



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

## **Grao en Bioloxía**

### **Memoria do Traballo de Fin de Grao**

**Niveles ex vivo de marcadores autofágicos en células  
mesoteliales humanas**

**Niveis ex vivo de marcadores autofágicos en células mesoteliais  
humanas**

**Ex vivo levels of autophagic markers in human mesothelial cells**

**Rocío Carreja Álvarez**

**Curso: 2020-2021 Convocatoria: xullo**

*Director 1: María José López Armada*

*Director 2: Antonio Manuel Castro Castro*

D. Antonio Manuel Castro Castro, Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Biología de la Universidad de A Coruña, y Dña. María José López Armada, Investigadora del INIBIC (Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña),

INFORMAN,

Que el Trabajo de Fin de Grado presentado por Rocío Carreja Álvarez y con título "*Niveles ex vivo de marcadores autofágicos en células mesoteliales humanas*" ha sido realizado bajo nuestra dirección y, considerándolo finalizado, autorizamos su envío y presentación al tribunal calificador correspondiente.

Y, para que así conste, expedimos el presente informe en A Coruña a 22 de julio de 2021.

CASTRO CASTRO  
ANTONIO  
MANUEL - DNI  
32823383Z

Firmado digitalmente por  
CASTRO CASTRO  
ANTONIO MANUEL - DNI  
32823383Z  
Fecha: 2021.07.22  
17:32:06 +02'00'

Fdo. Antonio Manuel Castro Castro.

LOPEZ ARMADA  
MARIA JOSE -  
08029604M

Firmado digitalmente por  
LOPEZ ARMADA MARIA  
JOSE - 08029604M  
Fecha: 2021.07.22 17:22:36  
+02'00'

Fdo. María José López Armada

# ÍNDICE

Resumen .....	1
1. Introducción .....	3
1.1 El envejecimiento y su relación con las enfermedades renales .....	3
1.2 Diálisis peritoneal y transición epitelio-mesenquimal .....	4
1.3 Autofagia .....	6
2. Objetivos .....	7
3. Material y métodos .....	8
3.1 Obtención de muestras peritoneales y cultivo de células mesoteliales .....	8
3.2 Procesamiento de las muestras del efluente de la bolsa de drenado .....	8
3.3 Estudio proteico. Western Blot .....	9
3.3.1 Extracción y cuantificación de proteínas .....	10
3.3.2 Electroforesis SDS-PAGE .....	10
3.3.3 Transferencia a la membrana .....	11
3.3.4 Inmunodetección .....	12
3.3.5 Cuantificación de la señal .....	13
3.4 Análisis estadístico .....	13
4. Resultados .....	13
4.1 Expresión proteica de marcadores de la transición epitelio-mesenquimal .....	13
4.2 Expresión proteica de marcadores autofágicos .....	15
5. Discusión .....	17
6. Conclusiones .....	21
7. Bibliografía .....	22

## Resumen

La diálisis peritoneal es uno de los tratamientos a los que los pacientes con una enfermedad renal crónica pueden ser sometidos. Pese a las numerosas ventajas que presenta sobre la hemodiálisis, es menos utilizada debido a las dificultades que puede suponer la técnica. Las complicaciones infecciosas y las características bioincompatibles del líquido de diálisis inducen un deterioro progresivo en la membrana peritoneal, como consecuencia de la transición epitelio-mesenquimal (TEM), que puede conducir a un fallo de ultrafiltración. La producción de especies reactivas de oxígeno por parte de la mitocondria juega un papel fundamental como detonante de la inflamación característica de este proceso. Se ha demostrado que la autofagia regula la activación de inflamasomas como forma para limitar la inflamación. El objetivo de este proyecto es determinar si unos niveles bajos de autofagia pueden estar implicados en el estrés oxidativo que provoca la pérdida de la integridad física del tejido peritoneal. Para ello, se analizaron mediante Western-Blot los niveles de expresión de los marcadores autofágicos p62 y LC3 en células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal de pacientes en diálisis peritoneal. El análisis de los marcadores autofágicos p62 y LC3 permitió detectar una inhibición de la autofagia en las células mesenquimales (fibroblastos) en comparación con las células epiteliales.

**Palabras clave:** Diálisis peritoneal, Transición epitelio-mesenquimal, Inflamación, Autofagia.

## Resumo

A diálise peritoneal é un dos tratamentos aos que os pacientes cunha enfermidade renal crónica poden ser sometidos. Pese as súas beneficiosas vantaxes fronte á hemodiálise, é menos empregada debido as dificultades nas que pode derivar a técnica. As complicacións infecciosas e as características bioincompatibles do líquido de diálise inducen unha deterioración progresiva na membrana peritoneal, como resultado da transición epitelio-mesenquimal (TEM), que conduce a un fallo de ultrafiltración. A produción de especies reactivas de osíxeno pola mitocondria xoga un papel fundamental como detonante da característica inflamación deste proceso. Demostrouse que a autofaxia regula a activación de inflamasomas como forma de limitar a inflamación. O obxectivo deste proxecto é determinar se uns niveis baixos de autofaxia poden estar

implicados no estrés oxidativo que supón a pérdida da integridade física da membrana peritoneal. Para isto, analizáronse mediante un Western-Blot os niveis de expresión dos marcadores autofáxicos p62 e LC3 en células mesoteliais procedentes do efluente peritoneal de pacientes en diálise peritoneal. A análise dos marcadores autofáxicos p62 e LC3 logrou detectar una inhiçión da autofaxia nas células mesenquimáis (fibroblastos) en comparanza coas células epiteliais.

**Palabras clave:** Diálise peritoneal, Transición epitelio-mesenquimal, Inflamación, Autofaxia.

## Summary

Peritoneal dialysis is one of the treatments that patients with chronic kidney disease can undergo. Despite its many advantages over haemodialysis, it is less widely used due to the difficulties that the technique can entail. Infectious complications and the bioincompatible characteristics of the dialysis fluid induce a progressive deterioration in the peritoneal membrane, as a consequence of epithelial-mesenchymal transition (EMT), which can lead to ultrafiltration failure. The production of reactive oxygen species by mitochondria plays a key role in triggering the inflammation characteristic of this process. Autophagy has been shown to regulate inflammasome activation as a way to limit inflammation. The aim of this project is to determine whether low levels of autophagy may be involved in the oxidative stress that leads to loss of physical integrity of peritoneal tissue. For this purpose, the expression levels of the autophagic markers p62 and LC3 in mesothelial cells from peritoneal effluent of patients undergoing peritoneal dialysis were analysed by Western-Blot. Analysis of the autophagic markers p62 and LC3 detected an inhibition of autophagy in mesenchymal cells (fibroblasts) compared to epithelial cells.

**Keywords:** Peritoneal dialysis, Epithelial-mesenchymal transition, Inflammation, Autophagy.

# 1. Introducción

## 1.1 El envejecimiento y su relación con las enfermedades renales

En las últimas décadas se ha experimentado un aumento progresivo de la esperanza de vida, por lo que se ha producido un envejecimiento significativo de la población (1). En el año 2018, el número de personas mayores de 65 años superó, por primera vez en la historia, al de 5 años en todo el mundo (2). La población española no es una excepción y, según las estimaciones del Instituto Nacional de Estadística (INE), a mitad de siglo las personas mayores de 65 años pasarán del 19,3% al 29,4% (3).

Paralelamente al envejecimiento de la población ciertas patologías crónicas presentan una tendencia ascendente representando el 80% de las consultas de Atención Primaria. Además, estas enfermedades de carácter crónico suponen la mayor causa de mortalidad en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2008, 36 millones de personas murieron como consecuencia de una enfermedad crónica, de las cuales 27 millones se concentraron en las personas mayores de 60 años. (4)

La enfermedad renal crónica (ERC) no es una excepción y continúa aumentando a nivel mundial suponiendo un grave problema de salud pública (5). Concretamente en España su prevalencia ya alcanza las 1367 personas por millón (6), afectando aproximadamente al 10% de la población adulta y a más del 20% de los mayores de 60 años (5). La ERC se considera el destino final común a una concatenación de patologías que afectan al riñón de manera crónica e irreversible (7) en la cual se produce la pérdida progresiva, permanente e irreversible de la tasa de filtración glomerular durante un tiempo variable, expresado por una reducción del aclaramiento de creatinina estimado  $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$  (8). También se puede definir como la presencia de una alteración estructural o funcional renal que persiste durante más de 3 meses. Muchos factores clásicos como la diabetes, la hipertensión o la obesidad multiplican el riesgo (5). Además, se ha observado una relación continua y creciente entre la prevalencia de la ERC y la acumulación de factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares que aumenta la posibilidad de sufrir morbimortalidad cardiovascular (9).

