



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma
de Barcelona

Tesi doctoral

Estudi de vesícules extracel·lulars al líquid
peritoneal pel monitoratge de la membrana
peritoneal en pacients en diàlisi peritoneal

Autor:

Jordi Soler Majoral

Directors:

Francesc Enric Borràs Serres

Maria Isabel Troya Saborido

Tutor

Jordi Tor Aguilera

Programa de Doctorat en Medicina

Departament de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Any 2020

(...)

L'Enric anava perdut. Demanà al senyor Codina-Fortiac el llibre de fórmules de les sopes i el fabricant va donar-li uns cops amistosos a l'esquena.

- *Les sopes, no me les enredeu – digué –. Això pertany a Producció i tu ets d'Investigació.*
- *I els cubets? – preguntà tímidament l'Enric.*
- *Van bé, van bé! Tu busca i calla, però no t'emboliquis amb coses que no entens.*

Total, que el sou allargava i l'Enric es va casar. El catedràtic que li feia de conseller va dir-li que podia treure partit de la situació: ja que el deixaven amb prou llibertat, que preparés la tesi, que versava sobre el procés de col·lisió múltiple produït per l'entrada d'una partícula carregada d'energia en un bloc sòlid de matèria, on els àtoms, apilats compactament, s'engegaven en forma de xàfec còsmic.

L'Enric treballava al costat del químic, i, de tant en tant, havia de tastar la sopa.

- *Encara és amargant – deia.*

I l'altre feia noves barreges, incansablement.

- *I ara?*
- *Ara no té gust de sopa.*

S'avenien, es van fer molt amics.

(...)

Àtoms per la pau

Pere Calders

Agraïments

Gràcies:

En primer lloc als directors de la tesi, Maribel i Francesc, per ser participants de la introducció, el nus i el desenllaç de tot plegat.

En segon lloc a la Laura, per la teva immensa capacitat de treball. He tingut la fortuna de poder recórrer plegats els primers corriols de la recerca bàsica. I ha sigut un plaer.

A la Fredzzia, perquè tot va començar un dia que corries per anar a fer una biòpsia. I perquè espero que no s'acabi mai, que no parem mai de córrer.

I en general, a tots els meus companys del servei de Nefrologia de Can Ruti, especialment a la Maru i a l'Helena per la docència que vaig rebre quan era (més) jove, i que encara dura; a la Ioana perquè, malgrat tot, ho hem acabat fent; a la Laura per ensenyar-me la importància d'ordenar bé les coses; a la Marina per aquesta lloable determinació per aconseguir allò que un vol; i a la Inés per ensenyar-me que la professionalitat i el *savoir faire* poden anar de bracet amb uns mitjans divertits.

L'atzar ha fet que el desenllaç d'aquesta tesi hagi coincidit amb una crisi sanitària, social i humanitària de pronòstic incert. La sort ha fet que estigués envoltat de bons metges i de bones persones. I això últim també és d'agrair. Molt.

Abreviacions

AlaGln:	Alanyl-glutamina
ATS:	Microscòpia de forces atòmiques
CA-125:	Antigen del càncer 125
Cryo-ME:	Microscòpia crioelectrònica
DLS:	Dispersió Dinàmica de Llum (<i>Dynamic light scattering</i>)
DPAC:	Diàlisi Peritoneal Ambulatòria Contínua
DPCC:	Diàlisi Peritoneal Continuada Cíclica
ELISA:	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EPS:	<i>Encapsulating Peritoneal Sclerosis</i> (Peritonitis Esclerosant Encapsulada)
FUF:	Fallida d'ultrafiltració
GSEA:	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i> (Anàlisi per enriquiment a nivell de conjunt de gens)
IL-6:	Interleucina 6
IL-8:	Interleucina 8
ISPD:	International Society for Peritoneal Dialysis
KDIGO:	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>

LC-MS/MS: Espectrometria de masses en tàndem acoblada a cromatografia

líquida

LTP: *Longer-Treated Patients*

ME: Microscòpia electrònica

NEP: *Newly-Enrolled Patients*

NTA: Anàlisi de rastreig de nanopartícules

PDGs: Productes de degradació de la glucosa

PDOPPS: *Peritoneal Dialysis Outcomes and Practice Patterns*

RNA_m: Àcid ribonucleic missatger

ROC: *Receiver Operating Characteristics*

SEC: *Size-Exclusion Chromatography* (Cromatografia per exclusió de mida)

TEP: Test d'Equilibri Peritoneal

VEs: Vesícules extracel·lulars

Índex

AGRAÏMENTS	- 5 -
ABREVIACIONS	- 7 -
ÍNDEX	- 9 -
RESUM	- 13 -
ABSTRACT	- 14 -
1. INTRODUCCIÓ	- 17 -
1.1. Malaltia renal crònica i tractament renal substitutiu	- 17 -
1.1.1 Definició	- 17 -
1.1.2 Incidència, prevalença i impacte econòmic	- 18 -
1.1.3 Malaltia renal crònica avançada i tractament renal substitutiu ...	- 18 -
1.1.3.1 Tractament renal substitutiu al nostre entorn	- 19 -
1.2. La diàlisi peritoneal	- 20 -
1.2.1 Definició	- 20 -
1.2.2 La diàlisi peritoneal al món	- 20 -
1.2.3 La diàlisi peritoneal al nostre entorn	- 21 -
1.2.4 Mortalitat comparada amb hemodiàlisi	- 22 -
1.2.5 Les modalitats del tractament en diàlisi peritoneal	- 23 -
1.2.6 Les solucions de diàlisi	- 23 -
1.2.7 Adequació en diàlisi peritoneal	- 24 -
1.2.8 La membrana peritoneal	- 25 -
1.2.8.1 Avaluació de la membrana peritoneal	- 26 -
1.2.8.2 Deteriorament de la membrana peritoneal	- 28 -
1.2.8.3 La recerca de biomarcadors en el deteriorament de la membrana peritoneal	- 31 -

1.3.	Les vesícules extracel·lulars	- 33 -
1.3.1	Definició i funció biològica	- 33 -
1.3.2	Aïllament i caracterització de les vesícules extracel·lulars	- 34 -
1.3.3	Anàlisi de la proteòmica de les vesícules extracel·lulars.....	- 36 -
2.	HIPÒTESI.....	- 39 -
3.	OBJECTIUS	- 41 -
3.1.	Objectiu principal.....	- 41 -
3.2.	Objectius secundaris	- 41 -
4.	METODOLOGIA.....	- 43 -
4.1.	Characterization and proteomic profile of extracellular vesicles from peritoneal dialysis efflux.....	- 43 -
4.2.	Proteomic profiling of peritoneal dialysis effluent-derived extracellular vesicles: a longitudinal study	- 65 -
5.	RESUM GLOBAL DELS RESULTATS.....	- 91 -
6.	RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ.....	- 95 -
5.	CONCLUSIONS	- 103 -
6.	LÍNIES DE FUTUR	- 105 -
7.	BIBLIOGRAFIA	- 109 -

Resum

La diàlisi peritoneal ha esdevingut, en els darrers anys, una bona opció com a tractament renal substitutiu per aquells pacients que presenten una malaltia renal crònica avançada. Presenta alguns avantatges respecte a l'hemodiàlisi assistida, la tècnica dialítica més estesa, com són una major autonomia per part del pacient, donat que és una tècnica domiciliària, i una major preservació de la funció renal residual. No obstant això, molts pacients que inicien el tractament amb diàlisi peritoneal, acaben transferits a hemodiàlisi donada la fallida de la tècnica, que ve determinada per diversos factors. Un dels més importants, és el deteriorament de la membrana peritoneal, provocada per l'agressió que aquesta rep per l'ús continuat de solucions de diàlisi riques en glucosa, així com pels episodis de peritonitis i d'hemoperitoneu que, a la llarga, provoquen la fibrosi i neovascularització de la membrana amb la conseqüent pèrdua de capacitat dialítica.

El mètode més utilitzat per a monitoritzar i avaluar la membrana peritoneal, el Test d'Equilibri Peritoneal, presenta algunes limitacions donat que dona una informació tardana del deteriorament de la membrana.

En aquesta tesi, es demostra per primera vegada la possibilitat d'aïllar vesícules extracel·lulars de l'efluent de diàlisi a través de cromatografia per exclusió de mida, i com el seu proteoma mostra diferències entre els pacients que presenten una membrana peritoneal estable i aquells que no, fins i tot abans que es produeixin canvis en el Test d'Equilibri Peritoneal. Finalment, s'han identificat algunes proteïnes com a potencials biomarcadors precoços del deteriorament de la membrana.

Abstract

In recent years, peritoneal dialysis has become a good alternative for renal replacement therapy in patients with end-stage kidney disease. It has some advantages over assisted hemodialysis, the most common type of dialysis, such as more patient autonomy, as it is a home-based therapy, and higher preservation of residual renal function. However, many patients in peritoneal dialysis will eventually transfer to hemodialysis due to the failure of the technique which is determined by several factors. One of the most important is the deterioration of the peritoneal membrane, caused by the long-term exposure to the dialysis solutions, which contain large amounts of glucose, as well as by repeated episodes of peritonitis and hemoperitoneum, which in turn causes peritoneal fibrosis, neovascularization and consequently, loss of the dialytic capacity.

The most widely used method for monitoring and evaluating the peritoneal membrane, the Peritoneal Equilibration Test, has some limitations, as it provides a delayed information about the peritoneal membrane state.

In the present thesis, we demonstrate for the first time, the feasibility to isolate extracellular vesicles from the peritoneal dialysis efflux using Size-Exclusion chromatography. Also, extracellular vesicles proteome shows differences between patients with stable and non-stable peritoneal membrane, even before changes occur in the Peritoneal Equilibration Test. In addition, some proteins have been identified as potential early biomarkers of membrane deterioration.

1. Introducció

1.1. Malaltia renal crònica i tractament renal substitutiu

1.1.1 Definició

La malaltia renal crònica es defineix com una alteració estructural o funcional dels ronyons persistent durant més de 3 mesos. El grup de treball KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) classifica la malaltia renal crònica en funció de l'etiologia del dany renal, del filtrat glomerular estimat (en 6 estadis) i de l'excreció urinària d'albúmina (en 3 estadis)⁽¹⁾. Aquesta classificació en estadis, que es mostra a la **taula 1**⁽²⁾, permet establir un pronòstic de la malaltia renal crònica, de manera que com més avançat sigui l'estadi, pitjor és el pronòstic tant des del punt de vista de mortalitat cardiovascular, com de malaltia renal avançada amb necessitat de tractament renal substitutiu. Així doncs, tant la disminució del filtrat glomerular com l'augment de l'excreció d'albúmina en orina són factors de risc de mortalitat global i mortalitat cardiovascular⁽³⁾.

Prognosis of CKD by GFR and albuminuria categories: KDIGO 2012

				Persistent albuminuria categories description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				<30 mg/g <3 mg/mmol	30–300 mg/g 3–30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR categories (ml/min/1.73 m ²) description and range	G1	Normal or high	≥90			
	G2	Mildly decreased	60–89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45–59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30–44			
	G4	Severely decreased	15–29			
	G5	Kidney failure	<15			

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); yellow: moderately increased risk; orange: high risk; red: very high risk.

Taula 1: Classificació del grup KDIGO (2012) sobre els estadis de la malaltia renal crònica segons el filtrat glomerular estimat (GFR) i pronòstic de malaltia renal crònica avançada amb necessitat de tractament renal substitutiu. Extret de la referència bibliogràfica n°2.

Globalment, la hipertensió arterial i la diabetis són les causes principals de malaltia renal crònica, tot i que en molts casos no s'arriba a filiar l'etiologia⁽⁴⁾.

1.1.2 Incidència, prevalença i impacte econòmic

Tant la incidència com la prevalença de la malaltia renal crònica varien molt en funció del país d'estudi. Amb tot, s'estima una prevalença mundial aproximada d'entre un 8-16% en la població, tot i que les dades en els estadis més inicials de la malaltia renal crònica són difícils d'obtenir i probablement està infradiagnosticada⁽⁵⁾⁽⁶⁾.

La malaltia renal crònica té un gran impacte econòmic en la societat donat que els costos del seguiment i, sobretot, del tractament renal substitutiu en la fase més avançada, són molt elevats. S'estima que en els països desenvolupats, el 2-3% dels costos sanitaris es destinen al tractament renal substitutiu, tot i que només corresponen a un 0,1-0,2% de la població⁽⁵⁾.

1.1.3 Malaltia renal crònica avançada i tractament renal substitutiu

A mesura que la malaltia renal avança, es redueix la capacitat d'eliminar toxines urèmiques i augmenta el risc de complicacions com l'anèmia, els trastorns hidroelectrolítics, la malaltia mineral òssia i la sobrecàrrega hidrosalina. En les fases més avançades, els pacients afectats poden presentar símptomes diversos com astènia, anorèxia, disgèusia, pruija i dispnea, entre d'altres, el conjunt dels quals rep el nom de simptomatologia urèmica. És en aquestes fases quan és necessari l'inici de tècniques renals substitutives, que inclouen el trasplantament renal, l'hemodiàlisi i la diàlisi peritoneal.

Del conjunt de tècniques renals substitutives, el trasplantament renal és el tractament que ofereix una millor supervivència i qualitat de vida en els pacients amb malaltia renal crònica avançada⁽⁷⁾⁽⁸⁾⁽⁹⁾. Aquells que tenen

alguna contraindicació per rebre un trasplantament renal, o que estan en llista d'espera, són tractats mitjançant tècniques dialítiques.

1.1.3.1 Tractament renal substitutiu al nostre entorn

En el cas concret de Catalunya, en els darrers anys, s'ha observat un augment significatiu tant de la prevalença com de la incidència de la malaltia renal crònica avançada en tractament renal substitutiu (**taula 2**)⁽¹⁰⁾.

		2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Prevalença	n	9.026	9.316	9.589	9.819	10.159	10.488	10.785
Prevalença	pmp	1.197,1	1.230,5	1.269,5	1.305,9	1.353,1	1.394,2	1.427,4
Incidència	n	1.049	1.088	1.149	1.184	1.247	1.263	1.249
Incidència	pmp	139,1	143,7	152,1	157,5	166,1	167,9	165,3

Taula 2: Evolució de la malaltia renal crònica avançada en tractament renal substitutiu a Catalunya. Extret del Registre de Malalts Renals de Catalunya del 2017⁽¹⁰⁾. pmp: per milió d'habitants

Les tècniques renals substitutives tenen una distribució diferent en el conjunt de la població catalana, de manera que l'hemodiàlisi assistida és el tractament d'elecció en els casos incidents. Pel que fa a la prevalença del tipus de tractament renal substitutiu, observem que més del 50% dels pacients tenen un trasplantament renal funcionant (**Figura 1**).

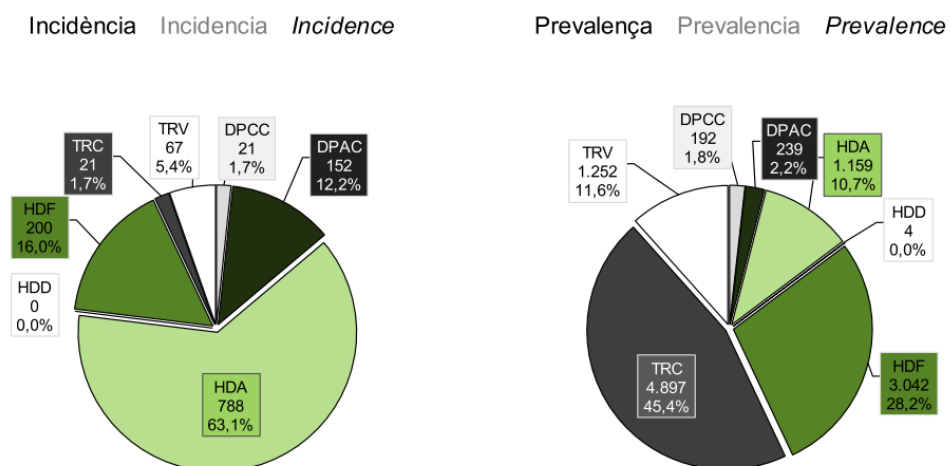


Figura 1: Incidència i prevalença segons el tipus de tractament renal substitutiu a Catalunya. Any 2017. Extret del Registre de Malalts Renals de Catalunya del 2017⁽¹⁰⁾. HDA: Hemodiàlisi assistida; HDD: Hemodiàlisi domiciliària; HDF: Hemodiafiltració on-line; DPAC: Diàlisi peritoneal ambulatoria contínua; DPCC: Diàlisi peritoneal continuada cíclica; TRC: Trasplantament renal de donant cadàver; TRV: Trasplantament renal de donant viu.

1.2. La diàlisi peritoneal

1.2.1 Definició

La diàlisi peritoneal és una tècnica dialítica que consisteix en la infusió d'un líquid de diàlisi a la cavitat peritoneal a través d'un catèter abdominal. Aquest líquid de diàlisi, entra en contacte amb la denominada membrana peritoneal, que actua com a membrana de diàlisi entre els capil·lars peritoneals i el líquid de diàlisi. L'objectiu principal és l'eliminació de substàncies urèmiques i de l'excés d'aigua corporal.

Els avantatges principals de la diàlisi peritoneal respecte a l'hemodiàlisi assistida són la preservació de la funció renal residual⁽¹¹⁾, i en alguns casos, un augment de la qualitat de vida⁽¹²⁾, derivada en part, pel fet de ser una tècnica que el pacient pot realitzar al seu domicili. De fet, en la nefrologia pediàtrica i fins a l'adolescència, la diàlisi peritoneal és la tècnica dialítica més utilitzada precisament perquè permet, entre d'altres, una major conciliació amb la vida familiar⁽¹³⁾.

Les contraindicacions absolutes de la diàlisi peritoneal són poques, i inclouen antecedents de cirurgia abdominal major, obesitat mòrbida, grans hèrnies abdominals, diverticulitis activa, i el fet de ser portador de colostomies i de grans aneurismes aòrtics abdominals⁽¹⁴⁾.

1.2.2 La diàlisi peritoneal al món

Aproximadament, al món, prop de 369000 pacients reben tractament renal substitutiu amb diàlisi peritoneal, que correspon a un 9% del total de tècniques renals substitutives i a un 11% del total de tècniques dialítiques⁽¹⁵⁾. S'estima un creixement anual global aproximat del 8%, que és irregular segons el territori: en els darrers anys, el creixement ha estat notori especialment en països asiàtics i als Estats Units, tot i que en d'altres zones, com a Europa, s'ha observat un decreixement per motius diversos⁽¹⁶⁾.

1.2.3 La diàlisi peritoneal al nostre entorn

A Catalunya, la diàlisi peritoneal té una prevalença d'un 4% sobre el total de tècniques renals substitutives (inclòs el trasplantament renal), mentre que la seva incidència és del 13,9%⁽¹⁰⁾.

Actualment, a la població catalana, el motiu més freqüent d'abandonament de la diàlisi peritoneal és el canvi de tècnica al trasplantament renal. Si ens fixem en l'evolució dels últims anys, observem que aquest flux ha augmentat molt donat l'increment anual del número de trasplantaments renals que es realitzen (**Figura 2**).

