



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



instituto de  
investigación biomédica  
de a coruña

# Grado en Biología

## Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Cuantificación del ADN mitocondrial en el líquido de diálisis de pacientes sometidos a diálisis peritoneal**

**Cuantificación do ADN mitocondrial no líquido de diálise de pacientes sometidos a diálise peritoneal**

**Quantification of mitochondrial DNA in the dialysis fluid from patients undergoing peritoneal dialysis**

**Sara Yunta Sánchez**

Julio, 2018

Directores | *Antonio Manuel Castro Castro*  
*María José López Armada*



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 Sara Yunta Sánchez y con título "Cuantificación del ADN mitocondrial en el líquido de diálisis de pacientes sometidos a diálisis peritoneal" 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 16 de julio de 2018.

Fdo. Antonio Manuel Castro Castro.

Fdo. María José López Armada



# Índice

RESUMEN.....	1
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	1
<b>1. Introducción .....</b>	<b>3</b>
1.1. Enfermedad renal crónica .....	3
1.1.1. Tratamientos .....	3
1.2. Diálisis peritoneal (DP) .....	4
1.2.1. Ventajas de la DP.....	4
1.2.2. Desventajas de la DP .....	4
1.3. Membrana peritoneal e inflamación crónica.....	5
1.4. ADN mitocondrial (ADNmt) .....	7
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>9</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>9</b>
3.1. Obtención del sobrenadante del líquido de diálisis.....	9
3.2. Extracción del ADN circulante .....	11
3.3. Cuantificación de ADN mitocondrial por PCR en tiempo real .....	14
3.3.1. PCR en tiempo real.....	14
3.3.2. SYBR Green.....	15
3.3.3. Cebadores específicos (12S) .....	16
<b>4. Resultados.....</b>	<b>19</b>
<b>5. Discusión .....</b>	<b>23</b>
<b>6. Conclusión/Conclusión/Conclusion.....</b>	<b>24</b>
<b>7. Bibliografía .....</b>	<b>25</b>



## RESUMEN

Los pacientes sometidos a tratamiento de diálisis peritoneal sufren un daño en la membrana peritoneal tras estar expuesta a una solución no fisiológica, generando un deterioro progresivo de la capacidad dializante de la misma y, por lo tanto, haciendo inviable esta técnica. Las alteraciones mitocondriales desempeñan un papel clave en muchas enfermedades, entre ellas las patologías inflamatorias. En el presente trabajo se ha cuantificado el ADN mitocondrial en el líquido de diálisis de pacientes sometidos a diálisis peritoneal mediante PCR en tiempo real con los cebadores específicos (12S). Los resultados obtenidos permiten relacionar la cuantificación del ADN mitocondrial del líquido de diálisis y el nivel de inflamación crónica de la membrana peritoneal, revelando la utilidad de este como biomarcador de la calidad de la membrana del paciente.

**Palabras clave:** diálisis peritoneal, membrana peritoneal, ADN mitocondrial, PCR en tiempo real, biomarcador.

## RESUMO

Os pacientes sometidos a tratamento de diálise peritoneal sofren un dano na membrana peritoneal tras estar exposta a unha solución non fisiolóxica, xerando unha deterioración progresiva da capacidade dializante da mesma e polo tanto, facendo inviable esta técnica. As alteracións mitocondriais desempeñan un papel clave en moitas enfermidades, entre elas as patoloxías inflamatorias. No presente traballo cuantificouse o ADN mitocondrial no líquido de diálise de pacientes sometidos a diálise peritoneal mediante PCR en tempo real cos cebadores específicos (12S). Os resultados obtidos permiten relacionar a cuantificación do ADN mitocondrial do líquido de diálise e o nivel de inflamación crónica da membrana peritoneal, revelando a utilidade deste como biomarcador da calidade da membrana do paciente.

**Palabras clave:** diálise peritoneal, membrana peritoneal, ADN mitocondrial, PCR en tempo real, biomarcador.

## ABSTRACT

The patients put under the treatment of peritoneal dialysis suffer from damage on the peritoneal membrane after being exposed to a non-physiological solution, generating a progressive deterioration of the dialyzing capacity of the membrane and, therefore, making it impossible for this technique to work. Mitochondrial alterations play a very important role in many diseases, such as inflammatory pathologies. In this project it has been quantified the mitochondrial DNA in the dialysis liquid from patients undergoing peritoneal dialysis by PCR in real time with the specific primers (12S). The results we have obtained allow us to connect the quantification of the mitochondrial DNA of the dialysis liquid with the level of chronic inflammation of the peritoneal membrane, revealing that its usefulness as a biomarker of the patients membranes quality.

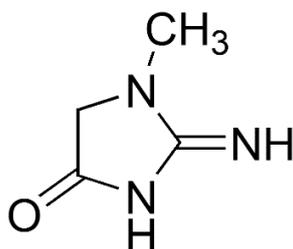
**Keywords:** peritoneal dialysis, peritoneal membrane, mitochondrial DNA, biomarker, real time PCR.

## 1. Introducción

### 1.1. Enfermedad renal crónica

España, al igual que el resto de Europa y otras partes del mundo, está envejeciendo y seguirá envejeciendo en los próximos años. Este incremento de la expectativa de vida lleva asociado un incremento en las enfermedades y patologías clínicas relacionadas con el proceso de envejecimiento; por ello, la prevalencia de las enfermedades crónicas ha aumentado. La enfermedad renal crónica no es una excepción, y ha adquirido dimensiones epidémicas a nivel mundial (Otero *et al.*, 2010).

Los riñones eliminan los desechos de la sangre y el exceso de líquido del cuerpo. La insuficiencia renal que sufren algunos pacientes consiste en una disminución en el flujo plasmático renal cuando los riñones no son capaces de filtrar adecuadamente los tóxicos y otras sustancias de desecho de la sangre, lo que se manifiesta en una presencia elevada de creatinina en el suero (Figura 1.1). La medición de la creatinina es el modo más simple de monitorizar la correcta función de los riñones. Se trata de un compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina, considerándose así, un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que habitualmente produce el cuerpo en una tasa muy constante, dependiendo de la masa muscular, y que filtran los riñones excretándola a la orina.



**Figura 1.1.** Estructura de la creatinina. La creatinina es una base orgánica que se produce como resultado del metabolismo muscular en la degradación del fosfato de creatina.

#### 1.1.1. Tratamientos

Entre los tratamientos para la insuficiencia renal en pacientes se conocen: i/el trasplante de riñón; mediante el cual se sustituye el riñón dañado por un riñón procedente de un donador sano para que realice las funciones de los riñones del paciente, ii/la hemodiálisis; donde la sangre circula a través de una máquina llamada dializador o riñón artificial con un filtro que "limpia" la sangre, y iii/la diálisis peritoneal (DP); se coloca en el abdomen un tubo flexible llamado catéter mediante un procedimiento de cirugía.

En estadios avanzados de la enfermedad renal crónica, surge la necesidad de sustituir la función de los riñones nativos. El trasplante renal es la modalidad preferida, pero no todos los pacientes tienen acceso potencial a ese tratamiento. Esta limitación convierte a la diálisis crónica en la forma básica de

tratamiento sustitutivo renal. La diálisis peritoneal es mucho menos costosa que la hemodiálisis y equivalente en términos de eficacia dialítica (Arrieta *et al.*, 2011).

## 1.2. Diálisis peritoneal (DP)

La DP (Figura 1.2) es un tratamiento alternativo de la enfermedad renal en fase terminal y se basa en el uso del peritoneo como una membrana semipermeable a través de la cual tienen lugar los procesos de ultrafiltración y la disfunción, que permiten remplazar la función renal (Loureiro *et al.*, 2011).

El líquido de diálisis se introduce en la cavidad peritoneal a través de un catéter que se coloca mediante una cirugía menor a través de la pared del abdomen hasta la cavidad peritoneal. Parte de este catéter permanece fuera del abdomen, recibiendo el nombre de transferencia, y es su acceso permanente para la diálisis. De esta forma puede conectarse a las bolsas de solución de diálisis (Figura 1.2.A). El catéter queda oculto bajo la ropa.

La DP elimina sustancias orgánicas, productos del metabolismo, sustancias tóxicas del organismo, cuando los riñones no funcionan adecuadamente, al igual que excedentes de líquidos endógenos, los cuales se excretarían por los riñones si funcionasen adecuadamente, y ayuda a corregir desequilibrios electrolíticos al igual que a disminuir el edema.

### 1.2.1. Ventajas de la DP

Algunas de las ventajas que presenta la DP frente a los demás tratamientos son que se puede realizar en el hogar, o mientras se está de viaje. Es un tratamiento fácil de aprender. Por ser continua o efectuarse al menos durante muchas más horas que la hemodiálisis, no requiere tantas limitaciones dietéticas. Es más barata, no solo por su precio, sino porque además no requiere desplazarse al hospital, y equivalente en términos de eficacia dialítica que la hemodiálisis.