Para reemplazar la función de los riñones, más de 64000 personas en España se encuentran en tratamiento renal sustitutivo, que puede realizarse mediante tres modalidades fundamentales: trasplante, hemodiálisis y diálisis peritoneal (DP) (6). La opción preferente en términos de eficacia sería el trasplante, pero debido a la carencia de suficientes órganos para realizarlo, los largos tiempos de espera y que no siempre el

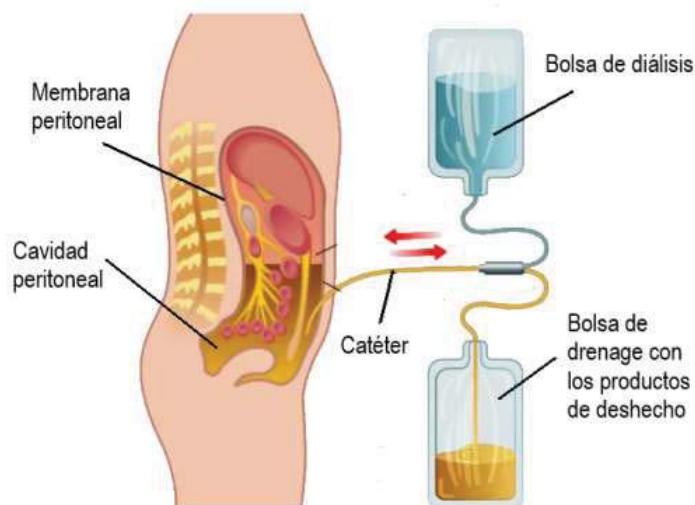
paciente tiene acceso potencial a este tratamiento, el trasplante renal sólo es aplicable a menos del 20% de los pacientes (10). Por ello, la mayor parte de las personas que padecen ERC deben someterse a un tratamiento de diálisis que se basa en la difusión de partículas y la filtración de fluidos a través de membranas semipermeables mediante el proceso conocido como ósmosis (11). En la hemodiálisis la filtración de los productos de deshecho se realiza de manera extracorpórea en una máquina que contiene una membrana artificial donde se produce la diálisis con el consiguiente regreso de la sangre al organismo una vez que ha sido depurada. Por otra parte, en la DP se utiliza el propio peritoneo a modo de membrana semipermeable a través de la cual se ponen en contacto el líquido de diálisis y la sangre (12).

## 1.2 La diálisis peritoneal y la transición epitelio-mesenquimal

La diálisis peritoneal es mucho menos costosa que la hemodiálisis siendo equivalente en términos de eficacia dialítica y morbimortalidad. Asimismo, una de las mayores ventajas que ofrece la DP es que el paciente puede permanecer en su casa sin verse en la necesidad de interrumpir sus actividades diarias para acudir al hospital (13). Pese a este beneficio su uso no es comparable al de la hemodiálisis debido a las dificultades que puede suponer la técnica. Las complicaciones infecciosas, principalmente la peritonitis, y las características bioincompatibles del líquido de diálisis (LD) pueden inducir un deterioro progresivo en la membrana que conduce a lo que se conoce como fallo de ultrafiltración (14). Por ello, mejorar la integridad de la membrana peritoneal o peritoneo incrementaría el tiempo que los pacientes pueden ser sometidos a DP, además de proporcionar acceso a diálisis a un mayor número de pacientes.

El peritoneo es una membrana continua serosa, formada por tejido conjuntivo, que rodea la cavidad peritoneal, lugar donde se alojan las vísceras abdominales. Está constituido por una sola capa de células mesoteliales bajo la cual se encuentra una capa submesotelial con vasos sanguíneo y linfáticos (15). Como se mencionó anteriormente, en la DP se utiliza esta delicada estructura a modo de membrana semipermeable que permite eliminar las sustancias tóxicas gracias a su capacidad dialítica (12). Como primer paso se coloca quirúrgicamente un catéter en la cavidad peritoneal a través del cual se infunde el LD (**figura1**). El líquido de diálisis presenta una composición específica que genera un gradiente osmótico que permite el intercambio de solutos y agua entre la sangre y el LD. La solución permanece en el abdomen por varias horas absorbiendo los productos de

deshecho y las toxinas que el riñón de estos pacientes no es capaz de eliminar. Posteriormente es drenado y eliminado en otra bolsa diferente (16).



**Fig 1: Representación esquemática de la diálisis peritoneal.** El líquido de diálisis es infundido a la cavidad peritoneal a través de un catéter. Gracias a las características de la membrana se produce el intercambio de sustancias y los productos de deshecho son eliminados del organismo depositándose en la bolsa de drenado. *Imagen modificada de <https://www.assocarenews.it/primo-piano/pazienti/dialisi-peritoneale-come-rimuovere-i-prodotti-di-scarto-nel-flusso-ematico>*

Sin embargo, para permitir la filtración de las sustancias tóxicas a través de la membrana peritoneal, el LD presenta una composición hipertónica que se caracteriza por la presencia de altos niveles de un agente osmótico, siendo el más frecuente la glucosa, con concentraciones superiores entre 10 y 50 veces a las concentraciones séricas fisiológicas (17). Otro factor que puede influir en la toxicidad del LD es la esterilización por calor del mismo, que supone la transformación de la glucosa en productos de degradación de la glucosa (GDP<sub>s</sub>) que a su vez promueven la formación de productos de glucosilación avanzada (AGE<sub>s</sub>) (18). Se ha demostrado que todas estas características terminan por modificar la membrana peritoneal favoreciendo la aparición de cambios estructurales y funcionales a medio y largo plazo (19).

Además, los niveles altos de glucosa promueven un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de la mitocondria, provocando un estrés oxidativo celular cada vez mayor (20) que, acompañado de la presencia de GDPs y AGEs, genera un estado crónico de inflamación peritoneal (21). Esta circunstancia se caracteriza por el aumento de la expresión de estímulos proinflamatorios. Durante la respuesta inmune fagocitos mononucleares, linfocitos y neutrófilos promueven la síntesis de citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas. Concretamente la interleuquina (IL-1 $\beta$ ) junto con otras citoquinas como IL-18 e IL-6, el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y el factor de



crecimiento endotelial (VEGF) suponen la base molecular de la inflamación (22). La síntesis y secreción continua de dichas moléculas genera un bucle de retroalimentación que deriva en cambios tisulares y estructurales tales como angiogénesis y fibrosis como consecuencia de la transición epitelio-mesenquimal (TEM) que sufren las células del peritoneo (23).

La transición epitelio-mesenquimal es un proceso biológico mediante el cual las células mesoteliales de la membrana peritoneal adquieren un fenotipo mesenquimal produciéndose múltiples cambios entre los que se encuentran: pérdida de la polaridad celular, adquisición de capacidad migratoria e invasora, mayor resistencia a la apoptosis y producción de matriz extracelular (24). Las células epiteliales, bajo la influencia de citoquinas proinflamatorias y estímulos profibróticos, se separan progresivamente para acumularse en el intersticio tisular donde adquieren un fenotipo miofibroblástico y sintetizan una matriz rica en colágeno, fibronectina y factores profibróticos (25). La transformación de las células mesoteliales a fibroblastos se caracteriza por el incremento de la proteína Snail, que es un represor de la transcripción del marcador epitelial E-cadherina cuya pérdida ayuda a adoptar un fenotipo mesenquimal (26). Molecularmente, la TEM se caracteriza por el aumento de la expresión de marcadores mesenquimales como fibronectina y  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) y la reducción de marcadores epiteliales como la E-cadherina (25). Estructuralmente, la producción excesiva de matriz supone la destrucción de la conformación normal del tejido lo cual provoca la pérdida de la integridad de la membrana peritoneal (27). Como consecuencia, se deterioraría gradualmente la capacidad dializante dando lugar al fallo de ultrafiltración.

### 1.3 Autofagia

La autofagia es un proceso altamente conservado de reciclaje presente en todas las células eucariotas en la que los componentes citoplasmáticos dañados o prescindibles son secuestrados por autofagosomas para posteriormente ser degradados en los lisosomas. En las células de mamíferos existen tres tipos principales de autofagia: la microautofagia, la macroautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (33) y, aunque son morfológicamente distintas todas desembocan en la entrega de la carga al lisosoma para su degradación y reciclaje (28).

