



Metodología para evaluar la capacidad de crecimiento ex vivo de las células mesoteliales obtenidas directamente del efluente peritoneal

M. A. Castro, C. Díaz, M. A. Bajo, M. J. Sánchez-Cabezudo, M. Fernández de Castro, G. del Peso, M. E. Martínez y R. Selgas*

Hospital Universitario La Paz y *Hospital Universitario de la Princesa. Madrid.

RESUMEN

La integridad anatómica y funcional de la célula mesotelial (CM) es fundamental para la estabilidad de la membrana peritoneal. En la actualidad, no existe un método que permita comprobar la función y capacidad regenerativa de las CM de forma individual en los pacientes en diálisis peritoneal (DP). La CM puede ser cultivada a partir de muestras obtenidas de biopsia peritoneal, sin embargo es un procedimiento invasivo que no permite realizarse de manera repetida. El objetivo de este estudio es explorar la posibilidad de cultivar de forma reiterada las CM obtenidas del efluente peritoneal de los pacientes tratados con DP.

Cincuenta y dos pacientes estables en DP han sido estudiados. Las CM fueron obtenidas a partir del efluente peritoneal del intercambio nocturno con glucosa al 2,27% y cultivadas en frascos de cultivo de 25 cm². Las células de 42 pacientes (80,7%) consiguieron alcanzar la subconfluencia en cultivo. En este estudio, el porcentaje de células caracterizadas como mesoteliales, tanto morfológicamente como por técnicas de inmunohistoquímica, se incrementó hasta el 95,5%. Posteriormente, las CM se subcultivaron en placas multipocillo, donde mostraron un crecimiento exponencial hasta el día 16. En nueve pacientes (17%) el número de CM liberadas al efluente peritoneal fue tan bajo que no consiguieron alcanzar el estado de subconfluencia. Otro paciente aunque liberó un número adecuado de CM fue incapaz de alcanzar la subconfluencia.

En resumen, las CM liberadas al efluente peritoneal son accesibles para su estudio mediante cultivo. Con esta técnica se abre la posibilidad del seguimiento longitudinal de la biología de las CM de forma individual en los pacientes en DP.

Palabras clave: **Cultivo de células mesoteliales. Diálisis peritoneal.**

Recibido: 29-X-99
En versión definitiva: 28-III-00
Aceptado: 28-III-00

Correspondencia: Dra. M. A. Bajo
Servicio de Nefrología
Hospital Universitario La Paz
Paseo de la Castellana, 261
28046 Madrid

EX-VIVO GROWTH CAPACITY OF HUMAN MESOTHELIAL CELLS OBTAINED DIRECTLY FROM PERITONEAL EFFLUENT

SUMMARY

The anatomical and functional integrity of mesothelial cells (MC) is necessary for peritoneal membrane stability. At present, there is no satisfactory method to assess MC function and regenerative capacity in individual peritoneal dialysis (PD) patients. MC may be cultured from peritoneal biopsy specimens, but peritoneal biopsy is an invasive procedure that cannot be performed serially. The aim of this study is to explore the feasibility of serial culture of MC from the peritoneal effluent of PD patients.

Fifty-two randomly selected PD patients were studied. MC were obtained from the peritoneal effluent of nocturnal 2.27% glucose exchanges and cultured in T25 tissue culture flasks. Subconfluent MC cultures were obtained in 80.7% of patients. At this stage, the percentage of cells in the tissue cultured flask characterized as MC by morphology and immunostaining had increased to 95.5%. MC were then subcultured in multi-well culture plates, where they showed exponential cell growth until day 16. Nine (17%) patients released low numbers of MC into the effluent and MC could not be cultured to subconfluence. One additional patient released an apparently adequate number of MC that repeatedly failed to reach confluence. Patients showed the same behavior in several cultures performed.

In conclusion, peritoneal MC released into peritoneal effluent are accessible for profound analysis by a culture technique. This technique opens the possibility of serial follow-up of the biology of MC individual PD patients.