### 1.2.2. Desventajas de la DP

A pesar de sus pros también presenta una serie de inconvenientes, y es que, en este procedimiento, el peritoneo se expone a una solución no fisiológica, el líquido de diálisis peritoneal, principalmente por su potencial glucotóxico. La exposición crónica del líquido de diálisis en el peritoneo puede conducir a un proceso inflamatorio crónico de bajo grado, que a su vez deriva en cambios estructurales en la membrana peritoneal como fibrosis, angiogénesis y vasculopatía hialinizante (Figura 1.2.B), cuya contrapartida funcional es un deterioro progresivo de la capacidad dializante de la misma, denominado fallo de membrana que, en muchos casos, acaba haciendo inviable la técnica (Loureiro *et al.*, 2011).

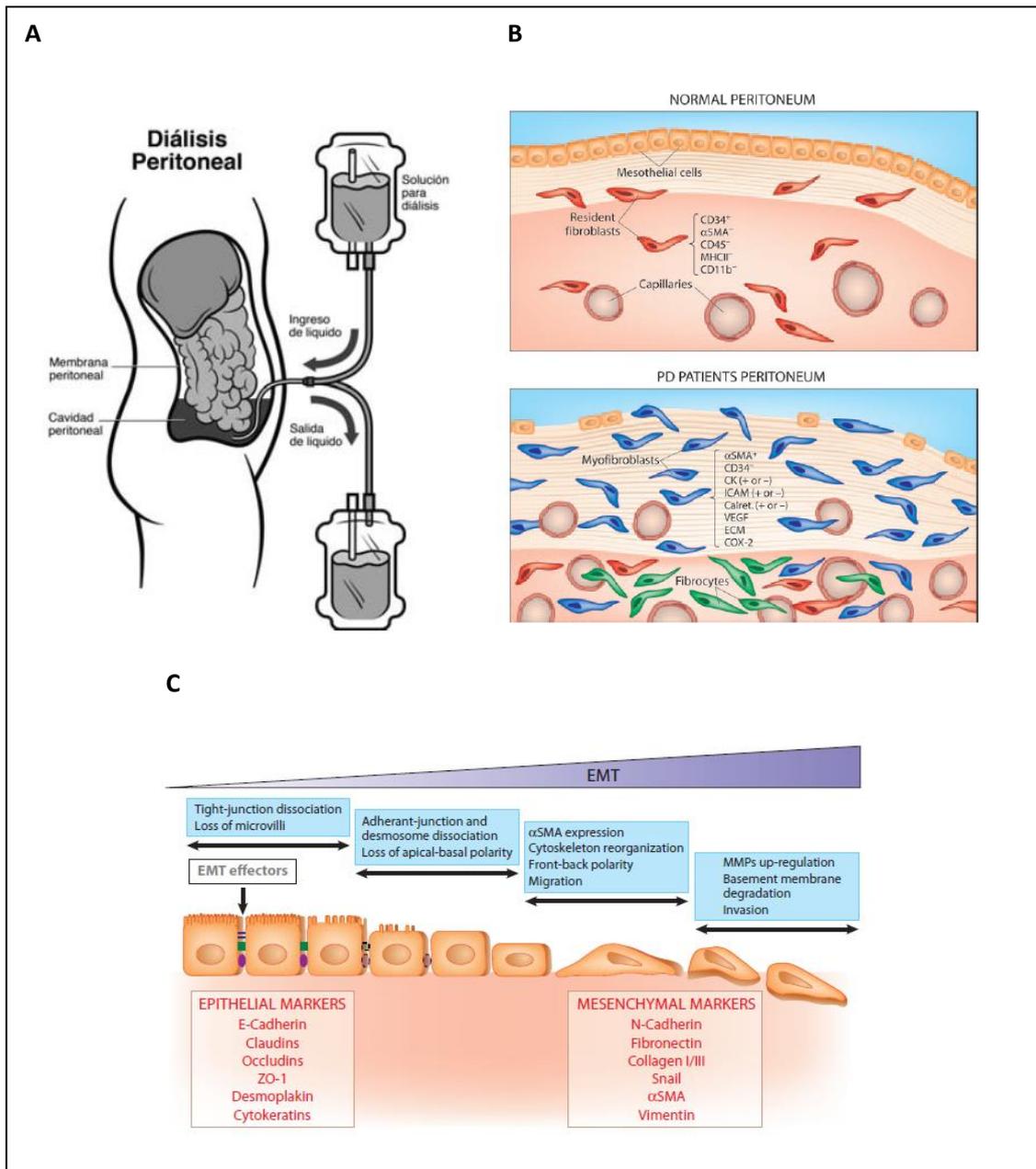
### 1.3. Membrana peritoneal e inflamación crónica

El papel de la célula mesotelial, tipo celular de carácter epitelial que recubre la cavidad peritoneal y los órganos que se alojan en ella, es indudable. Representa la primera línea de contacto con el líquido de diálisis. Así, se ha demostrado que en respuesta a la diálisis peritoneal la célula mesotelial peritoneal responde perdiendo su fenotipo epitelial y adquiriendo características miofibroblásticas mediante un proceso de transición epitelial-mesenquimal; TEM (Yáñez-Mó *et al.*, 2003).

Con este cambio fenotípico, las células adquieren capacidades invasivas alcanzando el estroma submesotelial (Figura 1.2.C), donde producen gran cantidad de matriz extracelular y factores inflamatorios y angiogénicos; en consecuencia, se amplifica la comunicación con las células vecinas promoviendo así la inflamación y fibrosis peritoneal, lo que conlleva el deterioro de la membrana peritoneal y el fallo de la misma (Aroeira *et al.*, 2009; Loureiro *et al.*, 2011).

La presencia de células mesoteliales con ese aspecto *in vitro* se correlaciona con el fallo de membrana (Loureiro *et al.*, 2013), por lo que si se previene la TEM podremos mejorar la fibrosis peritoneal y preservar la membrana peritoneal durante la DP.

La fibrosis es la consecuencia final de una reacción crónica inflamatoria. Este incremento crónico de mediadores pro-inflamatorios (p. ej. TNF) es consecuencia del desequilibrio del estado redox celular. A su vez, el desequilibrio del estado redox celular surge como el efecto neto de un incremento en la producción de especies reactivas, como el ión peróxido, una debilidad de los sistemas de defensa, como las clásicas enzimas antioxidantes, glutatión peroxidasa, así como otros secuestradores de especies reactivas como la vitamina E o el caroteno (López-Armada *et al.*, 2013). Además, las soluciones de diálisis tienen componentes capaces de estimular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), como son la glucosa y sus productos de degradación (Chaudhary and Khanna, 2010). Todo ello sugiere que el proceso de oxidación puede representar una vía patogénica crucial en la TEM que finalmente conduce al daño del peritoneo.

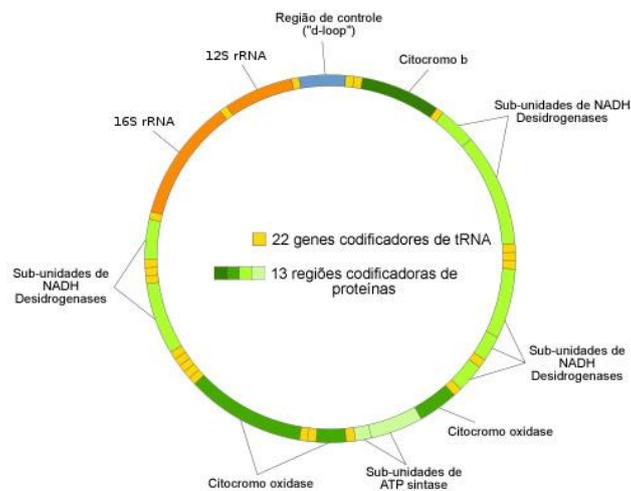


**Figura 1.2.** Diálisis peritoneal (DP). (A) Esquema de la diálisis peritoneal. (B) Subpoblaciones de fibroblastos peritoneales en la membrana peritoneal de pacientes sin tratamiento y pacientes sometidos a diálisis peritoneal (DP). La morfología del peritoneo normal es simple, con una sola capa de células mesoteliales (MC) que cubre una región submesotelial que está compuesta por tejido conectivo con pocos fibroblastos y algunos vasos sanguíneos. En los pacientes con DP, hay muchas anomalías estructurales en la membrana peritoneal, como número creciente de fibroblastos, fibrosis submesotelial y aumento del número de vasos sanguíneos. En contraste con el peritoneo normal, los miofibroblastos se pueden detectar fácilmente en la membrana peritoneal de muchos pacientes que son sometidos a DP. Los miofibroblastos pueden originarse de fibroblastos residentes activados, de células circulantes (fibrocitos) y de MC a través de una transición epitelial-a-mesenquimal (TEM) (Aroeira *et al.*, 2007). (C) Eventos clave durante la TEM. El diagrama muestra cuatro pasos clave que son esenciales para la terminación de todo el curso de TEM y los marcadores epiteliales y mesenquimales más comúnmente usados (Aroeira *et al.*, 2007).

