mitocondriales y apoptosis. pero no se sabe con exactitud la relación que existe entre la disfunción mitocondrial y la EMT [15]

### 1.1. Mediadores inflamatorios de interés.

La IL-1 representa un grupo de citoquinas de entre 17-20 kDa con una amplia gama de funciones biológicas centradas en la generación y el mantenimiento de procesos inflamatorios [16]. La secreción de IL-1 puede desencadenarse por medio de diversos estímulos proinflamatorios, incluidos la lesión celular, productos de la membrana celular bacteriana, componentes activados de la vía del complemento, etc. En cualquier caso, la activación de macrófagos y también de otros tipos celulares como las células mesoteliales, desencadena la producción del precursor de la IL-1, denominado pro-IL-1. Posteriormente, la pro-IL-1 será escindida por la enzima caspasa-1 para originar la forma activa, la IL-1 [16].

La IL-8, también conocida como CXCL-8 es una de las principales quimiocinas sintetizadas por el sistema inmunitario. La presencia de IL-8 estimula una fuerte adhesión de los leucocitos rodantes al endotelio vascular y promueve la migración transendotelial de los leucocitos [17]. En procesos de inflamación agudos, se ha observado que la activación de CXCR2 por parte de la IL-8 aumenta considerablemente la permeabilidad vascular, por lo que se considera que la IL-8 está altamente involucrada en el reclutamiento de monocitos y neutrófilos presentes en la circulación sanguínea [17].

### 3. ANTIOXIDANTES ORALES. RESVERATROL

Los antioxidantes se definen genéricamente como moléculas o sustancias que, a concentraciones relativamente bajas, son capaces de disminuir la velocidad de reacción de oxidación de otras moléculas [18]. Son sintetizados por el organismo, pero a medida que este envejece, la efectividad y la concentración de los antioxidantes decrece significativamente [19]. Los antioxidantes orales proporcionan una solución eficaz frente a dicho problema, ya que a través de una dieta equilibrada y rica en compuestos antioxidantes se puede suplir la deficiencia biológica de antioxidantes debida al proceso de envejecimiento [20].

El RSV es un compuesto polifenólico no flavonoide de origen natural, presente en vegetales y frutas fuertemente pigmentadas, así como en sus productos derivados. Las briofitas y las plantas superiores lo sintetizan en respuesta a diversos estímulos, como por ejemplo el ataque de patógenos y hongos o la exposición a rayos UV. Dicha sustancia resulta de gran interés debido a que posee actividades biológicas variadas, entre las que se incluyen su actividad antitumoral, antioxidante y antiviral [21].

### 4. SOLUCIONES DE DIÁLISIS PERITONEAL

En resumen, el alto poder osmótico, la glucosa y sus productos de degradación, el bajo pH, y el proceso mecánico de introducir y retirar el LD, están relacionados con la generación y el mantenimiento de un proceso inflamatorio. Por tanto, la composición de los LDs hace de la diálisis peritoneal un proceso bioincompatible, capaz de producir daño a la cavidad peritoneal [22]. Los parámetros que suelen modificarse con la intención de paliar el daño que la exposición al LD produce en las células del peritoneo son el pH, el contenido en agente osmótico, los GDPs que se generan durante la esterilización del LD, y la concentración de AGEs. En base a estos

parámetros, los LDs pueden clasificarse en dos grandes grupos, conocidos como bioincompatibles y biocompatibles, según sean más o menos tóxicos para el organismo [12][23], definiéndose la biocompatibilidad como la capacidad de una técnica o sistema de cumplir con su función sin generar respuestas adversas clínicamente significativas en el organismo [24]. En diálisis peritoneal, este concepto se aplicó inicialmente a la influencia de los LDs sobre las respuestas locales funcionales y morfológicas del peritoneo. En la actualidad, también se contempla el hecho de que los LDs pueden provocar a su vez efectos adversos a nivel sistémico [24].

### 1.1. Composición de las soluciones de diálisis peritoneal

La composición de los LDs ha cambiado notablemente gracias a la mejor comprensión de los principales determinantes de biocompatibilidad y a los avances técnicos acontecidos en estos últimos años. Existen diversos tipos de LDs, cada cual, con una composición determinada, aunque todos ellos poseen ciertas características comunes. Todas las soluciones de diálisis peritoneal son soluciones estériles y contienen agua, electrolitos, un tampón y un agente osmótico [24].

Con respecto a la composición de electrolitos, los LDs no contienen potasio y su concentración de sodio oscila entre 132-134 mM. La composición del resto de electrolitos, como calcio o magnesio, varía en función del LD [24].

En cuanto al tampón, el más utilizado convencionalmente es el lactato, aunque también puede ser de bicarbonato o una combinación de ambos. Diversos estudios preclínicos, sugieren que las soluciones dialíticas de bicarbonato son más biocompatibles que las de lactato [24].




Por último, la presencia de un agente osmótico en la solución de diálisis es necesaria para hacer un balance negativo de fluidos. En su ausencia, las soluciones de diálisis peritoneal se reabsorberían durante el curso de depuración de la sangre [24]. Los agentes osmóticos poseen diversos pesos moleculares. A mayor peso molecular, más larga es la permanencia de la molécula dentro del peritoneo y más tiempo se mantiene la ultrafiltración. Sin embargo, el aumento del volumen intraperitoneal es más lento con las moléculas de mayor peso molecular, por lo que no son aptas para intervenciones de corta duración [24]. Generalmente, la glucosa es el agente osmótico más usado, aunque también se usan la icodextrina y los aminoácidos [24]. Existen tres concentraciones diferentes de glucosa para adaptar la ultrafiltración a las

Influencia de los líquidos de diálisis sobre la disfunción mitocondrial y respuesta inflamatoria en células mesoteliales. Efecto de la dieta.

necesidades del paciente, las cuales oscilan entre los 1.360 y los 4.250 mg/dl. Las concentraciones más altas de glucosa permiten que la ultrafiltración sea más eficiente, pero también potencian los efectos negativos de la glucosa, como por ejemplo la aparición de sus productos de degradación [24].

Actualmente, se están adoptando nuevas medidas para corregir todos los problemas relacionados con la composición de los LDs, mediante la utilización de diferentes agentes osmóticos, empleando otras técnicas de esterilización, organizando el contenido de las soluciones en diferentes cámaras aisladas o manteniendo un pH más cercano al fisiológico, pero incluso así, no existe todavía una solución definitiva que evite los daños peritoneales que llevan a la fibrosis y finalmente al fallo de ultrafiltración [24]

*Información sobre las características de los principales LDs  
utilizados en clínica actualmente*

	SOLUCIÓN	BOLSA	AGENTE OSMÓTICO	TAMPÓN (mmol/L)	GDP	pH
<b>BAXTER</b>	Dianeal PD1	Simple	Glucosa 1.36 - 2.27 - 3.86 %	Lactato 35	Alto	5.2
	Dianeal PD4	Simple	Glucosa 1.36 - 2.27 - 3.86 %	Lactato 40	Alto	5.2
	Extaneal 	Simple	Icodextrina 7.5 %	Lactato 40	No	5.6
	Nutrineal	Simple	Aminoácidos 1.1 %	Lactato 40	No	5.5
	Physioneal 35	Doble	Glucosa 1.36 - 2.27 - 3.86 %	Lactato 10 + Bicarbonato 25	Bajo	7.4
	Physioneal 40 	Doble	Glucosa 1.36 - 2.27 - 3.86 %	Lactato 15 + Bicarbonato 25	Bajo	7.4
<b>FRESENIUS</b>	Stay Safe 2 - 3 - 4 	Simple	Glucosa 1.5 - 4.25 - 2.3 %	Lactato 35	Alto	5.5
	Stay Safe 17 - 18 - 19	Simple	Glucosa 1.5 - 4.25 - 2.3 %	Lactato 35	Alto	5.5
	Balance 2 - 3 - 4	Doble	Glucosa 1.5 - 4.25 - 2.3 %	Lactato 35	Bajo	7 - 7.4
	Balance 17 - 18 - 19	Doble	Glucosa 1.5 - 4.25 - 2.3 %	Lactato 35	Bajo	7 - 7.4
	BicaVera 2 - 3 - 4	Doble	Glucosa 1.5 - 4.25 - 2.3 %	Bicarbonato 34	Bajo	7.4
<b>GAMBRO</b>	Gambrosol Trio 10 A - B - A+B	Triple	Glucosa 1.5 - 2.5 - 3.9 %	Lactato 35	Bajo	5.5 - 6.5
	Gambrosol Trio 40 A - B - A+B	Triple	Glucosa 1.5 - 2.5 - 3.9 %	Lactato 41 - 40 - 39	Bajo	5.5 - 6.5

*Tabla 1: Información sobre las características de los principales LDs utilizados en clínica actualmente. BAXTER, FRESENIUS y GAMBRO hacen referencia a las casas comerciales encargadas de producir las soluciones de diálisis peritoneal. La columna SOLUCIÓN muestra el nombre de los LDs. La columna BOLSA se refiere al número de cámaras en el cual está organizado la solución. La columna GDP indica el grado de productos de degradación de la glucosa (GDP) generados en cada caso, significando "No" la ausencia total de los mismos [24]. Las flechas rojas señalan los 3 líquidos de diálisis utilizados para llevar a cabo la presente investigación.*

Influencia de los líquidos de diálisis sobre la disfunción mitocondrial y respuesta inflamatoria en células mesoteliales. Efecto de la dieta.