Key words: **Mesothelial cell culture. Peritoneal dialysis.**

INTRODUCCIÓN

La diálisis peritoneal (DP) a largo plazo depende de la funcionalidad de la membrana peritoneal¹. Su monocapa de células mesoteliales (CM) está en contacto continuo con el líquido peritoneal y su integridad es fundamental para la estabilidad peritoneal²⁻⁴. La literatura refleja el interés de la comunidad científica por las CM peritoneales. Para la supervivencia de la membrana peritoneal a largo plazo es esencial la viabilidad y capacidad regenerativa de estas células. El conocimiento actual de la biología de las CM procede de estudios realizados a partir de cultivos de células obtenidas de biopsias peritoneales de sujetos sanos o de pacientes durante la implantación del catéter peritoneal⁵⁻⁹. La información obtenida por lo tanto, está limitada a estas condiciones, y pudiera no ser aplicada a las CM que están continuamente bañadas por el líquido peritoneal. Además, la biología de las CM puede cambiar a lo largo del tiempo en DP. Hay evidencia indirecta que apoya este concepto, como es el descenso del antígeno CA 125 en el efluente peritoneal a lo largo del tiempo¹⁰. Las técnicas actualmente utilizadas no

permiten el estudio rutinario de las CM de los pacientes en DP, pues la biopsia peritoneal de momento no puede ser obtenida fácilmente, en especial en los pacientes con alteración funcional peritoneal. El cultivo primario de células es una alternativa para el estudio de tejidos de difícil acceso o con dificultad en la obtención de células. Los pacientes en DP liberan diariamente distintos tipos de células al efluente peritoneal. Las CM representan menos del 10% de estas poblaciones¹¹. La facilidad para obtener estas células nos ofrece la oportunidad de explorar nuevas alternativas para el estudio de la biología de las mismas. Las células vivas podrían ser capaces de crecer en cultivo, permitiendo el estudio de su actividad metabólica, sus características morfológicas y su capacidad de regeneración. El estudio a largo plazo de los pacientes en DP, debe ser realizado de forma individual con el fin de determinar los cambios en la biología de las CM como consecuencia del proceso de diálisis. Este conocimiento permitiría nuevas perspectivas preventivas y/o terapéuticas.

El objetivo de este estudio es explorar la posibilidad de cultivar CM a partir de la bolsa del efluente

te peritoneal. La descripción metodológica permitirá a otros investigadores reproducir esta técnica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las CM se obtuvieron del efluente peritoneal nocturno de cincuenta y dos pacientes de DP seleccionados. Todos los pacientes estaban clínicamente estables y sin episodios de peritonitis en las ocho semanas previas al estudio. El intercambio nocturno se estandarizó para una concentración de glucosa al 2,27% y una concentración de calcio de 1,25 ó 1,75 mmol/l. A los pacientes en DP autonómica (DPA), se les indicó que tras la realización de su pauta habitual de diálisis con la cicladora se infundieran un líquido con las características descritas y acudieran a la unidad tras al menos ocho horas de permanencia del líquido en la cavidad peritoneal. Las bolsas se procesaron inmediatamente en condiciones de esterilidad evitando la contaminación inicial del efluente.

Aislamiento de CM a partir del efluente peritoneal (Técnica modificada de Douvdevani y Chaimovitz, Israel)¹²

Las bolsas del efluente peritoneal se colocaron colgadas en posición vertical, para lograr la sedimentación de las células, en un incubador a 37° durante 3-4 horas. El efluente residual fue cuidadosamente eliminado mediante succión a vacío con una pipeta estéril, dejando un volumen residual de unos 200 ml en el fondo inferior de la bolsa. Las células se resuspendieron en este volumen y fueron transferidas a cuatro tubos de 50 ml y se lavaron posteriormente con PBS por centrifugación a 1.500 rpm durante 20 minutos.