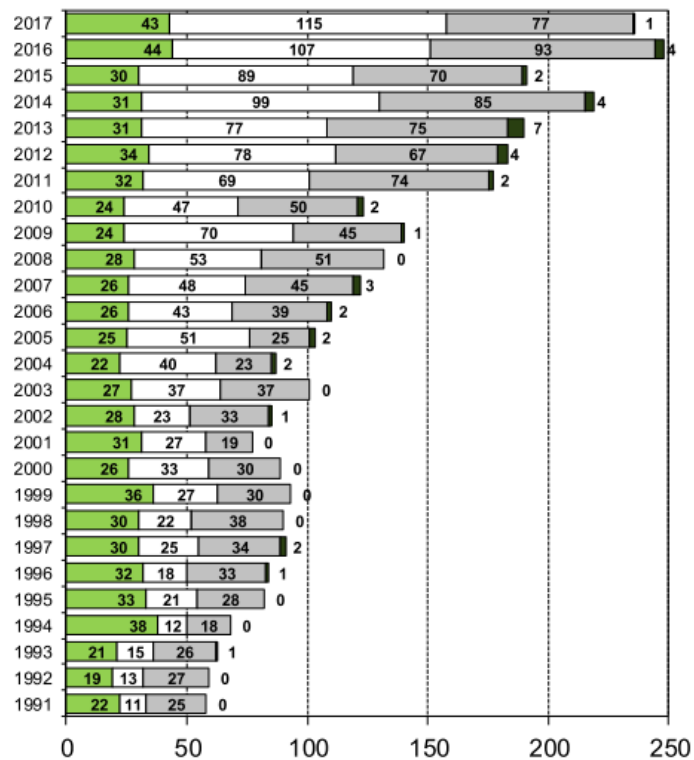


Figura 2: Flux de pacients. Sortides de diàlisi peritoneal. Extret del Registre de Malalts Renals de Catalunya del 2017⁽¹⁰⁾.

Eix X: Número de pacients

Codi de colors: *Verd*: Èxitus; *Blanc*: Transferència a trasplantament renal; *Gris*: Transferència a hemodiàlisi; *Negre*: Exclosos

Per altra banda, els pacients vius que abandonen la diàlisi peritoneal i no reben un trasplantament renal, han de canviar necessàriament a hemodiàlisi. En un 18,4% dels casos, el canvi de tècnica a hemodiàlisi és conseqüència de la pèrdua de la funció de la membrana peritoneal (**Figura 3**).

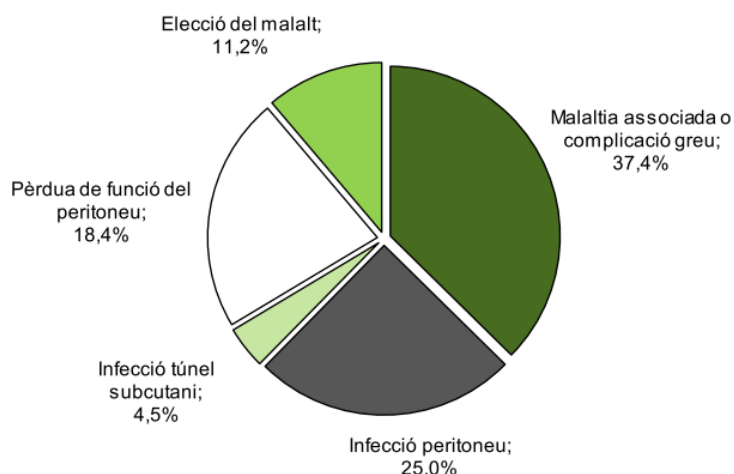


Figura 3: Causa del canvi de la diàlisi peritoneal a hemodiàlisi. Període 2000-2017. Manca informació en 150 casos (16%). Extret del Registre de Malalts Renals de Catalunya del 2017⁽¹⁰⁾.

1.2.4 Mortalitat comparada amb hemodiàlisi

Els estudis comparatius més recents sobre la supervivència global en funció de la tècnica dialítica (diàlisi peritoneal i hemodiàlisi assistida) són costosos per la complexitat de llur disseny. Els resultats obtinguts han estat diversos, i depenen de les poblacions estudiades. *Vonesh et al*⁽¹⁷⁾, van mostrar els resultats comparatius del seu estudi en una mostra de pacients dels Estats Units de forma estratificada en funció de l'edat, causa de la malaltia renal i comorbiditats: l'hemodiàlisi estava associada a un augment de la mortalitat respecte a la diàlisi peritoneal, en aquells pacients sense nefropatia diabètica i més joves (<45 anys) que no presentaven més comorbiditats, mentre que s'observava un augment de la mortalitat en diàlisi peritoneal en el grup de pacients amb nefropatia diabètica i majors de 45 anys. En un altre estudi epidemiològic en una població danesa⁽¹⁸⁾, la diàlisi peritoneal mostrava una major supervivència significativa respecte a l'hemodiàlisi en tots els subgrups estudiats durant els 4 primers anys, moment a partir del qual la supervivència era menor de forma no significativa.

En general, i tot i les diferències geogràfiques, el consens generalitzat és que l'elecció de la tècnica dialítica hauria de dependre de la preferència del pacient, un cop ha estat informat durant el seguiment de la malaltia renal crònica avançada.

1.2.5 Les modalitats del tractament en diàlisi peritoneal

Distingim entre dues grans modalitats en el moment de prescriure el tractament en diàlisi peritoneal. D'una banda, rep el nom de Diàlisi Peritoneal Ambulatòria Contínua (DPAC) a la modalitat que consisteix en la infusió, per part del pacient o cuidador, d'entre una i quatre bosses de solució de diàlisi a la cavitat peritoneal durant un dia. D'altra banda, parlem de Diàlisi Peritoneal Continuada Cíclica (DPCC) quan la infusió es realitza a través d'un aparell anomenat cicladora a què el pacient està connectat entre unes 7 i 9 hores (habitualment durant la nit, mentre es dorm). L'elecció entre una modalitat i una altra dependrà de l'elecció del pacient però també de les característiques del transport de la membrana peritoneal.

1.2.6 Les solucions de diàlisi

Les solucions de diàlisi estan constituïdes pels ions sodi, calci, magnesi i clor a una concentració semblant a les concentracions plasmàtiques fisiològiques, així com d'un agent osmòtic, responsable de la ultrafiltració, i un tampó (lactat i/o bicarbonat) pel tractament de l'acidosi metabòlica⁽¹⁹⁾.

El principal agent osmòtic és la glucosa i es troba a diferents concentracions, l'elecció de la qual depèn de la capacitat d'ultrafiltració desitjada durant la prescripció del tractament. Actualment existeixen dues solucions amb agents osmòtics diferents: i) les solucions isoosmolars basades en icodextrina, un polímer de la glucosa que permet un temps de permanència major de la solució a la cavitat peritoneal, donat que s'esdevé una ultrafiltració mantinguda a través de la membrana peritoneal superior a la de les solucions de glucosa⁽²⁰⁾; i ii) les solucions basades en aminoàcids.

Les solucions de diàlisi més recents, denominades biocompatibles, són aquelles en les que se separa el tampó de la glucosa durant el seu emmagatzematge i esterilització, de manera que permet l'ús de bicarbonat sol o amb lactat com a tampó (més fisiològic que les antigues solucions que utilitzaven altes concentracions de lactat) i l'esterilització de la glucosa a un pH més baix, amb la conseqüent reducció dels denominats productes de degradació de la glucosa (PDGs), lesius per a la membrana peritoneal⁽²¹⁾.

1.2.7 Adequació en diàlisi peritoneal

El concepte d'adequació en diàlisi peritoneal inclou una sèrie de condicions que tenen en compte la correcta diàlisi de petits soluts i la ultrafiltració assolida, així com paràmetres que afecten a la qualitat de vida dels pacients, tal i com l'anèmia, la volèmia, l'estat de nutrició, afectació mineral-òssia, el balanç àcid-base, etc⁽²²⁾.

Un dels paràmetres més àmpliament utilitzats per a l'avaluació de la diàlisi de petits soluts és l'anomenat Kt/V setmanal total d'urea (resultant de la suma del Kt/V setmanal d'urea peritoneal i del Kt/V setmanal d'urea renal). Es tracta d'un índex que mesura l'aclariment fraccional de la urea en el temps (Kt) i que permet quantificar la dosi de diàlisi atorgada. S'expressa com un valor setmanal, normalitzat pel volum de distribució de la urea (V)⁽²³⁾. Les guies clíniques de la *International Society for Peritoneal Dialysis* (ISPD) recomanen que superi el valor de 1.7, donat que hi ha evidència que valors més baixos es relacionen amb pitjor supervivència del pacient i de la tècnica, així com a una major necessitat d'estimulants de l'eritropoesi⁽²⁴⁾. En aquells pacients que en el seguiment no assoleixen un Kt/V adequat, cal valorar l'augment de dosi de diàlisi, habitualment augmentant els litres de tractament amb les solucions de diàlisi. A mesura que augmenta el temps de la tècnica en diàlisi, és habitual que el clínic hagi d'anar augmentant la dosi de diàlisi.

Tal i com veurem més endavant, l'avaluació de la membrana peritoneal, també és cabdal per a la correcta adequació de la diàlisi.

1.2.8 La membrana peritoneal

Rep el nom de membrana peritoneal el conjunt format per mesoteliòcits, membrana basal mesotelial, interstici, membrana basal capil·lar, glicocàlix i endoteliòcits, és a dir, a les estructures que s'interposen entre la sang dels capil·lars peritoneals i el líquid de diàlisi de la cavitat peritoneal (**Figura 4**)⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾.

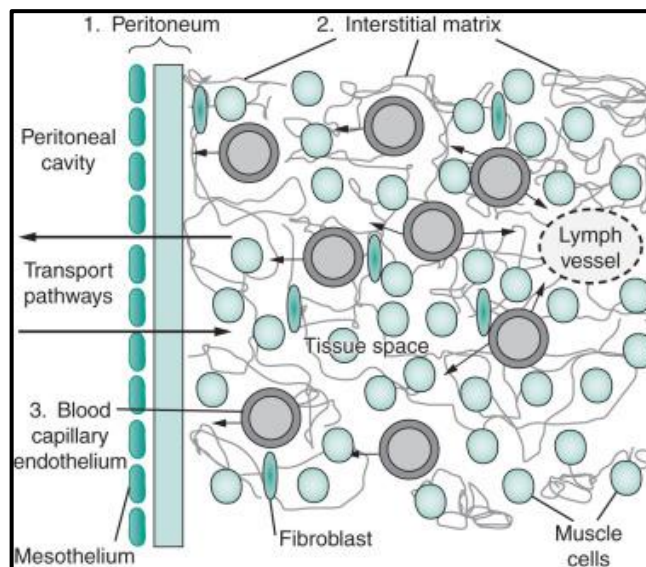


Figura 4: Estructura de la membrana peritoneal⁽²⁶⁾.

El conjunt d'aquestes estructures, permet el transport de soluts i d'aigua que succeeixen durant el procés de diàlisi.

Els dos principals mecanismes pels qual es produeix aquest transport són la difusió, que es produeix per la diferència de gradient de soluts; i la convecció, provocada per la diferència de gradient de pressió osmòtica.

Actualment s'accepten dos models teòrics complementaris que expliquen com es produeix aquest transport a través de la membrana: la teoria dels tres porus i el model distribuït⁽²⁷⁾.

La teoria dels tres porus sosté que la barrera més important pel transport peritoneal es troba en els capil·lars sanguinis, i que aquest depèn principalment de tres porus de diferent mida. Els porus grans (20-40 nm) corresponen a grans escletxes entre l'endoteli que permeten el pas de macromolècules com les proteïnes (albúmina i proteïnes més grans com les immunoglobulines). D'altra banda, els porus petits (4-6 nm) corresponen a petites escletxes interendotelials i permeten el pas de molècules petites com creatinina, urea, potassi i sodi. Finalment, els ultraporus (<0,8 nm) corresponen a aquaporines que permeten el pas d'aigua lliure de soluts (Figura 5).

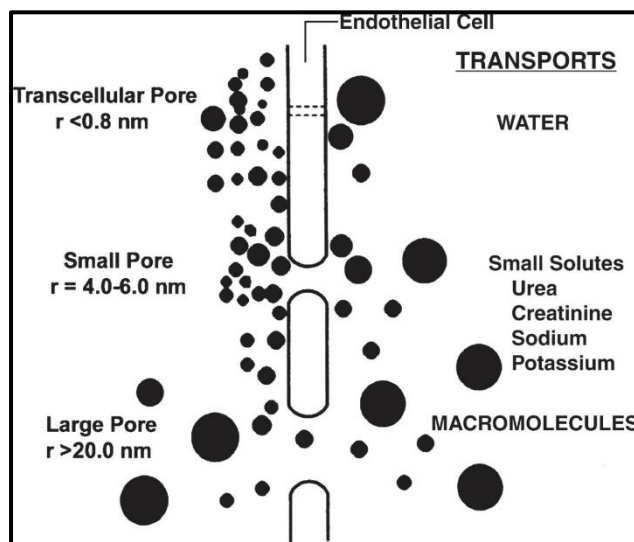


Figura 5: Teoria dels tres porus⁽²⁷⁾.

Pel que fa al model distribuït, posa de manifest que el transport peritoneal depèn de la distribució que els capil·lars tenen a la membrana peritoneal, així com de la distància que l'aigua i els soluts han de travessar entre els capil·lars i el mesoteli, a través de l'interstici, de manera que els capil·lars més propers al mesoteli són els que presenten una eficiència en el transport peritoneal més elevada.

1.2.8.1 Avaluació de la membrana peritoneal

Del bon funcionament de la membrana, en depèn la capacitat dialítica de la tècnica i, per tant, és necessària la monitorització de la mateixa al llarg de

la vida útil del tractament. El mètode més àmpliament utilitzat per avaluar la capacitat dialítica de la membrana peritoneal en les unitats de diàlisi peritoneal, és el Test d'Equilibri Peritoneal (TEP). El test tradicional va ser estandarditzat per Twardowski el 1987 i consistia en la infusió d'una solució de diàlisi de glucosa al 2,27% durant 4 hores, obtenint una relació entre els valors del quocient de creatinina del dialitzat i del plasma (D/P creatinina), així com de la relació entre la concentració de glucosa en el dialitzat a l'inici i al final del test (D/D_0 de glucosa). Més tard, s'ha estandarditzat amb una solució de glucosa amb una concentració del 3,86%, per comptes del 2,27%, donat que ofereix la mateixa informació respecte al transport de petits soluts, però millor respecte a la capacitat d'ultrafiltració, ja que s'obtenen volums de drenatge més grans i fa que es disminueixin els errors en llur mesura. Així mateix, aporta informació sobre el transport d'aigua lliure mediat pels canals d'aquaporina-1 gràcies a la mesura del *Sieving* de sodi (reducció de la concentració de sodi en el dialitzat a l'inici de la ultrafiltració), permetent una millor avaluació de la membrana⁽²⁸⁾.

En funció dels resultats, els pacients són classificats en quatre tipus segons el tipus de transport que s'hagi observat de la membrana: Alt, Mig-Alt, Mig-baix i baix (**Figura 6**).

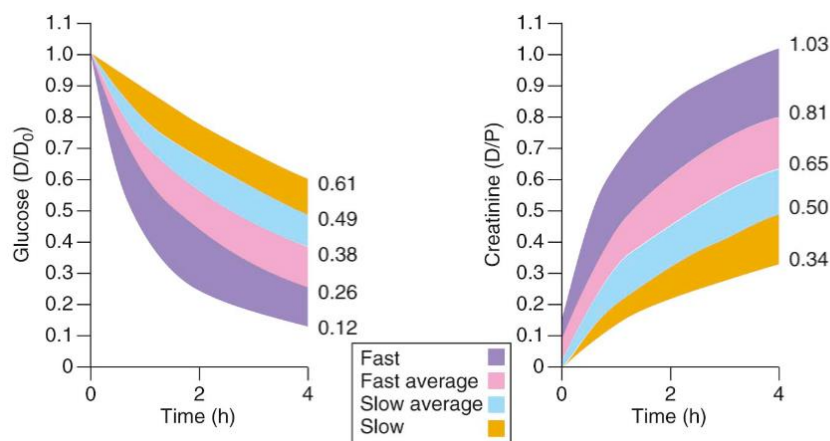


Figura 6: Interpretació del TEP i classificació del tipus de transportador⁽¹⁹⁾.

Aquesta classificació permet, juntament amb l'avaluació clínica i analítica del pacient, fer una correcta adequació de la diàlisi en el moment de fer la

prescripció del tractament, de manera que els alts transportadors es beneficiaran d'una prescripció amb cicles de tractament d'una durada més curta i de l'ús de solucions d'icodextrina, mentre que els transportadors baixos es beneficiaran de cicles de permanència més llargs⁽²⁹⁾.

1.2.8.2 Deteriorament de la membrana peritoneal

Anteriorment hem descrit que un dels motius més freqüents d'abandonament de la tècnica és la pèrdua de la funció de la membrana peritoneal. La pròpia condició d'urèmia dels pacients amb malaltia renal crònica i, sobretot, l'exposició a solucions de diàlisi al llarg del temps, provoquen un augment del gruix de l'espai submesotelial, un augment de l'angiogènesi i una lesió progressiva dels vasos sanguinis de la membrana anomenada vasculopatia hialinitzant (semblants a les que s'observen en els pacients amb diabetis mellitus), que és més evident en aquells pacients que presenten una disminució de l'ultrafiltració peritoneal (**Figures 7 i 8**)⁽³⁰⁾⁽³¹⁾.

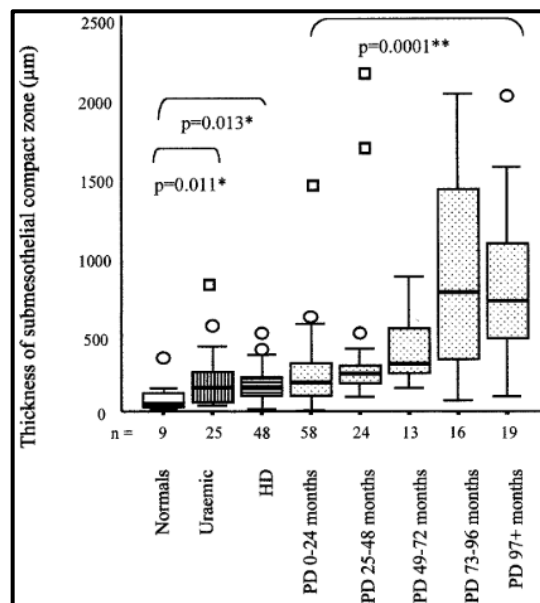


Figura 7: Gruix de l'espai submesotelial en funció del temps en diàlisi⁽³⁰⁾.
HD: Hemodiàlisi; PD: Diàlisi Peritoneal

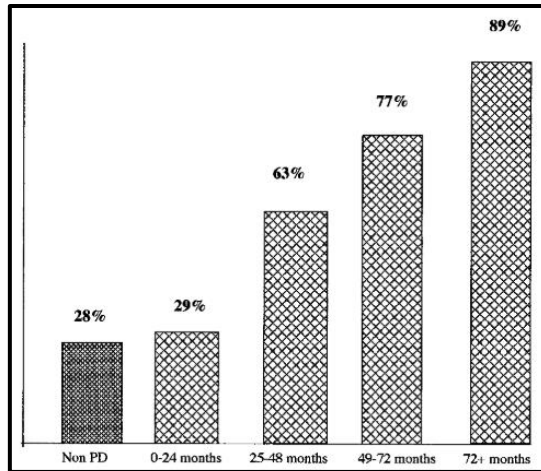


Figura 8: Prevalença de vasculopatia d'acord amb el temps en diàlisi peritoneal ⁽³⁰⁾.