#### 1.4. ADN mitocondrial (ADNmt)

Las mitocondrias son orgánulos membranosos presentes en el citoplasma de las células participando en el metabolismo energético.

En la matriz mitocondrial se encuentra el ADN, los ribosomas y los enzimas para llevar a cabo procesos metabólicos. El ADNmt humano es una molécula circular bicatenario de 16.569 pares de bases, conteniendo 37 genes que en humanos codifican para 13 proteínas (Figura 1.3). El número de moléculas de ADNmt por célula varía entre unos pocos cientos en los espermatozoides a unas 200.000 copias en el oocito, pero en la mayor parte de los tejidos el rango está comprendido entre unas 1.000 y 10.000 copias por célula, con 2-10 moléculas de ADN por mitocondria.



**Figura 1.3.** ADN mitocondrial humano.

La mitocondria juega un papel clave en el estrés oxidativo. Debido a su papel central en la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) vía cadena respiratoria mitocondrial, la mitocondria representa la fuente más importante en la formación de ROS (Figura 1.4). Así, el daño oxidativo de las mitocondrias incluye la oxidación de los lípidos de membrana, proteínas y ADNmt (ADN mitocondrial). Este daño oxidativo en el ADNmt podría ser la fuente principal de la inestabilidad genómica mitocondrial que conduce a la disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial. A su vez, la disfunción de la cadena aumentaría ROS, estableciéndose un círculo vicioso de estrés oxidativo, capaz de perpetuar y propagar la respuesta inflamatoria (López-Armada *et al.*, 2013).



Respecto a este proyecto hay tres modelos de analizar estas conjeturas, *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*. El presente trabajo se centra en una parte del modelo *ex vivo*, que consiste en valorar el estado de la función de las mitocondrias en el peritoneo y células mesoteliales humanas procedente de efluente peritoneal de pacientes sometidos a diálisis peritoneal, observando correlaciones con pacientes de interés clínico.

## 2. Objetivos

En el presente trabajo se pretende cuantificar el ADN mitocondrial en el líquido de diálisis de pacientes en diálisis peritoneal como posible biomarcador de daño peritoneal. En este sentido, los objetivos (específicos) planteados para este estudio han sido los siguientes:

1. Procesar en la campana de cultivo celular muestras de efluente de bolsas del líquido de diálisis de pacientes sometidos a DP.
2. Aislar y extraer el ADN circulante con el Kit de extracción a partir del efluente del líquido de diálisis de pacientes en tratamiento en diálisis peritoneal.
3. Cuantificar el ADN mitocondrial por PCR con los cebadores 12S.
4. Detectar diferencias de expresión en pacientes sometidos a diálisis peritoneal.

## 3. Materiales y métodos

Los estudios con muestras humanas se realizaron conforme a las recomendaciones de la Declaración de Helsinki 2008 y la Ley Orgánica 15/199 de protección de Datos de Carácter Personal, tras la aprobación por el Comité de Ética de la Investigación de Galicia.

### 3.1. Obtención del sobrenadante del líquido de diálisis

El objetivo de este primer paso es la obtención del sobrenadante de las muestras de efluente peritoneal de pacientes en tratamiento con diálisis peritoneal en la Unidad de Diálisis del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC), conteniendo este el ADN circulante (Figura 3.1).

#### *Equipos y reactivos necesarios*

- Pipetas de 1000 µl.
- Pipetas.
- Tijeras o pinzas de clamp.
- Bisturí.
- Tubos Eppendorfs de 1500 µl.
- Botes estériles de 500 ml.
- Centrífuga BECKMAN COULER™ Allegra™6 Centrifuge.
- Alcohol.
- Agua destilada.

## Protocolo

La bolsa de diálisis peritoneal se recoge en el Área de Diálisis Peritoneal del CHUAC (Figura 3.1.A).

Una vez recogidas las bolsas, cada una de 2 l más o menos, vamos a la planta de cultivo donde realizaremos todo el proceso en la campana de cultivo celular manteniendo así las condiciones de esterilización. Además todo lo que entre en la campana se esterilizará.

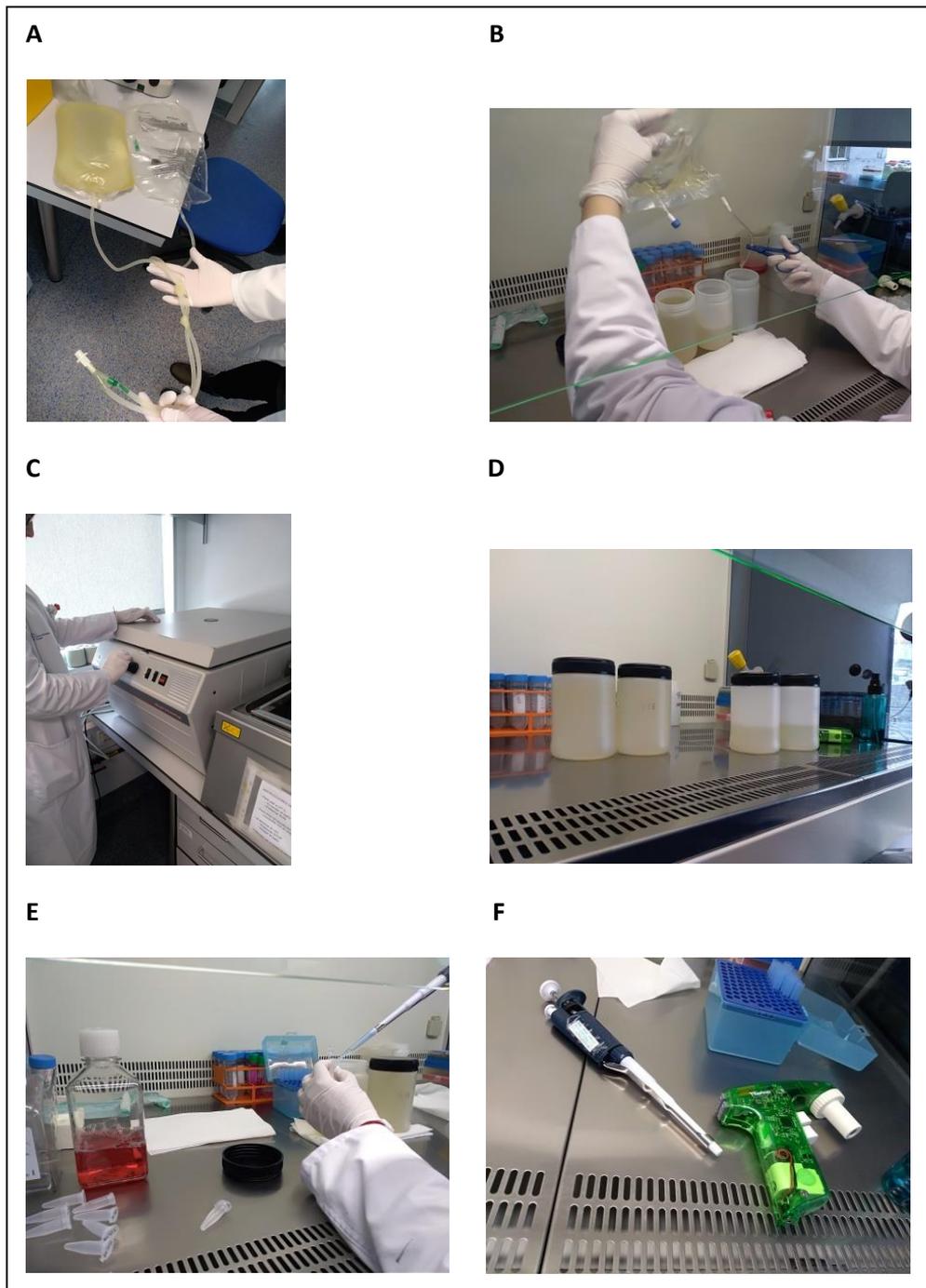
El primer paso es introducir el líquido de diálisis en botes de ½ l; para ello se campla la bolsa con unas pinzas de clamp, las cuales se ponen en el tubo que va de una bolsa a la otra de drenaje para cortar el posible flujo de un lado a otro. Posteriormente cortar con un bisturí estéril el tubo, desechando la bolsa de diálisis vacía, y así proceder al trasvase por presión del líquido de la bolsa a los botes intentando llenar los botes con cantidades iguales para que a la hora de realizar la centrifugación estén equilibrados (Figura 3.1.B).

A continuación, centrifugar 10 minutos a 1200 rpm, para obtener la separación sobrenadante-*pellet*. Colocar los botes en paralelo con las tapas puestas comprobando antes que tengan el mismo peso (Figura 3.1.C).

