

stricto
SENSU
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**FACULDADE DE MEDICINA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA**

ANDRÉ ANTUNES POITEVIN

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE FIBROBLASTOS NIH/3T3 A
DIFERENTES SOLUÇÕES DE DIÁLISE PERITONEAL**

**Porto Alegre
2010**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEFROLOGIA

ANDRÉ ANTUNES POITEVIN

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE FIBROBLASTOS NIH/3T3 A DIFERENTES
SOLUÇÕES DE DIÁLISE PERITONEAL**

Porto Alegre
2010

ANDRÉ ANTUNES POITEVIN

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO DE FIBROBLASTOS NIH/3T3 A DIFERENTES
SOLUÇÕES DE DIÁLISE PERITONEAL**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina e Ciências da Saúde ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – Área de Concentração: Nefrologia.

Orientador: Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo

Co-orientadores: Profa.Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa
Profa.Dra. Denise Cantarelli Machado

Porto Alegre
2010

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

P756e Poitevin, André Antunes

Efeito da exposição de fibroblastos NIH/3T3 a diferentes soluções de diálise peritoneal / André Antunes Poitevin. Porto Alegre: PUCRS, 2010.

72 p.: tab.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo.

Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Nefrologia.

1. DIÁLISE PERITONEAL. 2. FIBROBLASTOS. 3. SOLUÇÕES PARA DIÁLISE. 4. IN VITRO. 5. EPIDEMIOLOGIA EXPERIMENTAL. 6. CAMUNDONGOS. 7. CÉLULAS NIH/3T3. I. Figueiredo, Carlos Eduardo Poli de. II. Título.

C.D.D.

616.61

C.D.U. 616.61:612.38(043.3)

N.L.M. WJ 378

À minha família

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela Vida e por tornar tudo possível;

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, pelo constante apoio, pela confiança, pelo estímulo, pela amizade e por me ensinar a acreditar que tudo é possível. Qualquer palavra é pouco para expressar a minha gratidão;

Aos meus Pais, pelo amor, pelo carinho, pela dedicação e por sempre estimularem o meu crescimento profissional durante todos esses anos;

À minha irmã, Nádia. Nós crescemos e tudo mudou, mas não o meu amor por você;

Ao Rodrigo, obrigado pelo incentivo e pelo companheirismo;

Em especial a Enf^a. Dra. Ana Elizabeth Prado Lima Figueiredo, por me inserir neste Universo fantástico da Diálise Peritoneal, pela amizade, pelas oportunidades de aprendizagem que me proporcionou. Agradeço de coração;

À Dra. Denise Cantarelli Machado, que abriu as portas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do IPB e mostrou como é possível fazer pesquisa séria com alegria.

Ao biólogo Christian Viezzer, pela paciência, pela disposição, pelo apoio e ensinamentos que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho;

À Dra. Bartira Ercília Pinheiro da Costa, pelo apoio e auxílio na concretização de uma idéia;

Ao Dr. Irênio Gomes, pelo auxílio com as análises estatísticas;

A todos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do IPB.

Aos Colegas do Instituto de Doenças Renais, Dra. Adriana Barbieri Comparsi, Diego da Rosa Milstersteiner e Maria Cristina Klarmann Giugliani, Obrigado pelo apoio, sem vocês o trabalho seria muito mais árduo;

À Dra. Fernanda Longhi, obrigado pelo incentivo e auxílio no trabalho diário;

À PUCRS pela excelente estrutura oferecida na pós-graduação;

À *Fresenius Medical Care* pelas bolsas de diálise peritoneal disponibilizadas para este estudo;

O Laboratório de Nefrologia recebe suporte da Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), e Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

RESUMO

Introdução: A contínua exposição da membrana peritoneal às soluções de diálise peritoneal convencionais, consideradas não fisiológicas, é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de alterações morfológicas e funcionais do peritônio.

Objetivo: Comparar a viabilidade celular *in vitro* de fibroblastos de camundongos NIH/3T3 expostos a diferentes soluções de diálise peritoneal.

Materiais e Métodos: Estudo experimental; onde foram realizadas culturas de fibroblastos empregando meios de cultura contendo diferentes soluções de diálise (padrão e pH-neutro) nas 3 concentrações de glicose disponíveis. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do sal de tetrazólio.

Resultados: A viabilidade celular foi significativamente superior na solução com pH neutro em comparação a solução controle, nas três concentrações de glicose (Densidade óptica-média \pm dp: 1,5%^{controle} 0,295 \pm 0,047 vs 1,5%^{pH neutro} 0,372 \pm 0,042 P<0,001; 2,3%^{controle} 0,270 \pm 0,036 vs 2,3%^{pH neutro} 0,337 \pm 0,051 P<0,001; 4,25%^{controle} 0,284 \pm 0,037 vs 4,25%^{pH neutro} 0,332 \pm 0,032 P<0,001). Não ocorreu diferença significativa na viabilidade celular entre as três concentrações de glicose quando se usou a solução de diálise peritoneal padrão (ANOVA P=0,218), embora a viabilidade celular foi maior após a exposição à solução com pH neutro na concentração de glicose de 1,5% em comparação com 2,3 e 4,25% (ANOVA P=0,008: Bonferroni 1,5% vs 2,3% P=0,033, 1,5% vs 4,25% P=0,014, 2,3% vs 4,25% P=1,00).

Conclusão: A viabilidade celular foi maior nos fibroblastos expostos a solução de diálise peritoneal com pH neutro, especialmente nas menores concentrações de glicose. É possível que o pH mais fisiológico e a menor quantidade de produtos de degradação da glicose possam ser responsáveis pelos resultados.

Descritores: Diálise peritoneal, Biocompatibilidade, Fibroblasto 3T3, Cultura de células

ABSTRACT

Introduction: Peritoneal membrane continuous exposition to conventional peritoneal dialysis solutions is an important risk factor related to structural and functional alterations.

Objective: To compare *in vitro* cell viability in mice fibroblast NIH/3T3 after exposition to a neutral pH dialysis solution in comparison to cells exposed to a standard solution.

Methods: Experimental study. In order to evaluate cellular viability, mice fibroblast NIH/3T3 cell culture were used in media containing conventional peritoneal dialysis solution or a neutral pH peritoneal dialysis fluid. Both solutions were tested in all the commercially available glucose concentrations.

Results: Cell viability was evaluated with tetrazolium salt colorimetric assay. Fibroblast viability was significantly superior in the neutral pH solution in comparison to control, in all three glucose concentrations (Optical density - means \pm SD: 1.5%^{control} 0.295 \pm 0.047 vs 1.5%^{neutral pH} 0.372 \pm 0.042 P<0.001; 2.3%^{control} 0.270 \pm 0.036 vs 2.3%^{neutral pH} 0.337 \pm 0.051 P<0.001; 4.25%^{control} 0.284 \pm 0.037 vs 4.25%^{neutral pH} 0.332 \pm 0.032 P<0.001; control vs neutral pH respectively, Student t Test). There was no significant difference in cell viability between the three concentrations of glucose when standard solution was used (ANOVA P=0.218), although cell viability was higher after exposition to neutral pH peritoneal dialysis fluid at 1.5% in comparison to 2.3 and 4.25% glucose concentrations (ANOVA P=0.008: Bonferroni 1.5%vs2.3% P=0.033, 1.5%vs4.25% P=0.014, 2.3%vs4.25% P=1.00).

Conclusion: Cell viability was higher in the neutral pH dialysis solution, especially in the lower glucose concentration. A more physiological pH and lower glucose degradation products may be responsible for such results.

Keywords: Peritoneal dialysis, Biocompatibility, Fibroblast, Cell culture

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE	<i>Advanced Glycation End-products</i> (produtos da glicação avançada)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análise de variância)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CA-125	<i>cancer antigen 125</i>
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dp	Desvio padrão
DP	Diálise peritoneal
DPAC	Diálise peritoneal ambulatorial contínua
DPBS	Solução salina tamponada com fosfato
IIQ	Intervalo inter-quartil
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
IRT	Insuficiência renal terminal
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio
NF-kb	fator nuclear kB
OD	<i>optical density</i> (densidade ótica)
P	Nível de significância estatística
PAI-1	inibidor do ativador do plasminogênio-tipo1
PDG	Produtos de degradação da glicose
PTHrP	<i>Parathyroid hormone-related protein</i>
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TGF β -1	<i>transforming growth factor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das soluções de diálise peritoneal.....	27
Tabela 2 – Valores das médias e os desvios-padrão das absorbâncias dos ensaios piloto.....	36

LISTA DE FIGURAS E ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Densidade óptica pelo tempo de incubação na concentração de 25%. ...	33
Figura 2 – Densidade óptica pelo tempo de incubação na concentração de 50%. ...	33
Figura 3 – Densidade óptica pelo tempo de incubação na concentração de 75%. ...	34
Figura 4 – Densidade óptica pelo tempo de incubação na concentração de 100%. .	34
Figura 5 – Valores dos controles negativo e positivo do ensaio piloto.	35
Figura 6 – Cultivo de fibroblastos em diferentes soluções de diálise peritoneal.....	37
Figura 7 – Densidade óptica média dos controles negativo e positivo do ensaio principal.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Peritônio	16
2.1.1	Estruturas do peritônio e transporte	16
2.1.2	Alterações Morfológicas Peritoneais	17
2.1.3	Causas das modificações da Membrana Peritoneal	19
2.1.3.1	Uremia	19
2.1.3.2	Cateter para DP	19
2.1.3.3	Peritonite	20
2.1.3.4	Soluções de diálise peritoneal e a formação de AGEs	20
2.1.4	Mecanismos moleculares	22
3	OBJETIVO	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Delineamento	26
4.2	Soluções de diálise peritoneal (DP)	26
4.3	Linhagem celular e cultura de células	27
4.4	Determinação das condições experimentais	28
4.5	Cultivo de fibroblastos 3T3 com a presença de diferentes soluções de diálise peritoneal	28
4.6	Viabilidade celular pelo método do MTT	28
4.7	Análise Estatística	29
5	CONSIDERAÇÕES SOBRE O TRABALHO	30
6	RESULTADOS	32
6.1	Estabelecimento das condições experimentais	32
6.2	Ensaio principal	37
7	DISCUSSÃO	39
8	CONCLUSÃO	45
9	PERSPECTIVAS	46

REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO A – CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL – CEP 1357/06, 2006....	56
ANEXO B – COMPROVAÇÃO DA SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	57
ANEXO C – ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO.	58

1 INTRODUÇÃO

Introduzida há aproximadamente 20 anos por Popovich e Monchrief, a diálise peritoneal ambulatorial contínua (DPAC) é um método de terapia renal substitutiva estabelecido (Negoi et al., 2009).

O princípio básico da diálise peritoneal (DP) é a transferência de água e solutos da circulação para a cavidade peritoneal, utilizando o peritônio como membrana dialítica. A presença da solução de diálise na cavidade abdominal permite que essa troca ocorra. Para que a solução de diálise remova líquidos e solutos é adicionado um agente osmótico à solução, que na maior parte das vezes é a glicose. A concentração da solução de diálise peritoneal está baseada na quantidade de glicose adicionada à solução, que pode variar de 1,5% a 4,25% nas soluções padrões comercialmente disponíveis.

Desde o final dos anos 70, as soluções de diálise peritoneal são acondicionadas em bolsas de cloreto de polivinil, modificação que foi introduzida por Oreopoulos et al (1978). Após vários anos de utilização desta técnica, cresceram as preocupações com a manutenção e a viabilidade da membrana peritoneal exposta a soluções de diálise peritoneal não fisiológicas. O contato contínuo das soluções de diálise peritoneal convencionais com o peritônio é considerado um fator de risco importante para o desenvolvimento de alterações teciduais na membrana peritoneal (Di Paolo et al., 1986). As alterações que se estabelecem são atribuídas à quantidade elevada de glicose, hiperosmolaridade e pH ácido destas soluções, bem como a presença de substâncias potencialmente tóxicas ao peritônio, como os produtos de degradação da glicose e os produtos finais da glicação avançada (Topley et al., 1998). Por essas razões, as soluções de diálise peritoneal convencionais são consideradas bioincompatíveis. Entende-se por biocompatibilidade a capacidade do material de não provocar qualquer resposta do hospedeiro ao ser utilizado. Em diálise peritoneal, biocompatibilidade é a habilidade da solução de diálise peritoneal em manter as características anatomo-fisiológicas do peritônio (Gurland, 1994).

As modificações estruturais sofridas pela membrana peritoneal conduzem a perda de ultrafiltração, a redução do *clearance* de solutos e a falência da técnica (Williams et al., 2004).