El número total de células se contabilizó en una cámara de Neubauer. El exceso de PBS se eliminó y las células fueron resuspendidas en 7 ml de medio de cultivo y sembradas en frascos de cultivo de 25 cm² e incubadas en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. El medio de cultivo M-199 (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) se suplementó con un 20% de suero bovino fetal, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 2% de Biogro-2 que contiene insulina, transferrina, etanolamina y putrescina (Biological Industries). Dicho medio fue reemplazado cada 4 días.

Subcultivo de CM

Una vez que las CM alcanzaron la subconfluencia, se lavaron con PBS y fueron desprendidas con 4 ml de

tripsina al 0,125% y EDTA al 0,01% durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. El desprendimiento celular se monitorizó mediante microscopio de contraste de fase, y la viabilidad celular se comprobó por el Test de Exclusión del Azul Tripán. Las células se resuspendieron en medio de cultivo, se siembran en placas de 24 pocillos con una densidad de 2 x 10⁴ células/pocillo y se incubaron en las mismas condiciones que anteriormente. El medio fue recambiado cada 3-4 días.

La curva de crecimiento celular se obtuvo por conteo celular en una cámara de Neubauer a los 7, 10, 13, 16, 20, 23, 27 y 30 días después del subcultivo. El número de células se estimó por duplicado en 3-4 pocillos tripsinizados.

Identificación y caracterización de CM

Las células fueron identificadas como CM en dos ocasiones: en el momento del aislamiento en el efluente peritoneal y después de la tripsinización de las células subconfluentes en los frascos de 25 cm². La morfología celular se comprobó mediante preparaciones en citocentrífuga (Cytospin Shandon, 500 rpm) teñidas con May-Grünwald-Giemsa. De esta forma, las CM son fácilmente distinguibles de macrófagos, linfocitos y neutrófilos.

Posteriormente, las células se caracterizaron por técnicas de inmunohistoquímica. Las CM fueron identificadas por su tinción positiva para citoqueratina^{13,14} y tinción negativa para CD-45, que tiñe las células hematopoyéticas, HLA-DR, que tiñe macrófagos y linfocitos, y factor vW que tiñe las células endoteliales (todos los anticuerpos utilizados fueron de Dako, Glostrup, Dinamarca).

Para inmunohistoquímica se utilizó la técnica de la fosfatasa alcalina-anti-fosfatasa alcalina (APAAP)¹⁵. Las preparaciones se incubaron con anticuerpo primario de ratón, lavadas con PBS e incubadas con anticuerpo secundario de cabra marcado con biotina, posteriormente se lavaron y revelaron con el complejo avidina-fosfatasa alcalina (Stravigen, Universal Kit, Bio Genex Laboratories). Las células positivas adquirieron una coloración roja.

Los resultados se presentan como media más menos desviación estándar.

RESULTADOS

El número total medio de células liberadas al efluente fue 887.127 ± 2.711.898 (rango 7.000-18.590.000). De estas, 23.726 ± 30.785 (rango 600-136.680) fueron identificadas como CM. La figura 1 muestra los valores de diferentes percentiles del nú-

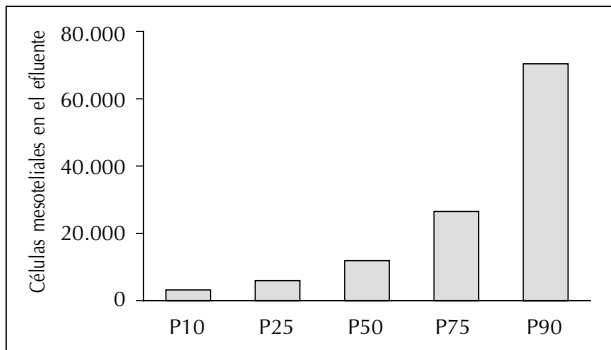


Fig. 1.—Distribución por percentiles del número de células mesoteliales liberadas al efluente peritoneal.