Mientras se realiza la centrifugación, coger unos tubos eppendorfs, los cuales marcamos, con un número identificador del paciente, para luego llenar con el dializado.

Tras la centrifugación, los botes pueden estar abultados, deformados por la presión (Figura 3.1.D). Volver a la campana con los botes, donde pasaremos el sobrenadante a los tubos eppendorfs (Figura 3.1.C) con pipetas de 1000 µl (Figura 3.1.F).

Una vez llenos los tubos, tapar y colocar en un soporte. Estos tubos eppendorfs se mantienen en hielo y posteriormente a 4°C hasta el día siguiente que realicemos la extracción de ADN mitocondrial. Si se va a tardar un tiempo mayor en realizar el siguiente procedimiento, se mantendrán a -80 °C hasta el momento de la extracción.



**Figura 3.1.** Desarrollo del procedimiento de obtención del sobrenadante del líquido de diálisis. (A) Bolsas de diálisis peritoneal. (B) Trasvase por presión el líquido de diálisis de las bolsas a unos botes de 500 ml. (C) Centrifugación. (D) Botes deformados por la presión tras la centrifugación. (E) Trasvase del sobrenadante de los botes a los tubos eppendorfs. (F) Pipeta (izq.) y pipetas (dcha.). Fotografías tomadas por Sara Yunta Sánchez.

### 3.2. Extracción del ADN circulante

Para ello se empleó el Kit de extracción DANAGENE Circulating DNA Minikit. Este proporciona un método rápido, seguro y conveniente para purificar y concentrar ADN circulante de elevada calidad, pureza y libre de inhibidores a

partir de muestras frescas o congeladas de suero/plasma u otros fluidos biológicos de un volumen de 1 ml.

Consiste en una serie de fases de purificación y posterior eliminación de las sustancias tampón para acabar pasando el ADN circulante de la columna a un tubo eppendorf (Figura 3.2). Normalmente el ADN circulante se encuentra altamente fragmentado 50-1000 pb. El grado de fragmentación depende de varios parámetros, así como el contenido de ADN circulante depende de las condiciones particulares de cada muestra, pero típicamente oscila en el rango de 0,1-100 ng/ml de efluente.

#### *Equipos y reactivos necesarios*

- Termobloque Biometra®TB7<sub>Thermoblock</sub>
- Etanol 100% e isopropanol Sigma.
- Microcentrífuga BECKMAN COULTER™ Microfuge<sup>R</sup> R Centrifuge.
- Vortex Fisherbrand®.
- Tubos Eppendorf de 1,5 y 2,0 ml.
- Componentes Kit (Tabla 3.1):

Reactivos	Ref.0613.1 50 Extracciones	Tª Stock
Tampón Lisis PS	55 ml	15-25 °C
Proteinasa K	2 x 100 mg	-20 °C
Tampón Desinhibición	18 ml	15-25 °C
Tampón de Lavado	10 ml	15-25 °C
Tampón de Elución	2 ml	15-25 °C
MicroSpin Columns	50 unidades	15-25 °C
Tubos de Recogida	250 unidades	15-25 °C
Tubos de 3 ml	50 unidades	15-25 °C

**Tabla 3.1.** Componentes del Kit de extracción.

Antes de comenzar el procedimiento hay que recomponer algunos de los elementos que lo constituyen. En concreto:

Disolver la proteinasa K en 2 ml en agua libre de nucleasas y conservar a -20 °C.

Añadir 40 ml de etanol 100 % al tampón de lavado. Mantener el envase bien cerrado para evitar la evaporación del etanol.

Añadir 10 ml de etanol 100 % al tampón de desinhibición.

Precalear el tampón de elución a 70 °C.

A continuación, descongelar el efluente del líquido de diálisis (a 4 °C si estaban a -20 °C) y centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos a 4 °C para eliminar posibles células residuales y otros restos celulares que puedan permanecer e

interferir con la técnica. Utilizar el sobrenadante resultante para la extracción de ADN circulante.

### *Protocolo*

Pipetear 1 ml de sobrenadante en un tubo eppendorf e incubar a 55 °C durante 15 minutos (Figura 3.2.A).

Centrifugar a 14000 rpm durante 5 minutos y a temperatura ambiente asegurando así una alta purificación sin restos de precipitado.

Pasar el sobrenadante a los tubos de 3 ml que trae el Kit (Figura 3.2.B). Ahí añadir a cada tubo: 1000 µl de tampón lisis PS del Kit (rompe vesículas que contengan ADN) más 75 µl de Proteinasa K del Kit (permeabiliza la membrana).

Agitar y mezclar bien. Incubar a 55 °C durante 15 minutos.

Añadir 750 µl de isopropanol Sigma y mezclar bien por inversión.

Pasar 700 µl de cada muestra a una MicroSpin columna (Kit) con su tubo de recolección. La capacidad de la columna son 800 µl, así que se hace lo siguiente 4 veces para pasar toda la muestra por la columna.

Centrifugar a 8000 rpm durante 30 segundos. Eliminar el líquido del tubo de recolección y pasar otros 700 µl de muestra, así hasta pasar todo el volumen de la muestra por la columna. La última centrifugación a 14000 rpm durante 30 segundos.

Colocar la columna en un nuevo tubo de recolección y añadir 500 µl de tampón de desinhibición a la columna (Figura 3.2.C).

Centrifugar a 14000 rpm durante 60 segundos y eliminar el líquido del tubo de recolección.

Añadir 500 µl de tampón de lavado en la columna. Centrifugar a 14000 rpm durante 60 segundos y eliminar el líquido nuevamente.

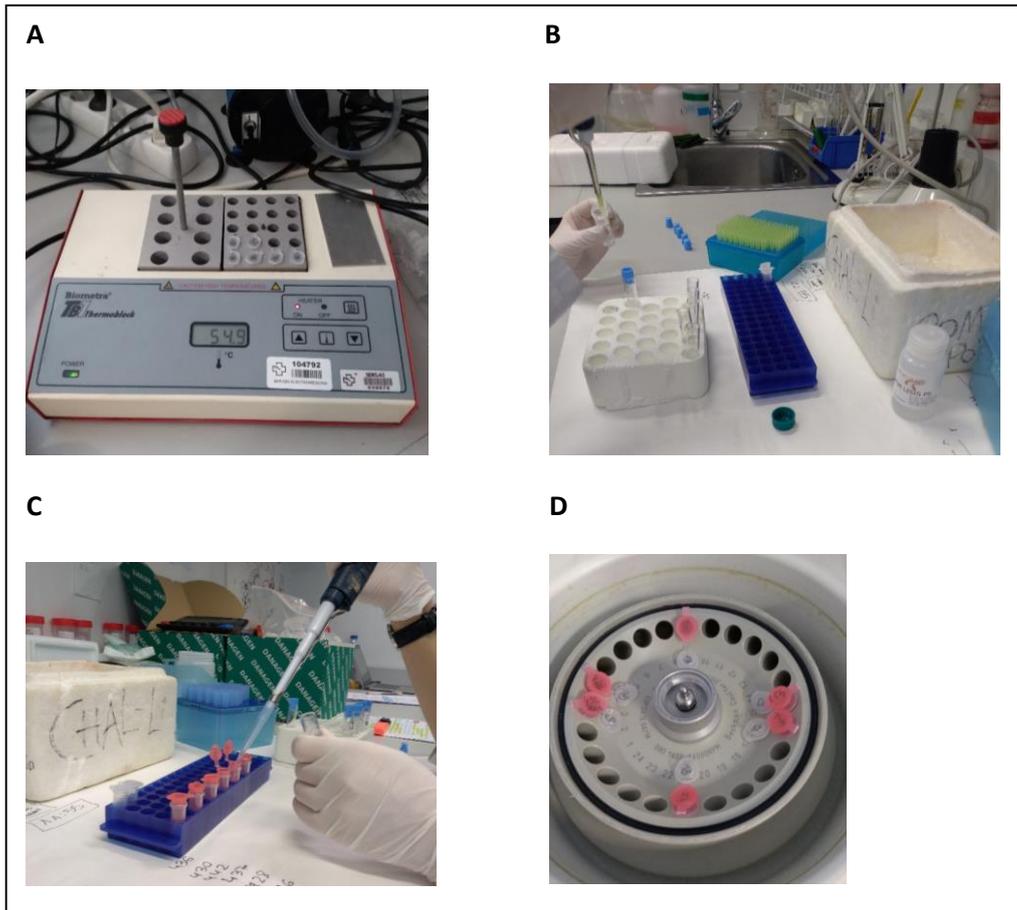
Centrifugar a 14000 rpm durante 3 minutos para eliminar el etanol residual.

Eliminar el tubo de recogida e insertar la columna en un tubo eppendorf de 1,5 ml. Añadir 30 µl de tampón de elución (precalentado a 70 °C) a cada columna. Incubar 2 minutos con los tubos abiertos a temperatura ambiente.