## OBJETIVOS

---

La finalidad de este estudio es analizar el efecto de diferentes líquidos de diálisis de uso habitual en el tratamiento de pacientes de diálisis sobre la disfunción mitocondrial en las células mesoteliales humanas y comprobar si una dieta antioxidante puede mejorar la actividad mitocondrial y la respuesta inflamatoria, protegiendo de los cambios estructurales y funcionales que puede padecer el peritoneo de estos pacientes.

En torno a este objetivo principal, aparecen una serie de objetivos secundarios, los cuales se enumeran a continuación:

- ✓ Analizar el potencial de membrana mitocondrial en la línea celular MeT5A mediante citometría de flujo tras someter a las células a distintos estímulos.
- ✓ Estudiar los niveles de ROS mitocondriales en la línea celular MeT5A tras la estimulación con distintos LD en relación con la actividad mitocondrial.
- ✓ Estudiar la expresión génica de mediadores inflamatorios en la línea celular MeT5A tras la exposición a interleuquina-1 $\beta$ , LD y/o RSV mediante PCR a tiempo real.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Se realizaron diversos experimentos con el objeto de estudiar *in vitro* la respuesta celular producida tras la exposición a determinados estímulos que modulan o pueden modular los cambios estructurales y funcionales que definen el deterioro de la membrana peritoneal, como por ejemplo distintos LDs, IL-1 $\beta$  o RSV. La utilidad de dicha investigación reside en dilucidar el papel que ejerce la disfunción mitocondrial sobre el estrés oxidativo, la expresión de medidores inflamatorios y la EMT.

### 1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizaron células MeT5A. Esta línea celular corresponde a células inmortalizadas humanas, obtenidas a partir de pleura de pulmón. Las células fueron cultivadas en medio DMEN (Lonza, Verviers, Belgium) (10% de SBF inactivado, complementado con insulina y penicilina-estreptomicina) en condiciones estándar (37°C al 5% de CO<sub>2</sub>). Se utilizó tripsina-EDTA 0.05% 1X (Gibco, Termofisher, Paisley, PA4 9RF, UK) para subcultivar las células cuando fue necesario.

Previamente a la estimulación celular, las células se sembraron en placas multipocillos. Para los experimentos en los cuales se analizaron parámetros celulares mediante citometría de flujo, se sembraron 30.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos. Para los experimentos dirigidos en última instancia a la extracción de RNA y al estudio de la expresión génica, se sembraron 80.000 células por pocillo en placas de 12 pocillos.

### 2. DEPLECIÓN Y ESTIMULACIÓN CELULAR

Las células se deplecionaron de forma previa a la estimulación celular. Se utilizó medio DMEN (0.5% de SBF inactivado, complementado con penicilina-estreptomicina e insulina) y se mantuvieron en condiciones estándar durante 24 o 48 horas, según los requisitos del experimento.

#### 2.1. Estimulación celular con líquido de diálisis

Tras la depleción, las células se lavaron con salino y se estimularon con tres LD distintos, cuyas características principales se detallan en la tabla 1.

Se realizó una estimulación con LD puro durante 20 minutos. Posteriormente, se diluyó el LD adicionando un volumen igual de medio DMEN (0% en SBF inactivado, suplementado con penicilina-estreptomicina e insulina). El estímulo se mantuvo durante seis horas en condiciones estándar.

Este experimento se realizó 3 veces por duplicado. En la tabla 2 se detalla paso a paso el procedimiento seguido en cada caso de experimentación.

### *Proceso de estimulación celular*

MUESTRA	PASO 1	PASO 2
<b>1. Basal</b>	DMEN 0%	DMEN 0%
<b>2. STAY SAFE</b>	LD STAY SAFE	DMEN 0%
<b>3. PHYSIONEAL</b>	LD PHYSIONEAL	DMEN 0%
<b>4. EXTRANEAL</b>	LDEXTRANEAL	DMEN 0%
<b>5. FCCP/AA</b>	DMEN 0%	DMEN 0%

*Tabla 2: Proceso de estimulación celular. El paso 1 consistió en añadir LD o medio DMEN (0% SBF inactivado + penicilina-estreptomicina + insulina) e incubar las células en condiciones estándar durante 20 minutos. Posteriormente, sin retirar los reactivos del paso 1, se adicionó medio DMEN (0% SBF inactivado + peniestreptomicina + insulina) Este último paso de estimulación tuvo una duración de seis horas, durante las cuales las células se mantuvieron en condiciones estándar. Se usó Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) 5mM para generar el control positivo referente al análisis del potencial de membrana mitocondrial y antimicina A (AA) 40 µg/ml para generar el control positivo referente a la cuantificación de ROS mitocondriales.*

## 2.2. Estimulación celular con LD y RSV

Se utilizó resveratrol (RSV) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 5 µM como sustancia antioxidante. Se realizó una preincubación con RSV, previa a la estimulación con LD, durante 30 minutos, tiempo durante el cual las células fueron mantenidas en condiciones estándar. Tras la preincubación con el tratamiento antioxidante, se retiró el medio de cada pocillo y se adicionaron 250 µl de DMEN (0% en SBF inactivado suplementado con peniestreptomicina e insulina) o bien 250 µl de LD. Las células fueron expuestas al LD completo durante 20 minutos en condiciones estándar, manteniéndose mientras tanto la estimulación con RSV. Posteriormente, se realizó una dilución ½ del LD con medio DMEN (0% en SBF inactivado suplementado con peniestreptomicina e insulina) y se mantuvo el estímulo en condiciones estándar durante seis horas, igual que en el caso anterior. La tabla 3 muestra paso a paso el procedimiento llevado a cabo.

Con este protocolo de estimulación se estudió la acción protectora del RSV previamente a la exposición del LD, como mecanismo preventivo; y la acción protectora del RSV durante la exposición al LD, como tratamiento simultáneo. Para ello, en los pocillos correspondientes a las muestras 3, 5 y 7 de la tabla 3, se mantuvo la concentración de RSV a 5  $\mu\text{M}$  en todos y cada uno de los pasos descritos en la misma tabla.

*Proceso de estimulación celular con tratamiento antioxidante*

MUESTRA	PASO 1	PASO 2	PASO 3
1. <b>BASAL</b>	DEMEN 0%	DEMEN 0%	DEMEN 0%
2. <b>STAY SAFE</b>	DEMEN 0%	LD STAY SAFE	DEMEN 0%
3. <b>STAY SAFE + RSV</b>	DEMEN 0% + RSV	LD STAY SAFE + RSV	DEMEN 0% + RSV
4. <b>PHYSIONEAL</b>	DEMEN 0%	LD PHYSIONEAL	DEMEN 0%
5. <b>PHY + RSV</b>	DEMEN 0% + RSV	LD PHY + RSV	DEMEN 0% + RSV
6. <b>EXTRANEAL</b>	DEMEN 0%	LD EXTRANEAL	DEMEN 0%
7. <b>EXT + RSV</b>	DEMEN 0% + RSV	LD EXT + RSV	DEMEN 0% + RSV
8. <b>CONTROL +</b>	DEMEN 0%	DEMEN 0%	DEMEN 0%

Tabla 3: Proceso de estimulación celular con tratamiento antioxidante. En el Paso 1 se adicionó un volumen de 250  $\mu\text{l}$  medio DMEN (0% en SBF inactivado, suplementado con penicilina-estreptomicina e insulina). Previo al paso 2, se retiró el medio. Se adicionaron 250  $\mu\text{l}$  de los reactivos que se indican. Tras 20 minutos en condiciones estándar, se adicionaron 250  $\mu\text{l}$  de los reactivos que se indican en el paso 3. En todos los pasos se mantuvo la concentración de RSV a 5  $\mu\text{M}$ . Physioneal (PHY), Extraneal (EXT)

### 2.3. Estimulación celular con LD, IL-1 $\beta$ y RSV

Tras la depleción celular, las células se lavaron con salino y se estimularon con diferentes sustancias, las cuales se testaron conjuntamente siguiendo distintas combinaciones de interés, y también por separado. Únicamente se utilizó medio Extraneal como LD, decisión tomada a la luz de los resultados obtenidos en experimentos anteriores. Se usó RSV en una concentración de 5  $\mu\text{M}$  por pocillo. Por otro lado, la IL-1 $\beta$ , (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.) se usó en una concentración de 1 ng/ml por pocillo. Se usó medio DMEN al 0% en SBF inactivado, complementado con penicilina-estreptomicina e insulina en todos los pasos que requerían la adición de medio.