La macroautofagia es la modalidad más estudiada y conocida y comienza cuando el material intracelular que va a ser degradado es englobado por una doble membrana que forma un autofagosoma. Posteriormente el autofagosoma se fusiona con el lisosoma, un orgánulo que contiene las enzimas hidrolíticas necesarias para degradar el material

celular. Finalmente, el autofagolisosoma resultante y los productos finales de la degradación salen al citoplasma donde pueden ser reciclados y utilizados en nuevos procesos celulares (29).

La autofagia desempeña un papel delicado en la regulación de la supervivencia y la muerte celular. En condiciones normales la macroautofagia ayuda al mantenimiento celular degradando específicamente los orgánulos dañados, por lo que se considera que en la mayoría de los casos representa una función citoprotectora. No obstante, el envejecimiento, enfermedades metabólicas como la diabetes y otras patologías humanas entre las que se incluyen enfermedades renales, pueden ocasionar disfunción autofágica (28).

La proteína asociada a los microtúbulos 1 de cadena ligera 3 (LC3) y la p62 son dos importantes reguladores de la vía autofágica que pueden utilizarse como marcadores biológicos para identificar la autofagia en sistemas de mamíferos (29). Cabe destacar que LC3 presenta dos formas: la inactiva LC3-I (localizada en el citoplasma), que se convierte a la forma lipidada LC3-II (localizada en las membranas autofágicas) (30). Durante la autofagia, la proteína LC3 citoplasmática se lipida y se recluta en las membranas autofagosómicas. Por otro lado, la proteína p62, asociada a la ubiquitina, se une a LC3 ayudando a monitorizar el flujo autofágico. (31)

Se ha demostrado que la autofagia regula la activación de inflamasomas como forma para limitar la inflamación. El inflamasoma es una plataforma proteica que cuando es activada conduce a la liberación de las citoquinas IL-1 $\beta$  e IL-18, claves en el desarrollo de la inflamación (32). La autofagia puede destruir las mitocondrias dañadas para evitar la liberación de activadores del inflamasoma tales como ROS (33). En el caso de la DP cabría esperar que la eliminación selectiva de las mitocondrias dañadas por el estrés oxidativo, que participan en el estado de inflamación de la membrana peritoneal, pudiera suponer una correcta homeostasis de las células mesoteliales. (34). No obstante, existen estudios contradictorios sobre el papel que puede llevar a cabo la autofagia en el remodelado de la membrana peritoneal por lo que resulta imprescindible seguir investigando.

## 2. Objetivos

Las células mesoteliales de la membrana peritoneal de pacientes sometidos a diálisis peritoneal terminan por perder sus características, adquiriendo un fenotipo fibroblástico

como consecuencia de un estado crónico de inflamación. La contrapartida funcional de esta situación es una pérdida progresiva de la capacidad dialítica de la membrana peritoneal, lo que puede conducir al fallo de ultrafiltración poniendo en peligro la supervivencia de la técnica.

El papel que juega la autofagia en este proceso no está claro, por lo que es necesario conocer si una reducción en su actividad puede contribuir a una exacerbación de la respuesta inflamatoria, dando lugar a un fallo en la homeostasis de las células mesoteliales que termine por desencadenar un fallo de membrana. Por lo tanto, el principal objetivo de este trabajo es ***evaluar los niveles ex vivo de ciertos marcadores autofágicos en células mesoteliales humanas procedentes del fluido de drenaje de pacientes sometidos a diálisis peritoneal.***

### 3. Material y métodos

#### 3.1 Obtención de muestras de efluentes peritoneales y cultivo de células mesoteliales

Las células mesoteliales fueron aisladas del fluido de drenaje de pacientes sometidos a diálisis peritoneal de la Unidad de Diálisis del Hospital Universitario A Coruña (CHUAC). Al proceder de la descamación de la membrana peritoneal, estas muestras son especialmente interesantes para poder realizar estudios *ex vivo* que analicen el estado celular del peritoneo del paciente. Tras el procesamiento de las muestras, las células mesoteliales se cultivaron en el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) enriquecido con un 20% de suero bobino fetal (SBF) inactivado previamente durante 40 minutos (min) a 55°C, y suplementado con 1% de penicilina-estreptomicina (P/E) y 0,3% de insulina humana. El procedimiento fue aprobado por el Comité Ético de Investigación de A Coruña y Ferrol (Código de registro: 2014/454) y se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes.

#### 3.2 Procesamiento de las muestras del efluente de la bolsa de drenado

Para realizar los experimentos que sean de nuestro interés es preciso aislar las células mesoteliales con las que se trabajará. Además, para la correcta documentación del

proceso es necesario identificar el paciente del cual procede la muestra y registrar la mayor información posible: fecha de recogida, tipo de muestra según procedencia ( primera conexión, entrenamiento, intercambio nocturno o teste de equilibrio peritoneal) y parámetros fisiológicos del líquido de diálisis y clínicos del paciente.

Para lograr el aislamiento de las células el primer paso fue trasvasar el contenido de las bolsas de drenado a botes de 500 ml en condiciones de esterilidad para lo cual se trabajó en una campana de gases. Posteriormente, se centrifugaron los botes durante 10 min a 1500 rpm, tras lo cual se obtuvo un sobrenadante y un pellet de células. Con el objetivo de obtener una muestra más limpia y concentrada se resuspendió el pellet celular en medio RPMI en un tubo falcon que se centrifugó de nuevo durante 10 min a 1500 rpm. Tras desechar el sobrenadante y añadir de nuevo medio RPMI para que las células no se sequen, se sembraron 500  $\mu$ l en placas de cultivo de 48 pocillos. Posteriormente las células se mantuvieron en estufa humidificada al 5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C .

Las células obtenidas proceden de la descamación del peritoneo, por lo que tras 24 horas se necesita hacer un lavado enérgico con tampón fosfato salino pH 7 1x (PBS) para eliminar los restos de sangre que pueden permanecer. Se reemplazó el medio de cultivo cada dos días hasta que las células alcanzaron una confluencia del 80% aproximadamente, momento en el cual se procedió a realizar los experimentos. Adicionalmente las células mesoteliales se clasificaron según su morfología en epiteliales, mixtas o fibroblastos mediante microscopia de contraste. La caracterización fenotípica de las células nos permite intuir el estado de la TEM ya que las células epiteliales típicas de un peritoneo sano poseen una forma redondeada sin apenas espacios intercelulares entre ellas, mientras que los fibroblastos en los que se transforman tienen una apariencia fusiforme muy reconocible (23). Posteriormente, para corroborar el estado de la TEM se analizó la expresión del marcador epitelial E-cadherina y del marcador mesenquimal fibronectina mediante Western Blot .

### 3.3 Estudio proteico. Western Blot.

Los estudios de expresión de nuestras proteínas de interés se llevarán a cabo mediante la técnica de Western Blot, que consta de varias etapas: extracción y cuantificación de la concentración proteica, electroforesis en gel para separar las proteínas en función de su peso molecular, transferencia de dicho gel a una membrana, detección de las proteínas mediante su unión a anticuerpos y cuantificación de la señal expresada.

### 3.3.1 Extracción y cuantificación de proteínas

Una vez las células alcanzaron una confluencia del 80% fue el momento de utilizarlas realizando en primera instancia un lavado con PBS. La extracción de proteínas requiere un proceso inicial de rotura celular que se realizó con tripsina, una enzima peptidasa que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis. Para ello se añadieron 100  $\mu$ l de tripsina a cada pocillo de la placa, la cual se incubó durante 2 min en la estufa a 37 °C. Posteriormente se inactivó dicha tripsina con 200  $\mu$ l de medio de cultivo RPMI. Las células obtenidas se centrifugaron durante 10 min a 1500 rpm obteniéndose un pellet que se lavó con PBS y se centrifugó de nuevo durante 5 min a 1500rpm. A continuación, se resuspendió el pellet en 40  $\mu$ l de buffer de lisis cuya composición se indica en la tabla 1 del anexo. El siguiente paso consistió en hervir las muestras en un termobloque durante 5 min a 100°C. Pasado este tiempo, se volvió a centrifugar las muestras durante 10 min a 13000 rpm a 4°C. En este caso se desechó el pellet obtenido y se cuantificaron las proteínas contenidas en el sobrenadante en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000, midiendo su absorbancia a 280 nm. Finalmente, las muestras fueron congeladas a -80°C hasta el momento de su utilización.