mero de CM liberadas al efluente peritoneal. La morfología de las CM teñidas con May-Grünwald-Giemsa se muestra en la figura 2. El diámetro celular fue de 15-25 μm . Las CM son globulares con bordes festoneados y citoplasma basófilo. El núcleo es redondo, en posición central y la cromatina es de aspecto reticular; la relación núcleo/citoplasma es alta. Las células se observan frecuentemente formando nidos o agrupamientos. Ocasionalmente, se observaron células gigantes planas previamente descritas¹⁶ (fig. 3).

Las CM muestran una reacción fuertemente positiva a la citoqueratina, que forma parte de su citoesqueleto.

Crecimiento de las CM

Las células de 42 pacientes (80,7%) fueron capaces de proliferar en cultivo y alcanzaron la subcon-

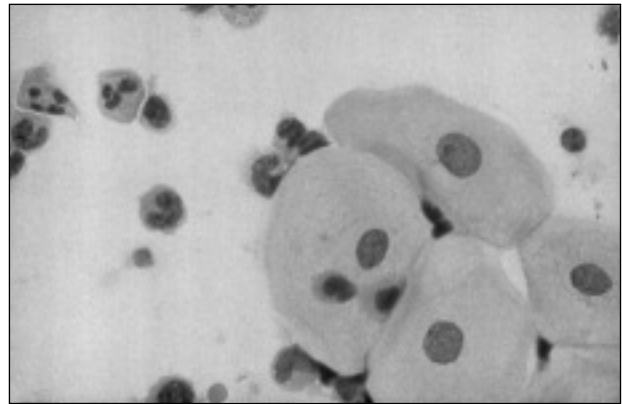


Fig. 3.—Morfología de las células mesoteliales gigantes planas de efluente peritoneal nocturno teñidas con May-Grünwald-Giemsa (160x).

fluencia $19,9 \pm 12$ días después de ser sembradas (rango 8-39 días). En este estado de cultivo, las células presentaban una apariencia heterogénea³ (fig. 4). En las primeras etapas del crecimiento, las células muestran generalmente una morfología bipolar, algunas veces multipolar y ocasionalmente un aspecto similar al fibroblasto. En los días siguientes, las células adoptan una conformación poligonal y adquieren una apariencia «en empedrado» cuando confluyen (fig. 5). El último cambio ocasionalmente no se observa, y en algunos cultivos las CM persisten en configuración poligonal. Pueden coexistir varias morfologías en el mismo cultivo, lo que definiremos como una morfología mixta.

En el momento de la tripsinización, la representación de CM se ha incrementado marcadamente, alcanzando 95,5% de células. Las células restantes

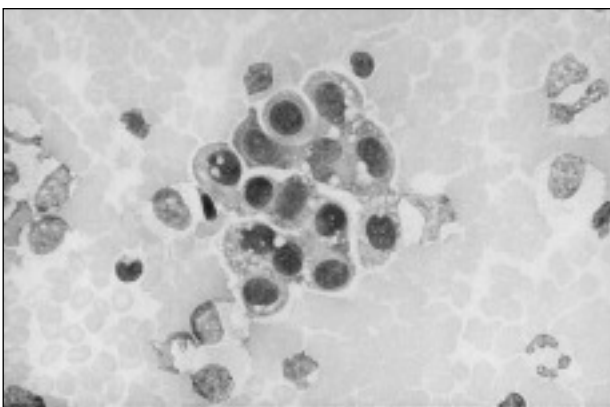


Fig. 2.—Morfología de las células mesoteliales de efluente peritoneal teñidas con May-Grünwald-Giemsa (160x).