En primer lugar, se realizó una preincubación con RSV durante 30 minutos. Para ello, se adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de medio DMEN en todos los pocillos y 5  $\mu\text{l}$  de RSV en los casos pertinentes, y se mantuvo la placa en un incubador en condiciones estándar el tiempo establecido. Pasados los 30 minutos, se retiró el medio de todos los pocillos y se adicionó, o bien 500  $\mu\text{l}$  de medio DMEN al 0%, o 500  $\mu\text{l}$  de LD Extraneal. La duración del estímulo fue de 20 minutos. Las células también se mantuvieron en condiciones estándar. Por último, se

Influencia de los líquidos de diálisis sobre la disfunción mitocondrial y respuesta inflamatoria en células mesoteliales. Efecto de la dieta.

añadieron 500 µl de medio DMEN al 0% a todos los pocillos, y también se añadió RSV y/o IL-1β, según procedía. El estímulo se mantuvo durante 6 horas en condiciones estándar. La tabla 4 muestra un esquema del procedimiento descrito.

*Proceso de estimulación celular con LD, IL-1β y RSV*

MUESTRA	PASO 1	PASO 2	PASO 3
<b>BASAL</b>	DMEN 0%	DMEN 0%	DMEN 0%
<b>EXTRANEAL</b>	DMEN 0%	<b>LD EXTRANEAL</b>	DMEN 0% + <b>LD EXT</b>
<b>IL-1β</b>	DMEN 0%	DMEN 0%	DMEN 0% + <b>IL-1β</b>
<b>RSV</b>	DMEN 0% + <b>RSV</b>	DMEN 0%	DMEN 0% + <b>RSV</b>
<b>EXT + IL-1β</b>	DMEN 0%	<b>LD EXTRANEAL</b>	DMEN 0% + <b>LD EXT</b> + <b>IL-1β</b>
<b>EXT + RSV</b>	DMEN 0% + <b>RSV</b>	<b>LD EXTRANEAL</b>	DMEN 0% + <b>LD EXT</b> + <b>RSV</b>
<b>EXT + IL-1β + RSV</b>	DMEN 0% + <b>RSV</b>	<b>LD EXTRANEAL</b>	DMEN 0% + <b>LD EXT</b> + <b>IL-1β</b> + <b>RSV</b>
<b>IL-1β + RSV</b>	DMEN 0% + <b>RSV</b>	DMEN 0%	DMEN 0% + <b>IL-1β</b> + <b>RSV</b>

Tabla 4: Proceso de estimulación celular llevado a cabo para estudiar la acción conjunta de la IL-1β junto con el LD, además de la acción protectora proporcionada por el RSV. Extraneal (EXT).

### 3. ANÁLISIS CITOMÉTRICO

Para determinar el potencial de membrana mitocondrial, así como la cantidad de ROS mitocondriales acumulados en la célula tras la estimulación, se llevaron a cabo varios análisis por citometría de flujo. En esta técnica, las células o partículas en suspensión se hacen pasar individualmente y a velocidad constante a través de un haz luminoso. El impacto entre las células y el rayo de luz genera señales que son recogidas por detectores. Las señales que se producen como fruto de la interacción entre el haz luminoso y las células son la dispersión de la luz y la fluorescencia. Por ello, las células deben marcarse previamente con un fluorocromo específico, que permita el estudio del parámetro de interés. Los datos obtenidos se representan como histogramas mediante el uso de Software específicos, y permiten obtener gran cantidad de información acerca de las características estructurales y funcionales de la célula. La principal ventaja de la citometría de flujo es que permite medir simultáneamente distintos parámetros celulares, que las medidas se realizan de forma individual célula a célula, y la elevada sensibilidad, objetividad y velocidad del análisis [25].

En este caso, se utilizó un citómetro BD FACSClibur y se usó el Software *BD CellQuest Pro* para el análisis de datos. En concreto, se analizaron 7500 eventos o células, de forma individual en cada condición experimental.

### 3.1. Estudio del potencial de membrana mitocondrial

Para determinar el potencial de membrana mitocondrial se utilizó tetrametilrodamina metil éster (TMRM). Se trata de un compuesto fluorescente cargado positivamente, que se acumula en la mitocondria de forma indirectamente proporcional al potencial de membrana y emite fluorescencia roja. De esta forma, las mitocondrias sanas acumulan mayor cantidad de fluoróforo que las mitocondrias que se encuentran en un estado de despolarización. Las células se incubaron con TMRM (Life technologies, Eugene, OR, USA) 250nM en medio DMEN al 10% en SBF inactivado durante 30 minutos. Se usó Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.) 5 mM como estímulo despolarizador de la mitocondria para generar el control positivo.

### 3.2. Medida de la cantidad de ROS mitocondriales

Para estudiar la acumulación de ROS mitocondriales se utilizó un fluoróforo derivado del etidio, denominado mitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator (Life Technologies, Eugene, OR, USA). Este compuesto reacciona con el radical  $O_2^-$ , oxidándose a etidio, el cual emite fluorescencia roja. El tiempo de incubación del mitoSOX (0.77ng/μl) fue de media hora. Se utilizó Antimicina A (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.) a una concentración de 40 μg/ml por pocillo, como estimulador de la producción de ROS para generar el control positivo.

## 4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

El estudio de la expresión génica se llevó a cabo con el objeto de determinar si, en respuesta a diversos estímulos (IL-1  $\beta$ , LD Extraneal y RSV), se expresan genes relacionados con el proceso inflamatorio, como por ejemplo el gen CXCL-8. A continuación, se describe de forma detallada el protocolo realizado para ello.

### 4.1. Lisis celular

Tras realizar el proceso de estimulación descrito en el apartado 2.2.3, se recogió el medio de cultivo y se almacenó a  $-80^{\circ}C$ , con la intención de realizar estudios futuros. A continuación, las células se lavaron con salino dos veces, para eliminar restos de medio de cultivo, así como de reactivos utilizados en la estimulación celular. Seguidamente, se adicionaron 100 μl de TRIzol (Molecular Research Center, Inc. Montgomery Rd Cincinnati, USA). El TRIzol es un reactivo que se usa para aislar RNA, DNA y proteínas, de forma rápida

y eficiente. Seguidamente, se agitó la placa de forma manual durante cinco minutos y se recogió el lisado celular en tubos Eppendorf, los cuales fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior extracción de RNA.

#### 4.2. Extracción de RNA

Durante la extracción de RNA se mantuvieron las muestras en hielo y todas las centrifugaciones se llevaron a cabo a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , con la intención de impedir la degradación del RNA.

En primer lugar, las muestras almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  procedentes de la lisis celular se descongelaron en hielo. Una vez descongeladas, se les añadió  $20\ \mu\text{l}$  de cloroformo y se voltearon los tubos Eppendorf durante 15 segundos para mezclar bien su contenido. A continuación, se incubaron 2-3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a  $12\ 000\text{gs}$  durante 15 min. Tras la centrifugación, en los tubos aparecieron tres fases bien diferenciadas. La primera de ellas, una fase acuosa y transparente, contenía el RNA. La segunda, una fina interfase blanquecina, contenía restos de DNA. Por último, la tercera fase era de color rosácea y contenía residuos de fenol y cloroformo. Se tomó la fase acuosa de cada muestra con sumo cuidado, y se introdujo en tubos Eppendorf nuevos, previamente rotulados. La interfase y la fase rosácea se desecharon.

Se adicionaron  $50\ \mu\text{l}$  de isopropanol con el objeto de precipitar el RNA. Se voltearon los tubos manualmente y se dejaron incubar durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a  $12\ 000\ \text{gs}$  durante 10 min y, como consecuencia, se obtuvo un pellet blanquecino en el fondo de los tubos, correspondiente al RNA extraído.

Se retiró el sobrenadante de los tubos y se realizó un lavado con etanol al 70%, sin resuspender el pellet. Solo se adicionó el reactivo, se voltearon los tubos manualmente dos veces y se centrifugaron a  $7\ 500\ \text{gs}$  durante 5 min. Se realizó un segundo lavado, repitiendo este mismo proceso, pero utilizando etanol al 100% de pureza. El sobrenadante obtenido en esta segunda centrifugación también fue desechado y se dejó secar el pellet de los tubos. Una vez secos, se les añadió agua libre de RNAsas atemperada y se incubaron durante 10 min a  $55-60^{\circ}\text{C}$  en el termobloque. Finalmente, se resuspendieron las muestras y se mantuvieron en hielo hasta el momento de cuantificarlas.

#### 4.3. Cuantificación

Se usó el Nanodrop para cuantificar la cantidad de RNA extraído, así como su calidad. Para ello, se utilizó el software Nucleic Acid. Para hacer el blanco se usó agua libre de RNAsas. La concentración de RNA se midió en ng/ $\mu$ l. También se midió el ratio 260/280 para determinar la calidad del RNA extraído. Después, las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4. Tratamiento con DNAsas

El tratamiento con DNAsas se realizó con el objeto de eliminar el posible DNA contaminante que pudiera haber en las muestras tras la extracción de RNA. Para ello, se usó el Kit DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad, CA), el cual digiere DNA mono y bicatenario en oligodexiribonucleótidos que contienen 5' fosfato. El uso de DNasa I está indicado en procedimientos vitales de purificación del RNA previos a la retrotranscripción y a la amplificación.