Centrifugar a 10000 rpm durante 60 segundos. Recoger los 30 µl y volver a depositar en el centro de la membrana (esto hace aumentar el rendimiento).

Incubar 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 14000 rpm durante 60 segundos (Figura 3.2.D).

Ahora el tubo eppendorf contiene el ADN circulante que se puede utilizar o almacenar a -20 °C.



**Figura 3.2.** Desarrollo del procedimiento de extracción del ADN circulante. (A) Termobloque con los tubos eppendorfs. (B) Tubos de 3 ml (tapa azul) con el sobrenadante, a los que se le añade el tampón lisis PS y la Proteinasa K del Kit. (C) Tubos de recolección con la columna (del Kit) a los que se le añade el tampón de desinhibición. (D) Centrifuga con las columnas insertadas en los tubos eppendorfs. Fotografías tomadas por Sara Yunta Sánchez.

### 3.3. Cuantificación de ADN mitocondrial por PCR en tiempo real

A partir de nuestro ADN circulante obtenido en el procedimiento anterior se realizará una PCR en tiempo real, un sistema basado en reporteros fluorescentes, para la posterior cuantificación del ADN mitocondrial.

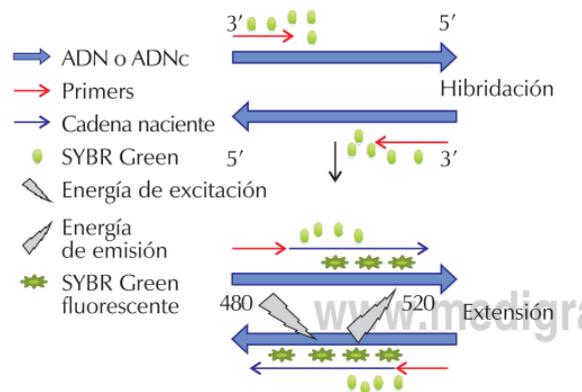
#### 3.3.1. PCR en tiempo real

Se trata de un método no específico basado en el uso de moléculas intercalantes con afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR.

Es una técnica simple y rápida donde no hay manipulación post-PCR, permitiendo la detección de productos inespecíficos con la opción de la “curva de desnaturalización” así como la detección de más de un producto específico en una misma reacción. Por otro lado, tiene la desventaja de ser una técnica de PCR laboriosa y dificultosa de poner a punto, y altamente sensible.

### 3.3.2. SYBR Green

El reportero SYBR Green (Figura 3.3) es una molécula cargada positivamente que, mientras esté en solución sin unirse al ADN de doble cadena, prácticamente no emite fluorescencia; sin embargo, cuando se une al ADN incrementa hasta 1000 veces su fluorescencia (Tamay de Dios *et al.*, 2013).



**Figura 3.3.** Método no específico. Cuando el SYBR Green está unido al ADN de doble cadena, es excitado a una longitud de onda de 480 nm, mientras que la longitud de onda de emisión corresponde a 520 nm (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La ventaja de emplear como marcador este tipo de moléculas es que se puede incluir junto a los demás reactivos de PCR y detectar cualquier producto amplificado, independientemente de su secuencia. Los inconvenientes son que tanto los productos específicos como los no específicos generan señal, ya que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena incluyendo dímeros de cebadores, y que no es posible detectar simultáneamente varias reacciones de amplificación distintas en el mismo tubo. Para evitar esta situación, se optimizan las reacciones realizando una comprobación de la técnica mediante una “curva melting” o “curva de disociación” (Figura 4.2.B) al final de la reacción, cuya función es la de evaluar si se formó un producto único o si hay presencia de productos no específicos (artefactos) como uniones inespecíficas de cebadores (por unión de los cebadores a secuencias parcialmente complementarias presentes en el ADN o ADN circulante de la muestra) o dímeros los cebadores (que pueden hibridarse entre ellos creando pequeños productos) ya que, cada gen tiene una temperatura de asociación ( $T_m$ ) específica. Por lo que la curva de disociación de diluciones muestra el perfil de desnaturalización de los productos amplificados. Si un producto presenta un perfil de desnaturalización diferente (valores de  $T_m$  diferentes), significa que es otro producto (no específico) de amplificación, pudiendo ser dímeros. Además, el SYBR Green es una sonda reversible, ya que cuando el ADN se encuentra en hebra simple el SYBR Green deja de unirse y por tanto no emite fluorescencia. Esto ocurre por ejemplo en la etapa de desnaturalización, mientras que, en la etapa de extensión, el ADN se encuentra en hebra doble y el SYBR Green se une a este emitiendo fluorescencia.

### 3.3.3. Cebadores específicos (12S)

Para el cálculo de copias de ADN mitocondrial se usan los primers o cebadores 12S “forward” y “reverse” (Tabla 3.2), de ADN complementarias a uno de los extremos de cada una de las hebras del ADN mitocondrial, los cuales amplifican fragmentos del gen mitocondrial.

GEN DIANA	CEBADOR SENTIDO (5'->3')	CEBADOR ANTISENTIDO (3'->5')	AMPLICIÓN (pb)
12S	CCACGGGAAACAGCAGTGAT	CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA	60

**Tabla 3.2.** Diseño de los cebadores empleados en la PCR en tiempo real, utilizando la herramienta informática *Primer3*, los cuales fueron manufacturados por Sigma. La expresión 12S se normalizó utilizando como gen de referencia el mitocondrial. Secuencia del cebador sentido 5'-3' (Forward Primer 12S) y cebador antisentido 3'-5' (Reverse Primer 12S), complementarias a los extremos de las hebras de ADN mitocondrial.

#### *Equipos y reactivos necesarios*

- Campana de esterilización con UV. DNA/RNA UV-CLEANER UVC/T-AR.
- Mastermix (LightCycler 4800 SYBR Green I, cebadores 12S y agua libre de nucleasas). Master kit, Roche Diagnostics.
- Microplacas de PCR de 96 pocillos. LightCycler 4800, Roche Diagnostics.
- Pipetas.
- Centrífuga BECKMAN COULER™ Allegra™6 Centrifuge.
- Termociclador de láser de PCR en tiempo real. LightCycler® 480 II, Roche Diagnostics.

#### *Protocolo*

El MasterMix se prepara en la campana de esterilización. Antes de comenzar es necesario encender los UV 20 minutos para esterilizar la zona de trabajo. Igualmente, al finalizar han de mantenerse encendidos 10 minutos para eliminar posibles restos de ADN (Figura 3.4).

En placas de PCR se realiza la mezcla de 10 µl de SYBR Green, 0,3 µl de cada cebador 20 µM (sentido y antisentido) y 4,4 µl de agua libre de nucleasas del kit de PCR para completar hasta 15 µl totales. Dejar MasterMix en frío.

En otra campana libre de UV, añadir 5 µl de la muestra de ADN circulante hasta completar 20 µl totales en cada pocillo de la placa (Figura 3.4.A).

Se emplea un calibrador, de concentración conocida (Figura 4.1), para luego poder calcular las concentraciones problema respecto a este con la curva de calibrado (Figura 3.6). Del calibrador en lugar de 5 µl de muestra del ADN circulante, se añaden 2,5 µl de calibrador y 2,5 µl de agua del kit de PCR, para que su volumen final también sea 20 µl.

También se ponen unos controles negativos de la técnica (Figura 4.1), lo más alejados de la muestra en la placa, en el que se añade solo la MasterMix y

agua del kit PCR, sin muestra, por lo que no debe producirse amplificación del ADN.

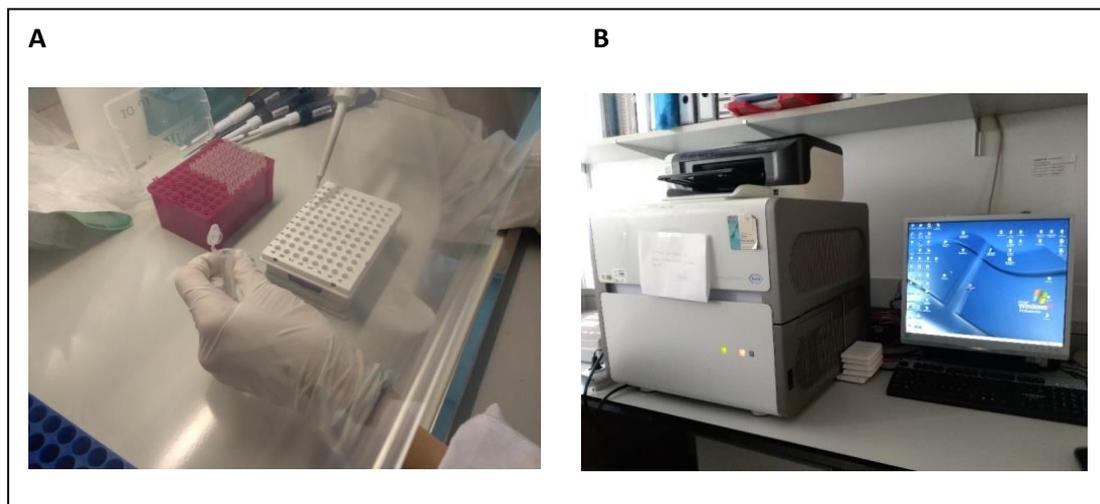
Cada pocillo se hace por duplicado.