### 3.3.2 Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis es una técnica de laboratorio empleada para separar biomoléculas por su tamaño y carga gracias a la aplicación de una corriente a través de un gel que contiene las moléculas de interés. En este caso las proteínas de las muestras se separaron según su tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), lo cual permite determinar su peso molecular (Pm) al compararlo con el de un marcador conocido, que en nuestro caso fue el NZY Colour Protein Marker II. El gel en el que se van a desplazar las proteínas consta de dos fases: fase superior o stacking, cuya función es concentrar las proteínas para facilitar su entrada en la siguiente fase, y fase separadora o running, donde se va a producir la separación de las proteínas. Para el gel de la fase superior, cuya composición se especifica en la tabla 2 del anexo, se usó un porcentaje de acrilamida del 6% mientras que, para el gel de la fase inferior, cuya composición se especifica en la tabla 3 del anexo, se utilizó un porcentaje de acrilamida del 12%. En primer lugar, de entre todas las muestras de pacientes, se seleccionaron 7 con células de fenotipo fibroblasto y 6 con células de fenotipo epitelial. De cada muestra se preparó un extracto que contuviese 30  $\mu$ g de proteína al que se le añadió 1/3 de su volumen de una mezcla de dos componentes:  $\beta$ -mercaptoetanol y buffer de carga Laemmli Buffer 4x, preparada en una proporción 1:10. Los cálculos de los volúmenes

utilizados se recogen en la **tabla 1**. El  $\beta$ -mercaptoetanol se usa como agente reductor para asegurar la desnaturalización de las proteínas mientras que el buffer de carga provoca que las proteínas se tiñan de azul, lo cual permite monitorizar su avance por el gel durante la electroforesis. La mezcla total se hirvió en termobloque durante 5 min a 95°C.

**Tabla 1.** Volumen de extracto proteico necesario para 30 $\mu$ g de proteína junto con el volumen de mezcla necesario para dicha concentración.

Paciente	Fenotipo	Tipo de muestra	Concentración	Vol. para 30 $\mu$ g	Vol. mezcla	vol. total
698	Epitelial	PET	5,43	5,52	1,84	7,37
696	Epitelial	1ª conexión	7,50	4,00	1,33	5,33
680	Epitelial	PET	4,35	6,90	2,30	9,20
657	Epitelial	PET	4,27	7,03	2,34	9,37
630	Epitelial	PET	4,35	6,90	2,30	9,20
629	Epitelial	PET	5,13	5,85	1,95	7,80
624	Epitelial	PET	3,02	9,93	3,31	13,25
686	Fibroblasto	PET	2,45	12,24	4,08	16,33
665	Fibroblasto	PET	3,65	8,22	2,74	10,96
647	Fibroblasto	PET	1,91	15,71	5,24	20,94
621	Fibroblasto	PET	5,79	5,18	1,73	6,91
608	Fibroblasto	PET	3,55	8,45	2,82	11,27
438	Fibroblasto	PET	5,09	5,98	1,96	7,86
556	Fibroblasto	PET	6,48	4,63	1,54	6,17
667 (C)	Epitelial	PET	5,18	5,79	1,93	7,72

Una vez que las muestras han sido preparadas, el siguiente paso fue rellenar la cubeta de electroforesis del sistema Mini-Protean III con running buffer 1x cuya composición se muestra en la tabla 4 del anexo. A continuación, se cargaron las muestras en los pocillos del gel, al cual se aplicó una carga de 100 voltios (V) durante 20 min para que las muestras se concentrasen en el stacking y así facilitar el desplazamiento en la siguiente fase. Pasado este tiempo se aumentó la potencia a 120V hasta que las proteínas alcanzaron la parte interior de la fase running.

### 3.3.3 Transferencia a la membrana

Tras la separación de las proteínas mediante la electroforesis el siguiente paso fue la transferencia del gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF). En primera instancia tuvo lugar la activación de la membrana, cuyo proceso se llevó a cabo en tres pasos: un baño de 5 min en metanol, un baño de 5 min en agua destilada y de nuevo un baño de 5 min de metanol. Una vez activada, la membrana debe quedar sumergida en buffer de transferencia, cuya composición se especifica en la tabla 5 del anexo. Posteriormente, se desmontó el gel de la electroforesis y se sumergió en buffer de transferencia durante 5 min en una nevera a 4°C. También se usaron papeles absorbentes blot que se humedecieron con buffer de transferencia. El proceso se llevó a

cabo en un Trans-blot semi-dry transfer cell donde se colocó el gel sobre la membrana, ambos dispuestos entre los papeles absorbentes. La transferencia se completó en 40 min aplicando un voltaje de 20 V. Para comprobar el éxito de la transferencia, la membrana se sumergió durante 2 min en Rojo Ponceau, un colorante sintético de alta afinidad por las proteínas cuya tinción desaparece posteriormente por lo que es compatible con la mayor parte de procedimientos de detección con anticuerpos. El resultado puede observarse en la imagen 1 del anexo.

### 3.3.4 Inmunodetección

Las bandas del marcador que se visualizan en la electroforesis son de Pm conocido, lo cual nos permite identificar donde se encuentran las proteínas que nos interesa analizar. Se usó la E-cadherina como marcador epitelial y la fibronectina como marcador mesenquimal. Para examinar los niveles de autofagia se usaron los marcadores LC3 y p62. Además, como control de carga se utilizó la proteína GAPDH.

En primer lugar, con el objetivo de evitar uniones inespecíficas, se bloqueó la membrana sumergiéndola en tampón de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente en agitación continua. En nuestro caso el tampón de bloqueo está formado por leche o BSA, según las preferencias de cada proteína a analizar, ambos diluidos al 5% en buffer de lavado, cuya composición se detalla en la tabla 6 del anexo. A continuación, se incubó la membrana con el anticuerpo primario diluido en el tampón de bloqueo. La información relativa a dichos anticuerpos se especifica en la **tabla 2**. La incubación se produjo overnight en agitación continua a 4 ° C. Al día siguiente se lavó la membrana tres veces con tampón de lavado durante intervalos de 5 min en agitación continua.

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados

ANTICUERPO	ANIMAL DE ORIGEN	DILUCIÓN	TAMPÓN BLOQUEO
<b>Fibronectina</b>	Rabbit	1:5000	Leche
<b>E-cadherina</b>	Mouse	1:1000	Leche
<b>p62</b>	Rabbit	1:500	BSA
<b>GAPDH</b>	Rabbit	1:5000	BSA
<b>LC3</b>	Rabbit	1:700	Leche
<b>Anti-rabbit</b>	Burro	1:4000	BSA o Leche (según corresponda)
<b>Anti-mouse</b>	Cabra	1:2500	Leche

Posteriormente se incubó la membrana durante 1 h con los anticuerpos secundarios correspondientes (**tabla 2**) en agitación a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario al reconocer las inmunoglobulinas (Ig) del animal en el que se ha desarrollado con la función de marcar el anticuerpo primario para su posterior detección. Finalmente se lavó la membrana tres veces con tampón de lavado durante intervalos de 5 min. Para el revelado de la membrana se utilizó el kit Luminata Classico Western HRP Substrate, cuya señal quimioluminiscente fue detectada por una cámara de revelado LAS 3000 tras un periodo de exposición.

### 3.3.5 Cuantificación de la señal

Para cuantificar la cantidad de proteína detectada por la cámara de revelado se utilizó el programa informático Image J. De forma manual se selecciona con el cursor la región de la banda deseada y el programa transforma la intensidad de la señal en una región bajo una campana cuya área es fácilmente calculable.

### 3.4 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos que permitieron evaluar los resultados obtenidos se realizaron mediante el software estadístico GraphPad PRISM utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney.