El tratamiento con DNAsas consistió en tomar tubos Eppendorf previamente rotulados y en introducir en su interior los siguientes reactivos:

- *H<sub>2</sub>O DEPC-treated water* (volumen variable, teniendo en cuenta que el volumen final de la mezcla debe ser de 10  $\mu$ l)
- 1  $\mu$ gr de RNA
- 1  $\mu$ l 10x *DNase I Reaction Buffer*
- 1  $\mu$ l *DNase I, Amplification Grade*, 1U/  $\mu$ l

Tras preparar la mezcla, se homogenizó el contenido pipeteando suavemente y se incubaron los tubos durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 1  $\mu$ l de solución EDTA 25 mM y se introdujeron los tubos en el termociclador MWG-AG BIOTECH, el cual estaba programado para mantener la temperatura a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 min.

#### 4.5. Retrotranscripción

La retrotranscripción reversa permite la síntesis de DNA complementario (DNAc) mediante el uso de RNA monocatenario como plantilla, cuya reacción está mediada por la transcriptasa reversa (RT) [26]. Para ello, se usó el Kit SuperScript® VILO™ MasterMix – 50rxn (ThermoFisher Scientific, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA).



El protocolo de actuación se basó en tomar 5  $\mu$ l del producto obtenido de cada muestra a partir del tratamiento con DNAsas y adicionarle 2  $\mu$ l de Vilo y 3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas a cada tubo. Finalmente, los tubos se introdujeron en un termociclador *MWG-AG BIOTECH* en el cual se mantuvieron las siguientes condiciones de retrotranscripción:

- 25°C durante 10 min
- 42°C durante 1h y 30 min
- 85°C durante 5 min

El producto obtenido, DNAc, se diluyó con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas en proporción 1/10.

#### 4.6. Q-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación de una secuencia específica de DNA mediante una reacción enzimática cíclica *in vitro* [27]. La enzima utilizada es la DNA polimerasa, la cual tiene la capacidad de sintetizar el DNA celular de forma natural. Los elementos necesarios para que la PCR se lleve a cabo correctamente son el templado o molde de DNA o DNAc, la DNA polimerasa, los primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), ion magnesio, un buffer y H<sub>2</sub>O libre de endonucleasas. Estos elementos interactúan en las tres etapas principales que componen la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión [27]. Todas ellas se llevan a cabo gracias a un aparato automatizado, denominado termociclador, el cual está diseñado para establecer un sistema donde las condiciones de temperatura y tiempo sean las necesarias en cada instante y se mantengan estables [27].

La PCR a tiempo real, qPCR, es una variante de la PCR convencional cuya utilidad reside en que permite detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos que resultan de interés, mediante el uso de sondas fluorescentes [27]. Para ello, el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa, tal y como sucede en la PCR de punto final. A medida que se produce la amplificación de ácidos nucleicos, la sonda utilizada emite fluorescencia, la cual es captada en cada ciclo por una serie de detectores [27].

Actualmente, la PCR en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar ácidos nucleicos, incluso tratándose de muestras poco concentradas de DNA

templado [27]. El sistema garantiza elevada sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus principales aplicaciones es la detección de pequeñas variaciones en el perfil de expresión génica de determinadas células o tejidos [27].

En este experimento se usó el kit LightCycler<sup>®</sup> 480 Probes Master (Roche, Mannheim, Germany) para llevar a cabo la amplificación del gen de la IL-8 (gen diana) y del gen TBP-1 (gen de referencia) en distintas condiciones de estimulación celular. Se analizó la expresión del gen de la IL-8 en humanos, CXCL-8, y se utilizó como marcador sistémico en procesos inflamatorios. Para amplificar el gen de la IL-8 se utilizaron los *primers* IL8-F Human e IL8-R Human (Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad, CA), cuyas secuencias *forward* y *reverse* se corresponden con 5'-GAG CAC TCC ATA AGG ACA AAA-3' y 5'-ATG GTT CCT TCC GGT GGT- 3', respectivamente. Por otro lado, para amplificar el gen de referencia TBP-1 se utilizaron los *primers* TBP1-F Human y TBP1-R Human (Invitrogen, Van Allen Way Carlsbad, CA), cuyas secuencias *forward* y *reverse* se corresponden con 5'-GCC CAT AGT GAT CTT TGC AGT-3' y 5'-CGC TGG AAC TCG TCT CAC TA-3', respectivamente. En cuanto a las sondas utilizadas, para la amplificación del gen de la IL-8 se usó la sonda 72 (Roche, Mannheim, Germany) y para la amplificación del gen TBP1- se usó la sonda 67 (Roche, Mannheim, Germany), ambas pertenecientes a la *Universal Probe Library*.

En la tabla 5 se muestran los reactivos utilizados para llevar a cabo la qPCR, así como el volumen/muestra que se tomó de cada uno de ellos.

#### *Reactivos utilizados en la qPCR*

<b>REACTIVOS</b>	<b>VOLUMEN (μl)</b>
LightCycler <sup>®</sup> 480 Probes Master, 2x concentrated	5
Primer Forward	0.35
Primer Reverse	0.35
Sonda	0.1
Water, PCR Grade	0.2
Muestra DNAc	4

*Tabla 5: Reactivos utilizados para amplificar DNAc. La columna de la derecha muestra el volumen de reactivo utilizado por muestra. Para amplificar cada gen se utilizaron primers específicos. Se usaron la sonda 72 y la sonda 67 de la librería universal de sondas de Roche para amplificar los genes CXCL-8 y TBP-1, respectivamente. Volumen final de reacción=10 μl.*

Las condiciones de amplificación se detallan en la tabla 6. Concretamente, se usó un termociclador LightCycler® 480 II de Roche. Se estableció en primer lugar un programa de pre-incubación, seguido de un programa de amplificación y, finalmente, de uno de anillamiento. Es preciso señalar que el programa de amplificación constaba de 55 ciclos, en los cuales tuvo lugar la detección y cuantificación del producto amplificado mediante fluorescencia. El procesamiento de datos, así como la obtención de resultados se llevó a cabo mediante el uso del Software LightCycler® 480. Para comprobar la veracidad de los datos obtenidos, así como la reproducibilidad y la fiabilidad del método, se realizaron 3 estimulaciones celulares (n=3) siguiendo el mismo protocolo. Posteriormente, se realizaron las consecuentes extracciones de RNA, retrotranscripciones y qPCR.

### *Programación del termociclador LightCycler 480 II*

#### **Programs**

Program Name	pre-incubation		
Cycles	1	Analysis Mode	None
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
95	None	00:10:00	4.40

Program Name	amplification		
Cycles	55	Analysis Mode	Quantification
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
95	None	00:00:10	4.40
60	None	00:00:30	2.20
72	Single	00:00:01	4.40

Program Name	cooling		
Cycles	1	Analysis Mode	None
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
40	None	00:00:20	1.50

*Tabla 6: Programación del termociclador LightCycler® 480 II obtenida a partir del propio Software proporcionado por la casa Roche. En ella se indica temperatura, tiempo, modo de adquisición y ratio de cambio de temperatura.*

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó la versión 7 del Software *GraphPad Prism* para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos. Se realizó un análisis *One-Way ANOVA* (no paramétrico). Para realizar el análisis multiparamétrico se usó el test de Tukey.  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente significativa.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las células se estimularon tal y como se explicó anteriormente, y se analizaron mediante citometría de flujo con el fin de evaluar el estado mitocondrial tras la estimulación. Para ello, se midió el potencial de membrana mitocondrial (Fig. 2, 3, 5 y 6) y la cantidad de ROS mitocondriales (Fig. 4). Asimismo, también se analizó el perfil de expresión génica de mediadores inflamatorios mediante RT-qPCR (Fig. 7).

1. La solución de diálisis Extraneal produce una disminución del potencial de membrana mitocondrial.

La figura 2 muestra de forma gráfica los cambios producidos en el potencial de membrana mitocondrial tras la exposición a distintos líquidos de diálisis. Se probaron los líquidos DPCA 3, Physioneal y Extraneal. Los resultados obtenidos en cada caso fueron analizados estadísticamente y comparados con el potencial de membrana de las células que no fueron sometidas a ningún tratamiento. En dicha figura se aprecia claramente que los LDs DPCA3 y Physioneal no producen ninguna alteración mitocondrial a nivel de potencial de membrana mitocondrial de forma significativa. Contrariamente, el líquido Extraneal produce un descenso significativo en el potencial de membrana mitocondrial ( $P < 0.05$ ) de las células. El FCCP utilizado como estímulo despolarizador de la mitocondria para generar el control positivo causó el efecto esperado, por lo que se puede afirmar que el análisis citométrico se llevó a cabo correctamente.