A preocupação com a manutenção da membrana peritoneal tem estimulado o desenvolvimento de novas soluções de diálise peritoneal mais biocompatíveis. Dentre elas, existe a solução de dupla câmara, com pH neutro e baixa concentração de produtos de degradação da glicose considerada mais fisiológica, quando comparada com as soluções padrão. Esta solução mostrou efeitos benéficos tanto *in vitro*, como *in vivo* (Lee et al., 2005; Williams et al., 2004; Lage et al., 2000). Acredita-se que, por meio de condições experimentais, seja possível avaliar a biocompatibilidade das soluções de diálise peritoneal em culturas celulares. Logo, o presente estudo comparou a viabilidade celular de fibroblastos de camundongos NIH/3T3 expostos a diferentes soluções de diálise peritoneal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PERITÔNIO

2.1.1 Estruturas do peritônio e transporte

O peritônio é a membrana serosa mais extensa do corpo. É dividida em duas porções: a parietal que reveste a parede abdominal e a visceral que reflete sobre as vísceras. O espaço entre os dois folhetos é a cavidade peritoneal, que exerce a função excretora dos rins nos portadores de insuficiência renal crônica (Dobbie et al., 1988). A membrana peritoneal é composta por uma camada única de células mesoteliais e pelo interstício, que é composto por tecido conjuntivo frouxo que contém colágeno, células parenquimais, fibroblastos e mucopolissacarídeos, além de capilares peritoniais e vasos linfáticos. Em situação normal, a cavidade peritoneal contém aproximadamente 100ml de líquido composto pelo surfactante fosfatidilcolina que é secretado pelas próprias células mesoteliais, o qual fornece lubrificação aos órgãos internos, a fim de reduzir o atrito entre eles (D'Ávila et al., 1996; Dobbie, 1988).

Durante a diálise peritoneal (DP) a cavidade abdominal é ocupada por aproximadamente 2 litros de solução de diálise. Estima-se que no adulto normal a superfície total do peritônio seja de aproximadamente 1m^2 (Rubin, 1988). Aproximadamente 60% da superfície do peritônio é composta pelo visceral e 10% é formado pelo peritônio parietal. O restante é formado pelo omento e mesentério. Não está bem claro qual das porções do peritônio está ligada ao transporte peritoneal, pois existem diferenças entre as espécies estudadas (Fox et al., 1991; Alon et al., 1988).

A membrana peritoneal realiza o transporte de solutos e água entre o sangue e a solução de diálise de duas formas: a difusão e a ultrafiltração. Através da difusão, as soluções se movem de um lado para o outro da membrana, obedecendo a um coeficiente de concentração entre os solutos. Para ultrafiltração, utiliza-se a glicose como agente osmótico, a fim de realizar o transporte dos solventes. Juntamente com a ultrafiltração ocorre o arrastamento de solutos, enquanto acontece o transporte do solvente (Pecoits-Filho et al., 2003).

O maior constituinte do peritônio é o mesotélio, uma lamina única composta por células mesoteliais assentadas sobre a membrana basal. O transporte através da membrana é determinado pela área de superfície e pela permeabilidade, regra aplicada para qualquer membrana. Na diálise peritoneal o peritônio funciona como a membrana de troca, onde a área efetiva de troca é caracterizada pelo número de capilares perfundidos (Krediet et al., 1994) e não pela área anatômica. A área vascular é na verdade a principal envolvida no transporte de solutos. Esta área é consideravelmente menor que o território vascular do peritônio, correspondendo a 25% dos capilares perfundidos em condição de repouso (Pietrzak et al., 1989). Os capilares peritoneais são, provavelmente, a principal barreira de resistência ao transporte de água e solutos. A permeabilidade capilar funciona através do sistema de poros seletivos, chamado de *Modelo de Três Poros* que propõe que o transporte de moléculas de baixo peso molecular seja efetuado por poros de 4,0-6,0 nm, como as moléculas de uréia, de creatinina e de glicose, a chamada via transcapilar. Um número menor de poros de maior diâmetro 20-30 nm assumiriam o transporte de moléculas maiores, como as proteínas (Rippe, 1991; Rippe e Krediet, 1994). E as aquaporinas-1, uma proteína da membrana celular com poros 0,3-0,5 nm, está envolvida no movimento de água, chamada de via transcelular. (Pannekeet, 1996). Os vasos linfáticos peritoneais também se encontram localizados no interstício. Os linfáticos subdiafragmáticos contêm estômatos e espaços por onde drena água e solutos da cavidade peritoneal diretamente para a circulação sistêmica (Zakaria, 1996).

As células mesoteliais possuem microvilosidades e secretam substâncias como o surfactante fosfatidilcolina e o antígeno associado ao câncer 125 (CA125), este último utilizado como marcador de massa e renovação das células mesoteliais. (Dobbie, 1989, Koomen, 1994).

2.1.2 Alterações Morfológicas Peritoneais

No início da diálise peritoneal as células mesoteliais, apresentam aparência morfológica normal, com as células unidas umas com as outras e com a superfície recoberta pelas microvilosidades. Transcorridos alguns meses em tratamento dialítico, se inicia uma redução gradual nas microvilosidades e após um período de

aproximadamente 10 meses, observa-se a perda completa das microvilosidades. Segundo Krediet, essas alterações evoluem para o afastamento das junções intercelulares, conduzindo a separação das células mesoteliais e posteriormente, as células se tornam inviáveis, e ocorre esfoliação das células com o surgimento de áreas desnudadas. Além disso, começam alterações no interstício, como edema e aumento de depósito de colágeno tipo IV (Krediet, 1999; Williams et al., 2003).

Inicialmente, as investigações sobre as alterações morfológicas recaíam sobre as células mesoteliais e o interstício e a sua relação com as peritonites (Dobbie et al., 1990; Honda et al., 1996). Posteriormente, observaram que essas alterações, não estavam relacionadas somente as peritonites, mas também a outros fatores como o tempo de terapia dialítica, a própria condição urêmica do paciente (Williams et al., 2002) e o contato contínuo das soluções de diálise com o peritônio.

Podem ser encontradas alterações como a perda ou degeneração do mesotélio, espessamento submesotelial, que alguns autores descreveram como fibrose ou mesmo esclerose, e reduplicação do número de vasos sanguíneos e a da membrana basal (Mateijssen et al., 1999; Combet et al., 2000). As células mesoteliais podem sofrer trans-diferenciação no seu fenótipo, passando de células epiteliais para um fenótipo mesenquimal (Yanez et al., 2003). Esses dados sugerem a ação direta das células mesoteliais no processo de fibrose e com isso, de falência de ultrafiltração da membrana peritoneal.

Segundo Mortier (2003), estudos prévios descreveram as modificações sofridas pelo peritônio, mas não conseguiam estabelecer a relação entre as mudanças morfológicas e o evento clínico específico que as provocava. Rubin et al., (1991) demonstrou através de autópsia que as modificações presentes na membrana peritoneal estavam relacionadas diretamente com o número de eventos de peritonite.

Um estudo mais abrangente foi o de Williams et al., (2002), que comparou as alterações estruturais entre grupos de indivíduos normais, pacientes urêmicos pré-tratamento dialítico, pacientes em hemodiálise e em diálise peritoneal. Encontrou uma diferença significativa da espessura zona compacta da camada submesotelial entre os grupos – pacientes em DP apresentaram uma espessura de 270 μ m e nos

indivíduos saudáveis a espessura foi de 50µm. A espessura dessa camada aumenta significativamente com o tempo de duração da diálise peritoneal. Outro achado importante no grupo em diálise peritoneal foi que a prevalência das alterações vasculares aumentou também com o tempo em terapia. O número de capilares em relação à área do peritônio analisada encontrava-se maior nos pacientes que se apresentavam com falência de membrana peritoneal.

Clinicamente, essas modificações conduzem a aumento do transporte de solutos, prevalência maior de infecções, falha de ultrafiltração, diálise inadequada podendo culminar com abandono da técnica. (Davies et al., 1998; Devuyst et al., 2001).

2.1.3 Causas das modificações da Membrana Peritoneal

2.1.3.1 Uremia

A uremia por si só é capaz de produzir alterações na membrana peritoneal antes mesmo de ser utilizada para terapia dialítica (Mortier, 2003). No estudo de Williams et al., (2002) a espessura da zona compacta da camada submesotelial foi de 140µm. Confirmando que existem alterações antes mesmo do início de qualquer modalidade de terapia renal substitutiva.

Estudos prévios demonstram que na uremia há um aumento da produção de óxido nítrico na circulação sistêmica, juntamente com níveis elevados de produtos finais da glicação avançada (AGEs do inglês, *Advanced Glycation End-products*) circulante que estimulam a liberação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF do inglês, *Vascular endothelial growth factor*). (Lau T, 2000; Miyata T, 1999; Wasada T, 1998). Segundo Combet et al., (2001) a correção da anemia relacionada à uremia com eritropoetina pode não prevenir as alterações estruturais na membrana peritoneal de ratos urêmicos.

2.1.3.2 Cateter para DP

Recentemente Flessner et al., (2007) demonstraram em um estudo experimental com ratos, que a presença física do cateter na cavidade abdominal

provoca alterações morfológicas na membrana peritoneal. O mesmo grupo mostrou em outro estudo prévio a presença de alterações vasculares e do aumento na espessura do peritônio em ratos após oito semanas de exposição a soluções estéreis. Essas alterações foram atribuídas à presença do cateter para infusão das soluções utilizadas (Flessner, 2006).

2.1.3.3 Peritonite

O peritônio responde ao processo infeccioso com a liberação de citocinas inflamatórias. Na fase inicial da infecção os macrófagos liberam o fator de necrose tumoral e interleucina –1 em resposta a invasão microbiana (Jorres, 1996).

Na peritonite aguda pode-se observar desnudação das células mesoteliais (Pannekeet, 1995). Em quadros mais leves da infecção pode ocorrer regeneração do epitélio lesado durante o período de recuperação. Porém, em alguns casos essa recuperação pode ser prejudicada ou até mesmo não ocorrer, induzindo modificações permanentes na membrana peritoneal (Brownlee, 1984). Ahmad et al., (2006) conduziu um estudo com pacientes em diálise peritoneal, que usavam solução com bicarbonato/lactato como tampão e comparou com pacientes que utilizavam solução somente com lactato. Foi observado que a taxa de peritonite foi significativamente menor no grupo que utilizou a solução mais biocompatível quando comparado com a convencional.

Assim como descrito na uremia, episódios de peritonite provocam excessiva resposta inflamatória, modificações na membrana peritoneal, aumento da rede vascular, contribuindo para deterioração da função peritoneal (Schilte, 2009).

2.1.3.4 Soluções de diálise peritoneal e a formação de AGEs

As soluções de diálise peritoneal convencionais possuem concentrações elevadas de glicose (75-220 mmol/L), agente osmótico que torna a solução altamente osmolar (334-486 mosm/L) e possui um pH ácido (5,5), para que durante o processo de esterilização a quente a glicose não sofra o processo de caramelização. Essas características tornam as soluções convencionais substâncias não fisiológicas. O processo de esterilização a quente induz o surgimento de produto

de degradação da glicose (PDG) que estimula a formação dos produtos da glicação avançada (AGEs) (Passlick-Deetjen, 2001). Os PDG não se formam somente com a esterilização na autoclave, mas também durante o período de estocagem das soluções, porém em quantidades menores (Kjellstrand, 1995).

Outro processo de esterilização disponível é a filtração. Este processo apresenta a vantagem de formar uma menor quantidade de PDG (Sundaram, 1997). Os PDGs são um grande grupo originado a partir da degradação de carboidratos classificados como componentes carbonilados, altamente reativos, como os aldeídos e dicarbonilados, por exemplo, formaldeído, acetaldeído, glioxal, metilglioxal, 3-deoxiglucosone, 5-hidroxiacetilfurfural (Schwenger, 2006). Até a descoberta destas substâncias, acreditava-se que a alta concentração de glicose fosse o principal fator para dano na membrana peritoneal e como consequência a falência da técnica de diálise peritoneal. Entretanto, os PDGs foram identificados como substâncias tóxicas que agem diretamente na membrana peritoneal impondo, também, modificações no peritônio (Witowski, 2003).

Os AGEs se formam a partir de uma série de reações, iniciando com a reação de Maillard que resulta numa base de Schiff. Formada pela interação não enzimática do grupo carbonila do açúcar com o grupo amina da proteína (Weiss, 1999; Monnier, 1992). Na seqüência, a base de Schiff, mais instável, sofre rearranjos e se torna uma estrutura mais estável, o chamado produto de Amadori. Os produtos de Amadori gerados possuem grupos carbonilas reativos, que se condensam com grupos aminas primários, dando origem aos AGEs (Monnier, 2003). Henderson et al., (1986) chamou atenção para os PDG ao relacionar a dor abdominal dos pacientes no momento da infusão da solução de DP com o tempo que estas soluções ficavam armazenadas. Além disso, observou a redução na ultrafiltração dos pacientes que utilizaram soluções de diálise peritoneal estocadas por períodos longos.

Wieslander et al., (1991) investigou o efeito dos PDGs sobre a função celular e mostrou que esses causam inibição no crescimento de fibroblastos L929. Musi et al., (1998) demonstrou que a combinação dos PDG com pH baixo aumenta o transporte de solutos, com baixo peso molecular, durante um período curto de tempo em ratos.

Direta ou indiretamente, através de seus produtos de degradação, a glicose pode ser responsável pelas modificações morfológicas da membrana peritoneal. As alterações estruturais podem ser neoangiogênese, reduplicação da lamina basal do mesotélio e dos vasos sanguíneos, fibrose intersticial e hialinização da camada média dos capilares com depósito, preferencialmente, de colágeno tipo IV (Williams, 2003).

2.1.4 Mecanismos moleculares

Estudos prévios demonstram que a expansão da rede vascular da membrana peritoneal é um determinante importante no aumento do transporte de solutos através do peritônio. Associada com o aumento da rede capilar se encontra a fibrose intersticial evidenciada pelos estudos que efetuaram biópsia peritoneal. As células mesoteliais possuem a capacidade produzir citocinas fibrogênicas, TGF β -1 (do inglês, *transforming growth factor*) (Margetts et al., 2003).