D'altra banda, hi ha evidència que a mesura que augmenta el temps en diàlisi peritoneal, s'esdevé un canvi fenotípic de les cèl·lules mesotelials que formen la membrana peritoneal, de manera que aquestes perden la seva morfologia típica *cobblestone* transformant-se en cèl·lules *fibroblast-like*. Aquest canvi fenotípic també s'observa més acusadament després d'un episodi de peritonitis o d'hemoperitoneu⁽³²⁾.

Els mateixos investigadors van demostrar que les cèl·lules *fibroblast-like* provinents de cultius d'efluents de pacients en diàlisi peritoneal tenien un origen mesotelial, suggerint que les cèl·lules mesotelials de la membrana peritoneal experimenten una transició epiteli-mesènquima, adquirint capacitat de migració i un paper actiu en la formació de la fibrosi peritoneal i en la pèrdua de la capacitat d'ultrafiltració (**Figura 9**).

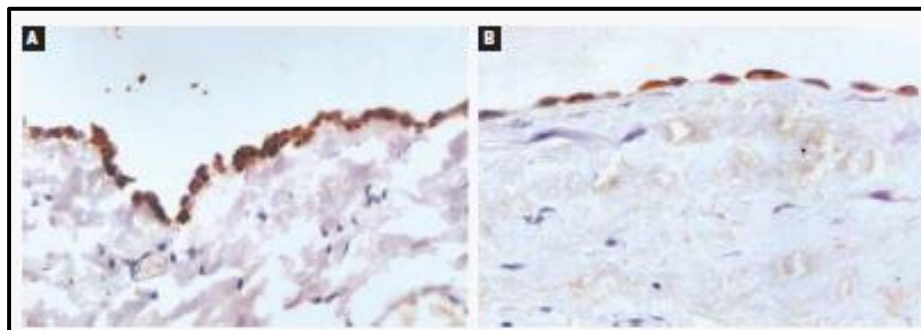


Figura 9: Transició epiteli-mesènquima de les cèl·lules mesotelials. A: Peritoneu de pacient que no rep tractament en diàlisi⁽³²⁾.

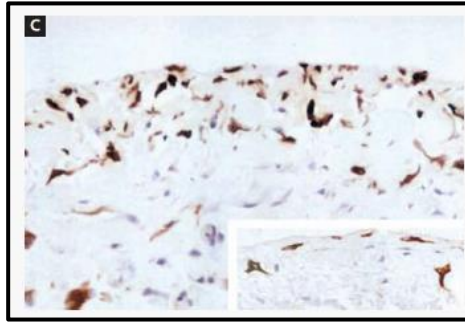


Figura 9: Transició epiteli-mesènquima de les cèl·lules mesotelials. B: Peritoneu de pacient en tractament en diàlisi peritoneal durant 6 mesos, i a on ja s'observa una pèrdua de polaritat de les cèl·lules mesotelials. C: 8 mesos en diàlisi peritoneal i, en el requadre petit, 34 mesos en diàlisi peritoneal. Cèl·lules marcades amb anticossos anticitokeratina (marcador epitelial)⁽³²⁾.

Globalment, els canvis funcionals de la membrana peritoneal es poden resumir en dos: inicialment s'observa un augment del ràtio del transport de petits soluts; i posteriorment s'observa una disminució de la capacitat d'ultrafiltració. Es postula que aquests esdeveniments tenen lloc, respectivament, com a conseqüència de l'augment de la proporció de vasos sanguinis efectius, i pel desenvolupament de la fibrosi peritoneal que afecta a la conductància osmòtica⁽³³⁾.

El principal problema del deteriorament de la membrana peritoneal és la fallida d'ultrafiltració (FUF). Es defineix com a la incapacitat d'assolir una ultrafiltració mínima de 400 mL durant 4 hores amb una solució de glucosa al 3,86%⁽³⁴⁾, en aquells pacients que presenten signes d'hiperhidratació, un cop s'ha descartat una possible disfunció del catèter o la presència de fugues⁽³⁵⁾. S'han descrit diverses causes de FUF, però la més freqüent té lloc quan es produeix una ràpida difusió dels soluts de mida petita, provocant una dissipació del gradient osmòtic. Característicament, aquests pacients presenten un canvi en el tipus de transport de membrana mesurada per TEP, virant a alts transportadors. Les causes més importants són la formació de fibrosi i angiogènesi peritoneal, provocant un augment de la superfície efectiva peritoneal. Els factors descrits més importants que contribueixen a aquest deteriorament són l'ús de glucosa com a substància osmòticament

activa, l'ús de solucions amb alta concentració de PDGs i les peritonitis greus o repetides en el temps⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾.

Una de les situacions més greus, encara que infreqüents, del deteriorament de la membrana peritoneal, és l'anomenada Peritonitis Esclerosant Encapsulada (EPS). Consisteix en un engruiximent greu del peritoneu, amb un atrapament de l'intestí que pot portar a una desnutrició greu i a una obstrucció intestinal⁽³⁹⁾. Actualment no hi ha evidència suficient per discernir si la EPS és una evolució pròpia del mateix deteriorament de la membrana peritoneal que succeeix en tots els pacients sotmesos a la tècnica, o es tracta de dues patologies independents⁽⁴⁰⁾, encara que la pèrdua de la capacitat d'ultrafiltració és un dels factors de risc més importants per al desenvolupament d'una EPS.

1.2.8.3 La recerca de biomarcadors en el deteriorament de la membrana peritoneal

Tot i la millora de la supervivència i de la qualitat de vida dels pacients afectats per una malaltia renal crònica avançada que reben tractament amb diàlisi peritoneal, hem vist que són múltiples les complicacions que poden presentar al llarg de la vida de la tècnica. Els procediments actuals que es fan servir a la pràctica assistencial disten molt de ser perfectes en el monitoratge i en el diagnòstic d'aquestes complicacions, especialment en el deteriorament de la membrana peritoneal. No obstant això, en els darrers anys han estat descrits diversos biomarcadors relacionats en el remodelatge de la membrana, en la inflamació crònica i en el desenvolupament de les peritonitis, que si bé encara no s'utilitzen en la pràctica clínica habitual, permeten un major coneixement dels processos biològics que es produeixen durant la tècnica, així com una classificació precoç d'aquells pacients suggestius de presentar un pitjor pronòstic⁽⁴¹⁾. Un dels avantatges més manifestes de l'ús de biomarcadors obtinguts a partir de l'efluent de diàlisi peritoneal és la seva facilitat d'obtenció, i al fet de ser un procediment

poc invasiu com ho poden ser d'altres com, per exemple, la biòpsia de la membrana peritoneal.

Un dels biomarcadors més estudiats en l'efluent peritoneal és la interleucina 6 (IL-6), marcador d'inflamació de la membrana, els nivells elevats de la qual s'han associat a un augment del transport peritoneal⁽⁴²⁾. D'altra banda, un augment en l'efluent peritoneal de la concentració del també marcador d'inflamació local interleucina 8 (IL-8), s'ha relacionat amb la durada del tractament amb diàlisi peritoneal i amb l'ús de solucions amb altes concentracions de PDGs⁽⁴³⁾. Finalment, les concentracions altes a l'efluent de l'antigen del càncer 125 (CA-125), relacionat amb la massa cel·lular mesotelial de la membrana peritoneal, s'ha associat a una major supervivència de la tècnica⁽⁴⁴⁾.

La millora de les noves tecnologies i de la informàtica en els darrers anys, ha permès l'adveniment de les tècniques denominades òmiques, que tenen com a objectiu l'anàlisi global d'un conjunt molecular, i inclou la genòmica, transcriptòmica, proteòmica i metabolòmica⁽⁴⁵⁾. La gran quantitat d'informació obtinguda a través d'aquestes tècniques, suposa un augment en la dificultat de la seva interpretació però el seu estudi permet diferenciar conjunts de biomarcadors, denominats signatures moleculars, que reflecteixen millor la complexitat dels processos biològics que s'estudien (**Figura 10**)⁽⁴¹⁾. Un dels exemples més propers a una pràctica clínica futura, el trobem en els treballs basats en l'estudi de la metabolòmica i proteòmica de l'efluent de diàlisi peritoneal on investiguen els canvis provocats per la suplementació d'alanyl-glutamina (AlaGln) al líquid de diàlisi⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾. La disminució dels marcadors d'estrès oxidatiu observats en els pacients que reben aquesta suplementació, converteixen l'AlaGln en un possible tractament pel deteriorament de la membrana peritoneal.

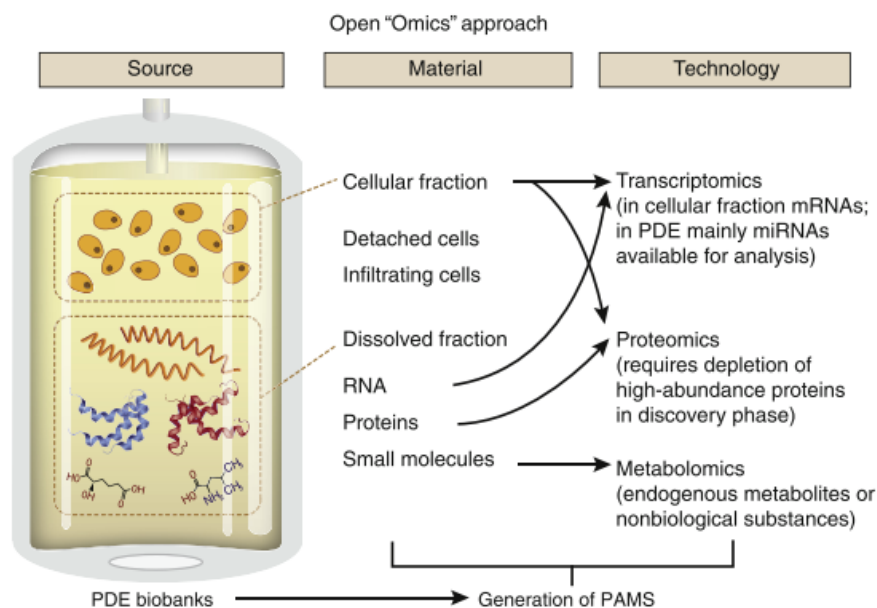


Figura 10: Model esquemàtic de l'estudi de les òmiques en l'efluent de diàlisi peritoneal (PDE)⁽⁴¹⁾.

PAMS: Pathogen-associated molecular signatures.

1.3. Les vesícules extracel·lulars

1.3.1 Definició i funció biològica

Les vesícules extracel·lulars (VEs) són partícules contingudes en una bicapa lipídica generades per les cèl·lules. La seva funció biològica principal rau en la comunicació intercel·lular, ja sigui en condicions fisiològiques o en processos patològics. Característicament, donada la seva capacitat de transferir material proteic, lipídic i també material nucleic (com RNAm i microRNA), els permet produir canvis fenotípics en les cèl·lules receptores⁽⁴⁹⁾.

S'han pogut aïllar en diferents líquids biològics (sang, saliva, orina, líquid amniòtic...) i s'ha observat que la seva composició depèn de l'estat funcional i fisiològic de la cèl·lula d'origen⁽⁵⁰⁾. En aquest sentit, l'estrès cel·lular provocat, per exemple, per l'estat d'urèmia dels pacients amb malaltia renal crònica, o el propi dany cel·lular per altres causes⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾, són responsables de l'augment de l'alliberació de VEs. És per aquest motiu que l'estudi de la composició d'aquestes estructures ha adquirit molta

rellevància en els darrers anys com a marcadors biològics de diferents patologies⁽⁵³⁾.

En funció de la mida i del seu procés de formació, s'han distingit diverses tipus de VEs que han rebut diversos noms (**Figura 11**)⁽⁵⁴⁾.

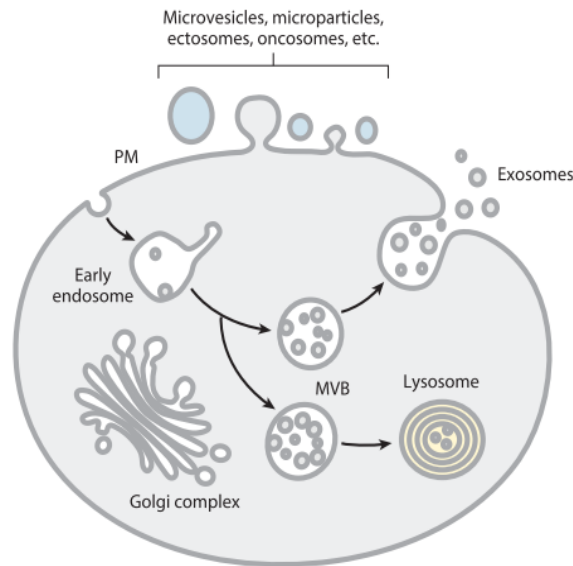


Figura 11: Representació esquemàtica dels diferents tipus de VEs generades per una cèl·lula eucariota⁽⁵⁴⁾.

PM: Membrana plasmàtica; MVB: Cossos multivesiculars

En general, parlem d'exosomes quan ens referim a VEs formades per la fusió de cossos multivesiculars intracel·lulars amb la membrana plasmàtica i alliberats posteriorment a l'espai extracel·lular; i de microvesícules (també reben el nom de micropartícules cel·lulars o ectosomes) quan són alliberades directament de la membrana plasmàtica. Finalment, els cossos apoptòtics són VEs que es produeixen a través de la membrana en el procés de mort cel·lular programada.

1.3.2 Aïllament i caracterització de les vesícules extracel·lulars

S'han descrit múltiples mètodes per a l'aïllament de les VEs en els diferents líquids biològics, que es diferencien, entre altres, per la seva capacitat de discriminar altres estructures, cost-efectivitat i aplicabilitat clínica⁽⁵⁵⁾. En aquest sentit, s'han emprat la centrifugació diferencial, la centrifugació per

gradient de densitat, la cromatografia per exclusió de mida (SEC), la ultrafiltració, la immunocaptació i la precipitació.

En la metodologia emprada en aquesta tesi farem èmfasi en la SEC, que consisteix en un mètode de separació basat en la mida de les partícules d'una solució que es fa passar a través d'una columna plena d'un polímer (per exemple, de safarosa) amb un determinada mida de porus. Lozano-Ramos et al⁽⁵⁶⁾, van demostrar que l'ús de la SEC per a l'aïllament de VEs urinàries, era un procediment fiable, més ràpid que la ultrafiltració (un mètode clàssicament utilitzat en l'aïllament de VEs), cost-efectiu i amb la possibilitat d'automatització i adaptació per als laboratoris de diagnòstic.

Pel que fa a la caracterització de VEs, s'utilitzen mètodes per a distingir algunes de les seves característiques, ja sigui la mida, la morfologia, l'origen cel·lular o la composició molecular. Els mètodes més utilitzats són la citometria de flux, la microscòpia electrònica (ME), l'anàlisi de rastreig de nanopartícules (NTA), la dispersió dinàmica de llum (DLS), i la microscòpia de forces atòmiques (AFM)⁽⁵⁷⁾. Farem èmfasi en les tres primeres, per ser específicament utilitzades en l'obtenció dels resultats d'aquesta tesi. La citometria de flux, sobretot quan és utilitzada per a la detecció de marcadors específics de VEs gràcies a l'ús d'anticossos monoclonals marcats amb un fluoròfor, té l'avantatge de ser un mètode ràpid que permet la detecció de múltiples marcadors en una mateixa mostra de VEs en suspensió⁽⁵⁷⁾. La ME és el *gold standard* en l'anàlisi de VEs per imatges, donat que permet una alta resolució d'entre 1-3 nm⁽⁵⁵⁾. Finalment, la NTA permet obtenir informació sobre la mida mitjana de les partícules d'una mostra i de la distribució per mida de les mateixes.

La principal limitació de la citometria de flux rau en la detecció de les VEs de mida més petita i que en situacions on hi ha una elevada concentració de VEs, aquestes es mesurin com a un únic resultat. Pel que fa a la ME, la seva limitació principal és la dificultat en la preparació de la mostra i el cost de la tècnica. A més, en el procés de preparació de la mostra es poden produir

alteracions estructurals en les VEs. Aquesta limitació se soluciona, en part, amb la criogenització de la mostra, donant lloc a un tipus de ME que rep el nom de microscòpia crioelectrònica (cyro-ME). Per últim, les desavantatges més importants pel que fa a la NTA, són el fet que les partícules de mida més petita poden resultar ocultes o emmascarades per les partícules més grans, i que la NTA no permet una diferenciació fenotípica acurada de les VEs⁽⁵⁷⁾.

1.3.3 Anàlisi de la proteòmica de les vesícules extracel·lulars

Un cop s'ha procedit a l'aïllament i a la caracterització de les VEs, és interessant procedir a l'anàlisi del contingut de les mateixes, donat que aquest és variable en funció de la cèl·lula d'origen i de l'ambient en què han estat sotmeses. En aquest sentit, es pot fer una anàlisi de la transcriptòmica (mRNAs, miRNAs), metabolòmica i proteòmica. Aquesta tesi se centrarà en l'anàlisi de la proteòmica com a base de recerca de nous biomarcadors de deteriorament de la membrana. Concretament, i per ser una de les tècniques més àmpliament utilitzades per a la identificació d'un espectre el més gran possible de proteïnes en una mostra, farem esment de l'espectrometria de masses en tàndem acoblada a cromatografia líquida (LC-MS/MS). En aquesta tècnica, inicialment es produeix la digestió de la mostra amb una proteasa per a l'obtenció de pèptids que posteriorment són analitzats per un espectròmetre de masses (en la metodologia d'aquesta tesi, s'ha emprat un analitzador de tipus trampa d'ions Orbitrap). Finalment, l'anàlisi peptídica es fa mitjançant programari específic que permet la identificació de les proteïnes presents a la mostra⁽⁵⁸⁾.

Així doncs, l'anàlisi d'un determinat perfil proteic d'un grup de pacients pot ser comparat amb altres grups de pacients per a determinar-ne diferències. Aquestes diferències, poden útils no només des del punt de vista d'identificació sinó també des del punt de vista de significació biològica.

2. Hipòtesi

La supervivència dels pacients en diàlisi peritoneal i de la pròpia tècnica ha experimentat una millora significativa respecte als seus inicis. No obstant això, encara avui, una de les causes més freqüents d'abandonament de la tècnica està relacionada amb la pèrdua de funcionalitat de la membrana peritoneal pel seu deteriorament. Els mètodes actuals d'avaluació de la membrana basats en estudis funcionals donen una informació massa tardana respecte al seu estat i fa difícil preveure l'evolució dels pacients. A més, precisen el desplaçament del pacient a l'hospital i una espera mínima de 4 hores mentre s'obtenen les mostres per a l'estudi, essent un gran desavantatge en una tècnica domiciliària com és la diàlisi peritoneal.

Darrerament, l'estudi de la composició de les VEs en diferents líquids biològics ha obert un nou ventall de possibilitats diagnòstiques en altres àmbits de la medicina, erigint-se com a una excel·lent font de biomarcadors.