## 4. Resultados

### 4.1 Expresión proteica de marcadores de la transición epitelio-mesenquimal

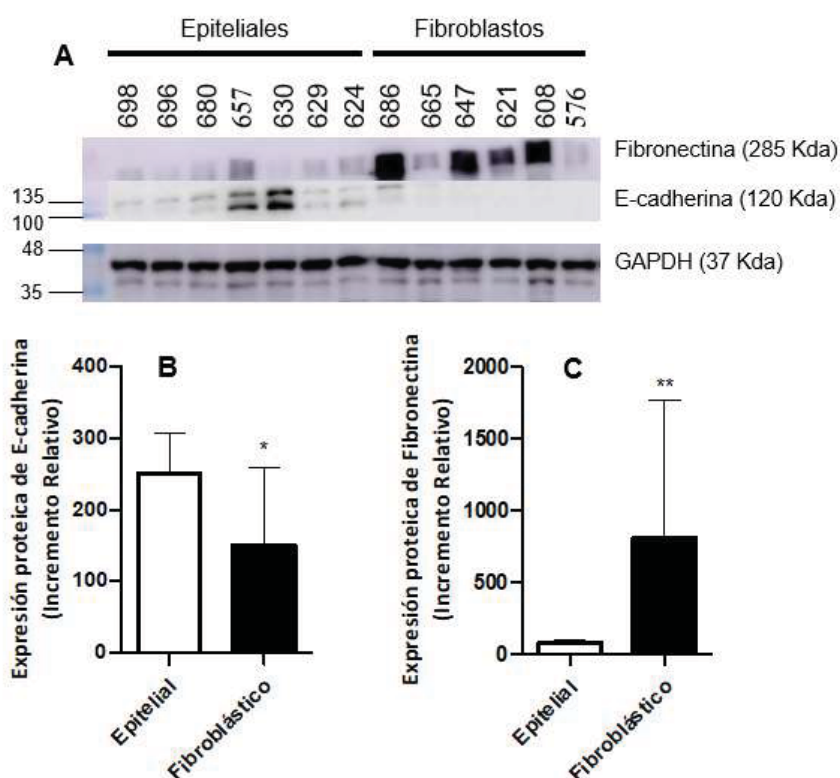
Las células mesoteliales procedentes del fluido de drenaje de los pacientes en DP se aislaron mediante centrifugación y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 80%. Antes de proceder al estudio proteico se clasificaron mediante microscopia óptica según su fenotipo en: epiteliales, fibroblastos o mixtas. Para llevar a cabo el experimento se seleccionaron muestras de pacientes cuyo fenotipo, a priori, era puramente epitelial o mesenquimal (fibroblastos). Como se mencionó anteriormente, se evaluó mediante un Western Blot la expresión proteica de E-cadherina y fibronectina, marcadores del fenotipo epitelial y mesenquimal respectivamente, para corroborar dicha selección.

En la **figura 2B** se observa que las células clasificadas como epiteliales poseen una expresión significativamente mayor de E-cadherina que las clasificadas como fibroblastos



( $p \leq 0.05$ ). Como se puede ver, concretamente las células epiteliales muestran una expresión positiva en E-cadherina de aproximadamente 250 unidades arbitrarias (u.a), que desciende hasta alrededor de 150 u.a en las células con fenotipo fibroblástico. Los valores exactos de la cuantificación de la señal expresada pueden verse en la tabla 7 del anexo.

Por el contrario, en la **figura 2C** se observa que la expresión de fibronectina fue mínima en las células con fenotipo epitelial, aumentando significativamente ( $p \leq 0.01$ ) en células con fenotipo fibroblástico donde la expresión alcanzó aproximadamente los 800. Los valores exactos de la cuantificación de la señal expresada pueden verse en la tabla 8 del anexo.



**Fig 2: Expresión proteica de E-cadherina y fibronectina.** Las células procedentes del efuente peritoneal se clasificaron según su fenotipo en epitelial (n=7) y fibroblasto (n=6). A.- Imagen del Western Blot de la expresión de E-cadherina y Fibronectina, utilizándose GAPDH como control de carga. B.- Representación gráfica de la expresión de E-cadherina en células epiteliales vs células con fenotipo fibroblasto ( $p \leq 0.05$ ). C.- Representación gráfica de la expresión de fibronectina en células epiteliales vs células con fenotipo fibroblasto ( $p \leq 0.01$ )

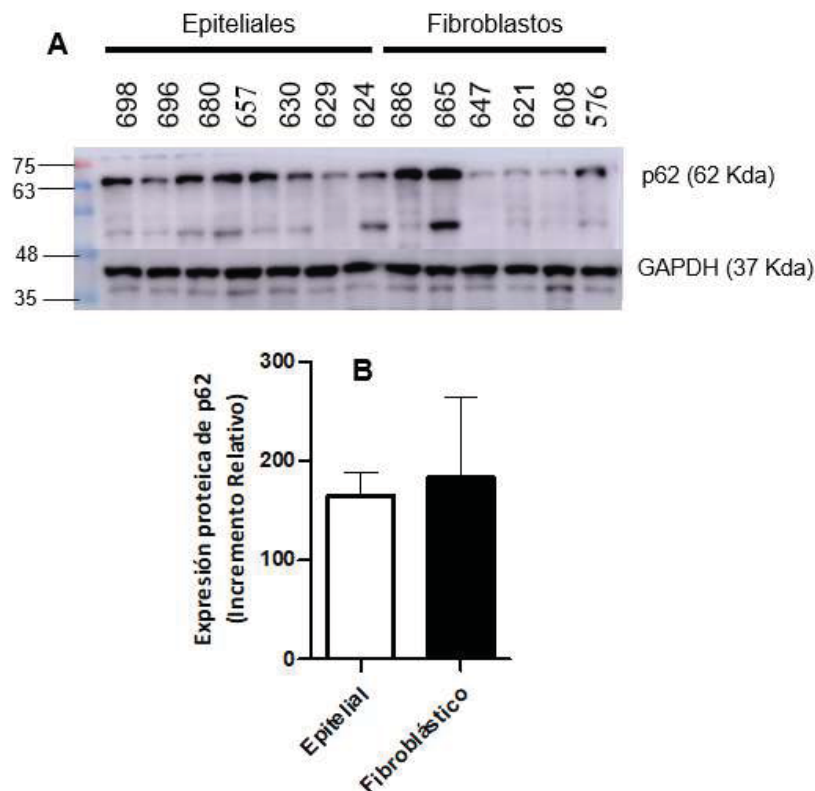
Estos resultados corroboran que la clasificación fenotípica de las células, realizada previamente mediante microscopía óptica, fue la correcta ya que se corresponde con un descenso de la expresión de E-cadherina y un aumento de la expresión de fibronectina por parte de las células mesenquimales.

## 4.2 Expresión proteica de marcadores autofágicos

Con el objetivo de comprobar si existe un defecto en la actividad autofágica que conduzca a un estado crónico de inflamación, se analizó mediante un Western Blot la expresión de los marcadores p62 y LC3.

La proteína p62 se encarga de unir físicamente la carga que se desea degradar a receptores situados en las membranas autofágicas en formación. Además, es continuamente degradada vía autofagia por lo que una reducción en los niveles totales de p62 indicarían una inducción del proceso autofágico, motivo por el cual se considera un buen marcador para evaluar la actividad de dicho proceso (31).

Como se observa en la **figura 3B**, no existe una diferencia significativa en los niveles de expresión de p62 entre las células con fenotipo epitelial y las células con fenotipo fibroblasto. Los valores exactos de la cuantificación de la señal expresada pueden verse en la tabla 9 del anexo.



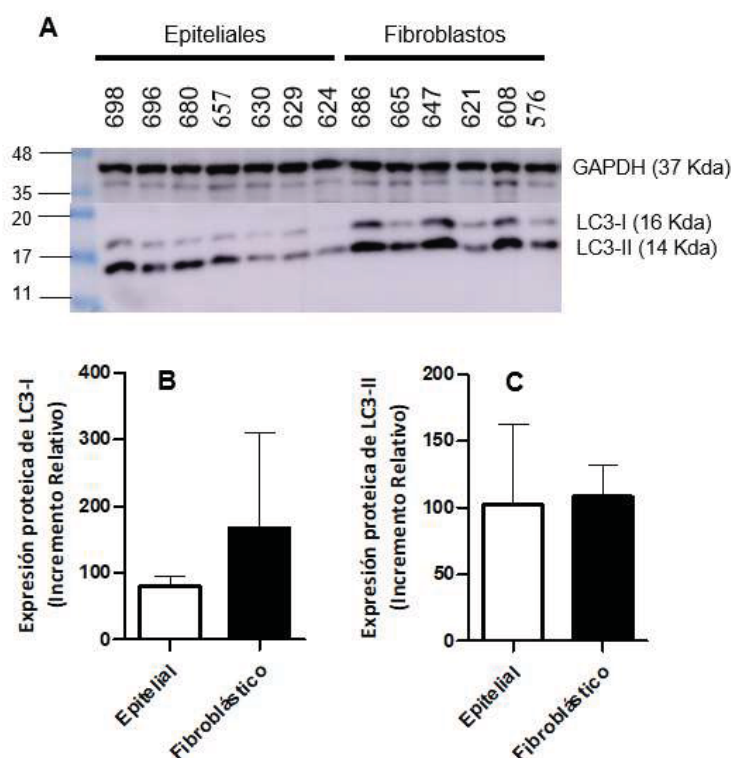
**Fig 3: Expresión proteica del marcador autofágico p62.** Las células procedentes del efluente peritoneal se clasificaron según su fenotipo en epitelial (n=7) y fibroblasto (n=6). A.- Imagen del Western Blot de la expresión de p62, utilizándose GAPDH como control de carga. B.- Representación gráfica de la expresión de p62 en células con fenotipo epitelial vs células con fenotipo fibroblástico.