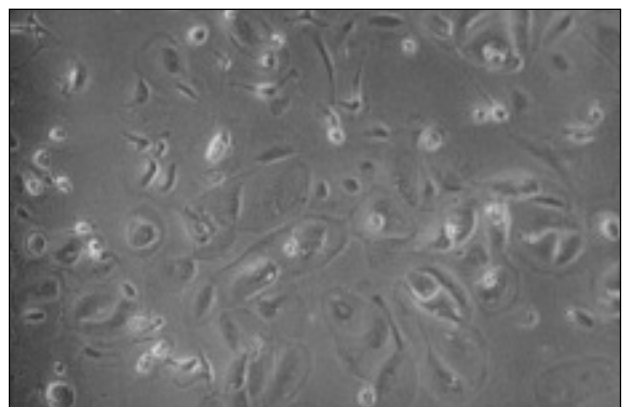


Fig. 4.—Apariencia heterogénea de las células mesoteliales en los frascos de cultivo en la subconfluencia (10x).

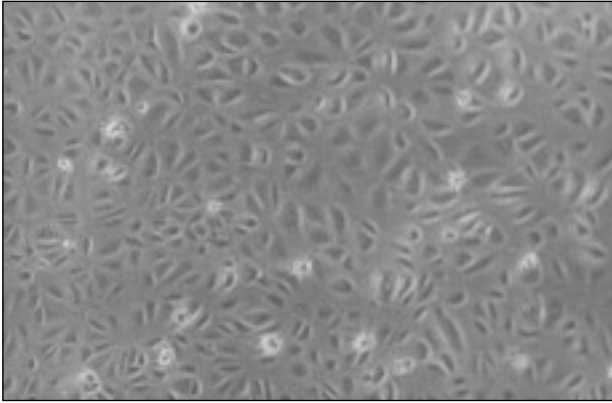


Fig. 5.—Apariencia de empedrado de la monocapa de células mesoteliales en cultivo en la subconfluencia (10x).

se identificaron como macrófagos, linfocitos y eosinófilos. La morfología de CM en cultivo es más heterogénea que la de las células obtenidas recientemente del efluente peritoneal (fig. 6). Las células cultivadas son más grandes (diámetro 20-50 μm , o más), y frecuentemente muestran atipias nucleares, bi o multinuclearidad vacuolización citoplasmática. Se observan todavía la basofilia y el festoneado.

En nueve pacientes, el número de CM liberadas al efluente fue tan escaso que no lograron alcanzar la subconfluencia en cultivo. Estas células mostraban una morfología predominantemente poligonal o de aspecto fibroblástico. En contraste, hubo un paciente cuyas células en cultivo no lograron alcanzar la subconfluencia a pesar de liberar un número de células similar a aquéllos que mostraban una capa-

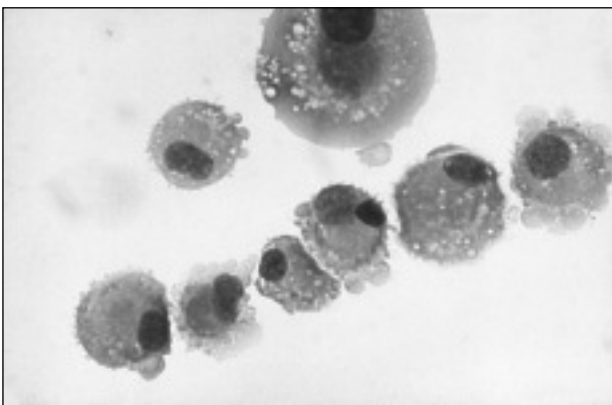


Fig. 6.—Morfología de las células mesoteliales en cultivo teñidas May-Grünwald-Giemsa (160x).

cidad óptima de crecimiento. Este experimento se repitió en varias ocasiones, confirmándose que las CM de este paciente tenían una dificultad intrínseca para crecer en estas condiciones. La tabla I muestra datos comparativos del crecimiento celular de los pacientes que crecen ($n = 42$) y de los que no crecen ($n = 10$).