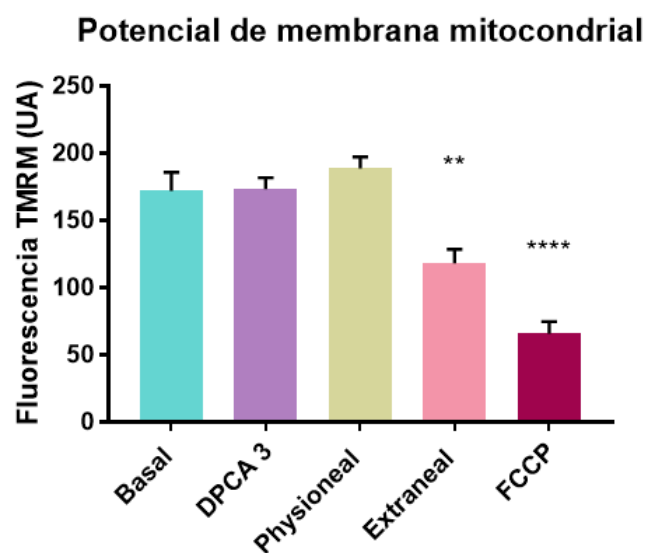


Figura 4: Cambios producidos en el potencial de membrana mitocondrial tras la exposición a distintos LDs. La gráfica muestra la media de los datos obtenidos mediante citometría de flujo  $\pm$  SEM ( $n=6$ ) \*\* $P=0,0026$ , \*\*\*\* $P=<0,0001$ . En el eje X se muestran los líquidos utilizados y en el eje Y la fluorescencia medida en UA (UnidadesArbitrarias)

Los resultados obtenidos pueden explicarse de forma razonable en base a las características fisicoquímicas propias de cada LD. El líquido Extraneal posee un alto porcentaje

de icodextrina (7.5%), elemento usado como agente osmótico, y tiene pH bajo [24]. Tanto la elevada concentración de icodextrina, como el pH ácido de la solución provocan bioincompatibilidad y toxicidad [23] [28], lo cual afecta negativamente a las células y conduce a una alteración del potencial de membrana mitocondrial [28]. Existen evidencias de que la disfunción mitocondrial y el daño oxidativo son causantes de procesos de inflamación crónicos, lo cual puede causar cambios morfológicos que afectan directamente a la estructura y a la funcionalidad de la membrana peritoneal. El deterioro progresivo de la misma provoca la pérdida de la capacidad de ultrafiltración de la membrana y, por tanto, hace totalmente inviable el proceso de diálisis peritoneal [29].

El líquido Extraneal no posee glucosa en su composición, sino que utiliza la icodextrina como agente osmótico. La icodextrina es una mezcla de polímeros de glucosa, que tiene mayor peso molecular y mayor radio hidrodinámico que la glucosa libre [30]. Debido a sus propiedades fisicoquímicas, la icodextrina es absorbida por la cavidad peritoneal más lentamente que la glucosa, lo cual supone cierta ventaja y parece adecuado en el caso de estancias de ultrafiltración frecuentes y prolongadas [30]. Además, la ausencia de glucosa implica, a su vez, la ausencia total de los productos de degradación de glucosa, ya que al no haber glucosa es imposible que los GDPs lleguen a formarse, siendo esta otra ventaja a tener en cuenta [30]. En oposición, el líquido Extraneal posee una serie de características citotóxicas y no fisiológicas, como su pH ácido de 5.6, y su elevada concentración en icodextrina, lo cual representa un inconveniente a la hora de llevar a cabo la diálisis peritoneal crónica. De la misma forma, el resto de LDs utilizados normalmente en la práctica clínica no son biocompatibles al 100% con las células mesoteliales del peritoneo humano. Es más, actualmente no existe ningún LD que sea biocompatible en su totalidad [23], por lo que investigaciones como la presente resultan de gran utilidad.

2. El RSV no proporciona un efecto protector significativo frente al daño producido por los líquidos de diálisis.

Además de la estimulación con LD, también se evaluó la acción del RSV como tratamiento antioxidante natural. En concreto, se analizó la capacidad del antioxidante como tratamiento preventivo, es decir, de forma previa a la exposición con la solución de diálisis; y la capacidad del RSV como tratamiento simultáneo. Para ello, se analizó el potencial de membrana mitocondrial de las células mediante citometría de flujo tras la estimulación celular.

En primer lugar, se realizó una preincubación de media hora con RSV, y posteriormente, se mantuvo la concentración de RSV durante todo el proceso de estimulación con las distintas soluciones de diálisis, tal y como se indicó con anterioridad. La figura 3 muestra los cambios producidos en el potencial de membrana mitocondrial tras la estimulación con RSV y con los distintos LDs. En ella se observa que el RSV no proporciona un efecto protector significativo frente al daño que producen los LDs en la membrana mitocondrial, o al menos no lo hace a la dosis y tiempo ensayado. A pesar de ello, se observa que existe una tendencia protectora en el caso del líquido Extraneal. Por otro lado, el FCCP utilizado como estímulo despolarizador de la mitocondria para generar el control positivo causó el efecto esperado, por lo que se puede afirmar que la citometría se llevó a cabo correctamente.

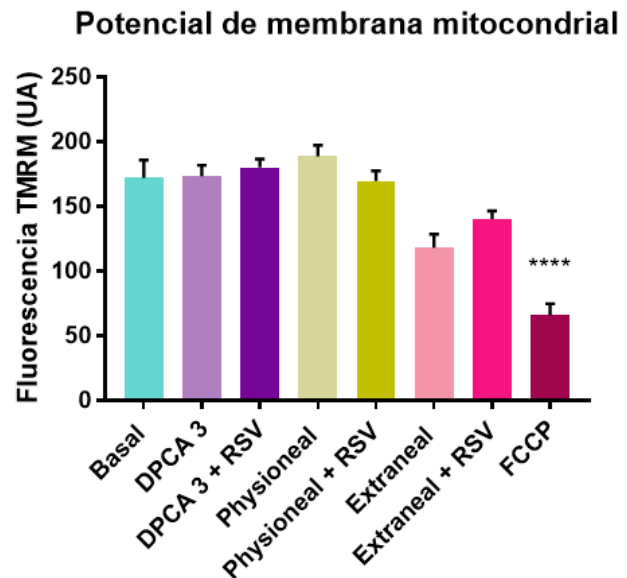


Figura 5: Cambios producidos en la membrana mitocondrial tras la estimulación con RSV y con LD. Los datos representados se corresponden con la media de los resultados obtenido mediante citometría de flujo  $\pm$  SEM (n=6), \*\*\*\*P<0.0001. En el eje X se exponen los estímulos aplicados a cada grupo de células y en el eje Y la fluorescencia medida en UA (Unidades Arbitrarias)

El resveratrol (trans-3,4', 5-trihidroxiestilbeno; RSV), una fitoalexina polifenólica natural que se encuentra en las uvas y en los frutos rojos, provoca varios efectos beneficiosos para la salud gracias a su capacidad antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena [31]. Consecuentemente, se han realizado diversos estudios en los que se utilizó RSV para tratar enfermedades como artritis [32] [33] [34], cáncer [31] [35] [36] o Alzheimer [37] [38], en los cuales se obtuvieron resultados positivos, evidenciando el gran potencial clínico que posee dicha sustancia. Con respecto a las afecciones derivadas del tratamiento de diálisis peritoneal, se sabe que el tratamiento con RSV induce mitofagia/autofagia mediante la activación de la proteína quinasa dependiente de adenosín monofosfato (AMPK), que atenúa el efecto de activadores inflamatorios como la IL-1 $\beta$  [39] y que mejora la inflamación vascular de la membrana peritoneal [40]. Sin embargo, el tratamiento con RSV no parece aportar efecto protector significativo frente al daño que produce la acción de las soluciones de diálisis en el potencial de membrana mitocondrial de las células MeT5A, o al menos, no lo hace a la

Influencia de los líquidos de diálisis sobre la disfunción mitocondrial y respuesta inflamatoria en células mesoteliales. Efecto de la dieta.

concentración y tiempo ensayado. En un futuro, sería interesante repetir este experimento variando la dosis ensayada, el tiempo de estimulación y la línea celular. También es cierto que, al utilizar LDs que no producen un daño excesivo en el potencial de membrana mitocondrial, no es posible ensayar adecuadamente el efecto protector y antioxidante del RSV, ya que como se ha comentado, si se compara el potencial de membrana mitocondrial de las células estimuladas con Extraneal, con el potencial de membrana mitocondrial de las células estimuladas con Extraneal+RSV, se aprecia un leve aumento del potencial de membrana mitocondrial en este último caso, aunque no lo hace de forma significativa.

3. La estimulación con los LDs no afecta a la cantidad de ROS producidos por la mitocondria en las células MeT5A.

Se midió la cantidad de ROS mitocondriales de las células MeT5A tras su estimulación con los distintos LD mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4. Tal y como se aprecia, el tratamiento con LDs no produce un aumento de la cantidad de ROS mitocondriales. El control positivo empleado, la Antimicina A, sí propició la producción de ROS mitocondriales en torno a los valores esperados, por lo que se puede concluir que, a pesar de haber obtenido resultados inesperados, la técnica se ha realizado correctamente. En ocasiones futuras, podría repetirse este experimento variando la concentración de LD, el tiempo de exposición y la línea celular. Por otro lado, las células de la línea MeT5A obviamente no responden de igual forma que lo harían las células mesoteliales de la membrana peritoneal de cultivo primario, debido a que las condiciones de cultivo distan evidentemente de las condiciones fisiológicas, por lo que sería interesante ensayar esta misma técnica sobre un cultivo primario.