Por otra parte, la proteína LC3 constituye la membrana autofagosomal. Durante la autofagia, el LC3-I citosólico se conjuga con fosfatidiletanolamina para formar LC3-II que se incorpora tanto a la membrana interna como a la externa del autofagosoma. Por lo

tanto, un aumento en los niveles de LC3-II es un indicador fiable para estimar un aumento de la actividad autofágica (35).

En la **figura 4B**, pese a no existir diferencias significativas en los niveles de expresión de LC3-I entre las células epiteliales y mesenquimales, podemos ver una tendencia al aumento en las células con fenotipo fibroblástico. Los valores exactos de la cuantificación de la señal expresada pueden verse en la tabla 10 del anexo.

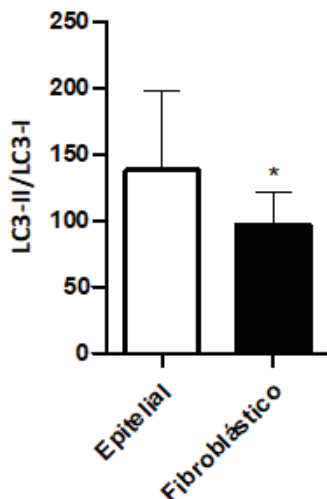
Por otra parte, como se puede ver en la **figura 4C**, tampoco se mostraron diferencias significativas entre ambos fenotipos celulares en la forma lipídada LC3-II. No obstante, se distingue un sutil aumento de la expresión proteica en las células con fenotipo fibroblástico. Los valores exactos de la cuantificación de la señal expresada pueden verse en la tabla 11 del anexo.



**Fig 4: Expresión proteica de los marcadores autofágicos LC3-I y LC3-II.** Las células procedentes del efluente peritoneal se clasificaron según su fenotipo en epitelial (n=7) y fibroblasto (n=6). A.- Imagen del Western Blot de la expresión de LC3-I y LC3-II, utilizándose GAPDH como control de carga. B.- Representación gráfica de la expresión de LC3-I en células con fenotipo epitelial vs células con fenotipo fibroblasto. C.- Representación gráfica de la expresión de LC3-II en células con fenotipo epitelial vs células con fenotipo fibroblástico.

El análisis de la conversión de la proteína autofágica LC3 (ratio LC3-II/ LC3-I) en una de las mejores formas de evaluar el proceso ya que un incremento en dicho ratio se correlaciona con un aumento en el número de autofagosomas y, por ende, con un incremento en el grado de actividad autofágica (36).

Como se puede observar en la **figura 5**, las células con fenotipo fibroblástico presentan un ratio LC3-II/ LC3-I significativamente menor ( $p \leq 0.05$ ) que las células con fenotipo epitelial. Los valores exactos de la cuantificación de la señal expresada pueden verse en la tabla 12 del anexo.



**Fig 5: Conversión de la proteína autofágica LC3.** Representación gráfica del ratio LC3-II/ LC3-I en células con fenotipo epitelial vs células con fenotipo fibroblástico ( $p \leq 0.05$ ).

Una disminución del ratio LC3-II/ LC3-I en las células mesenquimales indica una reducción en el número de autofagosomas, por lo que este resultado a priori sugiere un defecto en la actividad autofágica, lo que podría estar relacionado con el incremento de estatus inflamatorio que se observa en estas células.

## 5. Discusión

La ERC engloba un conjunto de enfermedades que afectan a la estructura y funcionamiento de los riñones de manera crónica e irreversible, cuya prevalencia se incrementa con el envejecimiento y otras enfermedades como la diabetes o la arteriosclerosis (7). En estadios avanzados de la ERC surge la necesidad de reemplazar la función de los riñones nativos, por lo que más de 64000 personas en España se encuentran en tratamiento renal sustitutivo, que puede realizarse mediante tres modalidades: trasplante, hemodiálisis y diálisis peritoneal (6).

El tratamiento con diálisis supone un 2,5 % del gasto sanitario total de nuestro país, a pesar de proporcionar soporte apenas al 0,1% de la población (10). Aunque la DP es mucho menos costosa que la hemodiálisis, siendo equivalente en términos de eficacia

dialítica y morbilidad, su uso no es comparable debido a las complicaciones que puede suponer la técnica (13).

Durante el procedimiento se somete al peritoneo a una solución no fisiológica que se caracteriza por su potencial glucotóxico (17). La exposición prolongada a dicho líquido de diálisis, en conjunto con otras agresiones como sangrados locales o infecciones, provoca cambios tisulares y estructurales tales como angiogénesis y fibrosis como consecuencia de la transición epitelio-mesenquimal (19).

Durante este proceso, las células mesoteliales de la membrana peritoneal pierden sus características adquiriendo un fenotipo fibroblástico debido a un estado crónico de inflamación (25). La contrapartida funcional de esta situación es una pérdida progresiva de la capacidad dialítica de manera que si prevenimos la inflamación podremos mejorar la fibrosis y preservar la arquitectura de la membrana peritoneal.

En respuesta a la alta concentración de glucosa del LD, se ha observado un aumento en la producción de ROS por parte de la mitocondria, activándose numerosas vías de señalización proinflamatorias que inducen un estrés oxidativo celular cada vez mayor (20). Asimismo, se ha demostrado una importante relación entre ROS y el inflamasoma NLRP3, un complejo multiproteico que se activa ante señales de “peligro” celular para desencadenar defensas inmunitarias innatas mediante la maduración de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18 (37).

Estudios anteriores sugieren que la actividad del inflamasoma NLRP3 está regulada negativamente por la autofagia (38) y de manera positiva por ROS (37). En este sentido, la inhibición de la autofagia conduce a la acumulación de mitocondrias dañadas que generan ROS, lo cual a su vez activa al inflamasoma NLRP3.

Por lo tanto, es necesario conocer si una reducción en la actividad autofágica podría contribuir a la acumulación de mitocondrias dañadas y producir una exacerbación de la respuesta inflamatoria, dando lugar a un fallo en la homeostasis de las células mesoteliales de la membrana peritoneal, desencadenando en última instancia el fallo de ultrafiltración.

Como se expuso anteriormente, el estado crónico de inflamación al que se ve sometido la membrana peritoneal provoca la TEM en las células mesoteliales del tejido. El estado de TEM observado en las muestras celulares empleadas se corroboró mediante un estudio proteico en el que se advirtió una disminución del marcador epitelial E-cadherina y un aumento del marcador mesenquimal fibronectina.

Basándonos en este hecho fisiológico, se analizó el nivel de expresión de los marcadores autofágicos p62 y LC3 en las células mesoteliales, cuyo fenotipo epitelial es característico

de un peritoneo sano, y en las células mesenquimales, cuyo fenotipo fibroblasto deriva de los cambios morfológicos provocados por la fibrosis como consecuencia de la inflamación. Los resultados hallados parecen indicar una inhibición de la autofagia, manifestada por un aumento en los niveles de p62 y una disminución del ratio LC3-II/ LC3-I en las células mesenquimales que han sufrido la TEM.

La proteína p62 es la principal molécula que interviene en el reconocimiento del material que se desea degradar en la autofagia, encargándose de unir físicamente la carga a receptores situados en las membranas autofágicas en formación (31). Además, p62 es continuamente degradada de manera eficaz por autofagia por lo que los niveles de expresión total de p62 se correlacionan inversamente con la actividad autofágica. En este sentido, una disminución en los niveles de p62 indicaría una inducción del proceso autofágico mientras que un aumento de la expresión de dicha proteína, como el que se puede observar en los resultados obtenidos en este trabajo, es indicativo de que se está produciendo una autofagia defectuosa (39).