Después del subcultivo en la placa multipocillo, las CM mostraron una capacidad exponencial de crecimiento hasta el día 16. Desde el día 16 al día 20 se produce una pequeña meseta y posteriormente la tendencia es descendente hasta el día 30. La figura 7 muestra los valores medios de los 42 cultivos de los pacientes que crecieron y las comparaciones entre los distintos puntos utilizando tests no paramétricos para datos pareados. Los marcadores específicos de CM estuvieron presentes en todas las células, incluyendo las diferentes morfologías.

Tabla I. Datos comparativos sobre el crecimiento mesotelial en diferentes estadios en pacientes que crecen ($n = 42$) y que no crecen ($n = 10$)

	Células mesoteliales iniciales	Células mesoteliales a la confluencia	Días de confluencia
Crece	32.410 ± 35.557	$1.296.680 \pm 706.459$	16 ± 6
No crece	8.912 ± 9.120	470.385 ± 262.388	28 ± 17
	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,05$

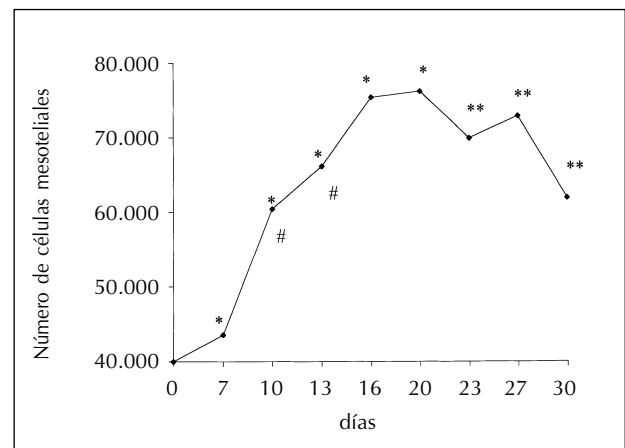


Fig. 7.—Curva de proliferación de las células mesoteliales tras subcultivo en placa multipocillo (valores medios de los 42 pacientes cuyas células mesoteliales proliferaron). Test de Wilcoxon: * $p < 0,01$ con respecto al basal, ** $p < 0,05$ con respecto al basal, # $p < 0,05$ con respecto al valor inmediatamente anterior.

DISCUSIÓN

En este estudio, confirmamos que las CM liberadas diariamente en la bolsa de diálisis peritoneal, son viables y pueden ser cultivadas *ex vivo*. Esta técnica tiene varias ventajas sobre el cultivo de CM procedentes de omento, ya que no requiere un procedimiento invasivo. Nuestra técnica difiere precisamente en este aspecto de la de Douvdevani¹², ya que él utiliza el omento como fuente celular. Otros puntos de diferenciación serían la utilización de suero humano AB o de Biogro-2 en vez del suero bovino fetal. Actualmente, no podemos pensar en la realización de biopsias peritoneales en repetidas ocasiones. Esta técnica permitiría estudiar CM en cultivo de pacientes tratados con DP, sin el requerimiento de métodos invasivos para su obtención y facilitaría la realización de estudios longitudinales que no han podido llevarse a cabo hasta la fecha por la agresividad de las técnicas actualmente disponibles para obtener las células.

La limitación principal para el estudio de CM exfoliadas en el efluente peritoneal es su bajo número tanto absoluto como relativo. Es preferible utilizar efluentes peritoneales nocturnos de al menos 8 horas de permanencia intraperitoneal, y de esta manera poder obtener un número suficiente de CM. Con tiempos de permanencia más cortos el número de células liberadas se reduce de forma importante y no se logra alcanzar la confluencia en los frascos de cultivo. Este fue también el motivo por el que elegimos frascos de 25 cm² de superficie en vez de 75 cm², ya que si no se prolonga excesivamente el tiempo requerido para alcanzar la subconfluencia. La morfología y la inmunohistoquímica pueden realmente identificar y distinguir estas, de otras células que están presentes inicialmente en el efluente¹⁷. Estas técnicas mostraban que el cultivo celular proporcionaba un enriquecimiento en CM, alcanzando un 95% de células subcultivadas en las placas multipocillo. En este momento, existe una contaminación mínima de macrófagos, linfocitos o eosinófilos.