No se usa un gen de referencia, no se hace relativa la cuantificación, sino que se extrapola de una concentración de una muestra de la que conocemos el número de copias.

Centrifugamos la placa de PCR para homogeneizar la Mastermix con la muestra de ADN circulante durante 2 minutos a 2000 rpm.

Pasamos la placa de PCR al Termociclador (Figura 3.4.B) para realizar la PCR en tiempo real. En el equipo escogeremos el programa adecuado (Figura 3.5). Se considera un resultado fiable si la amplificación se produce como máximo a 35-40 ciclos.

Como ya se ha comentado, el SYBR Green es una sonda inespecífica que se une a cualquier molécula de ADN de doble cadena; por ello, fue necesario realizar las curvas de *melting* o fusión (Figura 4.2.B), características del producto de PCR (dependiendo del tamaño y composición del amplicón). Para ello se realizó una etapa más de desnaturalización de 5 segundos a 95 °C, seguida de 1 minuto a 65 °C para que todas las hebras hibridasen de nuevo, alcanzando así el máximo de fluorescencia. Posteriormente se elevó la temperatura hasta 97 °C. La temperatura a la que la mitad de las hebras de ADN se encuentran disociadas es la temperatura de *melting* o temperatura de fusión ( $T_m$ ). Esta temperatura debe ser la misma en cada gen analizado, por lo que este dato permite destacar aquellas muestras en donde se haya amplificado algo distinto a nuestro amplicón ( $T_m$  sería distinta debido a que se trata de uniones inespecíficas del cebador o primer).



**Figura 3.4.** Desarrollo del protocolo de cuantificación de ADN mitocondrial a partir de PCR en tiempo real. (A) Microplacas de PCR con pocillos dentro de la campana de esterilización. (B) Termociclador de láseres de PCR en tiempo real. LightCycler® 480 II con el Software marca Philips. Fotografías tomadas por Sara Yunta Sánchez.

**DNAmIt son pacientes DP 20.03.2018**

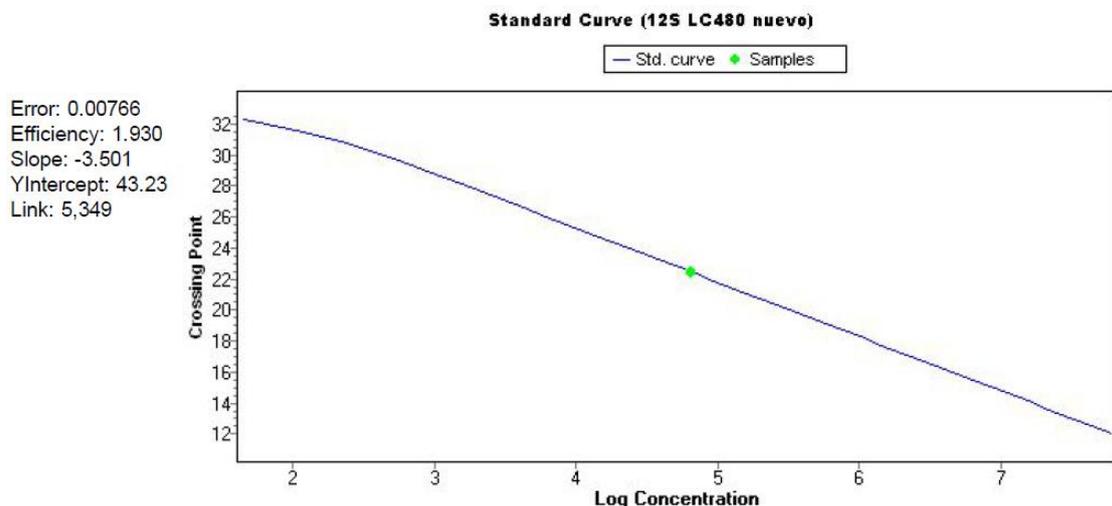
**Experiment**

Creation Date	03/20/2018 14:23:48	Last Modified Date	07/04/2018 11:59:18
Operator	María	Owner	María
Start Time	03/20/2018 14:24:35	End Time	03/20/2018 16:13:32
Run State	Completed	Software Version	LCS480 1.5.0.39
Macro		Macro Owner	
Macro Status			
Templates	mtDNA content SYBR Green new LC480-45 cyclers	Plate ID	06984813
Test ID		Lot ID	
Color Comp ID			
Run Notes			

**Programs**

Program Name		Cycles		Analysis Mode			
Incubation		1		None			
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.40		0	0	0
Program Name		Cycles		Analysis Mode			
amplificacion		45		Quantification			
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:10	4.40		0	0	0
62	None	00:01:00	2.20		0	0	0
72	Single	00:00:05	4.40		0	0	0
Program Name		Cycles		Analysis Mode			
Melting		1		Melting Curves			
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.40		0	0	0
65	None	00:01:00	2.20		0	0	0
97	Continuous		0.03	20	0	0	0
Program Name		Cycles		Analysis Mode			
enfriamiento		1		None			

**Figura 3.5.** Programa de PCR escogido. Se programan 45 ciclos de amplificación que consisten en una primera etapa de 10 segundos a 95 °C para la desnaturalización de las dobles cadenas de ADN, seguida de una bajada de temperatura de 1 minuto a 62 °C para permitir el anillamiento de los cebadores con la secuencia diana del ADN de cadena única y una etapa de extensión de 5 segundos a 72 °C, en la que el ADN polimerasa realiza la síntesis de la nueva hebra de ADN. Datos proporcionados por el LightCycler® 480 Software.



**Figura 3.6.** Curva de calibrado. Método de química analítica empleado para medir la concentración de una sustancia en una muestra por comparación con una serie de elementos de concentración conocida, a fin de conocer la cantidad de ADN inicial. Los valores  $C_p$  medios en función de la cantidad de ADN inicial de todas las réplicas pueden representarse en un gráfico semilogarítmico. De este modo, la recta de calibrado para estos valores medios puede definirse gracias a una regresión lineal con un determinado coeficiente de correlación ( $r^2$ ) que, para ser considerado de calidad, debe poseer un valor de 0,9999. No obstante, han de representarse los errores, generalmente definidos según el rango de valores obtenidos para un punto. Gráfica proporcionada por el LightCycler® 480 Software.

#### 4. Resultados

La cuantificación del ADN mitocondrial en el líquido de diálisis de pacientes sometidos a DP se ha realizado mediante PCR en tiempo real, permitiendo esta una detección rápida de los productos amplificados en cada ciclo de la reacción y una monitorización en tiempo real.

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y agentes específicos marcados con fluorocromos. Para este trabajo se ha recurrido al agente SYBR Green.

El SYBR Green es un compuesto fluorescente que se intercala entre las bases de ADN de doble cadena, por lo que a medida que aumenta el número de copias del producto de PCR, aumenta la fluorescencia emitida. Mediante la herramienta de cuantificación de expresión relativa del software LightCycler 480, la intensidad de la señal de fluorescencia es cuantificada y se realizan comparaciones entre los grupos basales y tratados teniendo en cuenta la eficiencia de la reacción y la normalización respecto al gen de referencia.