O TGF β -1 é uma citocina que está relacionada com diversos processos, como a ativação de fibroblastos, a deposição de colágeno, a inibição de fibrinólise através do inibidor do ativador do plasminogênio-tipo1 (PAI-1) e a manutenção da fibrose pela inibição da matriz das metaloproteinases. Dessa forma, o TGF β -1 induz fibrose submesotelial e participa dos processos de neovascularização (Margetts et al., 2005). Está, também, relacionado com transição do epitélio mesenquimal, por meio do qual as células mesoteliais trans-diferenciavam-se em miofibroblasto, um dos principais reguladores celulares da matriz extracelular e intimamente relacionados com a fibrose intersticial (Margetts et al., 2003; Margetts et al., 2005). Outras citocinas, junto com o TGF β -1, como PAI-1 estão associadas à fibrose em seus estágios iniciais através da inibição da atividade fibrinolítica na superfície da membrana peritoneal e conseqüentemente com o acúmulo de fibrina, que é a base para o desenvolvimento da fibrose.

O aumento no número dos vasos sanguíneos intersticiais está diretamente associado à elevação na permeabilidade capilar. Neste processo existe a participação do óxido nítrico que está envolvido na regulação da permeabilidade e do tônus vascular. Com o aumento do tempo de terapia dialítica existe a elevação da atividade da enzima óxido nítrico sintetase (Combet et al., 2000). Essa elevação na

atividade enzimática em pacientes com longo tempo de terapia sugere um significativo aumento da área endotelial. Juntamente com o óxido nítrico está o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) que é uma proteína que está ligada à formação de novos vasos sanguíneos. Esta proteína foi encontrada no efluente do dialisato e isso pode ser diretamente correlacionado com a permeabilidade vascular aumentada para moléculas pequenas (Combet et al., 2000). A elevação na atividade do VEGF se relaciona diretamente com a angiogênese na membrana peritoneal. Esse mecanismo ainda não está totalmente elucidado, mas se sabe que está ligado a fatores como o TGF β -1, a isquemia local e com citocinas inflamatórias como a interleucina 6. Mais recentemente, Noh et al., (2005) trouxeram evidências que a ativação do sistema renina-angiotensina pode estar relacionada com a angiogênese e a fibrose intersticial. O uso de losartan, *in vitro*, resultou na inibição do TGF β -1 em células mesoteliais expostas a soluções com altas concentrações de glicose. Ademais, outro estudo mostra que o uso de inibidores da enzima de conversão da angiotensina inibe a produção excessiva de VEGF, por bloquear os receptores da angiotensina II e assim reduzir a neovascularização (Sauter et al., 2007).

Mais recentemente, tem aumentado as pesquisas sobre o peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP do inglês, *Parathyroid hormone-related protein*) considerado como um regulador importante do sistema renina-angiotensina, pois a elevação do PTHrP inibe a liberação de renina, efeito diretamente relacionado ao seu aumento (Fritsch et al., 2004). Outro foco de pesquisas é o papel do estresse oxidativo, que contribui para alterações inflamatórias tanto sistêmicas, quanto peritoneais, que podem conduzir a falência de membrana peritoneal. O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de produtos reativos do oxigênio e a capacidade de ação do sistema antioxidante, a favor da produção. Esta elevação da produção provoca aumento de interleucina 6 mediante a ativação do fator de transcrição NF- κ B, um complexo sistema de proteínas que controla a transcrição do ácido desoxirribonucléico (Saxena, 2007).

Esses são somente alguns dos mecanismos moleculares relacionados com as alterações morfológicas da membrana peritoneal, certamente a descoberta de novas rotas e o melhor entendimento dos mecanismos das alterações na membrana

peritoneal permita uma modificação nas terapias, a fim de preservar a função do peritônio.

3 OBJETIVO

Comparar a viabilidade celular, *in vitro*, de fibroblastos de camundongos NIH/3T3 expostos a diferentes soluções de diálise peritoneal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão Científica do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexo A) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

4.1 DELINEAMENTO

Estudo Experimental *in vitro*.

4.2 SOLUÇÕES DE DIÁLISE PERITONEAL (DP)

Foram utilizadas no estudo soluções de diálise peritoneal que contém glicose, como agente osmótico, nas três concentrações disponíveis (1,5; 2,3 e 4,25%). A solução convencional utilizada foi a *Peritosteril®* (*Fresenius Medical Care*, Jaguariúna, Brasil) e a com pH neutro e lactato como tampão foi a *Balance®* (*Fresenius Medical Care*, Bad Homburg, Germany).

A solução *Balance®* é apresentada em uma bolsa com dupla câmara. Uma das câmaras contém a solução de lactato de sódio alcalina (sódio 75 mmol/l e lactato 70mmol/l) e a outra câmara que contém a solução ácida com eletrólitos com base em glicose (sódio 193mmol/l, cálcio 3,5mmol/l, magnésio 1mmol/l, cloro 203 mmol/l, glicose 166,5mmol/l) para a solução na concentração 1,5%. A solução pronta para uso é obtida após a mistura do conteúdo dos dois compartimentos quando se rompe o lacre entre as duas câmaras. A solução convencional é apresentada em bolsa com câmara única. Todas as manipulações das bolsas de diálise peritoneal seguiram sempre técnicas assépticas, a fim de evitar a contaminação das soluções. A solução com pH neutro foi utilizada somente nas 24h após a mistura dos líquidos de seus compartimentos, conforme orientação do fabricante contida na bula do produto.

A composição de ambas as soluções é apresentada na tabela 1.

Tabela 1 – Composição das soluções de diálise peritoneal.

Componentes (mmol/L)	CONTROLE (Peritosteril®1.5%)	pH NEUTRO (Balance®1.5%)
Sódio	134	134
Cálcio	1,75	1,75
Magnésio	0,5	0,5
Cloro	103,5	101,5
Lactato	35	35
pH	5,5	7,0
Osmolaridade teórica (mOsm/L)	358	358

4.3 LINHAGEM CELULAR E CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem celular utilizada foi a de fibroblastos de camundongos NIH/3T3 obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC CRL-1658, Manassas, Virginia, U.S.A). São células de crescimento aderente em monocamadas. A manipulação celular foi sempre realizada em condições estéreis, e as culturas foram mantidas em estufa (Sanyo) a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Os fibroblastos NIH/3T3 foram cultivados em garrafas de 25 cm² contendo meio de cultura DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, Grand Island, NY, U.S.A.), gentamicina (Gibco) (0,025 g/L), estreptomicina/penicilina (Gibco) (0,1 g/L) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco) em uma estufa (Sanyo) a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

As células foram cultivadas em triplicatas na densidade de 0,5x10⁴ células por poço, contadas com o auxílio da câmara de Neubauer, em placas de cultura de 96 poços.

4.4 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Para o estudo piloto, foram utilizadas três placas de cultura com 96 poços para cada período de tempo analisado 24, 48 e 72 horas. Os fibroblastos foram semeados em meio DMEM e cultivados por 24 h para aderirem à placa. Após este período, 50 µL da solução para diálise peritoneal PADRÃO/DMEM ou da solução de diálise peritoneal TESTE/DMEM foi adicionado para substituir o meio DMEM nos poços previamente definidos para cada uma das diferentes condições experimentais, em triplicata.

4.5 CULTIVO DE FIBROBLASTOS NIH/3T3 COM A PRESENÇA DE DIFERENTES SOLUÇÕES DE DIÁLISE PERITONEAL

A partir dos testes piloto, definiu-se que os ensaios experimentais seriam realizados empregando concentrações 1:1 (v/v) da solução de diálise peritoneal (TESTE ou pH neutro/DMEM) por um período de 48 horas de cultura. Foram semeadas três placas de 96 poços, com triplicatas das concentrações e diluições usadas no ensaio piloto. A densidade celular utilizada de $0,5 \times 10^4$ provou ser adequada para os tempos estipulados não necessitando alteração.

4.6 VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DO MTT

Após o período de incubação, as culturas celulares foram lavadas com tampão de DPBS (100 µL) e logo após, foi adicionado meio DMEM (50 µL/poço) contendo 10% da solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, Saint Louis, MO, USA) na concentração de 5 mg/mL. As células foram incubadas por 4 horas em estufa (Sanyo) a 37° contendo 5% de CO₂. Transcorridas às 4 horas, o meio com MTT foi aspirado e logo em seguida adicionado 100 µL de DMSO (Sigma) para solubilizar os sais de formazan. A conversão do produto do MTT (medida de viabilidade celular) foi mensurada através da densidade óptica (OD) em espectrofotômetro *Microplate Reader* (BioRad) a 570 nm. Controles foram realizados para avaliar os ensaios. O controle considerado “negativo” é aquele em que as células foram cultivadas em meio de cultura DMEM sem a adição da solução de diálise peritoneal. O controle chamado de “positivo” foi aquele em que as células foram cultivadas em meio de DMEM com adição de sulfato de cobre (CuSO₄). A

média da OD para o controle negativo (DMEM) representa 100% de viabilidade celular. Todas as amostras foram avaliadas em triplicatas e repetidas três vezes.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Variáveis contínuas são apresentadas como média e desvio-padrão. Para as comparações foi usado Teste t Student ou análise de variância, com um critério de classificação (one way ANOVA) e seguido de teste Bonferroni. Para todas as comparações, um valor de $P < 0.05$ foi considerado significativo.

Empregou-se o pacote *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, versão 17 para Windows, SPSS Inc. Chicago, IL, EUA) em todas as análises estatísticas.

5 CONSIDERAÇÕES SOBRE O TRABALHO

O Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde não exige um formato específico para a apresentação da dissertação. A presente dissertação utilizou as recomendações do sistema de Vancouver, para as referências bibliográficas listadas em ordem alfabética e as citações no texto seguiram o sistema autor-data.

Este trabalho marca o início de uma linha de pesquisa que investiga diálise peritoneal utilizando cultura de células, no Serviço de Nefrologia do Hospital São Lucas/Laboratório de Pesquisa em Nefrologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) e Faculdade de Medicina. Os dados da dissertação foram encaminhados para publicação no periódico *Clinical Pharmacology & Therapeutics* com fator de impacto 7,586 em 2008, e cópia do material submetido encontra-se no anexo C. A utilização de culturas celulares incubadas com soluções de diálise peritoneal foi desenvolvida e introduzida na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) para a realização deste trabalho.

O autor participou da revisão da literatura, do desenvolvimento da idéia, da preparação do projeto, da manipulação das bolsas de diálise, do preparo das amostras, da análise e interpretação dos dados e da redação do artigo. O projeto foi idealizado pelo autor juntamente com o Prof. Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo, Enf^a. Dra, Ana E.P.L. Figueiredo e a Dra. Bartira E. P da Costa. As culturas foram realizadas no IPB pelo autor e o biólogo Christian Viezzer sob supervisão da Dra. Denise Cantarelli Machado. Contou com a colaboração e estrutura dos Laboratórios de Nefrologia e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do IPB e dos bolsistas de iniciação científica de ambos os laboratórios. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do Prof. Dr. Irênio Gomes.

As bolsas de diálise peritoneal foram importadas e fornecidas pela *Fresenius Medical Care*.

O estudo apresentou diversas dificuldades desde o início dos experimentos no laboratório. O primeiro obstáculo foi a importação da solução de diálise peritoneal com pH neutro (*Balance®*), não disponível no mercado brasileiro. O primeiro lote da

solução diálise peritoneal (*Balance®*), importado da Alemanha, foi descartado por exigência da Vigilância Sanitária. Outro fator importante foi a necessidade de aprender as normas de trabalho em laboratório para os procedimentos com as culturas de células. Aprender o manuseio correto das culturas, desde o descongelamento da linhagem celular até o plaqueamento das mesmas, passando pela determinação da densidade celular que foi usada em cada poço das placas de cultura, bem como o preparo e a forma correta de uso dos reagentes e do MTT. Como o autor não apresentava experiência prévia com estas técnicas, foi necessário o apoio técnico do Biólogo Christian Viezzer. Sua expertise foi fundamental com seus ensinamentos nas técnicas básica de cultura de células. Este é o primeiro estudo experimental com a solução *Balance®* realizado no Brasil.

Portanto, esta dissertação é uma etapa que se iniciou com um projeto de pesquisa e foi executada com auxílio de vários colaboradores.

6 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em duas partes. A primeira que resume os experimentos que estabeleceram as condições necessárias para o estudo e a segunda considerada o ensaio principal para responder ao objetivo proposto.

6.1 ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O resultado do ensaio piloto é ilustrado pelas Figuras 1 a 4. As figuras apresentam 12 gráficos de densidade óptica em função do tempo de incubação dos fibroblastos em cultura celular. Cada linha apresenta 03 gráficos com a avaliação da viabilidade celular e densidade óptica, em uma diluição de solução de diálise peritoneal em relação ao meio de cultura DMEM (25, 50, 75 ou 100% de solução de DP). A coluna ilustra os gráficos referentes a cada uma das 03 diferentes concentrações de glicose (1,5; 2,3 e 4,25%) testadas.