La técnica de cultivo aquí descrita, muestra que el 80,7% de los cultivos alcanzan la subconfluencia. Aquellos pacientes con alta capacidad de crecimiento mostraron resultados similares en otras muestras testadas (datos no mostrados). Sin embargo, en los pacientes que liberaban un número bajo de CM al efluente, la técnica no resultó exitosa. Probablemente se requiere un número mínimo de células inicialmente liberadas para alcanzar la subconfluencia, lo que sugiere que como en el caso de otros tipos de células, las CM segregan factores de crecimiento autocrinos. La identificación de dichos factores será un reto para futuros estudios y se podrá influir en el

manejo de un número bajo de CM. El paciente cuyas células no eran capaces de crecer pero que liberaba un número de ellas teóricamente suficiente, mantenía el mismo comportamiento en varios intentos de cultivo. Actualmente no tenemos una explicación clara que justifique este peculiar comportamiento.

Otra característica interesante es que procesos distintos pueden contribuir a la subconfluencia en pacientes diferentes. Cuando se requieren períodos de tiempo similares para alcanzar este estado, el número de células en cultivo varía en muestras de pacientes diferentes. Esto sugiere que la subconfluencia se alcanza tanto por la proliferación celular como por un aumento del tamaño de las células. La contribución relativa de la hiperplasia *versus* la hipertrofia, y sus factores de regulación no se definen en este estudio y merecen posterior exploración. Para distinguir entre estos dos fenómenos, es esencial entender la capacidad de las CM de responder a las agresiones. Para mantener la funcionalidad de la membrana peritoneal es necesario que las CM tengan preservada la capacidad de proliferación. Por el contrario, las CM hipertróficas pueden tener limitada su capacidad proliferativa en respuesta a unas circunstancias adversas. El ejemplo extremo de este proceso puede estar representado por las células gigantes planas, que han perdido la capacidad de crecimiento¹⁸. Estas células son incapaces de crecer *in vitro* porque no se adhieren a la superficie del frasco¹¹.

Mediante el subcultivo de células en la placa multipocillos fuimos capaces de obtener grandes cantidades de CM. En el futuro esto permitirá un análisis más completo de la biología de la CM en los pacientes en DP, similar al que se ha realizado de CM obtenidas a partir del omento de sujetos sanos. Una ventaja adicional de esta técnica representa la comparación de diferentes pacientes; y a lo largo del tiempo pueden monitorizarse los cambios que se produzcan en la biología de la CM de la cada paciente.

En resumen, hemos demostrado que las CM de pacientes en DP son accesibles para poder profundizar en su análisis mediante cultivo de CM liberadas diariamente al efluente peritoneal. El bajo número de estas células en el efluente peritoneal podría ser la mayor limitación de esta técnica. Se debería investigar los motivos por los que existe una gran variabilidad en el número de CM liberadas diariamente por distintos pacientes y la diferente capacidad de proliferación con un número similar de CM liberadas. Esta técnica ofrece la posibilidad de realizar un seguimiento próximo y reiterativo de la biología de las CM en individuos en tratamiento con DP y el estudio de la influencia que sobre ellas tiene la DP a largo plazo.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Alberto Ortiz y al Profesor Francisco Vara por su inapreciable colaboración en la corrección de este manuscrito. Este estudio ha sido financiado parcialmente por Baxter, S. A. España.