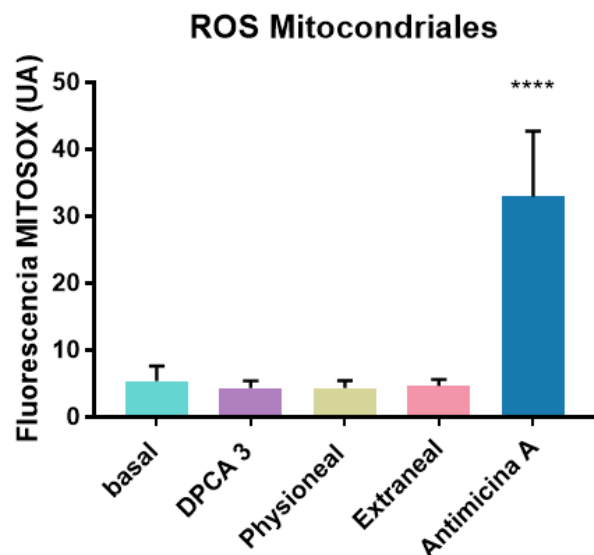


Figura 6: Cuantificación de ROS mitocondriales tras la exposición celular a los distintos LDs. Los resultados que se muestran en la gráfica se corresponden con la media de los datos obtenidos mediante citometría de flujo  $\pm$  SEM ( $n=6$ ), \*\*\*\* $P<0.0001$ . El eje X se corresponde con los estímulos aplicados a cada grupo celular y el eje Y con la fluorescencia medida en AU (Unidades Arbitrarias)



Se sabe que las mitocondrias son las principales fuentes de ROS y que, por lo tanto, están altamente involucradas en procesos de estrés oxidativo [14]. El exceso de ROS conduce a la oxidación de lípidos de membrana, proteínas y DNA<sub>mt</sub>. En particular, el DNA<sub>mt</sub> parece ser extremadamente sensible frente al daño oxidativo. De hecho, la acumulación de altos niveles de ROS se encuentra estrechamente relacionada con una mayor tasa de mutagénesis en el DNA<sub>mt</sub>, afectando a la integridad mitocondrial [41]. La disfunción mitocondrial conduce a la mutagénesis del genoma mitocondrial, afectando a genes que codifican complejos de cadenas respiratorias y comprometiendo la eficiencia de la actividad de fosforilación oxidativa. Todo ello, a su vez, puede conducir a la generación de mutaciones adicionales del genoma mitocondrial, aumentando el nivel de daño celular [42].

2. El tratamiento conjunto de IL-1β con LD Extraneal asevera el daño producido sobre las células MeT5A.

Durante el tratamiento de diálisis peritoneal, la propia manipulación mecánica relacionada con la implantación del catéter o el aumento de la presión en el interior del peritoneo debido a la presencia del LD, promueven la producción de mediadores inflamatorios, como por ejemplo la IL-1β. Por este motivo, resultó de gran interés analizar el efecto conjunto del LD Extraneal y de mediadores inflamatorios, que se producen de forma natural durante la diálisis, sobre las células mesoteliales.

Para estudiar ello, se estimularon las células tal y como se indica en la tabla 4, procedimiento explicado anteriormente con claridad en el mismo apartado. En resumen, se realizó una pre-incubación durante 30 min con RSV que, de nuevo, permitió estudiar el efecto preventivo de dicho antioxidante natural. Seguidamente, se realizó una incubación de 20 min con LD Extraneal al 100% de pureza. Finalmente, se realizó una dilución 1/2 del líquido Extraneal y se adicionaron los estímulos: IL-1β y/o RSV según procedía.

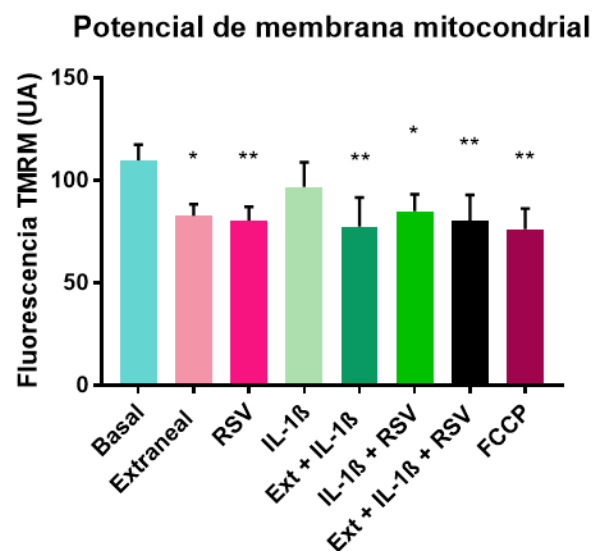


Figura 7: Cambios producidos en la membrana mitocondrial tras la estimulación con LD, IL-1β y/o RSV. Los datos representados se corresponden con la media de los resultados obtenido mediante citometría de flujo ± SEM (n=6), P<0.05. El eje X se corresponde con los estímulos aplicados a cada grupo celular y el eje Y con la fluorescencia medida en AU (Unidades Arbitrarias)

Influencia de los líquidos de diálisis sobre la disfunción mitocondrial y respuesta inflamatoria en células mesoteliales. Efecto de la dieta.

Se analizó el potencial de membrana mitocondrial de las células MeT5A mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5. En primer lugar, comentar que el FCCP utilizado como estímulo despolarizador de la mitocondria para generar el control positivo causó el efecto esperado, por lo que se puede afirmar que la citometría se llevó a cabo correctamente. De forma general, parece que todos los tratamientos, excepto el tratamiento con IL-1 $\beta$ , producen un descenso significativo del potencial de membrana mitocondrial con respecto al basal. Sin embargo, la acción conjunta de la solución de diálisis Extraneal y de la IL-1 $\beta$  produjo un descenso significativo del potencial de membrana mitocondrial, mayor que el que producen la solución de diálisis Extraneal y la IL-1 $\beta$  por separado. Dicha evidencia pone de manifiesto que el líquido Extraneal y la IL-1 $\beta$  actúan sinérgicamente (Fig. 6), produciendo un efecto más potente del que se cabría esperar de estos compuestos por separado. Por otro lado, la estimulación con RSV no parece proporcionar ningún tipo de efecto protector, al menos en las condiciones ensayadas, frente al daño producido por el LD Extraneal y por la IL-1 $\beta$  en el potencial de membrana mitocondrial de las células MeT5A. De nuevo, sería interesante ensayar en un futuro otras condiciones de estimulación, en las que se variara el tiempo de estimulación, así como la concentración del estímulo y la línea celular, para comprobar si el RSV podría proporcionar efecto protector en estas otras condiciones.

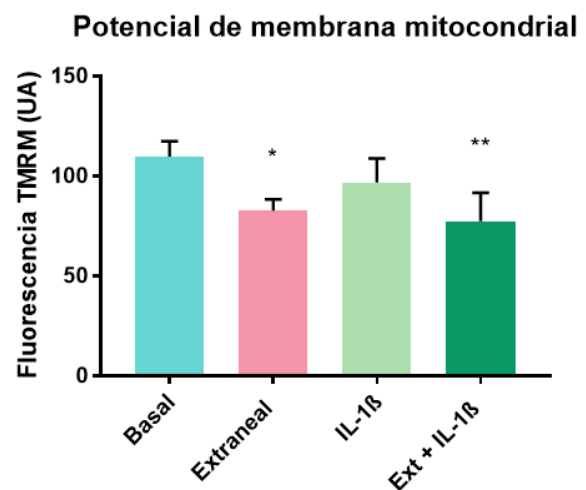


Figura 8: Efecto sinérgico de la IL-1 $\beta$  y la solución de diálisis Extraneal. El gráfico muestra las variaciones producidas en el potencial de membrana mitocondrial tras el tratamiento. En concreto, se expone la media de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo  $\pm$  SEM ( $n=6$ ). \* $P<0.0104$ , \*\* $P<0.0012$ . El eje X se corresponde con los estímulos aplicados a cada grupo celular y el eje Y con la fluorescencia medida en AU (Unidades Arbitrarias)

Tras obtener los primeros resultados que demostraban el efecto sinérgico de la IL-1 $\beta$  y del LD Extraneal, se decidió analizar la expresión génica de la IL-8, un mediador inflamatorio de gran importancia, para comprobar si el efecto conjunto de ambas sustancias también aumentaba sinérgicamente la expresión de dicho gen. Los resultados obtenidos a partir de la qPCR se exponen gráficamente en la figura 7. Tal y como se aprecia, ni el líquido Extraneal, ni el RSV, producen cambios sobre la expresión de la IL-8. Como era de esperar, la IL-1 $\beta$  utilizada

como control positivo causó un aumento de la expresión del mediador inflamatorio, lo que indica que el procedimiento experimental se llevó a cabo correctamente.