La nostra **hipòtesi** de treball postula que **els canvis que es produeixen a la membrana peritoneal durant el tractament dialític, poden ser detectats i monitoritzats, de manera precoç i no invasiva, a través de l'estudi de VEs aïllades en l'efluent de diàlisi peritoneal.**

3. Objectius

3.1. Objectiu principal

- Descriure el proteoma de les VEs aïllades de l'efluent de diàlisi en pacients en tractament crònic amb diàlisi peritoneal.

3.2. Objectius secundaris

- Comprovar la presència i obtenir VEs de l'efluent de diàlisi en pacients en diàlisi peritoneal. Validar la SEC com a un mètode d'aïllament de VEs en l'efluent de diàlisi.
- Cercar possibles diferències en la composició de les VEs dels pacients, en funció del seu temps d'exposició a líquids de diàlisi hiperosmolars.
- Identificar, a través de l'estudi de la composició de les VEs, un perfil peptídic que permeti usar-se com a biomarcador de l'estat de la membrana peritoneal.

4. Metodologia

4.1. Characterization and proteomic profile of extracellular vesicles from peritoneal dialysis efflux

Article publicat a la revista PLoS One

PLoS One 2017 May 10;12(5):e0176987.

doi:10.1371/journal.pone.0176987

Enllaç:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0176987>

S'adjunta l'article original (open access) a les properes pàgines

RESEARCH ARTICLE

Characterization and proteomic profile of extracellular vesicles from peritoneal dialysis efflux

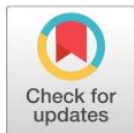
Laura Carreras-Planella^{1,2}✉, Jordi Soler-Majoral^{1,3,4}✉, Cristina Rubio-Esteve^{1,3}, Sara Inés Lozano-Ramos^{1,2}, Marcella Franquesa^{1,3}, Josep Bonet^{1,3}, Maria Isabel Troya-Saborido^{1,3,†,*}, Francesc Enric Borràs^{1,2,3,†,*}

1 REMAR-IVECAT Group, "Germans Trias i Pujol" Health Science Research Institute, Can Ruti Campus, Badalona, Spain, **2** Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Nephrology Department, "Germans Trias i Pujol" University Hospital, Can Ruti Campus, Badalona, Spain, **4** Department of Medicine, Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

✉ These authors contributed equally to this work.

† Senior co-authorship.

* mitroya.germanstrias@gencat.cat (MIT); feborras@igtp.cat (FEB)



OPEN ACCESS

Citation: Carreras-Planella L, Soler-Majoral J, Rubio-Esteve C, Lozano-Ramos SI, Franquesa M, Bonet J, et al. (2017) Characterization and proteomic profile of extracellular vesicles from peritoneal dialysis efflux. *PLoS ONE* 12(5): e0176987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176987>

Editor: Tatsuo Shimosawa, The University of Tokyo, JAPAN

Received: January 23, 2017

Accepted: April 20, 2017

Published: May 10, 2017

Copyright: © 2017 Carreras-Planella et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the PI16/00072 project, integrated in the National R + D + I and funded by the ISCIII and the European Regional Development Fund (<http://www.isciii.es>), "Suport Grups de Recerca" programme of Generalitat de Catalunya (2014SGR804, Group REMAR, <http://agaur.gencat.cat>), Instituto de Salud

Abstract

Peritoneal Dialysis (PD) is considered the best option for a cost-effective mid-term dialysis in patients with Chronic Renal Failure. However, functional failure of the peritoneal membrane (PM) force many patients to stop PD treatment and start haemodialysis. Currently, PM functionality is monitored by the peritoneal equilibration test, a tedious technique that often show changes when the membrane damage is advanced. As in other pathologies, the identification and characterization of extracellular vesicles (EVs) in the peritoneal dialysis efflux (PDE) may represent a non-invasive alternative to identify biomarkers of membrane failure. Using size-exclusion chromatography, we isolated EVs from PDE in a group of patients. Vesicles were characterized by the presence of tetraspanin markers, nanoparticle tracking analysis profile, cryo-electron microscopy and mass spectrometry. Here, we report the isolation and characterization of PDE-EVs. Based on mass spectrometry, we have found a set of well-conserved proteins among patients. Interestingly, the peptide profile also revealed remarkable changes between newly enrolled and longer-treated PD patients. These results are the first step to the identification of PDE-EVs based new markers of PM damage, which could support clinicians in their decision-making in a non-invasive manner.

Introduction

Peritoneal Dialysis (PD) is a renal replacement technique based on the semipermeable characteristics of the peritoneal membrane (PM). This membrane is composed by a monolayer of mesothelial cells and an interstitial matrix with a high number of capillaries that, in the presence of hyperosmotic PD fluids, permits the removal of small, medium and, to a lesser extent, large molecules, as well as water ultrafiltration. Prolonged exposure to PD fluids, the low pH of

Carlos III-Red de Investigación Renal (REDinREN) (RD16/0009 Feder Funds, <http://www.isciii.es>, <http://redinren.org>), and Fundació Cellex. MF is sponsored by the Beatriu de Pinós-B contract (2014BP B00118, <http://agaur.gencat.cat>) from Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) – Generalitat de Catalunya. FEB is sponsored by the “Researchers Stabilization Program” from the Spanish “Sistema Nacional de Salud” (SNS- ISCIII, <http://www.isciii.es>) and “Direcció d'Estratègia i Coordinació” Catalan Health Department (CES07/015, <http://salutweb.gencat.cat>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

the solutions, as well as episodes of peritonitis or haemoperitoneum can cause detachment of mesothelial cells, fibrosis and neovascularization of the PM, resulting in functional degradation. Although the mechanisms of peritoneal fibrosis are still under investigation, one of the most accepted hypotheses is the epithelial to mesenchymal cell transition [1,2], involving factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) or tumour growth factor- β (TGF- β) (reviewed in [3]). Thus, despite PD is considered the best alternative for cost-effective sustainability of dialysis treatment [4,5], different changes ultimately lead to the failure of ultrafiltration of the PM, causing many patients to discontinue their treatment.

Monitoring the PM's functional state is therefore of outstanding importance for patients' management. Currently, PM is monitored based on the 4-hour lasting peritoneal equilibration test (PET). PET data inform about the permeability and transfer characteristics of the PM, estimating the water transport secondary to osmotic changes in the peritoneal cavity. These data allow clinicians to estimate the peritoneal transport, set the dose and type of PD required for each patient, and monitor the function of the PM. However, PET data render a delayed vision of the status of the PM, as the functional failure only occurs in advanced fibrotic lesions. Thus, monitoring early changes may help to identify and prevent functional worsening of the PM, thus helping the clinician to apply the appropriate therapeutic tools to extend their functionality. In this sense, efforts have been made on the proteomic analysis of peritoneal dialysis efflux (PDE) [6–8].

In recent years, the study of extracellular vesicles (EVs) has gained enormous interest in the diagnostic and therapeutic scenarios [9]. EVs are lipid-bilayered vesicles of 50 to 200 nm in diameter produced by most cells, mainly containing proteins, RNAs and metabolites [10]. EVs' main function is related to cellular communication [10,11], but as their specific composition varies depending on the physiological and functional state of the producing cells, they have been extensively reported as potential biomarkers in a variety of diseases, including those of the renal system [12]. It is conceivable that the cells of the PM respond to the dialysis treatment by secreting EVs, and that these EVs change their composition reflecting the physiological state of the compartment of origin.

Here, our aim was to identify, isolate and characterize PDE-EVs of patients on PD. The results show that PDE is a non-invasive feasible material to isolate EVs using conventional, clinically applicable techniques. Analyses of PDE-EVs content permitted the identification of specific peptide profiles that changed according to time on dialysis. Thus, the study of EVs present in the PDE opens a new line of research to find non-invasive potential biomarkers for the early detection of PM damage in PD patients.

Materials and methods

Patients

The Ethical Committee of “Germans Trias i Pujol” Hospital approved the study, and all subjects gave their written consent according to the Declaration of Helsinki [13]. Inclusion criteria were patients over 18 years old diagnosed of a renal disease requiring PD as chronic renal replacement therapy. Patients starting PD due to heart failure, or those showing a peritonitis episode in the previous two months were excluded. Also, patients showing changes in the peritoneal membrane transport type compared to their initial PET or patients showing ultrafiltration failure were also excluded. Nine patients (56% female) from our PD unit were considered for the study. No patients presented any peritonitis episodes in the 2 months previous to the study. Renal diseases included: 2 renal polycystic disease, 2 tubulointerstitial nephritis, 4 glomerulonephritis and 1 unknown aetiology. Seven patients were on Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis (CAPD) and 2 patients were on Automated Peritoneal Dialysis (APD).

Seven patients were treated with icodextrin. Clinical and laboratory variables, Peritoneal Equilibration Test (PET), type of peritoneal dialysis solution, and total Kt/V as well as peritoneal Kt/V and renal Kt/V were evaluated.

Peritoneal equilibration test

The Peritoneal Dialysis Unit routinely perform PET monitoring to each patient one month after the beginning of the treatment, and then repeat the test approximately every 6 months. In this study, samples used for EV analyses were obtained at the same time that a routine PET was performed. All patients included in the study were stable as for the PET functional result (ie, no changes were detected from their initial test). Samples were obtained between June and September 2014.

Peritoneal equilibration tests were performed with 3.87% glucose solution. The test bag was drained and reinfused at 60 min as reported[14]. A blood sample was withdrawn at 240 min and dialysate samples were taken from the pre-infusion bag, and at 0, 60, 120, and 240 min. Urea, creatinine, glucose, sodium, and potassium were analysed in all samples; urate, phosphate, total protein, albumin, were analysed in blood and dialysate samples at 240 min (Cobas 711 Roche diagnostics, Switzerland). A correction was applied for plasma water concentration for small solutes in the blood sample and, in the dialysate sample, creatinine concentration was corrected for the presence of glucose.

Calculations

Dialysate to plasma (D/P) ratios for urea and creatinine, and dialysate to baseline dialysate ratios (D/Do) for glucose were calculated. The mass transfer area coefficients (MTAC) for urea, creatinine, glucose, urate, phosphate, and potassium were calculated according to Waniewski et al. [15], using $F = 0.5$. Peritoneal clearances of total protein and albumin were also calculated. All parameters were corrected for 1.73 m² surface area.

Ultrafiltration in PET at 240 min was calculated as the difference between the drained volumes and the initial volume, as follows:

$$Uf_{240 \text{ min}} (\text{ml}) = (V_t) - (V_0)$$

where Uf , ultrafiltration; t , time (min); V , volume (mL).

Statistical analyses of patient data

Data are presented as median (rank). Quantitative data of the two groups were compared using U-Mann-Whitney test, while qualitative data of the groups were analysed using Fisher's test. (SPSS, version 18.0, Chicago, IL, USA). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Isolation of EVs from PDE

Isolation of EVs from the concentrated PDE was based on a modification of a previous method described by our group[16]. Five hundred mL PDE were centrifuged at 3,000 g for 5 min immediately after collection. The supernatant was filtered through a 0.2 μm filter and concentrated using a Centricon plus-70 filter unit (100 kDa cut-off; Millipore, Bedford, MA). In brief, supernatants were loaded onto the Centricon filter and centrifuged at 2,800 g for 30 min. This step was repeated using one filter unit for each sample until the total volume was processed. The retained volume (ranging from 0.8 mL to 2 mL) of concentrated PDE was loaded onto a size-exclusion chromatography (SEC) column.

Size-exclusion chromatography

Up to 2 mL of concentrated PDE samples were loaded onto 12 mL of Sepharose-CL2B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) columns equilibrated in citrate buffer (phosphate-buffered saline, PBS/0.32% citrate) and eluted with PBS. Immediately after, up to 20 fractions of approximately 0.5 mL each were collected and kept at -80°C until further use.

Protein concentration

The protein concentration was measured by Bradford assay (10 μL of sample; Bio-Rad laboratories, USA) with a standard linear curve based on bovine serum albumin (BSA) (Sigma Aldrich).

Flow cytometry

Flow cytometry was used to identify fractions containing EVs according to their tetraspanin content and performed as reported before [16]. Antibodies anti-CD9 (1:10, Clone VJ1/20), anti-CD63 (1:10, Clone TEA 3/18), or polyclonal isotype (1:5000, Abcam (ab37355), Cambridge, UK) were added to samples and incubated at 4°C for 30 min. After two washes, beads were incubated with FITC-conjugated secondary antibody (SouthernBiotech, Birmingham, AL) and analysed in a FacsVerse flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). Approximately 10,000 beads/sample were acquired and analysed using the Flow Jo software (Tree Star, Ashland, OR). In all samples, the top three tetraspanin-containing chromatographic fractions (those containing EVs) were pooled and used in experiments thereafter.

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis

Protein content profile of EV fractions was determined using sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Ten μL of each sample were diluted in the same volume of Laemmli buffer (2x; Bio-Rad) with β -mercaptoethanol (5%; Bio-Rad) and boiled at 95°C for 10 min. Then, 20 μL of the mix were loaded into a gel (Mini-Protean TGX gel; 10% polyacrylamide; Bio-Rad). Electrophoresis was performed for 1 hour at 150V. Gels were stained with SilverQuest (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

Nanoparticle tracking analysis

To determine the concentration and size distribution of EVs, nanoparticle tracking analysis (NTA) was performed in a Nanosight LM10 (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) with charge-coupled device (CCD) camera (model F-033) and a 638 nm laser. Data were analysed with the NTA V3.0 software. Samples were diluted 10- to 40-fold with $0.2\ \mu\text{m}$ -filtered PBS to yield 40 to 120 particles/frame as recommended by the manufacturer. Up to 3 videos of 60 seconds each were recorded for each sample with the camera shutter at 30.02 ms, gain set at 650 and camera level at 16. Blur and Max Jump Distance were set automatically, detection threshold was set to 5.

Cryo-electron microscopy

Ten μL of pooled tetraspanin-peak fractions were used for cryoelectron microscopy (cryo-EM). Each sample was laid on Formvar-Carbon EM grids, frozen and immediately analysed with Jeol JEM 2011 transmission electron microscope equipped with a 626 Gatan cryoholder operating at an accelerating voltage of 200 kV. The samples, maintained at -182°C during imaging, were recorded on a Gatan Ultrascan cooled CCD camera under low electron dose

conditions to minimize electron beam radiation. The ImageJ software (NIH) was used to measure EVs size.

Mass spectrometry analysis

Protein content of PDE-EV-enriched fractions was analysed by liquid chromatography followed by mass spectrometry (LC-MS/MS) on a LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher, Carlsbad, CA). Samples were reduced with DTT, alkylated with iodoacetamide and precipitated with trichloroacetic acid. The samples were then washed with acetone and reconstituted in urea before an overnight digestion with trypsin.

Proteomic data processing and analysis

Raw data files were analysed with Max Quant software [17] (version 1.5.3.30) against Uniprot human database (downloaded on December 11, 2015, 70,076 proteins). Parameters set for single protein identification include: (i) minimum peptide length of 7; (ii) maximum false discovery rate (FDR) for peptides and proteins of 1%; (iii) minimum peptides per protein of 1 and minimum unique peptides per protein of 0; (iv) the minimum score for modified peptides was set to 40; (v) main search error of 4 ppm. In addition, in all searches cysteine carbamidomethylation was established as a fixed modification and methionine oxidation and acetylation of the N-terminus were established as variable modifications, with a maximum number of modifications per peptide set to 5. Proteins identified as potential contaminants, those only identified by site or by a reverse sequence, as well as proteins with less than 2 unique peptides were not further considered.

Further analyses of proteins were made using the Intensity-Based Absolute Quantification (iBAQ) values obtained from MaxQuant, and analysed using Perseus software [18] (version 1.5.6.0), InteractiVenn [19] and the EVs specific databases EVpedia [20], Exocarta [21] and Vesiclepedia [22].

iBAQ values were logarithmized to perform the subsequent analysis such as correlation plots, hierarchical clustering analysis (HCA), Principal Component Analysis (PCA) and volcano plot. Gene Ontology (GO) terms for biological process and cellular components were annotated using Perseus. For PCA, data imputation to substitute non-quantified values with low valid intensities based on normal distribution (down-shift of 1.8 and distribution width of 0.3) was performed. Non-supervised HCA was also done after data imputation. Additional HCA was performed considering only the 63 "core" proteins shared by all samples, in both cases after data normalization with z-score and using Euclidean distance in columns and rows. A volcano plot was used to identify the most significant proteins by plotting fold-change difference of log₂ iBAQ on x axis and -log₂ (p-value) on y axis. The two-sided unpaired t-test was performed with FDR set at 0.05 and s0 at 0.1.

Results

Clinical and epidemiological characteristics of dialysis patients

The study included 9 patients divided in two groups depending on the time on PD: patients with less than 10 months on PD (Newly-Enrolled Patients or NEPs), and patients on PD for more than 18 months (Longer-Treated Patients or LTPs). Clinical data are summarized in Table 1 and detailed per patient in S1 Table. Only 1 patient of the LTP group had type 2 diabetes mellitus, while 3 NEPs and 4 LTPs had hypertension. Regarding the modality of PD, CAPD was used in all NEPs and in 3 patients LTPs. Two LTPs patients used APD. No statistical differences were observed in any of these parameters between both groups.

Table 1. Basal characteristics of the patients.

n = 9 patients	NEPs <10 months (n = 4 patients)	LTPs >18 months (n = 5 patients)	P-value ^b
Age (years)	53.5 (42.0–62.0) ^a	54.0 (27.0–75.0) ^a	0.806
Time on PD (months)	7.0 (5.0–10.0) ^a	24.0 (21.0–67.0) ^a	0.0001
DM (n)	0	1	1.000
HTA (n)	3	4	1.000
CAPD/APD (n)	4/0	3/2	0.444
Icodextrin (n)	3	4	1.000

^aMedian (rank)

^bp-values for quantitative data were calculated using U-Mann-Whitney test while qualitative data of the groups were analysed using Fisher’s test. DM, diabetes mellitus; HTA, hypertension; CAPD, Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis; APD, Automated Peritoneal Dialysis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176987.t001>

Based on PET results (summarized in Table 2 and detailed in S2 Table), 2 NEP patients were classified as “medium transport” and the other 2 NEP patients as “high transport”. In the LTP group, 3 patients were classified as “low transport” and 2 patients as “medium transport”. The median 4-hour ultrafiltration was 402 (676–82) mL, and the median of total Kt/V was 2.14 (2.37–1.78). Again, no statistically significant differences were found.

Isolation of PDE-EVs from PD patients

Peritoneal efflux-derived EVs were isolated from patients following a modification of the SEC method (Fig 1). As shown, PDE samples (500 mL) were cleaned from debris, ultra-filtered using a 100 kDa ultrafiltration unit, and loaded into SEC columns. Collected fractions containing higher amount of proteins eluted well-after fraction 10 (Fig 2A). When the same chromatographic fractions were analysed for their tetraspanin markers, CD9 and CD63 expression were found mostly in fractions 6 to 10 (Fig 2A) among the different samples, indicating the presence of PDE-EVs in those fractions.

Then, NTA analyses of these fractions showed that PDE-EVs had a modal distribution mainly ranging from 100 to 200 nm (Fig 2B). Regarding particles’ concentration, a faint non-significant reduction in the number of detected particles was found in LTPs compared to NEPs (Fig 2C).