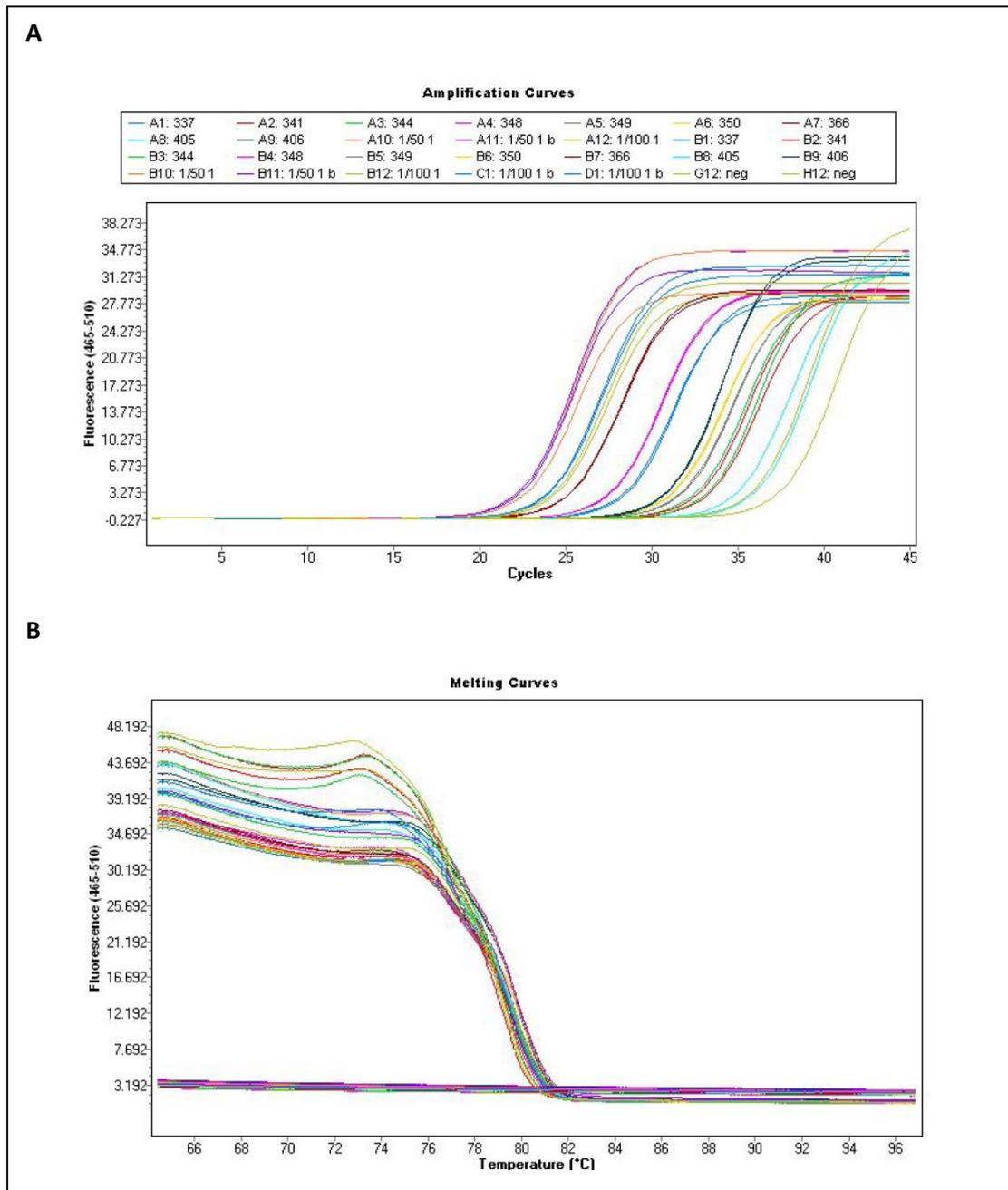
No es suficiente con detectar la amplificación en tiempo real y capturar la fluorescencia de cada muestra. El análisis de la reacción es el paso final para determinar la cuantificación génica (Figura 4.1). Para ello los termocicladores están provistos de una PC con un software que generalmente son fáciles de usar. Este software genera una serie de gráficas en donde se muestran todos los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa (Figura 4.2). Una de estas gráficas es la de amplificación (Figura 4.2.A) que muestra el curso y el progreso de la reacción, otra gráfica es la curva de disociación o curva de *melting* (Figura 4.2.B) que muestra información sobre la especificidad de la reacción.

## Results

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard	Status
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	337	Unknown	28.02	1.68E3		
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	341	Unknown	33.01	1.75E1		E
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	344	Unknown	32.26	4.70E1		E
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	348	Unknown	27.28	2.73E3		
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	349	Unknown	31.44	1.21E2		E
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	350	Unknown	30.85	2.17E2		E
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	366	Unknown	24.97	1.25E4		
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	405	Unknown	34.80	9.96E-1		E
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	406	Unknown	30.78	2.33E2		E
<input checked="" type="checkbox"/>	A10	1/50 1	Standard	22.49	6.39E4	6.53E4	
<input checked="" type="checkbox"/>	A11	1/50 1 b	Unknown	22.20	7.73E4		
<input checked="" type="checkbox"/>	A12	1/100 1	Unknown	24.16	2.13E4		
<input checked="" type="checkbox"/>	B1	337	Unknown	28.19	1.50E3		
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	341	Unknown	32.49	3.51E1		E
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	344	Unknown	33.03	1.69E1		E
<input checked="" type="checkbox"/>	B4	348	Unknown	27.34	2.63E3		
<input checked="" type="checkbox"/>	B5	349	Unknown	31.55	1.07E2		E
<input checked="" type="checkbox"/>	B6	350	Unknown	30.96	1.98E2		E
<input checked="" type="checkbox"/>	B7	366	Unknown	24.95	1.26E4		
<input checked="" type="checkbox"/>	B8	405	Unknown	35.91	1.20E-1		E
<input checked="" type="checkbox"/>	B9	406	Unknown	30.87	2.13E2		E
<input checked="" type="checkbox"/>	B10	1/50 1	Standard	22.42	6.67E4	6.53E4	
<input checked="" type="checkbox"/>	B11	1/50 1 b	Unknown	22.21	7.64E4		
<input checked="" type="checkbox"/>	B12	1/100 1	Unknown	24.07	2.25E4		
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	1/100 1 b	Unknown	23.87	2.57E4		
<input checked="" type="checkbox"/>	D1	1/100 1 b	Unknown	23.86	2.58E4		
<input checked="" type="checkbox"/>	G12	neg	Negative Control	37.30	5.83E-3		
<input checked="" type="checkbox"/>	H12	neg	Negative Control	35.88	1.28E-1		

E - Extrapolated concentration in standard curve

**Figura 4.1.** Listado de los resultados de cuantificación de Cp de ADN mitocondrial en cada paciente, incluidos unos calibradores y negativos. Se adquieren los datos cuando la amplificación está todavía en la fase exponencial. Esto está determinado por la identificación del número de ciclos al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo. Datos proporcionados por el LightCycler® 480 Software.



**Figura 4.2.** Gráficas generadas por el software. (A) Curva de amplificación. En el eje «Y» se muestra la cantidad de fluorescencia y en el eje «X» los ciclos de la reacción. La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de ADN (B) Curva *melting*. Se puede observar un único pico de amplificación que corresponde a la curva de disociación o curva *melting* que indica la especificidad de la reacción, es decir, que los amplicones que se formaron son del tamaño esperado. La línea inferior corresponde al control negativo, el cual no amplificó. Gráficas proporcionadas por el LightCycler® 480 Software.

Otro paso importante es elegir el tipo de cuantificación que se usará para determinar la amplificación; este procedimiento depende de los intereses del investigador. Para ello existen dos tipos de cuantificación: la absoluta y la relativa. La primera generalmente se utiliza para conocer el número exacto de copias amplificadas o la concentración precisa de ácidos nucleicos en una

muestra. La segunda se aplica cuando se desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Para la cuantificación del ADN mitocondrial a partir de estos datos (Figura 4.1) empleamos la siguiente ecuación (Figura 4.3):

$$C = Q \cdot \frac{\text{vol dilución}}{\text{vol ADN muestra}} \cdot \frac{1}{\text{vol efluente líquido diálisis}}$$

**Figura 4.3.** Ecuación para la cuantificación de ADN mitocondrial. C = número de copias de ADN mitocondrial del sobrenadante del paciente “x”. Q = una media del Cp de las dos réplicas, siendo Cp los valores inversamente proporcionales a la cantidad de ADN inicial. El volumen de ADN de la muestra que empleamos para realizar la PCR fue 5 µl. Volumen de dilución 30 µl de tampón. Volumen del efluente 1000 µl.

Ejemplo de una cuantificación:

Paciente 337:

$$C_{pA1-337} = 28,02 \text{ ----- } 1,68E3$$

$$C_{pB1-337} = 28,19 \text{ ----- } 1,50E3$$

$$C_{337} = 1,59 E3 \cdot \frac{30 \mu\text{l}}{5 \mu\text{l}} \cdot \frac{1}{1000 \mu\text{l}}$$

$$C_{337} = 9,54 \text{ copias ADN mitocondrial}$$

Los resultados obtenidos muestran claramente una diferencia en la cantidad de ADN mitocondrial en los diferentes pacientes:

- C<sub>337</sub> = 9,54 copias de ADN mitocondrial
- C<sub>341</sub> = 1,59 copias de ADN mitocondrial
- C<sub>344</sub> = 1,91 copias de ADN mitocondrial
- C<sub>348</sub> = 1,61 copias de ADN mitocondrial
- C<sub>349</sub> = 6,84 copias de ADN mitocondrial
- C<sub>350</sub> = 1,24 copias de ADN mitocondrial
- C<sub>366</sub> = 7,50 copias de ADN mitocondrial
- C<sub>405</sub> = 3,35 copias de ADN mitocondrial
- C<sub>406</sub> = 1,34 copias de ADN mitocondrial

Observándose una mayor cantidad de ADNmt en los pacientes 337, 349 y 366 en comparación con los demás pacientes como puede ser el 406, corroborándose en la curva de amplificación (Figura 4.1.B) que menos ciclos corresponde con una mayor expresión.