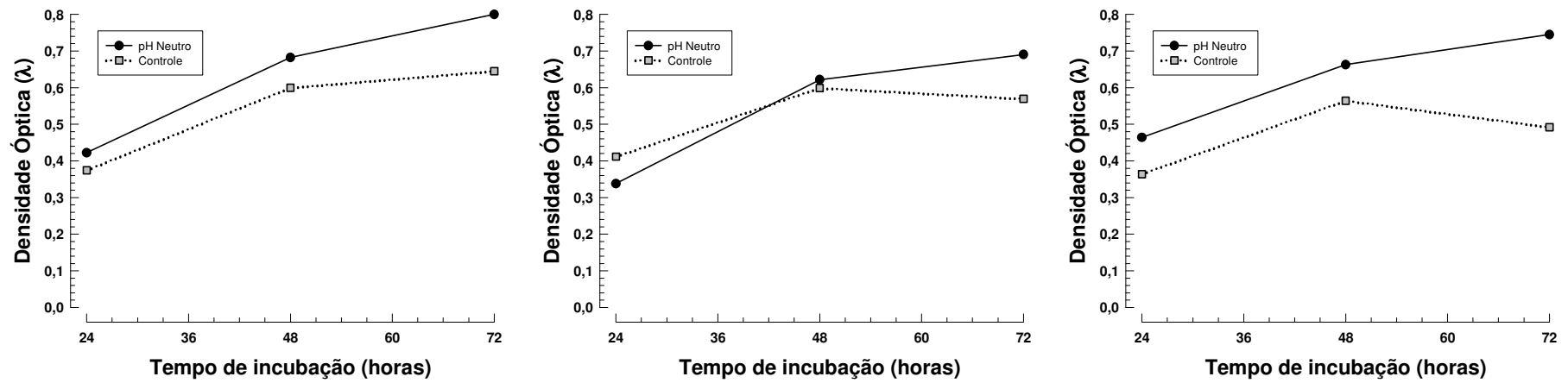


Figura 1 – Densidade óptica pelo tempo de incubação na concentração de 25% da solução de DP.

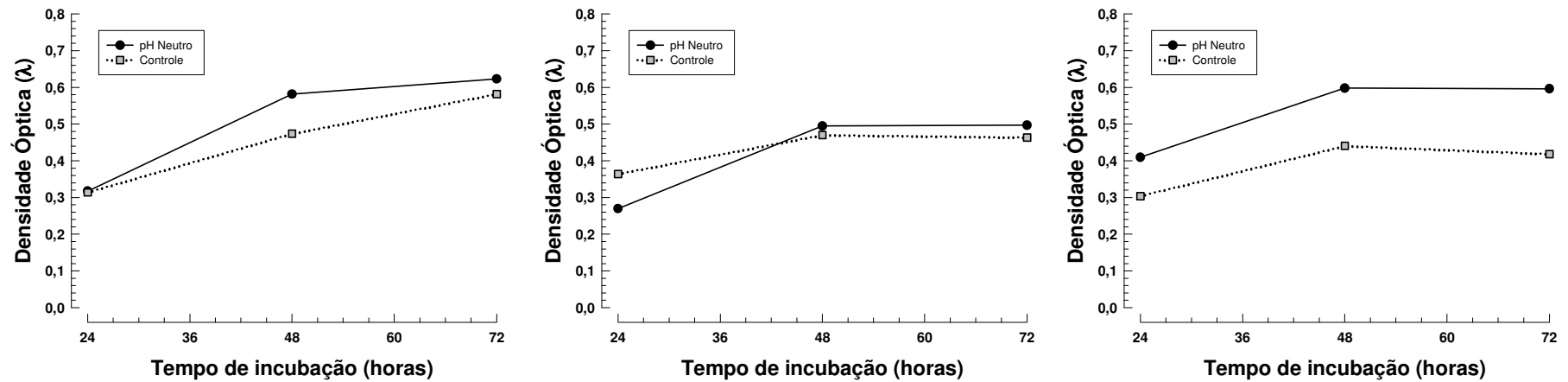


Figura 2 – Densidade óptica pelo tempo de incubação na concentração de 50% da solução de DP.

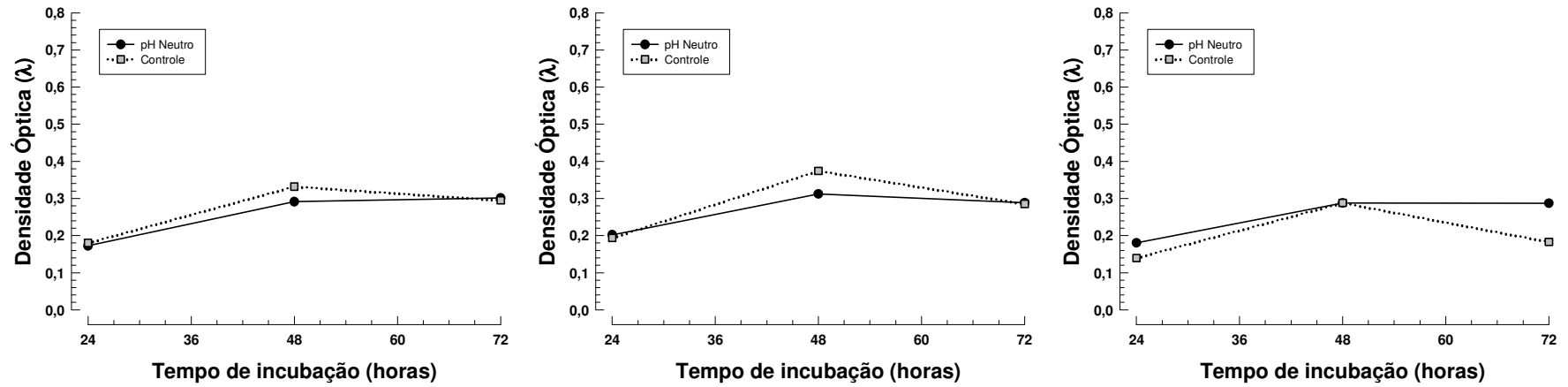


Figura 3 – Densidade óptica pelo tempo de incubação na concentração de 75% da solução de DP.

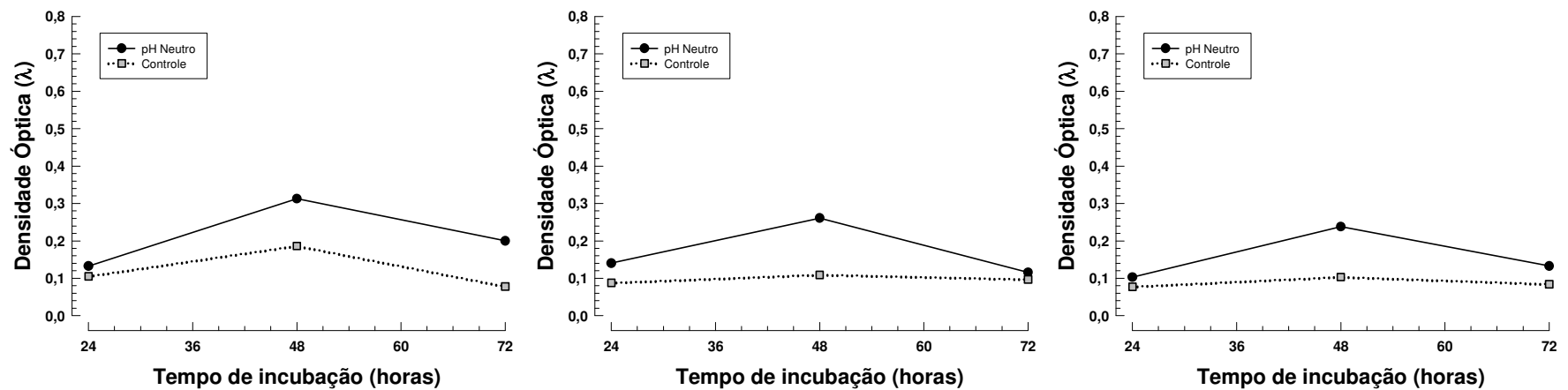


Figura 4 – Densidade óptica pelo tempo de incubação na concentração de 100% da solução de DP.

A Figura 5 ilustra densidade óptica média dos controles negativo e positivo.

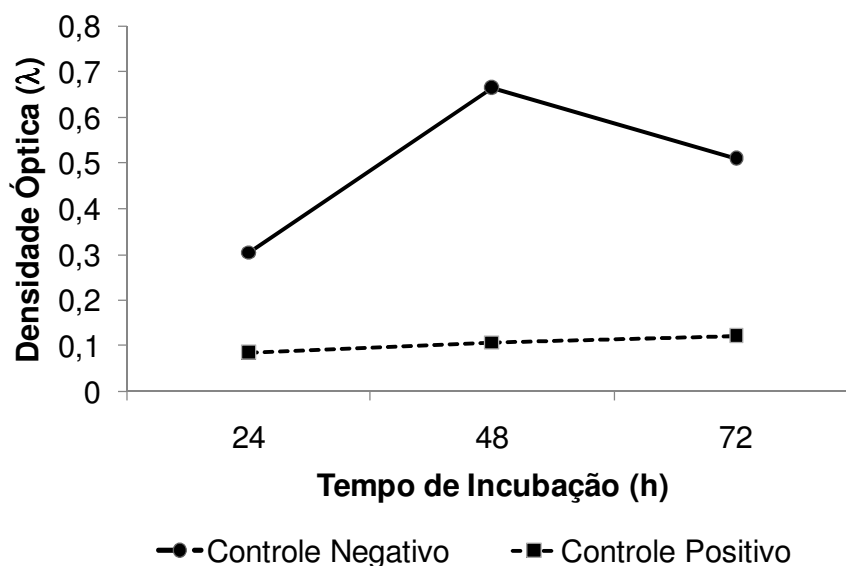


Figura 5 – Valores dos controles negativo e positivo do ensaio piloto.

Observou-se que nas culturas de fibroblasto que foram expostas as diluições com 75 e 100% de solução de diálise peritoneal em relação ao meio de cultura, a viabilidade celular foi próxima ao controle positivo em todos os tempos de incubação analisados. Enquanto, que nas diluições de 25 e 50% o desenvolvimento foi mais próximo do controle negativo. Quando se analisa a viabilidade celular para cada um dos tempos (24, 48, 72h) estudados, nas diluições de 25 e 50%, vemos um desenvolvimento adequado no período de incubação de 48h, porém observa-se uma discreta tendência a platô com 72h.

Com estes resultados verificamos que foi possível estabelecer condições experimentais adequadas para o estudo de células expostas a meios contendo soluções de diálise peritoneal. Optou-se por se realizar o ensaio principal com o tempo de incubação de 48h, e por adotar a diluição de 50% de solução de diálise peritoneal em relação ao meio de cultura.

Os valores das médias e os desvios-padrão das absorvâncias dos ensaios piloto estão exibidos na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores das médias e os desvios-padrão das absorbâncias dos ensaios piloto.

Solução		Concentração (%)											
		1,5				2,3				4,25			
		Padrão		pH neutro		Padrão		pH neutro		padrão		pH neutro	
Diluição (%)	Tempo (h)	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
	24	0,374	0,070	0,403	0,109	0,412	0,099	0,338	0,119	0,364	0,099	0,464	0,132
25	48	0,587	0,168	0,682	0,218	0,599	0,176	0,623	0,204	0,564	0,175	0,663	0,228
	72	0,645	0,057	0,803	0,133	0,569	0,104	0,690	0,173	0,492	0,103	0,745	0,108
	24	0,314	0,083	0,317	0,056	0,364	0,064	0,270	0,101	0,304	0,082	0,409	0,127
50	48	0,474	0,203	0,582	0,206	0,470	0,198	0,495	0,229	0,440	0,191	0,598	0,246
	72	0,444	0,161	0,623	0,170	0,463	0,127	0,497	0,203	0,418	0,087	0,596	0,141
	24	0,180	0,059	0,172	0,060	0,194	0,044	0,202	0,041	0,140	0,030	0,181	0,057
75	48	0,333	0,216	0,291	0,193	0,374	0,183	0,312	0,171	0,288	0,210	0,288	0,165
	72	0,295	0,151	0,301	0,189	0,286	0,168	0,289	0,155	0,183	0,074	0,287	0,144
	24	0,105	0,079	0,133	0,068	0,088	0,040	0,141	0,063	0,077	0,022	0,103	0,028
100	48	0,186	0,195	0,313	0,256	0,109	0,093	0,261	0,225	0,103	0,071	0,238	0,192
	72	0,078	0,016	0,200	0,141	0,097	0,030	0,224	0,171	0,084	0,017	0,133	0,064

Diluição representa a proporção de líquido de diálise peritoneal em relação ao meio de cultural.

Para avaliar a precisão do ensaio, estimou-se o coeficiente de variação. O coeficiente de variação médio foi de $0,10 \pm 0,09$ para as triplicatas (CV intraplaca) com mediana de 0,10 (IIQ₂₅₋₇₅ 0,05 – 0,13). O coeficiente de variação interplacas, aplicado entre as médias das triplicatas das diferentes placas foi de $0,08 \pm 0,06$ com mediana de 0,07 (IIQ₂₅₋₇₅ 0,05-0,09).