Further confirmation of the presence of PDE-EVs in tetraspanin fractions was obtained using Cryo-EM. Images revealed membrane-limited round shaped vesicles (Fig 2D). All

Table 2. PET characteristics of the patients.

n = 9 patients	NEPs <10 months (n = 4 patients)	LTPs >18 months (n = 5 patients)	P-value ^b
D/P creatinine	0.75 (0.64–0.89) ^a	0.56 (0.47–0.75) ^a	0.190
D/P urea	0.84 (0.75–0.87) ^a	0.79 (0.76–0.89) ^a	1.000
D/D ₀ glucose	0.22 (0.20–0.26) ^a	0.35 (0.24–0.39) ^a	0.063
UF 240 min (mL)	310.0 (82.0–482.0) ^a	577.0 (116.0–676.0) ^a	0.286

^a Median (rank)

^b p-values were calculated using U-Mann-Whitney test

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176987.t002>

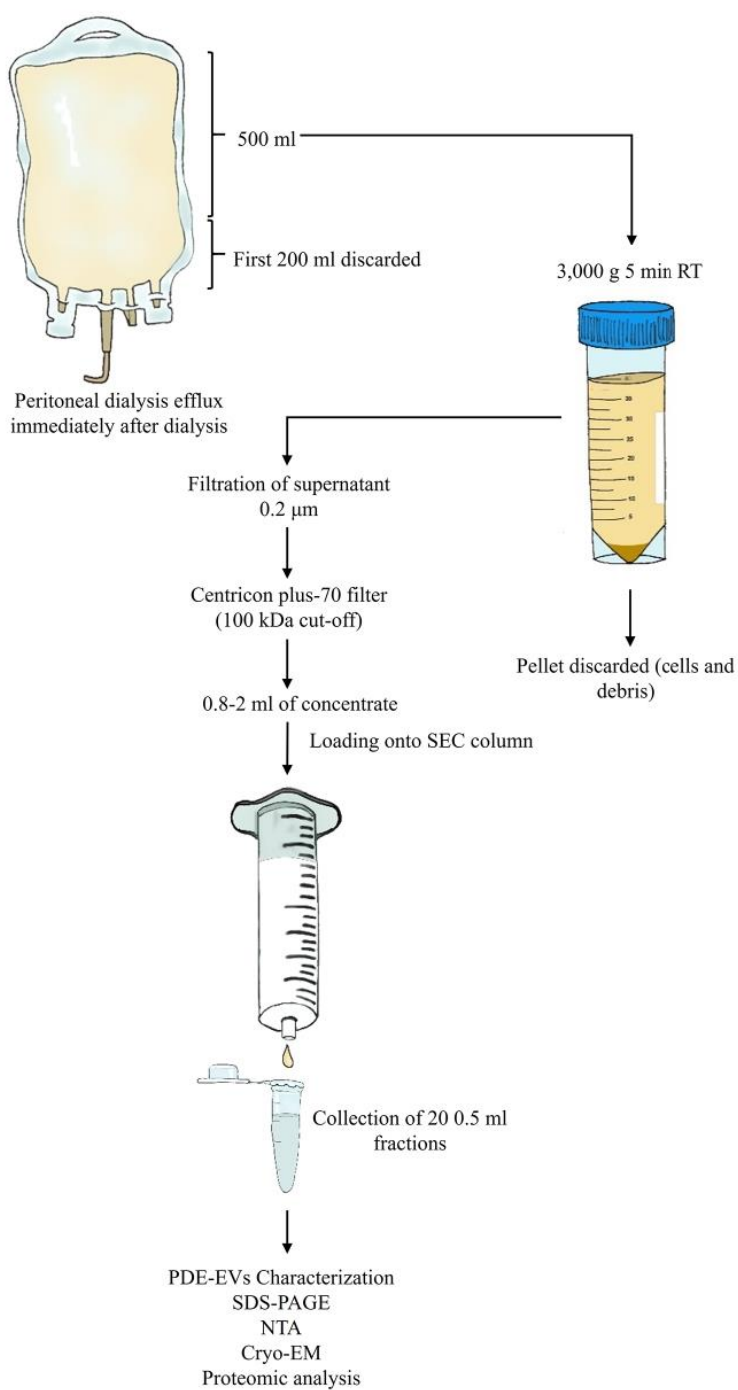


Fig 1. Schematic representation of peritoneal dialysis efflux sample processing and EV isolation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176987.g001>

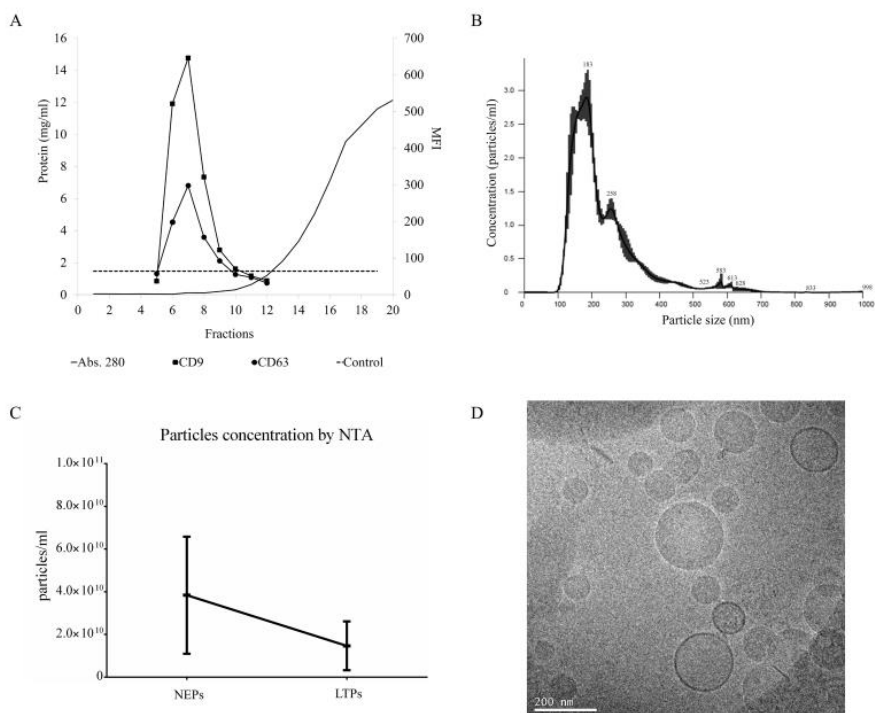


Fig 2. Characterization of PDE-EVs. PDE concentrated samples were further separated using SEC. Up to 20 fractions were recovered and analysed in each sample. In plot A, fractions were analysed for their protein content by BCA (black line). Protein concentration from the different EV-enriched fractions was measured by absorbance at 280nm and calculated using a BSA standard curve. Also, the expression of the EV markers CD9 (black squares) and CD63 (white circles) was determined by flow cytometry. The dotted line represents the isotype control. The left axis represents the total protein content (mg/ml) and the right axis shows the median fluorescence intensity (MFI). For each sample, the three fractions with the highest CD9 and CD63 MFI were pooled for further analyses. A representative plot from 9 experiments is shown. Plot B shows a representative NTA of PDE-EVs (n = 9). Plot C depicts particle concentration determinations, also performed by NTA analyses, in n = 4 NEPs and n = 5 LTPs. Finally, pooled PDE-EVs were visualized by cryo-EM (Fig 2D).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176987.g002>

together these data indicated that PDE-EVs could be obtained from NEPs and LTPs undergoing PD.

Proteomic analysis of PDE-EV fractions

As EVs fractions contain low protein amounts, a preliminary protein content analysis was performed using SDS-PAGE experiments to further characterize the PDE-EVs profile. Different fractions from one patient were analysed and silver-stained gels revealed the presence of some bands in fraction 7 (F7, EV-peak fraction), whilst in fractions 11 and 18 (F11, F18, protein fractions) the number and intensity of the bands increased, clearly revealing the presence of bulk proteins (Fig 3A). When pooled EV fractions from each sample (as detected in Fig 2A) were analysed, silver stained gels showed clearer bands although still less abundant compared to protein-containing fractions (Fig 3B, P2 and P3).

Peritoneal efflux-derived EVs obtained from each NEP (n = 4) and each LTP (n = 5) were further studied to determine their specific peptide profiles using LC-MS/MS. Only proteins identified by at least 2 unique peptides were considered. Overall, a total of 274 proteins were

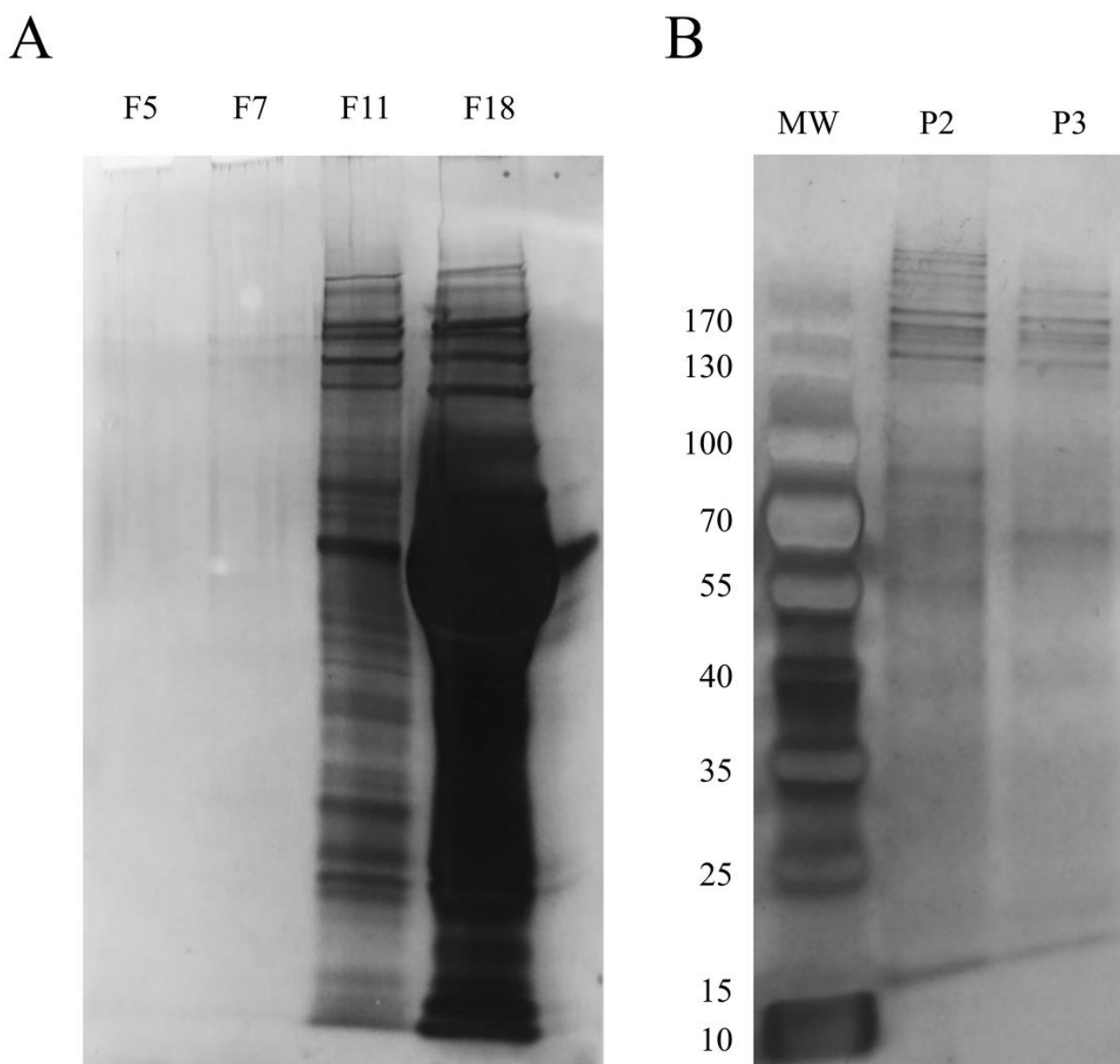


Fig 3. Protein profiling SEC fractions by SDS-PAGE. (A) Silver staining SDS-PAGE of several SEC fractions, including a pre-tetraspanin fraction (F5), a high tetraspanin-containing fraction (F7) and non-EV protein proximal (F11) and distal (F18) fractions. In plot B, pooled tetraspanin-rich fractions from two different experiments (P2 and P3) are shown. Molecular weight markers are also depicted.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176987.g003>

identified. Among NEPs samples, a mean of 211 proteins were identified (211 ± 8), from which 73% (154 proteins) were found in all patients (Fig 4A), revealing a high intragroup similarity. This was further confirmed by multi-scatter plot showing a Pearson Correlation mean “r” value of 0.76 ± 0.08 (mean \pm sd) (Fig 4B). Regarding LTPs, a mean of 147 proteins (147 ± 23) were identified, from which only 43% (63 proteins) were shared among all LTPs (Fig 4C), with a

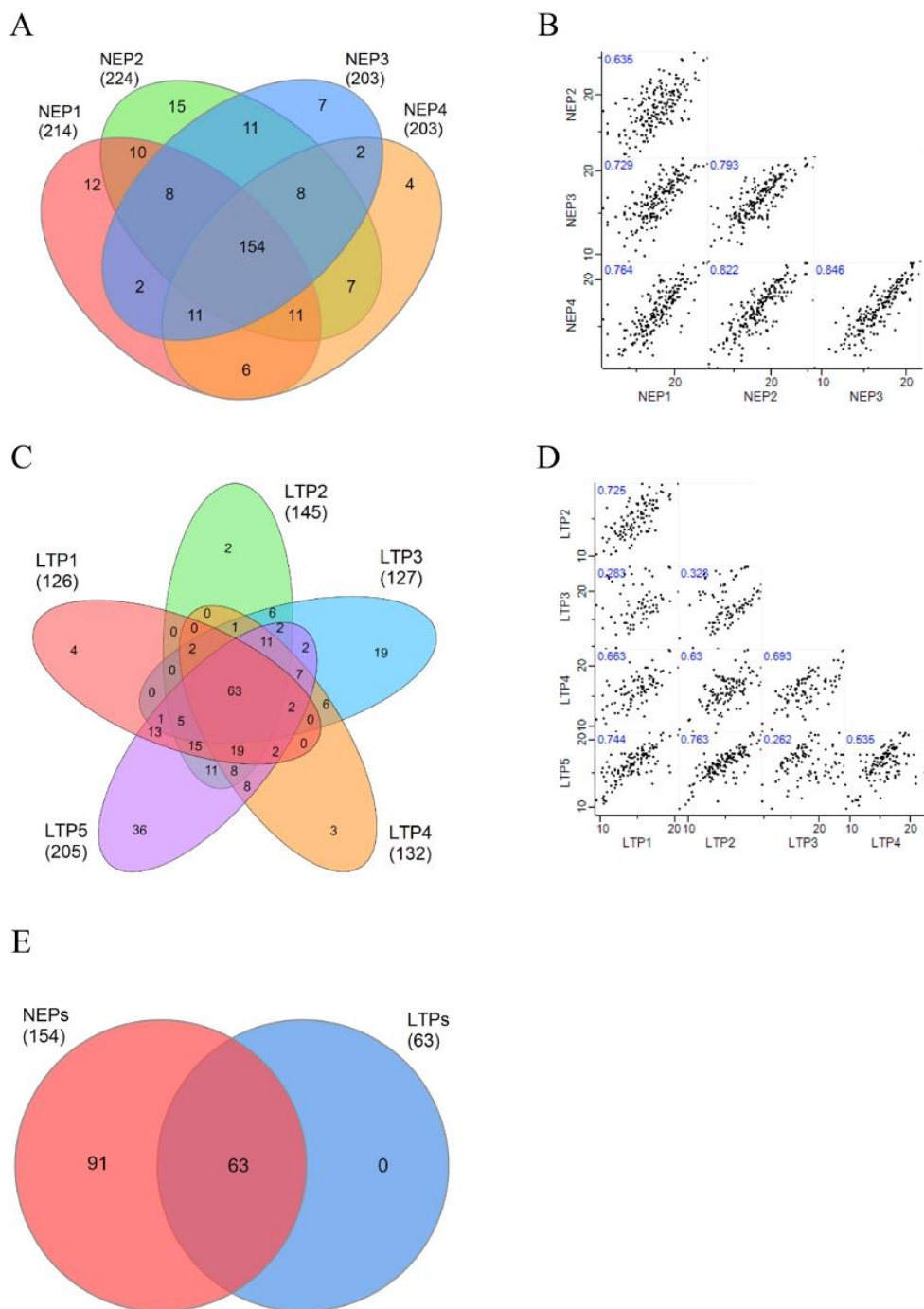


Fig 4. Protein analyses from PDE-EVs. Venn diagrams showing overlapping proteins from $n = 4$ NEPs (A) and $n = 5$ LTPs (C) are shown. Correlation multi-scatter plots to analyse the correlation within NEPs (B) and LTPs (D) samples. Pearson Correlation “r” values are labelled on each plot. (E) Venn diagram of the proteins shared by all NEPs compared to the proteins shared by all LTPs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176987.g004>

Pearson Correlation mean “r” value of 0.56 ± 0.20 (Fig 4D). Interestingly, all 63 proteins shared by LTPs were identified also in all NEPs (Fig 4E). These “core” proteins (listed in Table 3) included proteins unequivocally related to EVs, such as CD81, Galectin 3-binding protein (LGALS3BP), Ezrin (EZR) and several members of the Apolipoprotein (APO) and Annexin (ANXA) families, among others.

To further evidence the differences between both groups, a PCA was performed. Based on component 1, which accounts for the 52.6% of the variability between the samples, both groups were segregated based on their time on PD (Fig 6A). The Gene Ontology biological processes analysis of component 1 revealed that most enriched terms in NEP in comparison to LTP are those related to the immune system (Fig 6B). Additionally, HCA of the 274 proteins detected among all samples also clustered most patients based on their time on PD (Fig 6C). Finally, a volcano plot comparing the protein expression between the two groups evidenced the statistically significant proteins showing a significantly different level of expression (Fig 6D). These analyses revealed that up to 67 proteins were significantly overexpressed in NEP than LTP (p -value < 0.05).

In addition, a HCA performed exclusively on the 63 “core” proteins identified in all samples resulted in the segregation of 8 out of 9 patients based on time in PD, in a very similar way to the HCA performed with all the proteins (Fig 5).

Discussion

In this study we report, for the first time to our best knowledge, the presence, isolation and characterization of PDE-EVs from patients on PD.

Peritoneal dialysis is a convenient treatment for end-stage kidney disease patients waiting for a kidney transplant. Studies have reported better survival rates, quality of life and independence of PD patients compared to haemodialysis patients[23,24]. However, during the treatment, fibrotic changes reduce the ultrafiltration capacity of the PM, meaning that many patients have to discontinue treatment.

Current monitoring of the PM function (the PET), requires patients’ attendance to the dialysis centre, is time-consuming and only shows alterations when the PM is in an advanced state of fibrosis. Time-delays on identifying PMs’ dysfunction may carry dangerous complications, and even lead to the death of the patient. Therefore, finding early biomarkers of PM dysfunction that minimally disturb patients’ daily life may help to overcome these limitations, contribute keeping functional PMs for longer periods and improve patients’ management. Several studies have searched for biomarkers in PDE correlating with PM function, detection of fibrosis, and/or the failure of the technique (reviewed in[25]). Proteomic studies of mesothelial cell lines[7] and transcriptome analysis in rats[26] have reported differences between the protein and miRNA content, respectively, of cells exposed or non-exposed to peritoneal liquids.