## 5. Discusión

En este trabajo hemos demostrado, por primera vez, que la cuantificación del ADN mitocondrial en el efluente del líquido de diálisis de pacientes sometidos a diálisis peritoneal es posible. Además hemos observado una diferencia importante en la cantidad de ADN mitocondrial entre los pacientes. En particular, se aprecia una mayor cuantificación en pacientes de primera conexión con respecto a los que llevan más tiempo en diálisis. Sería necesario realizar más estudios de cuantificación de ADN mitocondrial en laboratorio trasladándolos al ámbito clínico para confirmar que hay un claro resultado significativo.

Esta gran diferencia de expresión en pacientes de primera conexión se puede deber a que la primera trasfusión de DP se realiza el mismo día de la cirugía abdominal del catéter donde ya se produce una gran agresión inicial. En este sentido, una posible solución podría ser la de alejar los días de la cirugía con la primera diálisis peritoneal.

Como es evidente que el estrés oxidativo y la inflamación desempeñan un papel fundamental en la disfunción asociada a la edad y en patologías asociadas como el fallo de ultrafiltración peritoneal, los estudios con estrategias terapéuticas por componentes antioxidantes y antiinflamatorios está en pleno auge. El resveratrol, un fitoestrógeno atóxico, es una de las moléculas que se ha puesto una gran esperanza como anti-oxidante y anti-inflamatorio. Así, en un modelo experimental de daño renal, la administración de resveratrol disminuyó la inflamación renal y mitigó la hipertensión (Javkhedkar *et al.*, 2015). Por lo que, el valor de los cultivos es indudable, pues a partir de las biopsias del peritoneo obtenidas tras la cirugía abdominal, de pacientes en DP, se puede valorar por fluorescencia las especies reactivas de oxígeno, ROS (totales y mitocondriales), el daño oxidativo mediante detección de alteraciones del ADN y peroxidación lipídica, así como, estudiar la TEM que finalmente conduce al daño del peritoneo, con un gran potencial clínico.

Hay una necesidad de desarrollar biomarcadores que puedan ayudar a los clínicos a mejorar el riesgo de predicción de daño peritoneal, por lo que explorar nuevas vías de prevención y tratamiento del daño de membrana asociado a la diálisis peritoneal, incluyendo nuevos biomarcadores es de gran interés clínico.

Se sugiere que el ADNmt de circulación en el plasma de pacientes podría servir como biomarcador, ya que todo parece indicar que la disfunción mitocondrial puede desempeñar un papel determinante en la patología del fallo de membrana peritoneal al participar en la TEM, por medio de un incremento en el nivel de estrés oxidativo y mediadores inflamatorios. Dada la facilidad y rapidez relativas de la medida del ADNmt, podría ser este un biomarcador valioso de la gravedad de los pacientes (Nakahira *et al.*, 2013).

En este trabajo hemos podido sugerir la utilidad de la cuantificación del ADNmt en los pacientes sometidos a diálisis peritoneal como un posible nuevo biomarcador. Sin embargo, se hacen imprescindibles nuevos estudios que ilustren más detalladamente el mecanismo y los efectos fisiopatológicos del ADNmt (Qin *et al.*, 2015).

## 6. Conclusión

Los resultados obtenidos han permitido extraer las siguientes conclusiones:

Es posible cuantificar el ADNmt en el efluente del líquido de diálisis de pacientes sometidos a diálisis peritoneal llevando a la práctica los protocolos mencionados con anterioridad.

Así mismo, la técnica de cuantificación de ADN mitocondrial permite detectar diferencias entre pacientes sometidos a diálisis peritoneal.

En resumen, la cuantificación de ADN mitocondrial del líquido de diálisis, podría ser un biomarcador del nivel de inflamación crónica de la membrana peritoneal y, por lo tanto, un buen indicador de la calidad de la membrana peritoneal del paciente.

## 6. Conclusión

Os resultados obtidos permitiron extraer as seguintes conclusións:

É posible cuantificar o ADNmt no efluente do líquido de diálise de pacientes sometidos a diálise peritoneal levando á práctica os protocolos mencionados con anterioridade.

Así mesmo, a técnica de cuantificación de ADN mitocondrial permite detectar diferenzas entre pacientes sometidos a diálise peritoneal.

En resumo, a cuantificación de ADN mitocondrial do líquido de diálise, podería ser un biomarcador do nivel de inflamación crónica da membrana peritoneal e, polo tanto, un bo indicador da calidade da membrana peritoneal do paciente.

## 6. Conclusion

According to the results we have obtained we have reached to these conclusions:

It is possible to quantify of mitochondrial DNA in the dialysis fluid from patients undergoing peritoneal dialysis putting into practice the protocols we have mentioned previously.

The technique of mitochondrial DNA quantification makes it possible to detect differences between patients put under peritoneal dialysis treatment.

In conclusion, the quantification of the mitochondrial DNA from the dialysis liquid could be a biomarker of the level of chronic inflammation of the peritoneal

membrane and, therefore, a good indicator of the quality of the patients peritoneal membrane.

## 7. Bibliografía

Aroeira, L. S. *et al.* (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), pp. 2004–2013. DOI: 10.1681/ASN.2006111292.

Aroeira, L. S. *et al.* (2009) 'Cyclooxygenase-2 mediates dialysate-induced alterations of the peritoneal membrane', *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(3), pp. 582–592. DOI: 10.1681/ASN.2008020211.

Arrieta, J. *et al.* (2011) 'La diálisis peritoneal es la mejor alternativa coste-efectiva para la sostenibilidad del tratamiento con diálisis', *Nefrología*, 31(5), pp. 505–513. DOI: 10.3265/Nefrologia.pre2011.Jul.11103.

Chaudhary, K. and Khanna, R. (2010) 'Biocompatible peritoneal dialysis solutions: do we have one?', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(4), pp. 723-732. DOI: 10.2215/CJN.05720809.

Hung, K. *et al.* (2014) 'High-dialysate-glucose-induced oxidative stress and mitochondrial-mediated apoptosis in human peritoneal', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014(2014): 642793. DOI: 10.1155/2014/642793.

Javkhedkar, A. A. *et al.* (2015) 'Resveratrol restored Nrf2 function, reduced renal inflammation, and mitigated hypertension in spontaneously hypertensive rats', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 308(10), pp. R840–R846. DOI: 10.1152/ajpregu.00308.2014.

Kinugasa, H. *et al.* (2015) 'Mitochondrial SOD2 regulates epithelial–mesenchymal transition and cell populations defined by differential CD44 expression', *Oncogene*, 34(41), pp. 5229–5239. DOI: 10.1038/onc.2014.449.Mitochondrial.

López-Armada, M. J. *et al.* (2013) 'Mitochondrial dysfunction and the inflammatory response', *Mitochondrion*, 13(2), pp. 106–118. DOI: 10.1016/j.mito.2013.01.003.

Loureiro, J. *et al.* (2011) 'Blocking TGF- $\beta$ 1 protects the peritoneal membrane from dialysate-induced damage', *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(9), pp. 1682–1695. DOI: 10.1681/ASN.2010111197.

Loureiro, J. *et al.* (2013) 'Tamoxifen ameliorates peritoneal membrane damage by blocking mesothelial to mesenchymal transition in peritoneal dialysis', *PLoS ONE*, 8(4): e61165. DOI: 10.1371/journal.pone.0061165.

Nakahira, K. *et al.* (2013) 'Circulating mitochondrial DNA in patients in the ICU as a marker of mortality: derivation and validation', *PLoS Medicine* 10(12): e1001577. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001577.

Otero, A. et al. (2010) 'Prevalence of chronic renal disease in Spain : results of the EPIRCE study', *Nefrología (english version)*, 30(1), pp. 78-86. DOI: 10.3265/Nefrologia.pre2009.Dic.5732.

Qin, C. et al. (2015) 'Variation of perioperative plasma mitochondrial DNA correlate with peak inflammatory cytokines caused by cardiac surgery with cardiopulmonary bypass', *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 10(85), pp. 1–6. DOI: 10.1186/s13019-015-0298-6.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013) 'Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real', *Investigación en Discapacidad*, 2(2), pp.70-78. Disponible en : <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=44427> [Consultado 22-05-2018].

Yañez-Mó, M. et al. (2003) 'Peritoneal Dialysis and Epithelial-to- Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells', *The New England Journal of Medicine*, 348(5), pp. 403–413. DOI: 10.1056/NEJMoa020809.

Yuan, Y. et al. (2012) 'Mitochondrial dysfunction accounts for aldosterone-induced epithelial-to-mesenchymal transition of renal proximal tubular epithelial cells', *Free Radical Biology and Medicine*, 53(1), pp. 30–43. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.015.