6.2 ENSAIO PRINCIPAL

A viabilidade celular após a exposição a diferentes soluções de diálise peritoneal (Controle e com pH neutro), em diferentes concentrações de glicose é ilustrada pela Figura 6. A viabilidade celular foi significativamente superior na solução com pH neutro em comparação a solução controle, nas três concentrações de glicose analisadas (Densidade óptica - λ - média \pm dp: 1,5%^{controle} $0,295 \pm 0,047$ vs 1,5%^{pH neutro} $0,372 \pm 0,042$ $P < 0,001$; 2,3%^{controle} $0,270 \pm 0,036$ vs 2,3%^{pH neutro} $0,337 \pm 0,051$ $P < 0,001$; 4,25%^{controle} $0,284 \pm 0,037$ vs 4,25%^{pH neutro} $0,332 \pm 0,032$ $P < 0,001$; controle vs pH neutro, respectivamente (Teste t Student).

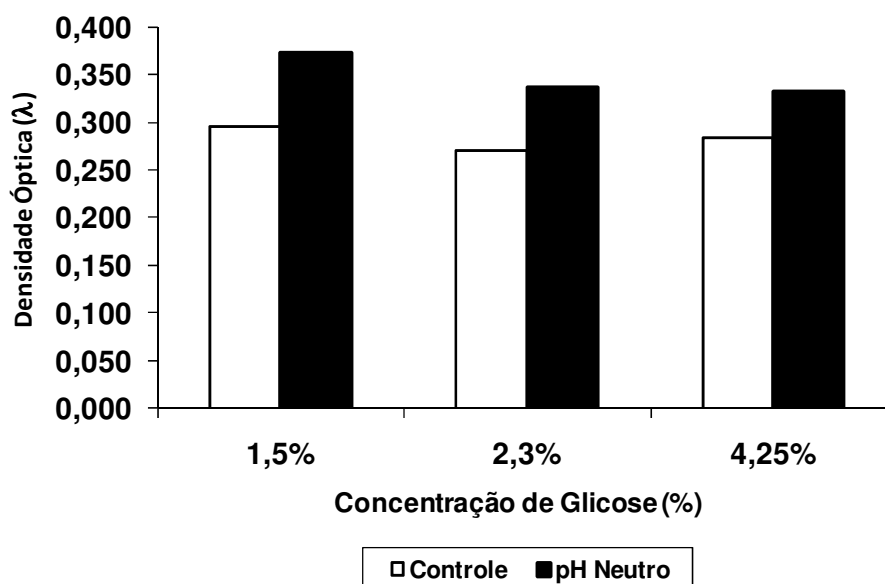


Figura 6 – Cultivo de fibroblastos em diferentes soluções de diálise peritoneal.

Não ocorreu diferença significativa na viabilidade celular entre as três concentrações de glicose quando se usou a solução de diálise peritoneal padrão (Controle, ANOVA $P = 0,218$), embora a viabilidade celular foi maior após a exposição

à solução com pH neutro na concentração de glicose de 1,5% em comparação com 2,3 e 4,25% (pH neutro; ANOVA $P=0,008$: Bonferroni 1,5% vs 2,3% $P=0,033$, 1,5% vs 4,25% $P=0,014$, 2,3% vs 4,25% $P=1,00$).

A Figura 7 ilustra o controle da placa com um gráfico da densidade óptica obtida com a incubação de fibroblastos em cultura celular. O controle negativo é a cultura em DMEM, onde se espera a proliferação referência. O controle positivo é aquele com sulfato de cobre adicionado à cultura de células, meio inadequado para viabilidade e proliferação celular. Ocorreu um declínio do controle negativo com 72h de incubação.

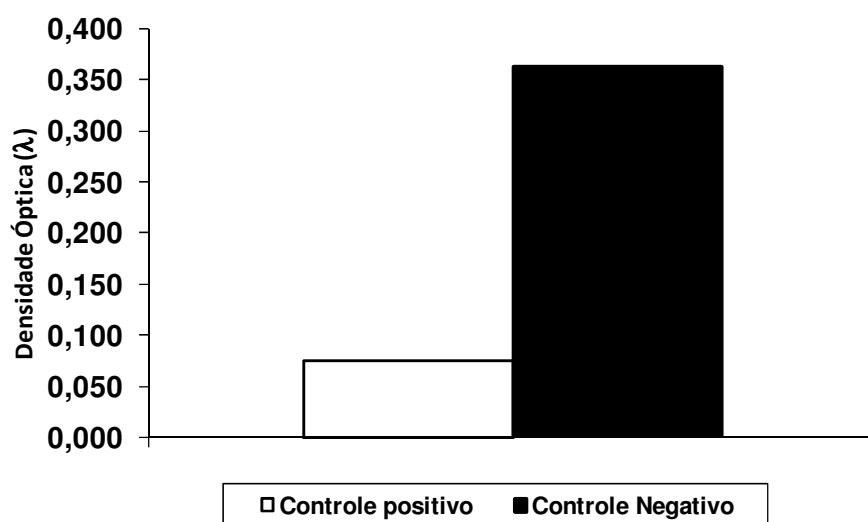


Figura 7 – Densidade óptica média dos controles negativo e positivo do ensaio principal.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a viabilidade celular foi maior quando os fibroblastos 3T3 foram expostos, *in vitro*, à solução de diálise peritoneal com pH neutro em comparação com a solução de diálise peritoneal convencional. Além disso, a viabilidade celular dos fibroblastos foi maior na concentração de glicose de 1,5% em comparação com as concentrações de 2,3 e 4,25% da solução de diálise com pH neutro. Os significados destes achados ainda não estão muito claros, mas pode-se considerar que a solução com pH neutro e menor concentração de produtos de degradação de glicose, neste ambiente, possa ser benéfica à viabilidade celular, efeito amplificado pela baixa concentração de glicose. O fato de a viabilidade celular ter sido melhor na solução com pH neutro não afasta a possibilidade da solução não ser tóxica e de que esta induza menos fibrose.

Para definição metodológica do presente estudo, inicialmente, realizou-se um ensaio piloto utilizando-se 09 placas de culturas com 96 poços. O objetivo era de definir qual o melhor momento para se avaliação da biocompatibilidade das soluções de diálise peritoneal nesta população celular e qual das diluições (DMEM/ Solução) seria adotada.

Definiu-se, a partir de estudos prévios realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do IPB, que a densidade celular de $0,5 \times 10^4$ estaria adequada para este tipo de placa de cultura, fato comprovado pelo presente estudo.

O comportamento desta linhagem foi observado nos períodos de tempo de 24h, 48h, 72h sob a influência das diluições previamente definidas. Após 48h de incubação as células mantinham um desenvolvimento adequado (curva ascendente no gráfico). Optou-se por este intervalo de tempo para se realizar o ensaio principal, porque o período vai de encontro com o que a literatura preconiza. Chan et al., (2007) considera que o tempo de incubação das células é um ponto importante nos ensaios celulares, pois varia conforme o objetivo do estudo. Períodos curtos, ou seja, exposições rápidas das células às soluções, servem para analisar fatores como pH e a influência dos tampões sobre as culturas. Para avaliação da osmolaridade um período de 01 a 04 horas pode ser suficiente e períodos mais longos, superiores

a 24 horas são adotados para estudos da expressão gênica e podem ser empregados para estudo de proliferação e viabilidade celular.

No ensaio piloto, quando se analisa o comportamento das células entre os tempos de 48h e 72h, observa-se que esta população celular apresentou um crescimento menor que o apresentado no período anterior este fato pode ter ocorrido, porque a população atingiu seu desenvolvimento máximo naquele espaço físico e alcançou as paredes do poço da placa de cultura e começaram a morrer por falta de espaço ou por ser seu período de declínio natural.

Fibroblastos foram utilizados como modelos experimentais para avaliação dos efeitos da exposição a soluções de diálise em outros estudos (Wieslander et al., 1991; Witowski et al., 2006). O desenvolvimento de modelos celulares para pesquisas de biocompatibilidade permite um melhor entendimento das interações que ocorrem entre a população de células da membrana peritoneal e os leucócitos, bem como macrófagos, monócitos e suas capacidades de fagocitose (Glancey et al., 1992; Lewis et al., 1991). Os estudos *in vitro* com fibroblastos e células mesoteliais proporcionam um avanço nos conhecimentos sobre a citologia da membrana peritoneal e sua extensa rede de citocinas, opsoninas e outros fatores que regulam os mecanismos locais de defesa, ou seja, a imunidade humoral (Topley et al., 1994). Ainda, permite que esses conhecimentos adquiridos através dos ensaios, sejam a base para estudos mais complexos sobre a biocompatibilidade das soluções de diálise peritoneal. Os ensaios celulares proporcionam, também, um melhor entendimento dos mecanismos de angiogênese, inflamação e fibrose, modificações, as quais o peritônio está suscetível durante a DP (Jörres et al., 2005), pois, entendendo-se esses mecanismos, pode-se evoluir em terapêuticas para tratar e prevenir alterações estruturais. Logo, procuramos com os estudos experimentais conhecer a evolução dos eventos que conduzem as alterações morfológicas e funcionais da membrana peritoneal durante os anos de terapia renal substitutiva. Com o presente estudo, procurou-se adquirir conhecimento e destreza necessários para o desenvolvimento de uma linha de pesquisa sólida com outras populações celulares. Por esta razão, analisou-se inicialmente o comportamento *in vitro* de uma linhagem celular, com características bem definidas, fibroblastos 3T3.

Duwe et al., (1981) foi o primeiro a relatar os efeitos indesejados das soluções de diálise peritoneal ao avaliar a supressão da atividade dos leucócitos no sangue periférico. Desde este estudo, passaram-se aproximadamente 30 anos e novas soluções para diálise peritoneal, ou seja, substâncias mais biocompatíveis ainda não fazem parte do arsenal terapêutico disponível em muitos países.

Por outro lado, os estudos *in vitro* apresentam limitações, pois não permitem analisar todas as interações celulares que ocorrem nas situações *in vivo*. Relações multifatoriais como as das células entre si, das células com a matriz e com o líquido extracelular, onde estão agindo hormônios, fatores de crescimento e inibição fundamentais para a viabilidade celular (Chan, 2007). Outro fator a ser considerado, é a modificação do comportamento celular após inúmeros subcultivos, também chamado de passagens pelos quais as linhagens celulares são submetidas, como por exemplo, células que secretam hormônios podem passar a não produzi-los tornando estas células um modelo inadequado para estudos. É importante controlar o número de passagens para que as células não percam suas características iniciais e permaneçam bons modelos para estudos, porém não existe um número exato a partir do qual se estabeleça que as células não possam mais ser utilizadas. Alguns autores estabelecem um período de três meses ou 70 a 80 passagens, ou subcultivos, após o descongelamento para que as células sejam utilizadas (Peres, 2005). No presente estudo, os fibroblastos foram utilizados após duas semanas do descongelamento.

O sal tetrazólico MTT, um método colorimétrico, foi usado para avaliação da viabilidade celular. Este método detecta células vivas, não células mortas, porque o sinal gerado é dependente do grau de ativação celular. O mecanismo de ação é a redução do MTT, que é amarelo, para formazan (roxo) nas mitocôndrias das células vivas. Mede a citotoxicidade, a proliferação celular e a ativação celular. A principal vantagem na utilização do método é a velocidade de processamento das amostras, consome menos tempo para realização e é mais econômico. A densidade óptica ou absorbância da solução colorida pode ser quantificada pela medida do comprimento de onda no espectrofotômetro (Mosmann, 1983; Gerlier et al, 1986). Este comprimento de onda pode variar dependendo do solvente em estudo, usualmente

adota-se entre 500 e 600nm. No presente estudo, usou-se o comprimento de onda de 570nm.

Foram usados controles positivo e negativo para avaliar a eficácia do ensaio de citotoxicidade. O controle negativo deve ser uma substância que não cause dano às células, enquanto que o controle positivo deve ser uma substância citotóxica, que cause dano. Como controle positivo da placa foi utilizado sulfato de cobre (CuSO_4) e para controle negativo somente o meio DMEM. O controle negativo, meio DMEM puro, normaliza os valores de absorvância obtidos como sendo 100% das células viáveis. Os valores da absorvância obtidos para o controle positivo (CuSO_4) foram significativamente menores que os valores dos controles negativos (DMEM puro), dados esperados uma vez que o cobre tem efeito citotóxico, demonstrando que a avaliação pelo método do MTT foi satisfatória.

Fibroblastos também foram utilizados no estudo, *in vitro*, de Cooker et al., (1999) e não foi detectada diferença significativa para a proliferação celular, quando as células foram incubadas com solução de diálise peritoneal padrão e icodextrina. Naquele estudo, foi realizado ajuste de pH nas misturas das soluções com o meio de cultura, uma distinção importante do presente estudo, no qual o diferente pH das soluções foi uma variável a ser avaliada.

O pH *in vivo*, isoladamente, não parece ser um fator importante de agressão direta a membrana peritoneal, uma vez que ocorre um aumento do pH minutos após a infusão da solução de diálise na cavidade peritoneal conforme os estudos de Duwe et al., (1981). O pH do dialisato se eleva de 5,4 a 7,1 após 5 minutos de permanência da solução na cavidade abdominal. O volume de líquido residual na cavidade peritoneal também é responsável por um aumento no pH servindo como tampão, conforme Ahmed et al., (1992).