It is of current acceptance that information contained in EVs may serve as biomarkers of pathological situations. Biomarkers for kidney pathology have been described in urine EVs [12,27], and serum/plasma EVs have been also related to multiple pathologies[28]. It may be therefore envisaged that PDE-EVs may also provide useful information about the state and function of the PM. Such information could help the clinician to accommodate the treatment to enhance the optimal functionalism of the PM.

PDE-EVs were equally identified in all patients from both NEPs and LTPs groups. SEC-isolated vesicles contained in the tetraspanin rich fractions had a size and morphology compatible with EV, as shown by NTA and cryo-EM analyses. As reported before in urine[29] and plasma samples[30], our results point to SEC as an efficient technique to isolate EVs also from PDE samples. Importantly, SEC permits the segregation of EVs from the bulk of proteins found in

Table 3. Proteins found in all PDE-EVs samples. Sequence coverage, number of matched peptides, expression fold change between NEPs and LTPs and MS/MS counts are shown for each protein, according to MaxQuant processing of mass-spectrometry data. The proteins are listed in the same order as shown in the clustering analysis in Fig 5. All the proteins present a q-value lower than 10^{-3} .

Uniprot entry	Protein name	Gene	Sequence coverage (%)	Matched peptides	Fold Change (NEP/LTP)	Total MS/MS count	MS/MS count									
							NEP1	NEP2	NEP3	NEP4	LTP1	LTP2	LTP3	LTP4	LTP5	
P04275	von Willebrand factor; von Willebrand antigen 2	VWF	25.9	60	-1.057	453	1	9	47	70	91	20	122	62	31	
P81605	Dermcidin; Survival-promoting peptide; DCD-1	DCD	20.0	2	-0.514	23	1	2	2	1	5	3	2	3	4	
P01024	Complement C3; Complement C3 beta chain; C3-beta-c; Complement C3 alpha chain; C3a anaphylatoxin; Acylation stimulating protein; Complement C3b alpha chain; Complement C3c alpha chain; fragment 1; Complement C3dg fragment; Complement C3g fragment; Complement C3d fragment; Complement C3f fragment; Complement C3c alpha chain fragment 2	C3	53.9	73	1.536	1426	125	192	175	118	73	263	61	306	113	
P02656	Apolipoprotein C-III	APOC3	39.3	3	1.579	69	9	5	4	6	2	1	27	3	12	
P08123	Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	15.0	15	2.431	311	49	40	44	34	34	15	20	61	14	
P02461	Collagen alpha-1(III) chain	COL3A1	12.6	13	2.734	274	57	39	37	32	16	14	24	44	11	
P02452	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	20.0	23	2.940	343	54	44	54	45	37	8	27	56	18	
P02679	Fibrinogen gamma chain	FGG	55.0	26	2.877	1213	219	148	96	137	101	66	190	244	12	
P02675	Fibrinogen beta chain; Fibrinopeptide B; Fibrinogen beta chain	FGB	75.6	38	2.804	2020	489	257	116	181	106	68	359	429	15	
P02671	Fibrinogen alpha chain; Fibrinopeptide A; Fibrinogen alpha chain	FGA	40.1	28	2.921	639	158	87	50	53	30	27	106	125	3	
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	37.4	15	3.795	251	20	36	48	47	1	1	67	17	14	
P02649	Apolipoprotein E	APOE	61.2	18	3.297	256	22	25	53	40	3	1	72	12	28	
P01876	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1	53.5	13	2.999	541	48	115	78	52	3	27	132	62	24	
P04003	C4b-binding protein alpha chain	C4BPA	57.0	27	3.843	513	59	92	88	52	1	30	150	21	20	
B9A064; P0CG04	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5; Ig lambda-1 chain C regions	IGLL5; IGLC1	40.4	7	2.775	262	25	57	27	30	9	14	63	25	12	
P01860	Ig gamma-3 chain C region	IGHG3	34.0	12	2.937	198	16	51	23	28	3	5	45	23	4	
P01861	Ig gamma-4 chain C region	IGHG4	47.4	10	3.250	45	2	22	2	2	1	1	8	4	3	
AOA0B4J1Y9		IGHV3-72	51.5	4	2.773	56	5	13	7	9	3	2	8	5	4	

(Continued)

Table 3. (Continued)

Uniprot entry	Protein name	Gene	Sequence coverage (%)	Matched peptides	Fold Change (NEP/LTP)	Total MS/MS count	MS/MS count									
							NEP1	NEP2	NEP3	NEP4	LTP1	LTP2	LTP3	LTP4	LTP5	
P02647	Apolipoprotein A-I; Proapolipoprotein A-I; Truncated apolipoprotein A-I	APOA1	58.1	16	3.159	257	16	53	42	33	2	1	78	25	7	
P98160	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein; Endorepellin; LG3 peptide	HSPG2	10.1	32	3.238	111	6	13	26	14	3	41	1	2	5	
Q08431	Lactadherin; Lactadherin short form; Medin	MFGE8	47.5	15	2.354	138	16	5	10	37	31	3	2	12	22	
P15311	Ezrin	EZR	58.5	34	1.641	607	141	42	45	57	56	126	26	22	92	
O00299	Chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	66.0	11	1.771	128	29	9	5	16	9	36	5	2	17	
O00592	Podocalyxin	PODXL	12.0	7	2.582	57	13	3	7	5	8	4	3	1	13	
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein; AHNAK	AHNAK	13.8	25	1.953	88	37	3	4	7	12	6	1	1	17	
P60903	Protein S100-A10	S100A10	35.1	3	1.981	93	31	6	12	11	8	9	1	2	13	
P02751	Fibronectin; Anastellin; Ugl-Y1; Ugl-Y2; Ugl-Y3	FN1	48.8	79	1.726	1930	247	240	260	131	69	486	247	67	183	
P06703	Protein S100; Protein S100-A6	S100A6	28.2	3	1.828	63	9	5	8	8	2	13	6	5	7	
Q8WUT4	Leucine-rich repeat neuronal protein 4	LRRN4	28.8	16	2.023	368	70	35	34	44	19	66	20	12	68	
P68133; P68032; P63267; P62736	Actin, alpha skeletal muscle; Actin, alpha cardiac muscle 1; Actin, gamma-enteric smooth muscle; Actin, aortic smooth muscle	ACTA1; ACTC1; ACTG2; ACTA2	34.0	11	2.057	129	30	12	20	9	4	25	9	8	12	
P12110	Collagen alpha-2(VI) chain	COL6A2	17.7	14	2.363	49	6	5	3	7	3	4	1	15	5	
P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	ITIH1	30.6	18	2.358	461	85	54	62	68	45	40	11	55	41	
P19823	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	ITIH2	28.3	22	1.711	379	40	44	51	52	33	32	17	46	64	
G53TN4	Cytochrome b reductase 1	CYBRD1	8.7	2	2.267	16	2	2	3	3	1	1	2	1	1	
P62987; P62979; P0CG47; P0CG48	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40; Ubiquitin-60S ribosomal protein L40; Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a; Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a; Polyubiquitin-B; Ubiquitin; Polyubiquitin-C; Ubiquitin	UBB; RPS27A; UBC; UBAS2; UBBP4	46.2	4	1.752	97	10	12	11	15	10	9	4	10	16	
P27487	Dipeptidyl peptidase 4; Dipeptidyl peptidase 4 membrane form; Dipeptidyl peptidase 4 soluble form	DPP4	32.6	25	1.964	272	50	29	13	58	20	30	9	10	53	

(Continued)

Table 3. (Continued)

Uniprot entry	Protein name	Gene	Sequence coverage (%)	Matched peptides	Fold Change (NEP/LTP)	Total MS/MS count	MS/MS count									
							NEP1	NEP2	NEP3	NEP4	LTP1	LTP2	LTP3	LTP4	LTP5	
P00325; P07327; P00326	Alcohol dehydrogenase 1B; Alcohol dehydrogenase 1A; Alcohol dehydrogenase 1C	ADH1B; ADH1A; ADH1C	38.7	12	2.519	92	14	26	3	15	9	6	4	1	14	
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	ATP1A1	25.6	21	2.949	136	31	12	30	12	11	9	1	7	23	
P63000; P60763	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; Ras-related C3 botulinum toxin substrate 3	RAC1; RAC3	25.5	5	2.461	39	9	2	7	6	3	1	1	2	8	
P29966	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS	48.2	8	2.686	76	12	11	8	9	6	10	2	7	11	
Q9UB16	Guanine nucleotide-binding protein G(i)(G(S)/G(O) subunit gamma-12	GNG12	66.7	4	2.523	87	16	9	8	13	9	13	3	4	12	
P04899	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	GNAI2	58.3	15	2.312	281	56	23	48	39	18	27	4	15	51	
P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(i)(G(S)/G(T) subunit beta-1	GNB1	56.8	14	2.303	139	32	14	21	15	8	14	1	8	26	
P35613	Basigin	BSG	44.3	6	2.373	164	39	18	18	15	12	27	1	8	26	
P23634	Plasma membrane calcium-transporting ATPase 4	ATP2B4	18.3	17	2.764	119	26	12	9	18	19	16	2	2	15	
P62328	Thymosin beta-4; Hematopoietic system regulatory peptide	TMSB4X	47.7	3	1.548	29	3	2	3	3	4	7	1	2	4	
P04083	Annexin A1	ANXA1	61.8	18	2.241	261	80	19	23	25	28	26	6	16	38	
P09525	Annexin A4; Annexin	ANXA4	41.7	11	3.180	87	23	10	9	13	2	3	2	2	23	
P80723	Brain acid soluble protein 1	BASP1	75.3	10	2.798	64	10	7	8	11	2	8	1	4	13	
P06733	Alpha-enolase; Enolase	ENO1	32.7	10	2.614	78	17	8	6	10	7	10	1	1	18	
Q8WX17	Mucin-16	MUC16	12.7	49	2.319	773	66	77	130	164	25	67	30	57	157	
Q9ULI3	Protein HEG homolog 1	HEG1	10.3	11	2.959	61	9	7	5	15	1	1	0	3	20	
P60033	Tetraspanin; CD81 antigen	CD81	35.8	3	2.154	179	26	18	23	24	12	22	6	19	29	
P09382	Galectin-1	LGALS1	57.0	6	2.722	82	27	9	7	11	2	2	0	9	15	
P13611	Versican core protein	VCAN	5.4	15	2.328	263	76	22	35	30	10	21	13	24	32	
P61586; P08134	Transforming protein RhoA; Rho-related GTP-binding protein RhoC	RHOA; RHOC	42.0	7	2.927	88	18	7	14	16	1	8	1	7	16	
P60953	Cell division control protein 42 homolog	CDC42	25.1	4	2.664	80	18	11	11	9	5	10	1	4	11	
P13987	CD59 glycoprotein	CD59	29.6	4	3.278	86	16	11	10	13	0	14	2	3	17	
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	36.5	6	1.898	70	16	5	10	9	5	8	2	4	11	

(Continued)

Table 3. (Continued)

Uniprot entry	Protein name	Gene	Sequence coverage (%)	Matched peptides	Fold Change (NEP/LTP)	Total MS/MS count	MS/MS count									
							NEP1	NEP2	NEP3	NEP4	LTP1	LTP2	LTP3	LTP4	LTP5	
P07355; A6NMY6	Annexin A2; Annexin; Putative annexin A2-like protein	ANXA2; ANXA2P2	69.0	23	2.285	557	132	48	68	52	48	72	21	40	76	
P62158; P27482	Calmodulin	CALM2; CALM1; CALM3	42.2	8	1.912	123	30	9	15	15	2	17	3	9	23	
P08758	Annexin A5; Annexin	ANXA5	70.9	19	3.374	286	106	28	33	31	5	10	6	24	43	
P63104	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	51.8	12	2.729	163	46	15	16	21	6	17	6	13	23	

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176987.t003>

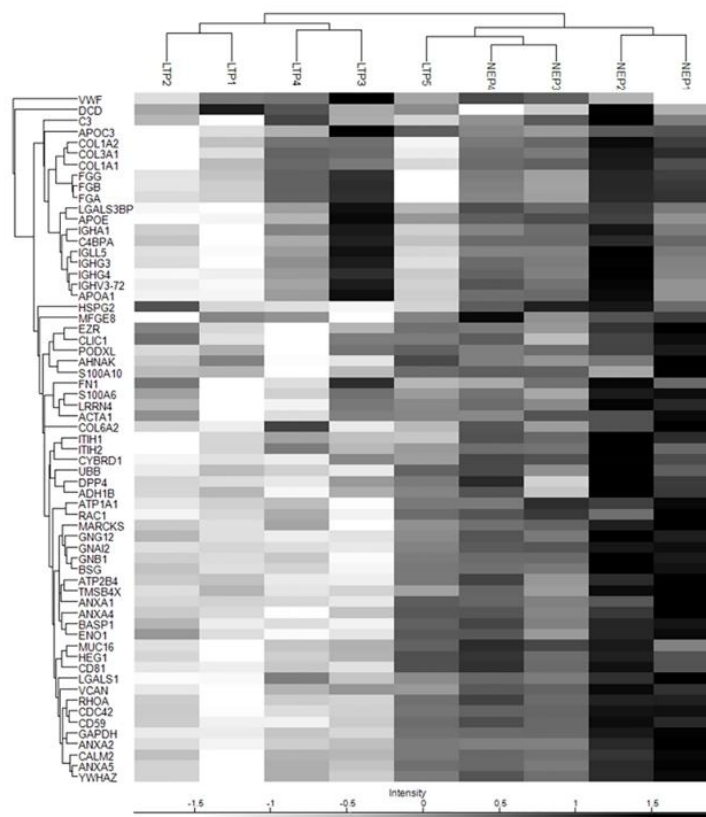


Fig 5. Hierarchical clustering analysis of the 63 “core” proteins. Samples and the 63 proteins shared by all samples were clustered with HCA associated with a heat map. Names of the codifying genes are shown. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176987.g005>

samples, thus allowing more accurate analyses of the EV-protein content and enabling the search for minimally expressed proteins. In line, SDS-PAGE results confirmed that EVs were cleanly separated from other major components of the PDE, and preliminary proteomic analysis of SEC-isolated EVs identified a number of well-defined EV-related proteins. Importantly, all these results are in accordance with the recommendations of the International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) to identify EVs in a given sample [31], thus validating SEC to isolate EVs also from PDE.

Having identified EVs in all samples, and to further explore possible differences in this pilot study, patients were distributed in two arbitrary groups based on their median time on PD. Both groups did not show major differences in any of the parameters analysed, nor in the PET test. However, a slightly (not significant) reduced number of EVs and also a reduced number of proteins were identified in the PDE-EVs from the LTP group compared to NEPs. It was also interesting to note that a “core” of proteins were identified in both groups, although showing some differences in their level of expression. These “core” proteins included most proteins unequivocally related to EVs. Whether these differences may anticipate a possible worsening of the ultrafiltration capacity of the membrane not detected by PET analyses need further investigation and validation in a wider cohort of patients.

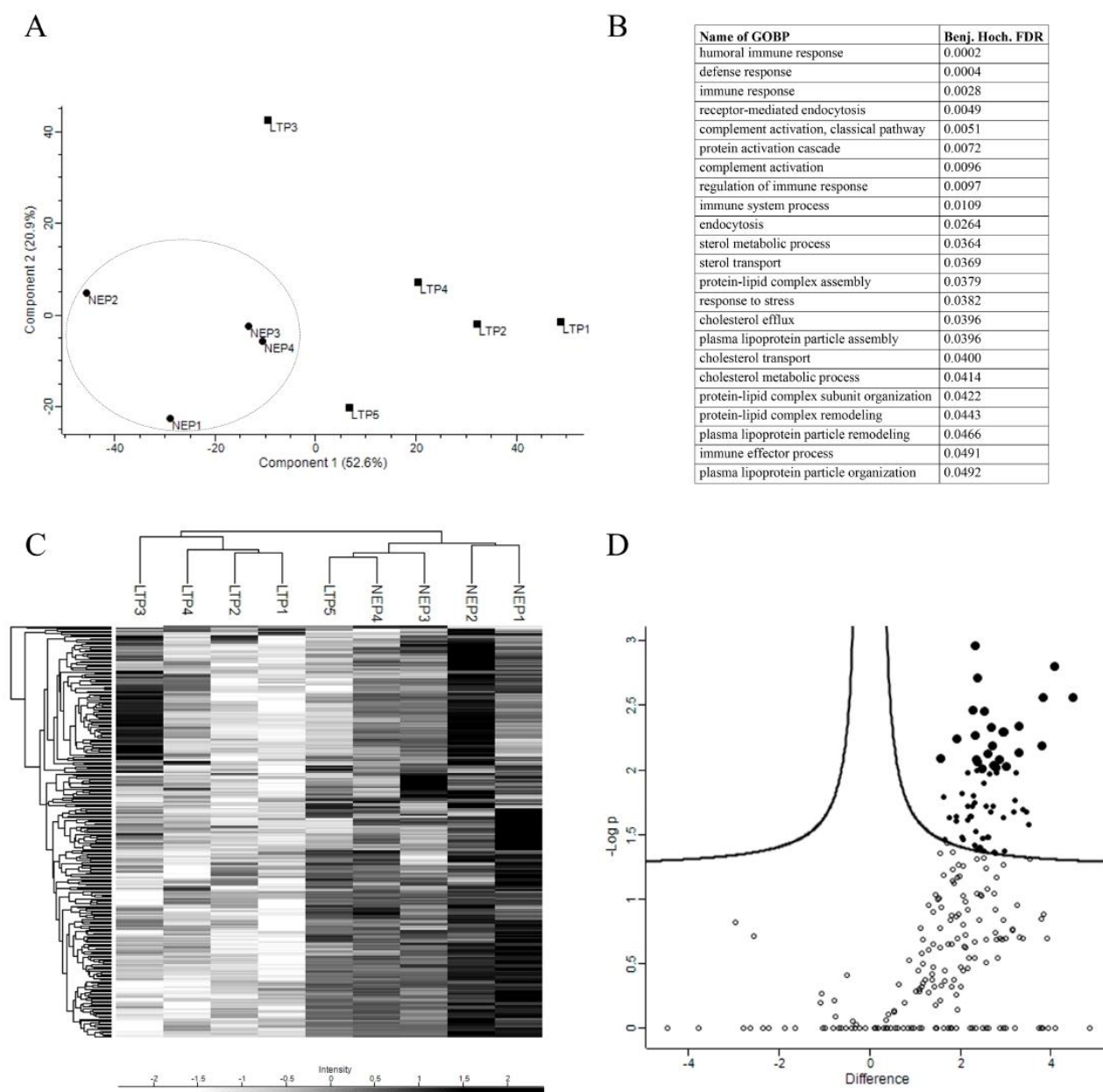


Fig 6. Proteins analyses from PDE-EVs. (A) Two dimensional scatter plot of Principal Component Analysis (PCA) showing component 1 and 2, which account for 52.6% and 20.9%, respectively, the variability of all the 274 proteins. NEPs (circles) and LTPs (squares) are separated by component 1. A dashed line circle indicates grouped NEPs. (B) Table with Gene Ontology biological process enriched terms for component 1 with their corresponding Benjamini-Hochberg FDR values is shown (all the listed terms have a Benj. Hoch. FDR <0.05). (C) HCA associated with a heat map of the 274 proteins (rows) and the samples (columns). (D) A volcano plot was performed to determine significantly differentially expressed proteins between groups. Each circle represents a protein, being statistically significant with this parameters shown as filled circles. Proteins with p-value <0.01 are represented as bigger filled circles.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176987.g006>

Since this study has consistently demonstrated that EVs can be isolated from concentrated PDE, it seems reasonable to think that these EVs could be used as a source of biomarkers. In addition, the non-invasive origin of the sample and the reduced inconvenience for patients point to the analysis of PDE-EVs as a next step in the definition of early biomarkers of ultrafiltration failure in peritoneal dialysis.