En un estudio sobre la unión de agregados proteicos a la maquinaria autofágica por parte de p62 se encontró que la inhibición de la autofagia condujo a un aumento de los niveles de proteína p62. En el citado trabajo las células se trataron con rapamicina, un inductor de la autofagia, y con bafilomicina, un compuesto que bloquea la fusión de autofagosomas con lisosomas, obteniéndose resultados que demuestran la correlación entre los niveles de p62 y la actividad autofágica. El tratamiento con rapamicina provocó una disminución de p62 mientras que el tratamiento con bafilomicina condujo a la acumulación de p62 en las células (40).

Cabe destacar que p62 contiene dominios que interactúan con otras moléculas de señalización, pudiendo desempeñar funciones adicionales a su papel autofágico. Asimismo, también se puede degradar por el sistema ubiquitina-proteasoma de manera que sus niveles de expresión pueden aumentar si se produce una inhibición del mismo (41). Estas características podrían suponer una incorrecta interpretación del flujo autofágico por lo que es necesario emplear otros métodos como el recambio de LC3-II para determinar la existencia de un defecto en el mecanismo de la autofagia.

LC3 es una proteína autofágica implicada en la formación de autofagosomas. Cuando la autofagia es inducida, la forma citosólica LC3-I se conjuga con fosfatidiletanolamina para formar una nueva molécula denominada LC3-II que, una vez sintetizada, se inserta tanto en la membrana externa como interna del autofagosoma, siendo esencial en su proceso de formación. Por esta razón, un aumento en los niveles de LC3-II es un indicador fiable de la actividad autofágica (35).

En los resultados de la expresión proteica de LC3-II no se observó una disminución en los niveles del marcador en las células mesenquimales, tal y como se esperaría encontrar en una situación de supresión del flujo autofágico.

No obstante, el flujo autofágico se refiere al proceso completo de autofagia que incluye la entrega de la carga a los lisosomas, así como su posterior descomposición y reciclaje. En este sentido, altos niveles de LC3-II no solo podrían representar una inducción en la autofagia sino también una inhibición en las fases finales de este proceso en la que se produciría una acumulación de autofagosomas que no se llegarían a fusionar con los lisosomas (42). Además, no toda la LC3-II está presente en las membranas autofágicas. En diversos estudios (39) se detectaron niveles de expresión altos para dicho marcador a pesar de que la formación de autofagosomas estaba total o parcialmente inhibida.

Medir los niveles de LC3-II en relación con los de LC3-I es una buena forma de estimar una acumulación en el número de autofagosomas. Los resultados obtenidos muestran que las células con fenotipo fibroblasto presentan un nivel significativamente menor en el ratio LC3-II/ LC3-I con respecto a las células con fenotipo epitelial, lo cual indica que no se está produciendo una conversión suficiente de la forma citosólica LC3-I a la forma lipídica LC3-II, proceso que tendría lugar cuando la autofagia es inducida.

El análisis global de los resultados obtenidos no permite descartar que, como se suponía en la hipótesis de partida, exista una disfunción autofágica en las células peritoneales que conduzca a la acumulación de mitocondrias dañadas que participen en el estado de inflamación del peritoneo. En este sentido, descubrimientos recientes sugieren un papel crucial de la autofagia en la inmunidad e inflamación al prevenir la excesiva activación del complejo NLRP3-inflamasoma y en consecuencia la liberación de IL-1 $\beta$  e IL-18 (citoquinas proinflamatorias) (43). Asimismo, existen diversos fármacos estudiados que pueden inducir autofagia, bien por una activación de las moléculas pro-autofágicas, o por inhibición de sus reguladores negativos, como es el caso de la rapamicina. En este sentido se ha descrito que la rapamicina protege al peritoneo de pacientes en DP a través de un efecto antifibrótico y antiproliferativo de vasos sanguíneos y linfáticos (44).

Puesto que es evidente que el estrés oxidativo y la inflamación desempeñan un papel fundamental en el fallo de ultrafiltración peritoneal, es necesario seguir investigando el papel que juega la autofagia con el fin de obtener nuevos resultados que permitan mantener la capacidad dializante de la membrana peritoneal para mantener la supervivencia de la técnica.

## 6. Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que, tal y como se planteó inicialmente, existe una relación entre la transición epitelio-mesenquimal de las células peritoneales de pacientes en DP y una deficiencia en el proceso autofágico. El análisis de los marcadores autofágicos p62 y LC3 permitió detectar una inhibición de la autofagia en las células mesenquimales (fibroblastos) en comparación con las células epiteliales. No obstante, el mecanismo molecular de la activación/inhibición de la autofagia es muy complejo, por lo que los resultados obtenidos pueden tener interpretaciones variables y no son suficientes para dilucidar con certeza la cuestión planteada. Para corroborar la interpretación de los resultados obtenidos, un buen punto de partida sería tratar las células con inhibidores e inductores de la autofagia, como son la cloroquina y la rapamicina respectivamente.

### Conclusións

Os resultados obtidos suxiren que, coma se plantexou nun comezo, existe una relación entre a transición epitelio-mesenquimal das células peritoneáis de pacientes en DP e una deficiencia no proceso autofáxico. A análise dos marcadores autofáxicos p62 e LC3 logrou detectar una inhición da autofaxia nas células mesenquimáis (fibroblastos) en comparanza coas células epiteliais. Porén, o mecanismo molecular da activación/inhibición da autofagia é moi complexo, polo que os resultados obtidos poden ter interpretación varias e non chegan para esclarecer con certeza a cuestión plantexada. Para ratificar a interpretación dos resultados obtidos, un bo punto de partida consistiría en tratar as células con inhibidores e inductores da autofaxia, coma son a cloroquina e a rapamicina respectivamente.

### Conclusions

The results obtained suggest that, as initially proposed, there is a relationship between the epithelial-mesenchymal transition of peritoneal cells in PD patients and a deficiency in the autophagic process. Analysis of the autophagic markers p62 and LC3 detected an inhibition of autophagy in mesenchymal cells (fibroblasts) compared to epithelial cells. However, the molecular mechanism of autophagy activation/inhibition is very complex, so the results obtained may have variable interpretations and are not sufficient to elucidate with certainty the question posed. To corroborate the interpretation of the results obtained, a good starting point would be to treat the cells with autophagy inhibitors and inducers, such as chloroquine and rapamycin respectively.



## 7. Bibliografía

1. OMS. (2017). Datos interesantes acerca del envejecimiento. Retrieved May 02, 2021, from <https://www.who.int/ageing/about/facts/es/>
2. Naciones Unidas. (2020). Perspectivas de la población mundial 2019: metodología de las Naciones Unidas para las estimaciones y proyecciones de población. Serie Población (Nº132)
3. Pérez Díaz, J., Abellán García, A., Aceituno Nieto, P., & Ramiro Fariñas, D. (2020). Un perfil de las personas mayores en España, 2020. Indicadores estadísticos básicos. Envejecimiento en red.
4. Ramos Cordero, P., & Pinto Fontanillo, J. A. (2015). Las personas mayores y su salud: situación actual. *Avances en odontoestomatología*, 31(3), 107-116. <https://dx.doi.org/10.4321/S0213-12852015000300001>
5. Otero, A., de Francisco, A., Gayoso, P., García, F., & EPIRCE Study Group (2010). Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrología : publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*, 30(1), 78–86. <https://doi.org/10.3265/Nefrologia.pre2009.Dic.5732>
6. Mahillo Durán, B. (2020). *Informe de diálisis y trasplante 2019* (Diapositivas de PowerPoint). Registro Español de Enfermos Renales, Sociedad Española de Nefrología. Retrieved May 02, 2021, from [https://www.senefro.org/contents/webstructure/INFORME\\_REER\\_SEN\\_2020\\_WEB\\_SEN.pdf](https://www.senefro.org/contents/webstructure/INFORME_REER_SEN_2020_WEB_SEN.pdf)
7. Sellarés, V. L. (2010). Enfermedad renal crónica. *Nefrología al día. Edición del grupo editorial nefrología de la sociedad española de nefrología. España*, 335-352. Retrieved May 03, 2021, from <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-enfermedad-renal-cronica-136>
8. Cabrera, S. S. (2004). Definición y clasificación de los estadios de la enfermedad renal crónica. Prevalencia. Claves para el diagnóstico precoz. Factores de riesgo de enfermedad renal crónica. *Nefrología*, 24, 27-34. Retrieved May 03, 2021, from <https://www.revistanefrologia.com/es-definicion-clasificacion-estadios-enfermedad-renal-articulo-X0211699504030666>
9. Gorostidi, M., Sánchez-Martínez, M., Ruilope, L. M., Graciani, A., de la Cruz, J. J., Santamaría, R., Del Pino, M. D., Guallar-Castillón, P., de Álvaro, F., Rodríguez-Artalejo, F., & Banegas, J. R. (2018). Chronic kidney disease in Spain: Prevalence and impact of accumulation of cardiovascular risk factors. Prevalencia de enfermedad renal crónica en España: impacto de la acumulación de factores de riesgo cardiovascular. *Nefrología*, 38(6), 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2018.04.004>
10. Arrieta, J. (2010). Evaluación económica del tratamiento sustitutivo renal (hemodiálisis, diálisis peritoneal y trasplante) en España. *Nefrología (English Edition)*, 1(1), 37-47. Retrieved May 03, 2021, from <https://www.revistanefrologia.com/es-evaluacion-economica-del-tratamiento-sustitutivo-articulo-X2013757510002348>