No Estudo de Cooker et al., (1999), as soluções de diálise peritoneal com concentrações de 4,25% esterilizadas a quente causaram uma redução significativa do crescimento celular *in vitro* em comparação com a solução esterilizada por filtração. Essas alterações, provavelmente, associadas com o aumento dos produtos de degradação da glicose. Os produtos da degradação de glicose e o pH baixo são fatores importantes relatados com a biocompatibilidade das soluções de diálise

peritoneal. As duas soluções utilizadas nos ensaios são esterilizadas a quente por autoclavamento. A solução de diálise peritoneal com pH neutro foi desenhada como uma bolsa com duas câmaras, uma contendo componentes alcalinos com lactato e outro compartimento com eletrólitos e glicose. Este formato permite a elevação do pH e um processo de esterilização com reduzida formação de produtos de degradação da glicose. Os componentes dos dois compartimentos são misturados momentos antes do uso, pela ruptura do lacre entre as duas câmaras.

O crescimento celular foi previamente demonstrado ser melhor nas células expostas a concentrações de glicose menores (1,5 ou 2,27%) em comparação com concentrações mais elevadas (3,86%) da solução de diálise peritoneal *in vitro* (Cooker et al., 1997). Estes resultados estão em conformidade com o presente estudo, sugerindo que a concentração mais elevada de produtos de degradação de glicose tem uma ação inibitória na função no crescimento celular *in vitro*. No início dos ensaios tinha-se a idéia que nas maiores concentrações de glicose as células pudessem se desenvolver melhor, pois a glicose serviria como um elemento extra na suplementação do meio de cultura. Fato que não se confirmou no estudo.

Os produtos de degradação da glicose formados a partir da esterilização a quente das soluções para DP podem reduzir o crescimento celular, *in vitro*, das células mesoteliais. Entretanto, Witowski et al., (2003) demonstraram uma melhor viabilidade e preservação da função das células mesoteliais em um ensaio *in vitro* com a solução com pH neutro comparada com a solução padrão. O mesmo autor (Witowski et al., 2004) demonstrou, que a proliferação e a viabilidade das células mesoteliais, obtidas a partir dos efluentes, estudos *ex vivo* dos pacientes que dialisavam com a solução com pH neutro, estavam mais bem preservadas quando comparadas com a solução padrão.

O uso de animais em experimentos pode ser considerado o próximo passo para avaliação de biocompatibilidade. Foi proposto o uso de coelhos, ratos e camundongos, porém cada espécie apresenta características próprias o que suscita questionamentos sobre seu uso, como por exemplo, roedores podem não ser modelos ideais para estudos com icodextrina, pois apresentam níveis elevados de amilase que degrada a molécula desta substância (Krediet et al., 2003).

Os efeitos deletérios locais dos PDG são conhecidos a partir de muitos estudos. Recentemente, estes estudos, Müller-Krebs et al., (2010) demonstraram alterações sistêmicas em ratos que receberam por via endovenosa solução contendo PDG e observaram um aumento significativo do miocárdio e da aorta desses animais, bem como da expressão dos receptores para AGE's no grupo que sofreu a intervenção quando comparado aos grupos controles.

In vivo o uso clínico da solução de diálise peritoneal com pH neutro resultou em melhora da ultrafiltração e aumento dos marcadores de integridade da membrana peritoneal (Williams et al., 2004; Choi et al., 2008), bem como aumento da proliferação e a viabilidade celular, quando analisou as células mesoteliais (Witowski et al., 2004). No estudo *Euro-Balance* (Williams et al., 2004) pacientes com solução com pH neutro por 12 semanas apresentaram um aumento no volume urinário e diminuição no volume de ultrafiltração. Porém Szeto et al., (2007), conduziram um estudo prospectivo, randomizado com um ano de duração, no qual os achados do estudo anterior não se confirmaram, não encontrou diferença entre volume de ultrafiltração, volume urinário e função renal residual.

Recentemente, Kim et al., (2009) mostraram dados de um estudo prospectivo, randomizado com um ano de duração, com população incidente usando solução de diálise peritoneal com pH neutro e solução padrão, no qual foram estudados pacientes incidentes em CAPD e observaram a preservação da função renal residual após o período.

O presente estudo buscou avaliar um aspecto da biocompatibilidade das soluções de diálise peritoneal que foi a viabilidade celular de fibroblastos 3T3 após a exposição a diferentes soluções de diálise peritoneal. Outras substâncias de interesse envolvidas na bioincompatibilidade destas soluções não foram analisadas como os produtos de degradação da glicose e os AGE's. Outra limitação foi dificuldade de importação do material utilizado e o tempo para se desenvolver maior prática em laboratório o que pode ter afetado os resultados do ensaio inicial.

8 CONCLUSÃO

A viabilidade celular de fibroblastos NIH/3T3 de camundongos foi melhor quando estes foram expostos a solução de diálise peritoneal com pH neutro, e em comparação com a solução convencional, especialmente nas menores concentrações de glicose. É possível que o pH mais fisiológico e a menor concentração de produtos de degradação de glicose possam ser os responsáveis por estes resultados.

9 PERSPECTIVAS

O Estudo abre o caminho para agregar uma nova metodologia nos estudos de diálise peritoneal do Grupo de Pesquisa em Nefrologia. O grupo tem produção científica consistente na área de diálise peritoneal com estudos predominantemente de clínica e fisiologia. O presente Estudo inaugura uma etapa para estudos experimentais *in vitro* e abre novo desafio para busca de estrutura para ensaios com animais de experimentação.

Na condução do estudo foi coletado o sobrenadante dos fibroblastos após cada período de incubação nas diversas condições experimentais com o plano de se realizar avaliação de citocina e de outros marcadores.

Com a manutenção dessa linha de pesquisa e a possibilidade de expansão do estudo, pensa-se em iniciar um novo projeto de pesquisa para um doutoramento no futuro.

REFERÊNCIAS

Ahmad S, Sehmi JS, Ahmad-Zakhi KH, Clemenger M, Levy JB, Brown EA. Impact of new dialysis solutions on peritonitis rates. *Kidney Int Suppl.* 2006;70(Suppl 103):s63-6.

Ahmed MI, Rawal PA, Patel NM, Yu AW, Abraham M, Harvey VC, et al. In vitro buffering capacity of residual peritoneal dialysate fluid: implications for peritoneal dialysis therapy. *Artif Organs.* 1992;16(4):416-8.

Alon U, Bar-Maor JA, Bar-Joseph G. Effective peritoneal dialysis in an infant with extensive resection of the small intestine. *Am J Nephrol.* 1988;8(1):65-7.

Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med.* 1984;101(4):527-37.

Chan TM, Yung S. Studying the effects of new peritoneal dialysis solutions on the peritoneum. *Perit Dial Int.* 2007;27(Suppl 2):s87-93.

Choi HY, Kim DK, Lee TH, Moon SJ, Han SH, Lee JE, et al. The clinical usefulness of peritoneal dialysis fluids with neutral pH and low glucose degradation product concentration: an open randomized prospective trial. *Perit Dial Int.* 2008;28(2):174-82.

Combet S, Ferrier ML, Van Landschoot M, Stoenoiu M, Moulin P, Miyata T, et al. Chronic uremia induces permeability changes, increased nitric oxide synthase expression, and structural modifications in the peritoneum. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(10):2146-57.

Combet S, Miyata T, Moulin P, Pouthier D, Goffin E, Devuyst O. Vascular proliferation and enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase in human peritoneum exposed to long-term peritoneal dialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(4):717-28.

Cooker LA, Luneburg P, Faict D, Choo C, Holmes CJ. Reduced glucose degradation products in bicarbonate/lactate-buffered peritoneal dialysis solutions produced in two-chambered bags. *Perit Dial. Int.* 1997;17(4):373-8.

D'Avila DO, Figueiredo AE. Métodos de depuração extrarenal: hemodiálise, diálise peritoneal e novas técnicas. In: Riella MC. *Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos*. 3ª.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p.607-45.

Davies SJ, Phillips L, Russell GI. Peritoneal solute transport predicts survival on CAPD independently of residual renal function. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13(4):962-8.

Devuyst O, Combet S, Cnops Y, Stoenoiu MS. Regulation of NO synthase isoforms in the peritoneum: implications for ultrafiltration failure in peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(3):675-8.

Di Paolo N, Sacchi G, De Mia M, Gaggiotti E, Capotondo L, Rossi P, et al. Morphology of the peritoneal membrane during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron.* 1986;44(3):204-11.

Dobbie JW, Lloyd JK. Mesothelium secretes lamellar bodies in a similar manner to type II pneumocyte secretion of surfactant. *Perit Dial Int.* 1989;9(3):215-9.

Dobbie JW, Pavlina T, Lloyd J, Johnson RC. Phosphatidylcholine synthesis by peritoneal mesothelium: its implications for peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis.* 1988;12(1):31-6.

Dobbie JW. From philosopher to fish; the comparative anatomy of the peritoneal cavity as an excretory organ and its significance for peritoneal dialysis in man [editorial]. *Perit Dial Int.* 1988;8(1):3-6.

Dobbie JW. Morphology of the peritoneum in CAPD. *Blood Purif.* 1989;7(2-3):74-85.

Dobbie JW. New concepts in molecular biology and ultrastructural pathology of the peritoneum: their significance for peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis.* 1990;15(2):97-109.

Duwe AK, Vas SI, Weatherhead JW. Effects of the composition of peritoneal dialysis fluid on chemiluminescence, phagocytosis, and bactericidal activity in vitro. *Infect Immun.* 1981;33 (1):130-5.

Flessner MF, Choi J, Vanpelt H, He Z, Credit K, Henegar J, et al. Correlating structure with solute and water transport in a chronic model of peritoneal inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290(1):F232–40.

Flessner MF, Credit K, Henderson K, Vanpelt HM, Potter R, He Z, et al. Peritoneal changes after exposure to sterile solutions by catheter. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(8): 2294-302.

Fox SD, Leyboldt JK, Henderson LW. Visceral peritoneum is not essential for solute transport during peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 1991;40(4):612-20.

Fritsch S, Lindner V, Welsch S, Massfelder T, Grima M, Rothhut S, et al. Intravenous delivery of PTH/PTHrP type 1 receptor cDNA to rats decreases heart rate, blood pressure, renal tone, renin angiotensin system, and stress-induced cardiovascular responses. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(10):2588-600.

Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods.* 1986;94(1):57-63.

Glancey GR, Cameron JS, Ogg CS. Peritoneal drainage: an important element in host defence against staphylococcal peritonitis in patients on CAPD. *Nephrol Dial Transplant.* 1992;7(7):627-31.

Gurland HJ, Davison AM, Bonomini V, Falkenhagen D, Hansen S, Kishimoto T. Definitions and terminology in biocompatibility. *Nephrol Dial Transplant* . 1994;9(Suppl 2):4-10, 1994.

Henderson LW. The problem of peritoneal membrane area and permeability. *Kidney Int.* 1973;3(6):409-10.

Holmes CJ. Pre-clinical biocompatibility testing of peritoneal dialysis solutions. *Perit Dial Int.* 2000;20(Suppl 5):s5-9.

Honda K, Nitta K, Horita S, Yumura W, Nihei H. Morphological changes in the peritoneal vasculature of patients on CAPD with ultrafiltration failure. *Nephron.* 1996;72(2):171-6.

Jörres A, Ludat K, Sander K, Dunkel K, Lorenz F, Keck H, et al. The peritoneal fibroblast and the control of peritoneal inflammation. *Kidney Int Suppl.* 1996;49(Suppl 56):s22-7.

Jörres A, Witowski J. Lessons from basic research for PD treatment. *Perit Dial Int.* 2005;25 (Suppl 3):s35-8.

Kim SG, Kim S, Hwang YH, Kim K, Oh JE, Chung W, et al. Korean Balnet Study Group. Could solutions low in glucose degradation products preserve residual renal function in incident peritoneal dialysis patients? A 1-year multicenter prospective randomized controlled trial (Balnet Study). *Perit Dial Int.* 2008;28(Suppl 3):s117-22.

Kjellstrand P, Martinson E, Wieslander A, Holmquist B. Development of toxic degradation products during heat sterilization of glucose-containing fluids for peritoneal dialysis: influence of time and temperature. *Perit Dial Int.* 1995;15(1):26-32.

Koomen GC, Betjes MG, Zemel D, Krediet RT, Hoek FJ. Cancer antigen 125 is locally produced in the peritoneal cavity during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 1994;14(2):132-6.

Krediet RT, Zemel D, Imholz AL, Struijk DG. Impact of surface area and permeability on solute clearances. *Perit Dial Int.* 1994;14(Suppl 3):s70-7.

Krediet RT, Zweers MM, van Westrhenen R, Ho-dac-Pannekeet MM, Struijk DG. What can we do to preserve the peritoneum? *Perit Dial Int.* 2003;23(Suppl 2):s14-9.

Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 1999;55(1):341-56.

Lau T, Owen W, Yu YM, Noviski N, Lyons J, Zurakowski D, et al. Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism in end-stage renal disease patients. *J Clin Invest.* 2000;105(9):1217-25.

Lewis S, Holmes C. Host defense mechanisms in the peritoneal cavity of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients [part 1]. *Perit Dial Int.* 1991;11(1):14-21.

Margetts PJ, Bonniaud P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int.* 2003;23(6):530-41.

Margetts PJ, Oh KH, Kolb M. Transforming growth factor-beta: importance in long-term peritoneal membrane changes. *Perit Dial Int.* 2005;25(Suppl 3):s15-7.

Mateijsen MA, van der Wal AC, Hendriks PM, Zweers MM, Mulder J, Struijk DG, et al. Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int.* 1999;19(6):517-25.

Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int.* 1999;55(2):389-99.

Monnier VM, Sell DR, Nagaraj RH, Miyata S, Grandhee S, Odetti P, et al. Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes.* 1992;41(Suppl 2):36-41.

Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys.* 2003;419(1):1-15.

Mortier S, De Vriese AS, Lameire N. Recent concepts in the molecular biology of the peritoneal membrane - implications for more biocompatible dialysis solutions. *Blood Purif.* 2003;21(1):14-23.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.

Müller-Krebs S, Kihm LP, Zeier B, Gross ML, Wieslander A, Haug U, et al. Glucose degradation products result in cardiovascular toxicity in a rat model of renal failure. *Perit Dial Int.* 2010;30(1):35-40.

Musi B, Carlsson O, Rippe A, Wieslander A, Rippe B. Effects of acidity, glucose degradation products, and dialysis fluid buffer choice on peritoneal solute and fluid transport in rats. *Perit Dial Int.* 1998;18(3):303-10.

Negoi D, Nolph KD. History of peritoneal dialysis. In: Khanna R, Krediet RT, editors. *Nolph and Gokal's textbook of peritoneal dialysis.* 3rd.ed. New York: Springer; 2009. p.12-3.

Oreopoulos DG, Robson M, Izatt S, Clayton S, deVeber GA. A simple and safe technique for continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 1978;24:484-9.

Pannekeet MM, Mulder JB, Weening JJ, Struijk DG, Zweers MM, Krediet RT. Demonstration of aquaporin-CHIP in peritoneal tissue of uremic and CAPD patients. *Perit Dial Int.* 1996;16(Suppl 1):s54-7.

Pannekeet MM, Zemel D, Koomen GC, Struijk DG, Krediet RT. Dialysate markers of peritoneal tissue during peritonitis and in stable CAPD. *Perit Dial Int.* 1995;15(6):217-25.

Passlick-Deetjen J, Lage C, Jörres A. Continuous flow peritoneal dialysis: solution formulation and biocompatibility. *Semin Dial.* 2001;14(5):384-7.

Pecoits-Filho, RFS. Diálise peritoneal. In: Riella MC. Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos. 4a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2003. p.919-28.

Peres CM, Curi R. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Pietrzak I, Hirszel P, Shostak A, Welch PG, Lee RE, Maher JF. Splanchnic volume, not flow rate, determines peritoneal permeability. *ASAIO Trans.* 1989;35(3):583-7.

Riella MC, Lowen J, Doris D, Emed LS. Diálise peritoneal ambulatorial continua (CAPD): experiencia preliminar. *J Bras Nefrol.* 1982;4(2):45–52.

Rippe B, Krediet R. Peritoneal physiology: transport of solute. In: Gokal R, Nolph KD, editors. *The textbook of peritoneal dialysis*. 2nd.ed. Netherlands: Kluwer; 1994. p.69-113.

Rippe B, Stelin G, Haraldsson B. Computer simulations of peritoneal fluid transport in CAPD. *Kidney Int.* 1991;40(2):315-25.

Rubin J, Clawson M, Planch A, Jones Q. Measurements of peritoneal surface area in man and rat. *Am J Med Sci.* 1988;295(5):453-8.

Rubin J, Herrera GA, Collins D. An autopsy study of the peritoneal cavity from patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis.* 1991;18(1):97-102.

Sauter M, Cohen CD, Wörnle M, Mussack T, Ladurner R, Sitter T. ACE inhibitor and AT1-receptor blocker attenuate the production of VEGF in mesothelial cells. *Perit Dial Int.* 2007;27(2):167-72.

Schilte MN, Celie JW, Wee PM, Beelen RH, van den Born J. Factors contributing to peritoneal tissue remodeling in peritoneal dialysis. *J Perit Dial Int.* 2009;29(6):605-17.

Schwenger V. GDP and AGE receptors: mechanisms of peritoneal damage. *Contrib Nephrol.* 2006;150:77-83. [15th International Course on Peritoneal Dialysis; 2006 May-June; Vicenza, Italy].

Sundaram S, Cendoroglo M, Cooker LA, Jaber BL, Faict D, Holmes CJ, ET AL. Effect of two-chambered bicarbonate lactate-buffered peritoneal dialysis fluids on peripheral blood mononuclear cell and polymorphonuclear cell function in vitro. *Am J Kidney Dis.* 1997;30(5):680-9.

Topley N, Williams JD. Role of the peritoneal membrane in the control of inflammation in the peritoneal cavity. *Kidney Int Suppl.* 1994;45(suppl 48):s71-8.

Topley N. Membrane longevity in peritoneal dialysis: impact of infection and bio-incompatible solutions. *Adv Ren Replace Ther.* 1998;5(3):179-84.

Wasada T, Kawahara R, Katsumori K, Naruse M, Omori Y. Plasma concentration of immunoreactive vascular endothelial growth factor and its relation to smoking. *Metabolism.* 1998;47(1):27-30.

Weiss MF. Pathogenic role of advanced glycation end-products (AGEs): an overview. *Perit Dial Int.* 1999;19(Suppl 2):s47–s52.

Wieslander AP, Nordin MK, Kjellstrand PT, Boberg UC. Toxicity of peritoneal dialysis fluids on cultured fibroblasts, L-929. *Kidney Int.* 1991;40(1):77-9.

Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, et al; Peritoneal Biopsy Study Group. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(2):470-9.

Williams JD, Craig KJ, von Ruhland C, Topley N, Williams GT; Biopsy Registry Study Group. The natural course of peritoneal membrane biology during peritoneal dialysis. *Kidney Int Suppl.* 2003;64(Suppl 88):s43-9.

Williams JD, Topley N, Craig KJ, Mackenzie RK, Pischetsrieder M, Lage C, et al. The Euro-Balance Trial: the effect of a new biocompatible peritoneal dialysis fluid (balance) on the peritoneal membrane. *Kidney Int.* 2004;66(1):408-18.

Witowski J, Bender TO, Wisniewska-Elnur J, Ksiazek K, Passlick-Deetjen J, Breborowicz A, et al. Mesothelial toxicity of peritoneal dialysis fluids is related

primarily to glucose degradation products, not to glucose per se. *Perit Dial Int.* 2003;23(4):381-90.

Witowski J, Jörres A. Peritoneal cell culture: fibroblasts. *Perit Dial Int.* 2006;26(3):292-9.

Witowski J, Korybalska K, Ksiazek K, Wisniewska-Elnur J, Jörres A, Lage C, et al. Peritoneal dialysis with solutions low in glucose degradation products is associated with improved biocompatibility profile towards peritoneal mesothelial cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(4):917-24.

Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med.* 2003;348(5):403-13.

Zakaria ER, Simonsen O, Rippe A, Rippe B. Transport of tracer albumin from peritoneum to plasma: role of diaphragmatic, visceral, and parietal lymphatics. *Am J Physiol.* 1996;270(5 Pt.2):H1549-56.

**ANEXO A – CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA PONTIFÍCIA
UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL – CEP 1357/06, 2006.**



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício 1357/06-CEP

Porto Alegre, 21 de novembro de 2006.

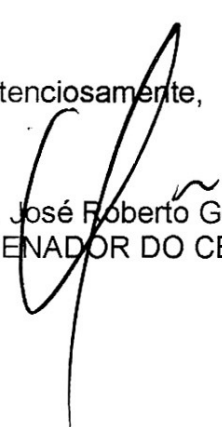
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS
apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 06/03399, intitulado:
**“Avaliação da biocompatibilidade in vitro da solução de diálise peritoneal
com pH neutro e solução padrão”.**

Sua investigação está autorizada a partir da
presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser
encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Carlos Eduardo Poli de Figueiredo
N/Universidade

ANEXO B – COMPROVAÇÃO DA SUBMISSÃO DO ARTIGO.

ScholarOne Manuscripts

Page 1 of 1

Clinical Pharmacology
& Therapeutics



[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE™
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Carlos Poli-de-Figueiredo

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Clinical Pharmacology and Therapeutics*.

Manuscript ID: 02-10-0111

Title: Effect of standard and neutral pH peritoneal dialysis solution on cell proliferation.

Poitevin, André
Viezza, Christian
Machado, Denise

Authors: Pinheiro da Costa, Bartira
Figueiredo, Ana
d'Avila, Domingos
Poli-de-Figueiredo, Carlos

Date Submitted: 24-Feb-2010

Print Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.2.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

ANEXO C – ARTIGO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO.

Clinical Pharmacology and Therapeutics Nature Publishing Group



Effect of standard and neutral pH peritoneal dialysis solution on cell proliferation.

Journal:	<i>Clinical Pharmacology and Therapeutics</i>
Manuscript ID:	Draft
mstype:	Report
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Poitevin, André; Programa de pos-graduacao em Medicina e Ciencias da Saude (Nefrologia)-PUCRS Viezzler, Christian; Programa de pos-graduacao em Medicina e Ciencias da Saude (Nefrologia)-PUCRS Machado, Denise; Programa de pos-graduacao em Medicina e Ciencias da Saude (Nefrologia)-PUCRS Pinheiro da Costa, Bartira; Programa de pos-graduacao em Medicina e Ciencias da Saude (Nefrologia)-PUCRS Figueiredo, Ana; Programa de pos-graduacao em Medicina e Ciencias da Saude (Nefrologia)-PUCRS d'Avila, Domingos; Programa de pos-graduacao em Medicina e Ciencias da Saude (Nefrologia)-PUCRS Poli-de-Figueiredo, Carlos; Programa de Pos-graduacao em Medicina e Ciencias da Saude (Nefrologia), Faculdade de Medicina/Instituto de Pesquisas Biomedicas/Hospital Sao Lucas Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul., Nephrology/Internal Medicine
Please identify a themed issue for which your paper might be considered. Note that selection from this list does not guarantee acceptance of your paper or that it will be considered for the selected issue.:	Drug Discovery and Development
Keywords:	Dialysis, Cells, Biocompatibility, Fibroblast, Cell culture, Peritoneal
Abstract:	Study to compare the effects on fibroblast viability in cells exposed to a neutral-pH and low levels of glucose degradation products peritoneal dialysis solution with a conventional solution. Cell viability was significantly superior in the neutral-pH solution compared to control ($p < 0.001$), and higher at 1.5% glucose concentration in comparison to 2.3 and 4.25% (ANOVA $p = 0.008$).

	In conclusion, the neutral-pH dialysis solution seems to have better biocompatibility than the conventional solution.



For Review Only

1

Effect of standard and neutral pH peritoneal dialysis solution on cell proliferation.

A.A. Poitevin, C. Viezzer, D.C. Machado, B.E. Pinheiro da Costa, A.E. Figueiredo, D. d'Avila, C.E. Poli-de-Figueiredo.

Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde (Nefrologia),
Faculdade de Medicina/Instituto de Pesquisas Biomédicas/Hospital São Lucas
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Correspondence:

Carlos E. Poli de Figueiredo

Centro Clinico PUCRS C414, Av Ipiranga 6690

Phone and Fax number: + 55 51 33367700

cepolif@pucrs.br

Abstract word count: 70

Introduction word count: 234

Manuscript word count (excluding, abstract, reference, table and figure): 1640

Total manuscript word count: 2297 (including front page and table)

Number of figures: 1 , Number of tables:1, Number of references: 13

Key words: Peritoneal dialysis, Biocompatibility, Fibroblast, Cell culture

2

Abstract

Study to compare the effects on fibroblast viability in cells exposed to a neutral-pH and low levels of glucose degradation products peritoneal dialysis solution with a conventional solution. Cell viability was significantly superior in the neutral-pH solution compared to control ($p < 0.001$), and higher at 1.5% glucose concentration in comparison to 2.3 and 4.25% (ANOVA $p = 0.008$). In conclusion, the neutral-pH dialysis solution seems to have better biocompatibility than the conventional solution.

For Review Only

3

Introduction

Long-term peritoneal dialysis as a therapeutic option for end-stage kidney disease patients is only possible with the preservation of adequate peritoneal membrane structure and function. Standard peritoneal solutions have acid pH (5.5), use lactate as a buffer, a high glucose concentration (75-220 mmol/L), hyperosmolarity (334-486 mOsm/L), and produce glucose degradation products (GDP) which are known to affect peritoneal membrane function (1). Maintenance of peritoneal dialysis for several years has been the main impulse to develop new dialysis solutions. Continuous exposition of the peritoneal membrane to conventional solutions is an important risk factor for inducing structural and functional tissue alterations. Loss of mesothelial cells from the peritoneal surface, vasculopathy, increased thickness of the submesothelial compact zone and fibrosis can be detected in peritoneal biopsy (2). Functional alterations include loss of ultrafiltration, reduction of solute clearance and technique failure (3).

To achieve membrane longevity, the use of more biocompatible peritoneal dialysis solutions is important (4). A dialysis solution with a neutral pH and low concentration of glucose degradation products in a double chamber bag has been developed to achieve improved biocompatibility in comparison to standard peritoneal dialysis fluid (3), with beneficial effects *in vitro* and *in vivo* (3,5,6). The aim of the present study was to compare the cell viability of a well characterized cell lineage, mouse fibroblast NIH-3T3, after exposition to a neutral pH dialysis solution in comparison to cells exposed to a standard solution.