Supporting information

S1 Table. Basal characteristics of the patients.

(DOCX)

S2 Table. Characteristics of each patients' PET samples analysed.

(DOCX)

Acknowledgments

Thanks to Marco A. Fernández (Flow Cytometry Unit, IGTP) and Pablo Castro Hartmann (Electron Microscopy Unit, UAB). Also, Carolina Gálvez-Montón for graphics and Hernando del Portillo (ICREA at ISGLOBAL-IGTP) for the NTA instrument. Antibodies to CD9 and CD63 were a gift from Dr. Yáñez-Mó (Unidad de Investigación, Hospital Sta Cristina, IIS-IP; Departamento Biología Molecular/CBM-SO, UAM) and Dr. Francisco Sánchez-Madrid (Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de la Princesa, IIS-IP, UAM; Cell-cell Communication Laboratory, CNIC).

Author Contributions

Conceptualization: MIT FEB.

Data curation: LC JS MIT FEB.

Formal analysis: LC JS.

Funding acquisition: MF FEB.

Investigation: LC JS CR SIL.

Methodology: SIL MIT FEB.

Project administration: MIT FEB.

Resources: JS CR MIT.

Supervision: MIT FEB.

Visualization: LC JS MIT FEB.

Writing – original draft: LC JS MIT FEB.

Writing – review & editing: LC JS CR SIL MF JB MIT FEB.

References

1. Aroeira L, Loureiro J. Characterization of epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells in a mouse model of chronic peritoneal exposure to high glucose dialysate. *Perit Dial.* 2008; 28:29–33.
2. Yáñez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med.* 2003; 348(5):403–13. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa020809> PMID: 12556543

3. Aguilera A, Yáñez-Mo M, Selgas R, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M. Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005 Mar; 6(3):262–8. PMID: [15816502](#)
4. Treharne C, Liu FX, Arici M, Crowe L, Farooqui U. Peritoneal dialysis and in-centre haemodialysis: A cost-utility analysis from a UK payer perspective. *Appl Health Econ Health Policy*. 2014; 12(4):409–20. <https://doi.org/10.1007/s40258-014-0108-7> PMID: [25017433](#)
5. Atapour A, Eshaghian A, Taheri D, Dolatkah S. Hemodialysis Versus Peritoneal Dialysis, Which is Cost-effective? *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2015; 26(5):962–5. <https://doi.org/10.4103/1319-2442.164578> PMID: [26354569](#)
6. Sritippayawan S, Chiangjong W, Semangoen T, Aiyasanon N, Jaetanawanitch P, Sinchaikul S, et al. Proteomic Analysis of Peritoneal Dialysate Fluid in Patients with Different Types of Peritoneal Membranes—Journal of Proteome Research (ACS Publications). *J Proteome Res [Internet]*. 2007; 6(11):4356–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/pr0702969> PMID: [17924681](#)
7. Lechner M, Kratochwill K, Lichtenauer A, Rehulka P, Mayer B, Aufricht C, et al. A proteomic view on the role of glucose in peritoneal dialysis. *J Proteome Res*. 2010; 9(5):2472–9. <https://doi.org/10.1021/pr9011574> PMID: [20334435](#)
8. Wang HY, Tian YF, Chien CC, Kan WC, Liao PC, Wu HY, et al. Differential proteomic characterization between normal peritoneal fluid and diabetic peritoneal dialysate. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25(6):1955–63. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp696> PMID: [20054029](#)
9. Fais S, O'Driscoll L, Borrás FE, Buzas E, Camussi G, Cappello F, et al. Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS Nano*. 2016; 10(4):3886–99. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b08015> PMID: [26978483](#)
10. Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell vesicles [Internet]*. 2015; 4:27066. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4433489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066> PMID: [25979354](#)
11. Simons M, Raposo G. Exosomes—vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol*. 2009; 21:575–81. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.007> PMID: [19442504](#)
12. Gámez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R, Borrás FE. Urinary Extracellular Vesicles as Source of Biomarkers in Kidney Diseases. *Front Immunol [Internet]*. 2015; 6(January):6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4311634&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Lynøe N, Sandlund M, Dahlqvist G, Jacobsson L. Informed consent: study of quality of information given to participants in a clinical trial. *BMJ*. 1991; 303(6803):610–3. PMID: [1932901](#)
14. Mujais S, Nolph K, Gokal R, Blake P, Burkart J, Coles G, et al. Evaluation and Management of Ultrafiltration Residual Renal Therapy. Society. 2000; 20:5–21.
15. Waniewski J, Werynski A, Heimbürger O, Lindholm B. Simple models for description of small-solute transport in peritoneal dialysis. *Blood Purif*. 1991; 9:129–41. PMID: [1801855](#)
16. Lozano-Ramos I, Bancu I, Oliveira-Tercero A, Armengol MP, Menezes-Neto A, Del Portillo HA, et al. Size-exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *J Extracell vesicles [Internet]*. 2015; 4:27369. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4449362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27369> PMID: [26025625](#)
17. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol [Internet]*. 2008; 26(12):1367–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1511> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029910> <https://doi.org/10.1038/nbt.1511> PMID: [19029910](#)
18. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods [Internet]*. 2016; 13(9):731–40. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.3901> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27348712> <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901> PMID: [27348712](#)
19. Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR, Telles GP, Minghim R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics [Internet]*. 2015; 16(1):169. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/16/169>
20. Kim DK, Lee J, Kim SR, Choi DS, Yoon YJ, Kim JH, et al. EVpedia: A community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics*. 2015; 31(6):933–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu741> PMID: [25388151](#)
21. Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*. 2009; 9(21):4997–5000. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900351> PMID: [19810033](#)

22. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol.* 2012; 10(12):8–12.
23. Heaf JG, Wehberg S. Relative survival of peritoneal dialysis and haemodialysis patients: Effect of cohort and mode of dialysis initiation. *PLoS One.* 2014; 9(3):1–10.
24. Lukowsky LR, Mehrotra R, Kheifets L, Arah O a, Nissenson AR, Kalantar-Zadeh K. Comparing mortality of peritoneal and hemodialysis patients in the first 2 years of dialysis therapy: a marginal structural model analysis. *Clin J Am Soc Nephrol [Internet].* 2013; 8(8):619–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23307879>
25. Lopes Barreto D, Krediet RT. Current status and practical use of effluent biomarkers in peritoneal dialysis patients. *Am J Kidney Dis [Internet].* Elsevier Inc.; 2013; 62(4):823–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.01.031> <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.01.031> PMID: 23669001
26. Lin F, Wu X, Zhang H, You X, Zhang Z, Shao R, et al. A microma screen to identify regulators of peritoneal fibrosis in a rat model of peritoneal dialysis. *BMC Nephrol [Internet].* 2015; 16(1):48. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84927761541&partnerID=tZOtx3y1>
27. Erdbrugger U, Le TH. Extracellular Vesicles in Renal Diseases: More than Novel Biomarkers? *J Am Soc Nephrol [Internet].* 2015;1–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26251351>
28. Boukouris S, Mathivanan S. Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics—Clin Appl.* 2015; 9(3–4):358–67. <https://doi.org/10.1002/prca.201400114> PMID: 25684126
29. Lozano-Ramos I, Bancu I, Olivera-Tercero A, Armengol M, de Menezes-Neto A, del Portillo HA, et al. Size exclusion chromatography-based enrichment of extracellular vesicles from urine samples. *J Extracell Vesicles.* 2015;accepted f:1–11.
30. Gámez-Valero A, Monguió-Tortajada M, Carreras-Planella L, Franquesa M, Beyer K, Borràs FE. Size-Exclusion Chromatography-based isolation minimally alters Extracellular Vesicles' characteristics compared to precipitating agents. *Sci Rep [Internet].* Nature Publishing Group; 2016; 6(September):33641. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep33641>
31. Lener T, Gioma M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials—an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles [Internet].* 2015; 4(January 2016). Available from: http://www.journalofextracellularvesicles.net/index.php/jev/article/view/30087/xml_44

4.2. Proteomic profiling of peritoneal dialysis effluent-derived extracellular vesicles: a longitudinal study

Article publicat a la revista: Journal of Nephrology

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

S'adjunta el manuscrit original a les properes pàgines. Les taules i gràfiques es troben a les pàgines finals del mateix.

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

Journal of Nephrology. 2019 Dec;32(6):1021-1031.

doi: 10.1007/s40620-019-00658-3

Enllaç:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s40620-019-00658-3>

5. Resum global dels resultats

En els dos treballs publicats i que es mostren a la metodologia d'aquesta tesi s'ha pogut observar, d'una banda i per primera vegada, la possibilitat d'aïllar VEs en l'efluent de diàlisi. En el primer estudi es van incloure 9 pacients als quals es va realitzar l'aïllament de VEs mitjançant una SEC. En les fraccions obtingudes, es van poder observar marcadors específics de VEs a través de citometria de flux, i es va realitzar llur caracterització mitjançant anàlisis per NTA i per cryo-ME. Aquests resultats, ens han permès demostrar que la SEC és també una tècnica eficient per a l'aïllament de VEs en l'efluent de diàlisi peritoneal, tal i com s'havia observat en altres líquids biològics.

Posteriorment, es va procedir a un estudi on es van incloure 11 pacients incidents en diàlisi peritoneal que van rebre un seguiment des de l'inici de diàlisi i fins a 24 mesos després. En períodes de 6 mesos, i coincidint amb la determinació del TEP, es procedia a l'aïllament de VEs a través de SEC i se n'estudiava el seu proteoma a través de LC-MS/MS. Un cop fet el seguiment, els pacients es van dividir en dos grups en funció de si havien presentat canvis o no en el tipus de transportador de membrana mesurat per TEP (grup "Estable" i grup "Inestable") i es va fer una anàlisi comparativa del proteoma entre els dos grups. El grup de pacients estables presentava un augment de la puntuació d'enriquiment (*enrichment score*) de l'expressió proteica respecte als inestables als 6, 12 i 18 mesos en l'anàlisi per enriquiment a nivell de conjunt de gens (GSEA), així com un major número de proteïnes amb expressió significativament major en l'anàlisi per *volcano plots*. De les proteïnes més enriquides del grup de pacients estables respecte als inestables, es van identificar algunes proteïnes diferenciadores, fins i tot abans dels canvis observats per TEP, essent l'endoglina una de les més prometedores.

Finalment, en els dos treballs, s'ha observat una disminució de l'expressió total de proteïnes en els pacients que feia més temps que rebien tractament amb diàlisi peritoneal.

6. Resum global de la discussió

En els darrers anys, la diàlisi peritoneal ha esdevingut una molt bona opció dins del tractament renal substitutiu, sobretot a partir de les millores a la pràctica clínica habitual gràcies a l'aparició de guies clíniques estandarditzades, a l'aparició de noves solucions de diàlisi més biocompatibles i lliures de glucosa, i a la possibilitat de realitzar el tractament dialític mitjançant l'ús d'una cicladora (APD), que ha permès una correcta adequació de diàlisi per a tots els tipus de pacients⁽⁵⁹⁾. Globalment, hem vist que s'està produint un creixement anual dels pacients que reben el tractament renal substitutiu a través d'aquesta tècnica, sobretot per l'augment en països com Hong Kong, Tailàndia, Xina i els Estats Units⁽¹⁶⁾. Les avantatges principals respecte a l'hemodiàlisi assistida, l'altra tècnica dialítica més estesa, són la preservació de la diüresi residual i la millora de la qualitat de vida pel fet de ser una tècnica domiciliària, així com una reducció dels costos sanitaris⁽⁶⁰⁾.

No obstant això, l'ús continuat de les solucions de diàlisi riques en glucosa, així com els eventuais episodis de peritonitis i d'hemoperitoneu, provoquen que molts pacients hagin d'abandonar la tècnica en detriment de l'hemodiàlisi assistida pel deteriorament que es produeix a la membrana peritoneal, amb el desenvolupament de fibrosi i neovascularització peritoneal que porta, a la llarga, a una FUF.

El TEP és, a dia d'avui, el mètode més estès i més útil per avaluar i monitoritzar la membrana peritoneal dels pacients sotmesos a la tècnica i que permet, entre altres paràmetres, l'adequació del tractament dialític per a cada pacient. Malgrat tot, els canvis que s'observen en el TEP sovint són tardans, un cop ja s'ha establert un deteriorament a la membrana. A més, és un procediment incòmode pel pacient, donat que necessàriament s'ha de du a terme a l'hospital i d'una durada mínima de 4 hores, cosa que representa una situació paradoxal tenint en compte que una de les avantatges de la

diàlisi peritoneal és que es tracta d'una tècnica domiciliària. El desenvolupament de noves eines diagnòstiques pel monitoratge de la membrana, doncs, és necessari per tal de continuar avançant en la millora dels resultats de la tècnica.

Darrerament, la recerca en la composició de les VEs en diversos líquids biològics, ha obert la porta al seu estudi com a potencials biomarcadors no invasius de determinats estats patològics⁽⁵³⁾, però fins ara no hi havia constància que s'haguessin aïllat mai en l'efluent del líquid de diàlisi peritoneal. Així doncs, el nostre grup ha estat pioner en el desenvolupament d'aquesta tècnica.

Els treballs exposats a l'apartat de resultats d'aquesta tesi demostren, per una banda, que és possible l'aïllament de VEs de l'efluent de diàlisi, i que aquest es pot du a terme mitjançant una SEC, un mètode que prèviament ja havia demostrat la seva utilitat en l'aïllament de VEs en orina i en plasma, aportant algunes avantatges respecte d'altres mètodes com la seva rapidesa, cost-efectivitat i reproductibilitat⁽⁵⁶⁾. A més, la SEC permet du a terme aquest aïllament malgrat la presència d'altres proteïnes presents amb més quantitat a la mostra analitzada, i que podrien actuar com a contaminants. En les fraccions riques de tetraspanines (identificades per citometria de flux), la visualització per ME d'estructures compatibles amb VEs, l'anàlisi de la distribució de mida per NTA i la determinació de proteïnes relacionades amb VEs per l'anàlisi proteòmica posterior, ens permeten afirmar que la SEC és un mètode adequat per a l'aïllament de VEs en l'efluent de diàlisi, d'acord amb les recomanacions de la ISEV (*International Society for Extracellular Vesicles*)⁽⁶¹⁾. Posteriorment, el grup de Pearson LJ et al.⁽⁶²⁾ va demostrar també la possibilitat d'aïllament de VEs de l'efluent per SEC, donant consistència als resultats obtinguts.

Una de les consideracions que cal tenir en compte en el moment de l'anàlisi dels resultats, és determinar si veritablement l'origen de les VEs prové de la pròpia membrana peritoneal, en resposta a l'agressió que suposen les

solucions de diàlisi quan hi estan en contacte i durant el propi desenvolupament del deteriorament de la membrana, o bé a través de la seva difusió des del plasma a l'efluent de diàlisi a través dels capil·lars peritoneals. Actualment, la resposta és incerta però es pot hipotetitzar que, almenys en part, les VEs provenen de la membrana peritoneal donat que experiments recents demostren la presència de mesotelina, una proteïna expressada normalment al mesoteli, a la superfície de VEs aïllades de l'efluent de diàlisi⁽⁶³⁾⁽⁶⁴⁾.

En l'anàlisi de la proteòmica, s'han identificat un número similar de proteïnes en els dos estudis presentats (274 i 382 proteïnes). Hem observat, també en els dos estudis, que hi ha una disminució de l'expressió total de proteïnes en aquell grup de pacients que han estat sotmesos a un major temps en diàlisi. En una anàlisi més detallada, s'observa també que la variabilitat en l'expressió proteica del grup de pacients NEP (*Newly-Enrolled Patients*) és menor que en el grup de pacients LTP (*Long-Treated Patients*) i que totes les proteïnes identificades en el grup de LTP, eren presents també en el grup de NEP. Tot i que el número total de pacients estudiats és reduït i caldria validar els resultats en una mostra indubtablement més gran, la pèrdua d'un determinat grup de proteïnes podria relacionar-se amb la pèrdua de la capacitat d'ultrafiltració que presenten els pacients al llarg del temps de la tècnica. D'altra banda, en l'anàlisi per enriquiment a nivell de conjunt de gens (GSEA), s'ha pogut observar també una major puntuació d'enriquiment (*enrichment score*) als 6, 12 i als 18 mesos de tractament dialític en els pacients que presentaven un transport estable mesurat per TEP, respecte als que presentaven un transport inestable, mostrant així una tendència semblant de major puntuació d'enriquiment en aquells pacients amb una major preservació de la membrana peritoneal. El més destacable, és que aquesta major puntuació d'enriquiment en els pacients que es mantenen estables, es comença a observar mesos abans que els canvis de transport que s'observen a través del TEP, de manera que els canvis en l'expressió proteica permeten

identificar aquells pacients que, a la llarga, desenvoluparan un canvi en el transport de membrana.

Cal tenir present que les tècniques de proteòmica són costoses per la seva complexitat tecnològica a l'hora de desenvolupar-les i per la interpretació dels resultats que s'obtenen, però permeten dibuixar un esbós genèric del contingut proteic de les VEs en l'efluent de diàlisi. Aquesta complexitat, fa que sigui difícil la seva aplicabilitat directa a la pràctica clínica habitual, però permeten identificar proteïnes que posteriorment poden ser candidates a ser estudiades amb més profunditat.

Entre elles, hem pogut identificar-ne algunes que podrien esdevenir potencials biomarcadors precoços del deteriorament de la membrana. Una de les més interessants és l'endoglina, la qual ha estat identificada com una de les proteïnes significativament més enriquides en el grup de pacients estables, tant en el període de 6 mesos de tractament dialític, com en el període de 12 mesos, així com també als 24 mesos (encara que en aquest darrer sense arribar a la significació estadística, i tenint en compte que s'havien perdut pacients en la mostra). L'àrea sota la corba ROC (*Receiver Operating Characteristic*) ha esdevingut de 1 i de 0.929 en els 6 i 12 mesos respectivament, cosa que fa que sigui un marcador a tenir en compte en recerques futures, especialment pel fet que forma part del complex del receptor TGF- β ⁽⁶⁵⁾, la regulació del qual s'ha vist implicada en estats profibròtics de la membrana peritoneal⁽⁶⁶⁾⁽⁶⁷⁾. També s'han observat un augment en l'enriquiment d'altres proteïnes relacionades amb l'esmentat complex del TGF- β , com el THY-1⁽⁶⁸⁾, el kininogen-1⁽⁶⁹⁾ i el biglycan, aquest darrer relacionat prèviament en la regulació del dany tissular mesotelial⁽⁷⁰⁾.