En primer lugar, a partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la acción conjunta de la solución de diálisis Extraneal y de la IL-1 $\beta$  produce un aumento significativo de la expresión de IL-8 (fig. 7A), ya que la expresión de dicho gen observada en el caso del control positivo es de aproximadamente la mitad. Teniendo en cuenta que el líquido Extraneal no parece afectar a la expresión de dicho mediador inflamatorio en las condiciones ensayadas, de nuevo se puede concluir que el LD Extraneal y la IL-1 $\beta$  producen una respuesta sinérgica (Fig. 7A). Durante el tratamiento dialítico, la propia manipulación mecánica relacionada con la implantación del catéter o el aumento de la presión en el interior del peritoneo debido a la presencia del LD, promueven la producción de mediadores inflamatorios, como por ejemplo la IL- 1 $\beta$

En segundo lugar, los resultados obtenidos permiten concluir que el RSV tiene efecto antiinflamatorio, y produce una disminución significativa de la expresión de IL-8 en el caso de las células tratadas con IL-1 $\beta$  (Fig. 7B), tal y como se esperaba. La acción individual del RSV no causa una variación significativa de la expresión de IL-8 con respecto al basal. Sí que se observa una subida ínfima, pero dicha tendencia podría explicarse mediante la suposición de que, en un primer contacto, el RSV tiene efecto prooxidante, siendo este el que pone en marcha los mecanismos de respuesta antiinflamatoria del organismo.

Sin embargo, contrariamente a lo esperado, se observa como el tratamiento conjunto con Extraneal, IL-1 $\beta$  y RSV aumenta, aunque no de forma significativa, la expresión de IL-8 (Fig. 7C). En este caso y en las condiciones ensayadas, la presencia de RSV no ofrece protección alguna frente a la respuesta inflamatoria ocasionada por la acción sinérgica del LD Extraneal y de la IL-1 $\beta$ , siendo cierto también que, la desviación estándar de los datos obtenidos en este caso es mayor que la del resto de casos estudiados. Lo ideal sería afinar al máximo la técnica y repetir el experimento al menos dos veces más, para poder descartar que se trate de un error experimental, y consolidar dicha respuesta celular como una tendencia claramente establecida.

Perfil de expresión de la IL-8

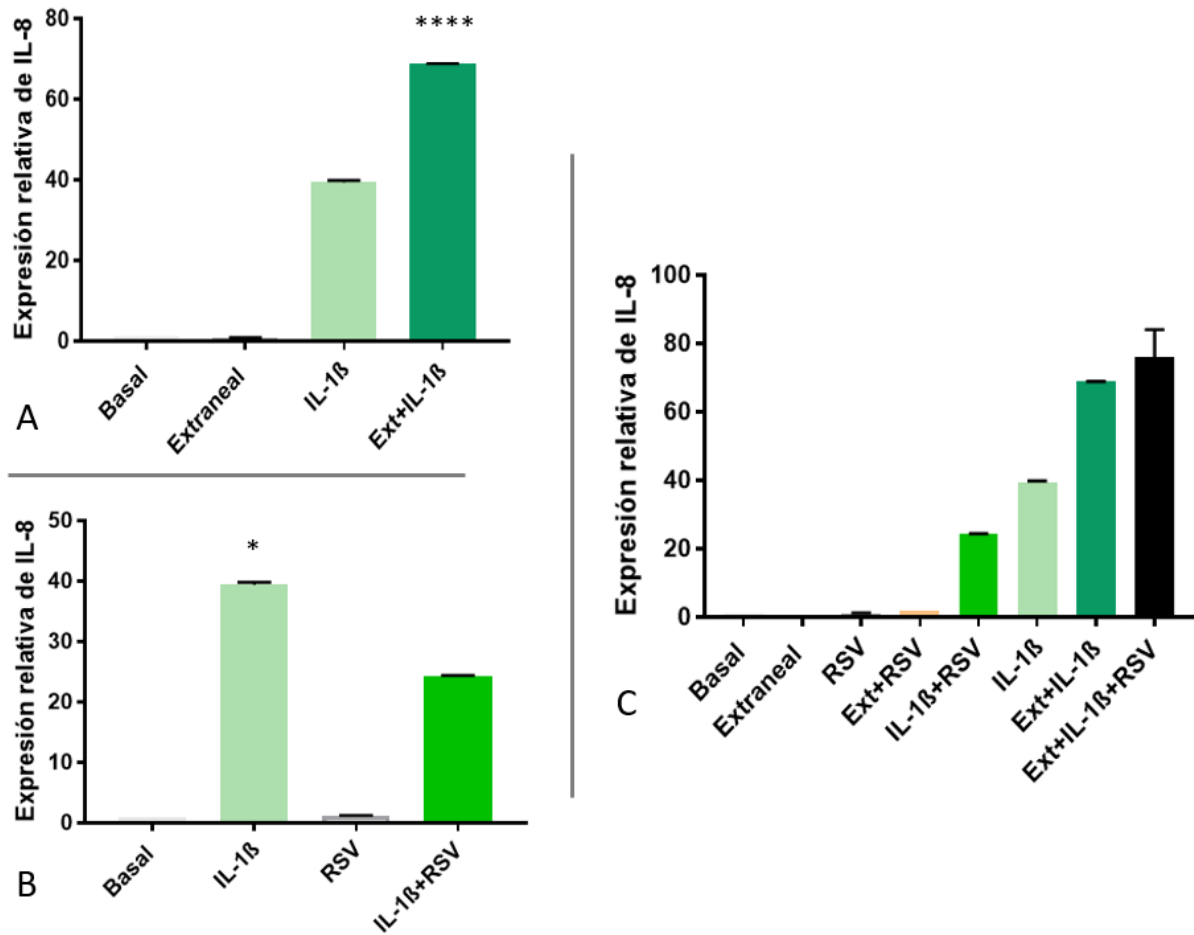


Figura 9: Variaciones producidas en la expresión génica de IL-8 en respuesta a la acción de diversos estímulos celulares. Los datos representados se corresponden con la media de los Cp obtenidos mediante q-PCR  $\pm$  SEM (n=3). \*P=0.0277, \*\*\*\*P<0.0001. En el eje X se representan los estímulos celulares aplicados a cada grupo de células MeT5A y en el eje Y la expresión relativa de IL-8 normalizada con respecto al basal. A. Variación de la expresión génica de IL-8 con respecto a la acción sinérgica del LD Extraneal y de la IL-1 $\beta$ . B. Variación de la expresión génica de IL-8 con respecto a la acción protectora del RSV en el caso del tratamiento con IL-1 $\beta$ . C. Variación de la expresión de IL-8 en todos los casos de estimulación ensayados.

## CONCLUSIONES

---

A partir del presente Trabajo de Fin de Máster en Biología Molecular, Celular y Genética se puede concluir qué:

1. La solución de diálisis Extraneal produce un descenso significativo del potencial de membrana mitocondrial de las células MeT5A.
2. La acción de la solución de diálisis Extraneal junto con mediadores pro-inflamatorios producidos en respuesta a la implantación del catéter abdominal y al propio proceso de diálisis peritoneal en sí, como la IL-1 $\beta$ , producen un efecto negativo sinérgico sobre las células MeT5A.
  2. 1. La acción conjunta de la solución de diálisis Extraneal y de la IL-1 $\beta$  conduce a un descenso significativo del potencial de membrana mitocondrial, mayor del que cabría esperar de la acción de ambos compuesto por separado.
  2. 2. La acción conjunta de ambos compuestos provoca que el gen de la IL-8 se exprese aproximadamente el doble con respecto a la acción de la solución de diálisis Extraneal y de la IL-1 $\beta$  por separado.
3. El RSV podría considerarse como posible tratamiento natural con elevado potencial antiinflamatorio, pero debido a la irregularidad de los resultados obtenidos, debería estudiarse en profundidad la dosis mínima efectiva, los niveles a partir de los cuales podría considerarse como una sustancia tóxica, así como su farmacocinética y su farmacodinámica.

Todo ello, permite concluir finalmente que determinados LDs con características bioincompatibles, utilizados de forma crónica durante el tratamiento de diálisis peritoneal, pueden provocar daño mitocondrial a través del incremento de estrés oxidativo y de mediadores inflamatorios, dando lugar a la disfunción mitocondrial de las células mesoteliales.

En el caso de que se quisieran realizar estudios y experimentos posteriores para continuar con el trabajo realizado, sería interesante analizar células procedentes de cultivos primarios obtenidos a partir de células mesoteliales del peritoneo de pacientes sometidos a tratamiento de diálisis peritoneal, así como el estudio de marcadores moleculares relacionados con el proceso de transición epitelio mesenquimal.