11. Sellarés, V. L. (2012). Principios físicos: definiciones y conceptos. *Nefrología*, 6(1), 355-67. Retrieved May 03, 2021, from <https://revistanefrologia.com/es-pdf-XX342164212000270>
12. Vadakedath, S., & Kandi, V. (2017). Dialysis: a review of the mechanisms underlying complications in the management of chronic renal failure. *Cureus*, 9(8), 1–8. <https://doi.org/10.7759/cureus.1603>
13. GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. (2020). Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 395(10225), 709-733. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30045-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30045-3)
14. Mehrotra, R., Devuyst, O., Davies, S. J., & Johnson, D. W. (2016). The current state of peritoneal dialysis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(11), 3238-3252. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016010112>
15. Bartosova, M. & Schmitt, C. P. (2019). Biocompatible peritoneal dialysis: The target is still way off. *Frontiers in Physiology*, 9(1853), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01853>
16. Maharjan, S. R. S., & Davenport, A. (2019). Comparison of sodium removal in peritoneal dialysis patients treated by continuous ambulatory and automated peritoneal dialysis. *Journal of nephrology*, 32(6), 1011-1019. <https://doi.org/10.1007/s40620-019-00646-7>
17. Zuo, X., Ye, X., Sun, F., Qian, K., Xiang, S., Liang, W., ... & Ying, C. (2015). Glucose absorption in nephropathy patients receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 24(3), 394-402. <https://doi.org/10.6133/apjcn.2015.24.3.16>
18. Haybrard, J., Simon, N., Danel, C., Pinçon, C., Barthelemy, C., Tessier, F. J., ... & Odou, P. (2017). Factors generating glucose degradation products in sterile glucose solutions for infusion: statistical relevance determination of their impacts. *Scientific reports*, 7(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12296-5>
19. Bajo, M. A., del Peso, G., & Selgas, R. (2009). Prevención de la esclerosis peritoneal encapsulante en pacientes en diálisis peritoneal. *Diálisis y Trasplante*, 30(2), 52-56. Retrieved May 03, 2021, from <https://www.elsevier.es/es-revista-dialisis-trasplante-275-articulo-prevencion-esclerosis-peritoneal-encapsulante-pacientes-13137822>
20. 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. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 642793. <https://doi.org/10.1155/2014/642793>
21. Welten, A. G., Schalkwijk, C. G., Ter Wee, P. M., Meijer, S., Van Den Born, J., & Beelen, R. J. (2003). Single exposure of mesothelial cells to glucose degradation products (GDPs) yields early advanced glycation end-products (AGEs) and a proinflammatory response. *Peritoneal dialysis international*, 23(3), 213-221. <https://doi.org/10.1177/089686080302300301>

22. Aroeira, L. S., Aguilera, A., Sánchez-Tomero, J. A., Bajo, M. A., del Peso, G., Jiménez-Heffernan, J. A., ... & López-Cabrera, M. (2007). Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(7), 2004-2013. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006111292>
23. Yáñez-Mó, M., Lara-Pezzi, E., Selgas, R., Ramírez-Huesca, M., Domínguez-Jiménez, C., Jiménez-Heffernan, J. A., ... & López-Cabrera, M. (2003). Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *New England Journal of Medicine*, 348(5), 403-413. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020809>
24. Hay, E. D. (1995). An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Cells Tissues Organs*, 154(1), 8-20. <https://doi.org/10.1159/000147748>
25. Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6), 1420-1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>
26. Sánchez-Tilló, E., Liu, Y., de Barrios, O., Siles, L., Fanlo, L., Cuatrecasas, M., ... & Postigo, A. (2012). EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cellular and molecular life sciences*, 69(20), 3429-3456. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1122-2>
27. Liu, Y., Dong, Z., Liu, H., Zhu, J., Liu, F., & Chen, G. (2015). Transition of mesothelial cell to fibroblast in peritoneal dialysis: EMT, stem cell or bystander?. *Peritoneal Dialysis International*, 35(1), 14-25. <https://doi.org/10.3747/pdi.2014.00188>
28. Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants and Redox Signaling*, 20(3), 460-473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>
29. Boya, P. (2017). Autofagia: como nuestras celulas se reciclan. *Sociedad Espanola de Bioquimica y Biologia Molecular*, pp. 1-2. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv\\_ANC.2017.01.2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18567/sebbmdiv_ANC.2017.01.2)
30. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular biology of the cell*, 15(3), 1101-1111. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-09-0704>
31. Larsen, K. B., Lamark, T., Øvervatn, A., Harneshaug, I., Johansen, T., & Bjørkøy, G. (2010). A reporter cell system to monitor autophagy based on p62/SQSTM1. *Autophagy*, 6(6), 784-793. <https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12510>
32. Harris, J., Lang, T., Thomas, JP, Sukkar, MB, Nabar, NR & Kehrl, JH (2017). Autophagy and inflammasomes. *Inmunología molecular*, 86, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.013>
33. Sun, X., Sun, L., Zhao, Y., Li, Y., Lin, W., Chen, D., & Sun, Q. (2016). MAVS maintains mitochondrial homeostasis via autophagy. *Cell discovery*, 2(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2016.24>

34. Wu, J., Li, X., Zhu, G., Zhang, & He, M. & Zhang, J. (2016). The role of Resveratrol induced mitophagy/autophagy in peritoneal mesothelial cells inflammatory injury via NLRP3 inflammasome activation triggered by mitochondrial ROS. *Experimental Cell Research*, 341(1), 42-53. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.01.014>
35. Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2008). LC3 and Autophagy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 445, 77–88. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-157-4_4)
36. Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6), 542-545. <https://doi.org/10.4161/auto.4600>
37. Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469(7329), 221-225. <https://doi.org/10.1038/nature09663>
38. Peña-Sanoja, M. J., & De Sanctis, J. B. (2013). Autofagia y respuesta inmunitaria. *Investigación Clínica*, 54(3), 325-337. Retrieved July 15, 2021 from <https://produccioncientificaluz.org/index.php/investigacion/article/view/28933>
39. Mizushima, N., Yoshimori, T., & Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell*, 140(3), 313-326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>
40. Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, A., ... & Johansen, T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *Journal of Cell Biology*, 171(4), 603-614. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507002>
41. Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., ... & Paglin, S. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*, 4(2), 151-175. <https://doi.org/10.4161/auto.5338>
42. Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., ... & Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *The Journal of cell biology*, 152(4), 657-668. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.4.657>
43. Shi, C. S., Shenderov, K., Huang, N. N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K. A., ... & Kehrl, J. H. (2012). Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nature immunology*, 13(3), 255-263. <https://doi.org/10.1038/ni.2215>
44. González-Mateo, G. T., Aguirre, A. R., Loureiro, J., Abensur, H., Sandoval, P., Sánchez-Tomero, J. A., ... & Liappas, G. (2015). Rapamycin Protects From Type-I Peritoneal Membrane Failure Inhibiting the Angiogenesis, Lymphangiogenesis, and Endo-MT. *BioMed research international*, 2015, 989560. <https://doi.org/10.1155/2015/989560>