Globalment, els resultats obtinguts ens permeten afirmar que és possible preveure aquells pacients que potencialment presentaran una FUF, mitjançant una determinada empremta proteica. Fins ara, el procediment actual pel monitoratge d'aquests pacients, el TEP, ens permet obtenir

aquesta informació de forma tardana, de manera que moltes vegades s'identifiquen un cop comencen a presentar signes i símptomes de FUF. Preveure aquells pacients amb deteriorament de la membrana, permet l'optimització i individualització de la tècnica, amb l'ús de prescripcions menys lesives, un monitoratge més estret per evitar la sobrecàrrega hídrica que, amb més freqüència, poden experimentar aquests pacients i que s'associa a un augment de la mortalitat⁽⁷¹⁾ i, a la llarga, una transferència a l'hemodiàlisi de forma programada i no traumàtica.

D'altra banda, la comoditat d'obtenció de la mostra per part del propi pacient, el fet de ser un procediment no invasiu i la informació precoç que pot permetre obtenir, converteixen l'anàlisi del proteoma de l'efluent de diàlisi en un procediment amb avantatges evidents respecte a l'actual TEP. A més, la recerca de biomarcadors permet una millor comprensió dels processos biològics que s'esdevenen a la membrana peritoneal, imprescindibles per a la millora contínua de la supervivència de la tècnica.

No obstant això, una de les principals limitacions dels treballs mostrats és el reduït nombre de pacients analitzats, que fa que sigui necessària la validació dels resultats obtinguts en un grup més nombrós de pacients. És per això que cal ser especialment curosos amb els potencials biomarcadors esmentats, i tenir-los en consideració en futurs experiments. El disseny d'aquests estudis és costós, pel fet que cal un seguiment durant un nombre elevat de mesos i pel fet que el deteriorament de la membrana no és l'únic motiu d'abandonament de la tècnica, de manera que el número de pacients analitzats ha de ser elevat. Aquest escenari, com en molts d'altres en la recerca biomèdica, fa que sigui imprescindible la col·laboració de diferents unitats de diàlisi peritoneal. En aquest sentit, iniciatives com la PDOPPS (*Peritoneal Dialysis Outcomes and Practice Patterns*), que ha permès diversos estudis per a la millora de la qualitat de vida i de la tècnica, agrupant més de 7000 pacients de fins a 7 països diferents, serveixen com a

exemples paradigmàtics a seguir pel futur de la recerca en diàlisi peritoneal⁽⁷²⁾.

5. Conclusions

1. La SEC és un mètode útil, fiable i ràpid que permet l'aïllament de VEs en l'efluent de diàlisi peritoneal.
2. El temps de tractament en diàlisi peritoneal provoca una disminució quantitativa de les proteïnes aïllades de les VEs en l'efluent de diàlisi. Malgrat la pèrdua de proteïnes, els pacients que porten més temps en diàlisi, comparteixen un grup comú d'expressió proteica respecte aquells que fa menys temps que han iniciat la tècnica.
3. Els pacients que evolucionen amb un canvi del tipus de transportador de la membrana, presenten una menor puntuació d'enriquiment proteic en l'anàlisi per GSEA en l'efluent del líquid de diàlisi. Aquesta disminució, es pot observar abans que es facin evidents els canvis mesurats a través del TEP.
4. L'endoglina, juntament amb altres proteïnes relacionades amb el complex del receptor TGF- β , pot esdevenir part d'una empremta peptídica útil com a biomarcador precoç del deteriorament de la membrana peritoneal.

6. Línies de futur

De les consideracions generades d'aquesta tesi, podem establir diferents línies de futur:

Per una banda, el nostre grup de recerca ha elaborat un projecte FIS coordinat amb la unitat de diàlisi peritoneal de l'Hospital de Bellvitge, actualment pendent de resolució. El nostre objectiu, és la validació dels resultats mostrats en aquesta tesi, a través d'un nou estudi prospectiu de pacients incidents en diàlisi peritoneal, fent èmfasi en els potencials biomarcadors, augmentant el número de pacients gràcies a la col·laboració de diferents unitats de diàlisi de Catalunya . La validació de biomarcadors a través de l'anàlisi proteòmica de les VEs de l'efluent, permetria llur detecció amb mètodes més senzills, econòmics i reproduïbles en la pràctica clínica habitual, com per exemple mitjançant una tècnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*).

D'altra banda, en els propers anys, la comprensió dels processos biològics que s'esdevenen en el deteriorament de la membrana peritoneal, pot experimentar una millora substancial amb l'ús i validació de les tècniques òmiques aplicades a l'efluent, que poden afavorir la recerca de noves solucions de diàlisi, per tal d'assegurar una menor agressivitat per la integritat de la membrana peritoneal. L'ús de solucions amb capacitat osmòtica però lliures de glucosa és, a dia d'avui, un dels aspectes més necessaris per a la millora contínua de la supervivència de la tècnica.

7. Bibliografia

1. Kidney Disease: Improving Global, Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney inter, Suppl.* 2013;3:1–150.
2. Bello A, Kawar B, El Kossi M, El Nahas M. Epidemiology and Pathophysiology of Chronic Kidney Disease. In: Johnson RJ, Feehally J, Floege J, editors. *Comprehensive Clinical Nephrology*. Fifth. Elsevier Saunders; 2010. p. 907–18.
3. Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium K, Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, et al. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet (London, England)*. 2010 Jun 12;375(9731):2073–81.
4. Webster AC, Nagler E V., Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet*. 2017;389(10075):1238–52.
5. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet (London, England)*. 2013 Jul 20;382(9888):260–72.
6. Glasscock RJ, Warnock DG, Delanaye P. The global burden of chronic kidney disease: Estimates, variability and pitfalls. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(2):104–14.
7. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LYC, et al. Comparison of Mortality in All Patients on Dialysis, Patients on Dialysis Awaiting Transplantation, and Recipients of a First Cadaveric Transplant. *N Engl J Med*. 1999 Dec 2;341(23):1725–30.
8. Suet-Ching Luk W. The HRQoL of renal transplant patients. *J Clin Nurs*. 2004 Feb 1;13(2):201–9.
9. Dew MA, Switzer GE, Goycoolea JM, Allen AS, DiMartini A, Kormos RL, et al. Does transplantation produce quality of life benefits? A quantitative analysis of the literature. *Transplantation*. 1997 Nov 15;64(9):1261–73.
10. Generalitat de Catalunya D de S. Registre de Malalts Renals de Catalunya. Informe estadístic del 2017. Barcelona: Servei Català de la Salut. Organització Catalana de Trasplantaments (OCATT); 2019.
11. Jansen MAM, Hart AAM, Korevaar JC, Dekker FW, Boeschoten EW, Krediet RT. Predictors of the rate of decline of residual renal function in incident dialysis patients. *Kidney Int*. 2002 Sep 1;62(3):1046–53.
12. Zazzeroni L, Pasquinelli G, Nanni E, Cremonini V, Rubbi I. Comparison of Quality of Life in Patients Undergoing Hemodialysis and Peritoneal Dialysis: a Systematic Review and Meta-Analysis. *Kidney Blood Press Res*. 2017;42(4):717–27.
13. Warady BA. Peritoneal dialysis and the pediatric patient. *Perit Dial Int*. 2012;32(4):393–4.

14. Blake PG, Quinn RR, Oliver MJ. Peritoneal Dialysis and the Process of Modality Selection. *Perit Dial Int.* 2013 May 1;33(3):233–41.
15. Fresenius Medical Care. Fresenius Medical Care 2018 Annual Report. Economic Report. 2018.
16. Li PK-T, Chow KM, Van de Looijgaarden MWM, Johnson DW, Jager KJ, Mehrotra R, et al. Changes in the worldwide epidemiology of peritoneal dialysis. *Nat Rev Nephrol.* 2017 Feb 28;13(2):90–103.
17. Vonesh EF, Snyder JJ, Foley RN, Collins AJ. The differential impact of risk factors on mortality in hemodialysis and peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 2004 Dec 1;66(6):2389–401.
18. Heaf JG, Wehberg S. Relative Survival of Peritoneal Dialysis and Haemodialysis Patients: Effect of Cohort and Mode of Dialysis Initiation. Burdman EA, editor. *PLoS One.* 2014 Mar 10;9(3):e90119.
19. Rippe B. Peritoneal Dialysis. Principles, techniques and adequacy. In: Johnson R, Feehally J, Floege J, editors. *Comprehensive Clinical Nephrology.* Fifth. Elsevier Saunders; 2015. p. 1097–106.
20. Mistry C., Mallick N., Gokal R. Ultrafiltration with an isosmotic solution during long peritoneal dialysis exchanges. *Lancet.* 1987 Jul 25;330(8552):178–82.
21. Schmitt CP, Aufricht C. Is there such a thing as biocompatible peritoneal dialysis fluid? *Pediatr Nephrol.* 2016/10/08. 2017 Oct;32(10):1835–43.
22. Hansson JH, Watnick S. Update on Peritoneal Dialysis: Core Curriculum 2016. *Am J Kidney Dis.* 2016 Jan;67(1):151–64.
23. Correa-Rotter R. Evaluación de la dosis adecuada de diálisis. In: Elsevier, editor. *Tratado de diálisis peritoneal.* Primera ed. 2009. p. 229–45.
24. Lo W-K, Bargman JM, Burkart J, Krediet RT, Pollock C, Kawanishi H, et al. Guideline on targets for solute and fluid removal in adult patients on chronic peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 2006;26(5):520–2.
25. Teixidó J. Fisiología peritoneal: modelos teóricos de la diálisis peritoneal y su implicación en la clínica. In: Elsevier, editor. *Tratado de diálisis peritoneal.* Primera ed. 2009. p. 51–79.
26. Flessner MF. Solute and Water Transport Across the Peritoneal Barrier. In: Ronco C, Bellomo R, Kellum JA, Ricci ZBT-CCN (Third E, editors. *Critical Care Nephrology: Third Edition.* Philadelphia; 2019. p. 1096-1102.e2.
27. Blake PG, Daugirdas JT. Physiology of Peritoneal Dialysis. In: Daugirdas JT, Blake PG, Ing TS, editors. *Handbook of Dialysis.* 5th ed. Wolters Kluwer Health; 2015.
28. La Milia V, Cabiddu G, Virga G, Vizzardi V, Giuliani A, Finato V, et al. Peritoneal Equilibration Test Reference Values Using a 3.86% Glucose Solution During the First Year of Peritoneal Dialysis: Results of a Multicenter Study of a Large Patient Population. *Perit Dial Int.* 2017;37(6):633–8.
29. Mujais S, Nolph K, Gokal R, Blake P, Burkart J, Coles G, et al. Evaluation and management of ultrafiltration problems in peritoneal dialysis. *International Society*

- for Peritoneal Dialysis Ad Hoc Committee on Ultrafiltration Management in Peritoneal Dialysis. *Perit Dial Int*. 2000;20 Suppl 4:S5–21.
30. Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, et al. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Feb;13(2):470–9.
 31. Williams JD, Craig KJ, von Ruhland C, Topley N, Williams GT, Group BRS. The natural course of peritoneal membrane biology during peritoneal dialysis. *Kidney Int Suppl*. 2003 Dec;(88):S43–9.
 32. 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 Jan 30;348(5):403–13.
 33. Davies SJ, Mushahar L, Yu Z, Lambie M. Determinants of Peritoneal Membrane Function Over Time. *Semin Nephrol*. 2011 Mar 1;31(2):172–82.
 34. Smit W, van Dijk P, Langedijk MJ, Schouten N, van den Berg N, Struijk DG, et al. Peritoneal function and assessment of reference values using a 3.86% glucose solution. *Perit Dial Int*. 2003;23(5):440–9.
 35. Boudville N, Blake PG. Volume Status and Fluid Overload in Peritoneal Dialysis. In: Daugirdas JT, Blake PG, Ing T, editors. *Handbook of Dialysis*. 5th ed. Wolters Kluwer Health; 2015.
 36. del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, Selgas R, Remón C, Ossorio M, Fernández-Perpén A, et al. Biocompatible Dialysis Solutions Preserve Peritoneal Mesothelial Cell and Vessel Wall Integrity. A Case-Control Study on Human Biopsies. *Perit Dial Int*. 2015/10/16. 2016;36(2):129–34.
 37. Fusshoeller A. Histomorphological and functional changes of the peritoneal membrane during long-term peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol*. 2008;23(1):19–25.
 38. José Fernández-Reyes M, Auxiliadora Bajo M, Del Peso G, Ossorio M, Díaz R, Carretero B, et al. The influence of initial peritoneal transport characteristics, inflammation, and high glucose exposure on prognosis for peritoneal membrane function. *Perit Dial Int*. 2012;32(6):636–44.
 39. Augustine T, Brown PW, Davies SD, Summers AM, Wilkie ME. Encapsulating peritoneal sclerosis: clinical significance and implications. *Nephron Clin Pract*. 2009;111(2):c149-54; discussion c154.
 40. Garosi G, Cappelletti F, Di Paolo N. Fibrosis and Sclerosis: Different Disorders or Different Stages? In: *Peritoneal Dialysis: A Clinical Update*. Basel: KARGER; 2006. p. 62–9.
 41. Aufricht C, Beelen R, Eberl M, Fischbach M, Fraser D, Jörres A, et al. Biomarker research to improve clinical outcomes of peritoneal dialysis: consensus of the European Training and Research in Peritoneal Dialysis (EuTRiPD) network. *Kidney Int*. 2017 Oct 1;92(4):824–35.
 42. Lambie M, Chess J, Donovan KL, Kim YL, Do JY, Lee HB, et al. Independent effects of systemic and peritoneal inflammation on peritoneal dialysis survival. *J*

- Am Soc Nephrol. 2013;24(12):2071–80.
43. Lai KN, Lam MF, Leung JCK, Chan LY, Lam CWK, Chan IHS, et al. A study of the clinical and biochemical profile of peritoneal dialysis fluid low in glucose degradation products. *Perit Dial Int.* 2012;32(3):280–91.
 44. Barreto DL, Hoekstra T, Halbesma N, Leegte M, Boeschoten EW, Dekker FW, et al. The Association of Effluent Ca125 with Peritoneal Dialysis Technique Failure. *Perit Dial Int.* 2015/07/07. 2015 Dec;35(7):683–90.
 45. Rhee EP. How Omics Data Can Be Used in Nephrology. *Am J Kidney Dis.* 2018;72(1):129–35.
 46. Kratochwill K, Boehm M, Herzog R, Gruber K, Lichtenauer AM, Kuster L, et al. Addition of Alanyl-Glutamine to Dialysis Fluid Restores Peritoneal Cellular Stress Responses - A First-In-Man Trial. *PLoS One.* 2016 Oct 21;11(10):e0165045–e0165045.
 47. Herzog R, Boehm M, Unterwurzacher M, Wagner A, Parapatics K, Májek P, et al. Effects of Alanyl-Glutamine Treatment on the Peritoneal Dialysis Effluent Proteome Reveal Pathomechanism-Associated Molecular Signatures. *Mol Cell Proteomics.* 2017/12/04. 2018 Mar;17(3):516–32.
 48. Wiesenhofer FM, Herzog R, Boehm M, Wagner A, Unterwurzacher M, Kasper DC, et al. Targeted Metabolomic Profiling of Peritoneal Dialysis Effluents Shows Anti-oxidative Capacity of Alanyl-Glutamine. *Front Physiol.* 2019 Jan 21;9:1961.
 49. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654–9.
 50. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* 2015;4(2015):1–60.
 51. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost.* 2005/12/23. 2006 Mar;4(3):566–73.
 52. Karpman D, Ståhl A-L, Arvidsson I. Extracellular vesicles in renal disease. *Nat Rev Nephrol.* 2017/07/24. 2017 Sep;13(9):545–62.
 53. Fais S, O’Driscoll L, Borràs FE, Buzas E, Camussi G, Cappello F, et al. Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS Nano.* 2016 Apr 26;10(4):3886–99.
 54. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30(1):255–89.
 55. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, Dignat-George F, Drees EEE, El-Andaloussi S, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ Res.* 2017;120(10):1632–48.
 56. Lozano-Ramos I, Bancu I, Oliveira-Tercero A, Armengol MP, Menezes-Neto A, Del Portillo HA, et al. Size-exclusion chromatography-based enrichment of

- extracellular vesicles from urine samples ¹. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27369.
57. Szatanek R, Baj-Krzyworzeka M, Zimoch J, Lekka M, Siedlar M, Baran J. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6).
 58. Doyle LM, Wang MZ. Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*. 2019 Jul 15;8(7):727.
 59. Mehrotra R, Devuyst O, Davies SJ, Johnson DW. The Current State of Peritoneal Dialysis. *J Am Soc Nephrol*. 2016/06/23. 2016 Nov;27(11):3238–52.
 60. Karopadi AN, Mason G, Rettore E, Ronco C. Cost of peritoneal dialysis and haemodialysis across the world. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(10):2553–69.
 61. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell vesicles*. 2015 Dec 31;4:30087.
 62. Pearson LJ, Klaharn I-Y, Thongsawang B, Manuprasert W, Saejew T, Somparn P, et al. Multiple extracellular vesicle types in peritoneal dialysis effluent are prominent and contain known biomarkers. *PLoS One*. 2017;12(6):e0178601.
 63. Akbari S, Abou-Arkoub R, Sun S, Hiremath S, Reunov A, McCormick BB, et al. Microparticle formation in peritoneal dialysis: A proof of concept study. *Can J Kidney Heal Dis*. 2017;4:1–8.
 64. Corciulo S, Nicoletti MC, Mastrofrancesco L, Milano S, Mastrodonato M, Carmosino M, et al. AQP1-Containing Exosomes in Peritoneal Dialysis Effluent As Biomarker of Dialysis Efficiency. :1–13.
 65. Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 1992 Sep 25;267(27):19027–30.
 66. Gangji AS, Brimble KS, Margetts PJ. Association between markers of inflammation, fibrosis and hypervolemia in peritoneal dialysis patients. *Blood Purif*. 2009/09/01. 2009;28(4):354–8.
 67. Margetts PJ, Oh K-H, Kolb M. Transforming growth factor-beta: importance in long-term peritoneal membrane changes. *Perit Dial Int*. 2005 Feb;25 Suppl 3:S15–7.
 68. Sauzay C, Voutetakis K, Chatziioannou A, Chevet E, Avril T. CD90/Thy-1, a Cancer-Associated Cell Surface Signaling Molecule . Vol. 7, *Frontiers in Cell and Developmental Biology* . 2019. p. 66.
 69. Wei Q, Liu Q, Ren C, Liu J, Cai W, Zhu M, et al. Effects of bradykinin on TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in ARPE-19 cells. *Mol Med Rep*. 2018/02/02. 2018 Apr;17(4):5878–86.
 70. Yung S, Thomas GJ, Stylianou E, Williams JD, Coles GA, Davies M. Source of peritoneal proteoglycans. Human peritoneal mesothelial cells synthesize and secrete mainly small dermatan sulfate proteoglycans. *Am J Pathol*. 1995 Feb;146(2):520–9.

71. Drepper VJ, Kihm LP, Kälble F, Diekmann C, Seckinger J, Sommerer C, et al. Overhydration is a strong predictor of mortality in peritoneal dialysis patients - Independently of cardiac failure. PLoS One. 2016;11(7):1–10.
72. Perl J, Davies SJ, Lambie M, Pisoni RL, McCullough K, Johnson DW, et al. The Peritoneal Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (PDOPPS): Unifying Efforts to Inform Practice and Improve Global Outcomes in Peritoneal Dialysis. Perit Dial Int. 2015/11/02. 2016;36(3):297–307.