La importancia de la presente investigación reside en la posibilidad de optimizar el tratamiento de diálisis peritoneal, así como la producción de nuevos líquidos de diálisis con mayor grado de compatibilidad. Como consecuencia, se obtendría mayor eficiencia durante la ultrafiltración, mayor periodo de funcionalidad del tratamiento, cierta mejora del bienestar de los pacientes sometidos a tratamiento de diálisis peritoneal y un ahorro económico sustancial sobre el balance de gastos sanitarios en nuestro país.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] A. K. Singh, «Chronic Kidney Disease», en *Decision Making in Medicine*, Elsevier, 2010, pp. 352-353.
- [2] L. A. Stevens, C. Huang, y A. S. Levey, «Measurement and Estimation of Kidney Function», en *Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation*, Elsevier, 2010, pp. 22-38.
- [3] A. Otero, A. de Francisco, P. Gayoso, F. García, y EPIRCE Study Group, «Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study.», *Nefrología*, vol. 30, n.º 1, pp. 78-86, 2010.
- [4] A. B. Fogo, M. Kashgarian, A. B. Fogo, y M. Kashgarian, «Renal Transplantation», en *Diagnostic Atlas of Renal Pathology*, Elsevier, 2017, pp. 463-489.
- [5] C. C. Magee, «Selection of Patients for Transplantation», en *Decision Making in Medicine*, Elsevier, 2010, pp. 396-397.
- [6] J. Arrieta *et al.*, «Peritoneal dialysis is the best cost-effective alternative for maintaining dialysis treatment.», *Nefrología*, vol. 31, n.º 5, pp. 505-13, 2011.
- [7] D. L. Longo, *Harrison: principios de medicina interna*. McGraw-Hill Interamericana, 2012.
- [8] C. Ronco y W. R. Clark, «Haemodialysis membranes», *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 14, n.º 6, pp. 394-410, jun. 2018.
- [9] J. Loureiro *et al.*, «Blocking TGF- $\beta$ 1 protects the peritoneal membrane from dialysate-induced damage.», *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 22, n.º 9, pp. 1682-95, sep. 2011.
- [10] A. Pletinck, R. Vanholder, N. Veys, y W. Van Biesen, «Protecting the peritoneal membrane: factors beyond peritoneal dialysis solutions», *Nat. Rev. Nephrol.*, vol. 8, n.º 9, pp. 542-550, sep. 2012.
- [11] S. Yung y T. M. Chan, «Peritoneal proteoglycans: much more than ground substance.», *Perit. Dial. Int.*, vol. 27, n.º 4, pp. 375-90.
- [12] T. Dai *et al.*, «Janus kinase signaling activation mediates peritoneal inflammation and injury in vitro and in vivo in response to dialysate», *Kidney Int.*, vol. 86, n.º 6, pp. 1187-1196, dic. 2014.
- [13] T. I. Chang *et al.*, «The effect of statin on epithelial-mesenchymal transition in peritoneal mesothelial cells.», *PLoS One*, vol. 9, n.º 10, p. e109628, 2014.
- [14] M. J. López-Armada, R. R. Riveiro-Naveira, C. Vaamonde-García, y M. N. Valcárcel-Ares, «Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response», *Mitochondrion*, vol. 13, n.º 2, pp. 106-118, mar. 2013.

- [15] K.-Y. Hung, S.-Y. Liu, T.-C. Yang, T.-L. Liao, y S.-H. Kao, «High-dialysate-glucose-induced oxidative stress and mitochondrial-mediated apoptosis in human peritoneal mesothelial cells.», *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2014, p. 642793, may 2014.
- [16] Z. Dembic, «Cytokines of the Immune System», en *The Cytokines of the Immune System. The Role of Cytokines in Disease Related to Immune Response*, Elsevier, 2015, pp. 143-239.
- [17] H. Mirzaei, G. A. Ferns, A. Avan, y M. G. Mobarhan, «Cytokines and MicroRNA in Coronary Artery Disease», *Adv. Clin. Chem.*, vol. 82, pp. 47-70, ene. 2017.
- [18] E. N. Frankel y E. N. Frankel, «Introduction to antioxidants», *Antioxidants Food Biol.*, pp. 1-19, ene. 2012.
- [19] F. A. Galle, D. Martella, y G. Bresciani, «Modulación antioxidante y antiinflamatoria del ejercicio físico durante el envejecimiento», *Rev. Esp. Geriatr. Gerontol.*, jun. 2018.
- [20] F. Millán Parrilla, E. Quecedo Estébanez, y E. Gimeno Carpio, «Antioxidantes orales», *Piel*, vol. 22, n.º 2, pp. 95-99, feb. 2007.
- [21] G. Risuleo, «Resveratrol: Multiple Activities on the Biological Functionality of the Cell», *Nutraceuticals*, pp. 453-464, ene. 2016.
- [22] O. Busnadiago *et al.*, «A Pathogenetic Role for Endothelin-1 in Peritoneal Dialysis-Associated Fibrosis», *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 26, n.º 1, pp. 173-182, ene. 2015.
- [23] M. Nataatmadja, Y. Cho, y D. W. Johnson, «Evidence for Biocompatible Peritoneal Dialysis Solutions.», *Contrib. Nephrol.*, vol. 189, pp. 91-101, 2017.
- [24] A. O. A. Esmeralda Castillo Rodríguez, Catalina Martin Cleary, «Soluciones de Diálisis Peritoneal», n.º Tabla 2, 2017.
- [25] J. M. González de Buitrago y J. M. González de Buitrago, «Citometría de flujo», en *Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico*, Elsevier, 2010, pp. 307-316.
- [26] «Transcripción reversa - ES».
- [27] T. L. de Dios, «Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa y de la polimerasa a tiempo real.», vol. 2, pp. 70-78, 2013.
- [28] K. Chaudhary y R. Khanna, «Biocompatible peritoneal dialysis solutions: Do we have one?», *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 5, n.º 4, pp. 723-732, 2010.
- [29] L. S. Aroeira *et al.*, «Cyclooxygenase-2 mediates dialysate-induced alterations of the peritoneal membrane.», *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 20, n.º 3, pp. 582-92, 2009.
- [30] J. Morelle *et al.*, «Mechanisms of Crystalloid versus Colloid Osmosis across the Peritoneal Membrane», pp. 1-12, 2018.
- [31] S. Ji *et al.*, «Resveratrol promotes oxidative stress to drive DLC1 mediated cellular senescence in cancer cells», *Exp. Cell Res.*, jun. 2018.

Influencia de los líquidos de diálisis sobre la disfunción mitocondrial y respuesta inflamatoria en células mesoteliales. Efecto de la dieta.



- [32] R. R. Riveiro-Naveira *et al.*, «Resveratrol lowers synovial hyperplasia, inflammatory markers and oxidative damage in an acute antigen-induced arthritis model», *Rheumatology*, vol. 55, n.º 10, pp. 1889-1900, oct. 2016.
- [33] J. Tian, J. Chen, J. Gao, L. Li, y X. Xie, «Resveratrol inhibits TNF- $\alpha$ -induced IL-1 $\beta$ , MMP-3 production in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via modulation of PI3kinase/Akt pathway», *Rheumatol. Int.*, vol. 33, n.º 7, pp. 1829-1835, jul. 2013.
- [34] N. Elmali, O. Baysal, A. Harma, I. Esenkaya, y B. Mizrak, «Effects of Resveratrol in Inflammatory Arthritis», *Inflammation*, vol. 30, n.º 1-2, pp. 1-6, mar. 2007.
- [35] M. Elshaer, Y. Chen, X. J. Wang, y X. Tang, «Resveratrol: An overview of its anti-cancer mechanisms», *Life Sci.*, vol. 207, pp. 340-349, ago. 2018.
- [36] S.-R. Lee *et al.*, «Tristetraprolin activation by resveratrol inhibits the proliferation and metastasis of colorectal cancer cells», *Int. J. Oncol.*, jun. 2018.
- [37] R. Corpas, C. Griñán-Ferré, E. Rodríguez-Farré, M. Pallàs, y C. Sanfeliu, «Resveratrol Induces Brain Resilience Against Alzheimer Neurodegeneration Through Proteostasis Enhancement», *Mol. Neurobiol.*, jun. 2018.
- [38] H. Wang, T. Jiang, W. Li, N. Gao, y T. Zhang, «Resveratrol attenuates oxidative damage through activating mitophagy in an in vitro model of Alzheimer's disease», *Toxicol. Lett.*, vol. 282, pp. 100-108, ene. 2018.
- [39] J. Wu, X. Li, G. Zhu, Y. Zhang, M. He, y J. Zhang, «The role of Resveratrol-induced mitophagy/autophagy in peritoneal mesothelial cells inflammatory injury via NLRP3 inflammasome activation triggered by mitochondrial ROS», *Exp. Cell Res.*, vol. 341, n.º 1, pp. 42-53, feb. 2016.
- [40] N. Rabbani y P. J. Thornalley, «Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease», *Kidney Int.*, vol. 93, n.º 4, pp. 803-813, abr. 2018.
- [41] G. C. Kujoth *et al.*, «Mitochondrial DNA Mutations, Oxidative Stress, and Apoptosis in Mammalian Aging», *Science (80- )*, vol. 309, n.º 5733, pp. 481-484, jul. 2005.
- [42] G. Escames, L. C. López, J. A. García, L. García-Corzo, F. Ortiz, y D. Acuña-Castroviejo, «Mitochondrial DNA and inflammatory diseases», *Hum. Genet.*, vol. 131, n.º 2, pp. 161-173, feb. 2012.
- [43] «Qué es diálisis peritoneal? | Dialisisyhemodialisis's Blog», 2010. [En línea]. Disponible en: <https://dialisisyhemodialisis.wordpress.com/2010/10/16/que-es-dialisis-peritoneal/>. [Accedido: 06-jul-2018].

Influencia de los líquidos de diálisis sobre la disfunción mitocondrial y respuesta inflamatoria en células mesoteliales. Efecto de la dieta.