Results

Cell viability after they were exposed to the different peritoneal dialysis solutions (Control and Neutral pH) at the different glucose concentrations is illustrated in Figure 1. Fibroblast viability was significantly superior in the neutral pH solution in comparison to control, in all three glucose concentrations (Optical density - λ - means \pm SD: 1.5%^{control} 0.295 \pm 0.047 vs 1.5%^{neutral pH}

4

0.372 ± 0.042 $p < 0.001$; $2.3\%^{\text{control}}$ 0.270 ± 0.036 vs $2.3\%^{\text{neutral pH}}$ 0.337 ± 0.051 $p < 0.001$; $4.25\%^{\text{control}}$ 0.284 ± 0.037 vs $4.25\%^{\text{neutral pH}}$ 0.332 ± 0.032 $p < 0.001$; control vs neutral pH respectively, Student t Test).

There was no significant difference in cell viability between the three concentrations of glucose when standard solution was used (Control, ANOVA $p = 0.218$), although cell viability was higher after exposition to neutral pH peritoneal dialysis fluid at 1.5% in comparison to 2.3 and 4.25% glucose concentrations (Neutral pH; ANOVA $p = 0.008$; Bonferroni 1.5% vs 2.3% $p = 0.033$, 1.5% vs 4.25% $p = 0.014$, 2.3% vs 4.25% $p = 1.00$).

Discussion

The present study shows that cell viability is improved when *in vitro* fibroblasts are exposed to a neutral pH peritoneal dialysis solution in comparison to cells exposed to a conventional peritoneal dialysis solution. Besides, greater viability was present in the cells exposed to a concentration of 1.5% glucose in comparison to 2.3 and 4.25% in cell culture with the neutral pH solution.

The significance of such findings is still not clear, but we may consider that the neutral pH and lower concentration of glucose degradation products environment may be beneficial to cell viability, effect amplified by lower glucose concentrations. The fact of improved cell viability does not mean that the solution is not toxic, and also it does not mean that it induces less fibrosis. Fibroblasts were used as an experimental model (7,8) and evaluating the effects of such exposition in other cell models, or in experimental animals, would be desired. *In vivo* the clinical use of this neutral pH dialysis fluid resulted in improvement of peritoneal ultrafiltration and of markers of peritoneal membrane integrity (3, 9), and also improved mesothelial cell proliferation and viability (10).

The MTT tetrazolium salt colorimetric assay was used to evaluate cell viability. It measures cytotoxicity, cell proliferation and cell activation. The assay is based on the capacity of mitochondrial enzymes of viable cells to transform

5

MTT tetrazolium salt into MTT formazan. This method is less time consuming, cheaper and allows the use of multiwell scanning spectrophotometers (11).

Fibroblasts were also the model used in a study by Cooker and coworkers, and no difference in cell proliferation was detected when cells were incubated either with icodextrin-containing solution or a standard glucose peritoneal dialysis solution *in vitro* (12). Their study was performed with pH-adjusted solutions mixed with culture medium, a major distinction from the present work in which test solutions pH difference was a major characteristic being evaluated.

On the other hand a heat sterilized 4.25% glucose solution caused significant reduction in cell growth *in vitro* in comparison to filter-sterilized solution (12), probably associated with increased glucose degradation products. Glucose degradation products and low pH are important factors related to biocompatibility of peritoneal dialysis solutions. Glucose degradation products, implicated in the formation of advanced glycation endproducts, are generated during heat sterilization process, and may reduced *in vitro* mesothelial cell growth (13).

The neutral pH peritoneal dialysis solution was designed as a two-chamber bag, one containing the alkaline component with lactate and the other compartment with electrolytes and glucose. Such approach allows a higher pH and sterilization with reduced formation of glucose degradation products. The fluids from the 2 compartments are mixed immediately before its use, by the rupture of the seal between the chambers.

Cell growth has been previously shown to be better in cell exposed to lower glucose concentrations (1.5 or 2.27%) in comparison with higher concentrations (3.86%) of peritoneal dialysis fluid *in vitro* (14). Such results are in conformity with this study, suggesting that higher glucose degradation products are more inhibitory to *in vitro* cell growth and function (14).

In conclusion, cell viability was better in the neutral pH dialysis solution, especially in the lowest glucose concentration, so it is possible that a more

6

physiological pH and lower glucose degradation products may be responsible for such results.

METHODS

In order to evaluate cellular viability, mouse fibroblast NIH-3T3 cell culture were used in media containing conventional peritoneal dialysis solution (CONTROL) or a neutral pH peritoneal dialysis fluid (NEUTRAL pH). Both solutions were tested in all the commercially available glucose concentrations (1.5, 2.3 and 4.25%).

Peritoneal Dialysis Solutions

Both solutions use glucose as the osmotic agent. The CONTROL solution was *Peritosteril* (Fresenius Medical Care, Jaguariúna, Brazil) and the test solution was *Balance* (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) provided in a dual-chambered bag. The composition of both dialysis fluids are presented in Table 1. The *Balance* bag contains one alkaline chamber with sodium lactate (sodium 75 mmol/L and lactate 70 mmol/L) and a second chamber with an acid fluid with electrolytes and glucose (sodium 193 mmol/L, calcium 3.5 mmol/L, magnesium 1 mmol/L, chloride 203 mmol/L, glucose 166.5 mmol/L) in the solution with glucose concentration of 1.5%. *Balance* solution is ready for use by opening the seam between the two chambers and mixing the contents, which results in a fluid with a physiologic pH in the range of 6.8 to 7.4. *Peritosteril* has a pH of 5.5.

Both *Peritosteril* and *Balance* bags were provided by *Fresenius Medical Care*.

Cell culture

Mouse fibroblast cell line NIH-3T3 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC CRL-1658, Manassas, Virginia, U.S.A) and grown in 25 cm² bottles containing cell culture media Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY, USA), gentamycin (Gibco) (0.025 g/L), streptomycin/penicillin (Gibco) (0.1 g/L) and supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco). Incubations were performed in a humid

7

atmosphere with 5% CO₂ at 37° C. All the procedures were performed in a laminar flow hood observing aseptic techniques in order to minimize the risk of microbiological contamination.

Fibroblast growth occurred as adherent monolayer in culture. Cells were washed with Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Gibco) and detached by trypsin-EDTA 0.05% (Gibco). FBS was used to inactivate trypsin action. Cells were counted in a Neubauer chamber and seeded in 96-well tissue culture plates in a density of 0.5x10⁴ cells per well. Cells were seeded in DMEM and allowed to grow for 24 hours. After this period 50 µL of the test solutions (CONTROL/DMEM or NEUTRAL-pH/DMEM) were applied to each well and plates were incubated for 48 hours. Tests were done in triplicates by mixing peritoneal dialysis fluid to DMEM at a 1:1 ratio, for each one of its different glucose concentrations.

The choice of a 1:1 ratio between peritoneal dialysis solutions and culture medium for a period of 48 hours was defined after a series of pilot tests. These evaluated cell proliferation using different proportions of test solution and culture media (25, 50, 75 e 100% of peritoneal dialysis fluid) and different incubation periods (24, 48 and 72 hours). When cells were incubated with 75 or 100% peritoneal dialysis fluid, fibroblast growth was poor for all the incubation periods. In the wells used for plate control (100% DMEM), the best cell viability was at 48 hours of incubation.

Cell viability with tetrazolium salt (MTT)

Cell viability was evaluated with MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide*) (Sigma, Saint Louis, MO, USA). After 48 hours of incubation PD SOLUTION/DMEM was aspirated from each well and cells were washed with PBS (100µL). DMEM with 10% MTT 5 mg/mL solution (50µL/well) was added for further 4 hour incubation. Next, MTT was aspirated, 100 µL dimethylsulphoxide (DMSO - Sigma) was added. The conversion of the MTT product, an estimate of cell viability, was measured by optical density (OD) using spectrophotometry with a *Microplate Reader* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 570 nm. The OD for the negative control (DMEM without peritoneal

8

dialysis fluid) represented 100% cell viability. All samples were performed in triplicate and experiments were repeated three times.

Statistical analysis

Continuous variables are presented as means \pm standard deviations. Comparisons used Student's *t* test or analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni Test for multiple comparisons. Differences were considered significant at a *p* value of 0.05 or less. Statistical Package for Social Sciences Software (SPSS, version 17 for Windows, SPSS Inc, Chicago, IL, USA) was used for the statistical analyses.

Acknowledgements

Both *Peritosteril* and *Balance* bags were provided by *Fresenius Medical Care*. The Nephrology Laboratory has received support from Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Poli-de-Figueiredo is a CNPq researcher.

Conflic of Interest/Disclosure

None to disclose.

9

References

1. Topley, N. Membrane longevity in peritoneal dialysis: Impact of infection and bio-incompatible solutions. *Adv. Ren. Replace. Ther.* **5**, 179-184 (1998).
2. Williams, J.D., Craig, K.J., von Ruhland, C., Topley, N., Williams, G.T., for the Biopsy Registry Study Group. The natural course of peritoneal membrane biology during peritoneal dialysis. *Kidney Int* **64**[suppl 88], S43-S49 (2003).
3. Williams, J.D. et al. The Euro-Balance Trial: the effect of a new biocompatible peritoneal dialysis fluid (balance) on the peritoneal membrane. *Kidney Int.* **66**, 408-418 (2004).
4. Mackenzie, R., Holmes, C.J., Jones, S., Williams, J.D., Topley, N. Clinical indices of in vivo biocompatibility: The role of ex vivo cell function studies and effluent markers in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int.* **64**[suppl 88], s84-s93 (2003).
5. Lage, C., Pischetsrieder, M., Aufricht, C., Jörres, A., Schilling, H., Passlick-Deetjen, J. First in vitro and in vivo experiences with *staysafe balance*, a pH-neutral solution in a dual-chambered bag. *Perit. Dial. Int.* **20**[suppl 5], 28-32 (2000).
6. Lee, H.Y. et al. Superior patient survival for continuous ambulatory peritoneal dialysis patients treated with a peritoneal dialysis fluids with neutral pH and low glucose degradation products (Balance). *Perit. Dial. Int.* **25**, 1248-255 (2005).

10

7. Wieslander, A.P., Nordin, M.K., Kjellstrand, P.T.T., Boberg, U.C. Toxicity of peritoneal dialysis fluids on cultured fibroblasts, L-929. *Kidney Int.* **40**, 77-79 (1991).
8. Witowski, J., Jörres, A. Peritoneal cell culture: fibroblasts. *Perit. Dial. Int.* **26**, 292-299 (2006).
9. Choi, H.Y. et al. The clinical usefulness of peritoneal dialysis fluids with neutral pH and low glucose degradation products concentration: open randomized prospective trial. *Perit. Dial. Int.* **28**, 174-182 (2008).
10. Witowski, J. et al. Peritoneal dialysis with solutions low in glucose degradation products is associated with improved biocompatibility profile towards peritoneal mesothelial cells. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 917-924 (2004).
11. Gerlier, D. & Thomasset, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* **94**, 57-63 (1986).
12. Cooker, L.A., Choo, C.G., Luneburg, P., Lamela, J., Holmes, C.J. Effect of icodextrin peritoneal dialysis solution on cell proliferation in vitro. *Adv. Perit. Dial.* **15**, 17-20 (1999).
13. Breborowicz, A., Witowski, J., Polubinska, A., Pyda, M., Oreopoulos, D. l-2-Oxothiazolidine-4-carboxylic acid reduce in vitro cytotoxicity of glucose degradation products. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 3005-3011 (2004).
14. Cooker, L.A., Luneburg, P., Faict, D., Choo, C.G., Holmes, C.J. Reduced glucose degradation products in bicarbonate/lactate_buffered peritoneal dialysis solutions produced in two-chambered bags. *Perit. Dial. Int.* **17**, 373-378 (1997).

11

Figure legends

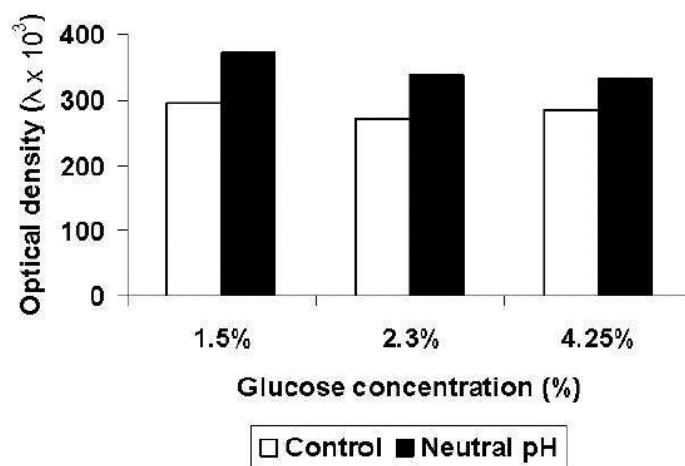
Figure 1: Fibroblast viability after cells were exposed to Control and Neutral pH peritoneal dialysis solutions at the different glucose concentrations.

For Review Only

1

TABLE 1. Composition of the peritoneal dialysis solutions before mixing with culture medium

	CONTROL	NEUTRAL Ph
Components in mmol/L	(Peritosteril [®] 1.5%)	(Balance [®] 1.5%)
Sodium	134	134
Calcium	1.75	1.75
Magnesium	0.5	0.5
Chloride	103.5	101.5
Lactate	35	35
pH	5.5	7.0
Osmolarity (mOsm/L)	358	358



172x118mm (96 x 96 DPI)