BIBLIOGRAFÍA

- Selgas R, Fernández-Reyes MJ, Bosque E, Bajo MA, Borrego F, Jiménez C, del Peso G, de Álvaro F: Functional longevity of the human peritoneum: How long is continuous peritoneal dialysis possible? Results of a prospective medium long-term study. *Am J Kidney Dis* 23: 64-73, 1994.
- Dobbie JW: Ultrastructure and pathology of the peritoneum in peritoneal dialysis. In: The Textbook of Peritoneal Dialysis. 4th. Gokal R, Nolph D (ed.). Kluwer Academic Publishers Group. pp 17-44. Amsterdam 1994.
- Nagy JA: Peritoneal membrane morphology and function. *Kidney Int* 50 (Supl. 56): S2-S11, 1996.
- Hjelle JT, Miller-Hjelle MA, Dobbie JW: The biology of the mesothelium during peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 15 (Supl. 17): S13-S23, 1995.
- Barbano G, Cappa F, Facchetti P: Outgrowth of interleukin-2-dependent T cell lines with cytotoxic activity against mesothelial cells from cultures of peritoneal effluent cells of children on CCPD. *Adv Perit Dial* 12: 321-325, 1996.
- Topley N: The host's initial response to peritoneal infection: the pivotal role of the mesothelial cell. *Perit Dial Int* 15: 116-117, 1995.
- Topley N, Jörres A, Luttmann W: Human peritoneal mesothelial cells synthesize interleukin-6: Induction by IL-1 β and TNF. *Kidney Int* 43: 226-233, 1993.
- Witowski J, Jörres A, Coles GA, Williams JD, Topley N: Superinduction of IL-6 synthesis in human peritoneal mesothelial cells is related to the induction and stabilization of IL-6 mRNA. *Kidney Int* 50: 1212-1223, 1996.
- Visser CE, Brouwer-Steenbergen JJE, Psoptmus PE, Meijer S, Struijk DG, Krediet RT, Beelen RHJ: Renal function influences interleukin-8 background production by cultured human mesothelial cells. *Adv Perit Dial* 12: 15-18, 1996.
- Pannekeet MM, Hiralall JK, Struijk DG, Krediet R: Longitudinal follow-up of CA-125 in peritoneal effluent. *Kidney Int* 51: 888-893, 1997.
- Fernández de Castro M, Selgas R, Jiménez C, Bajo MA, Martínez V, Romero JR, de Álvaro F, Vara F: Cell populations present in the nocturnal effluent of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis and their relationship with peritoneal function and incidence of peritonitis. *Perit Dial Int* 14: 265-270, 1994.
- Douvdevani A, Rapoport J, Konforty A, Argov S, Ovnat A, Chaimovitz C: Human peritoneal mesothelial cells synthesize IL-1 alpha and beta. *Kidney Int* 46: 993-1001, 1994.
- Krediet RT, Pannekeet MM, Zemel D, Koomen GCM, Struijk DG, Hoek FJ: Markers of peritoneal membrane status. *Perit Dial Int* 16 (Supl. 1): S42-S49, 1996.
- Breborowicz A, Karon J, Korybalska K, Martis L, Oreopoulos DG: Functional properties of mesothelial cells after prolonged exposure to dialysate effluent. *Adv Perit Dial* 11: 15-18, 1995.
- Erber WN, Mynheer LC, Massaon DY: APAAP labelling of blood and bone marrow samples for phenotyping leukemia. *Lancet* 1: 761, 1986.
- Perfumo F, Altieri P, Degl'Innocenti ML: Effects of peritoneal effluents on mesothelial cells in culture: cell proliferation and extracellular matrix regulation. *Nephrol Dial Transplant* 11: 1803-1809, 1996.
- Tsai TJ, Yen CJ, Fang CC: Effect of intraperitoneally administered agents on human peritoneal mesothelial cell growth. *Nephron* 71: 23-28, 1995.
- Selgas R, Fernández de Castro M, Víguer JM, Burgos E, Bajo MA, Cárcamo C, Vara F: Transformed mesothelial cells in patients on CAPD for medium to long term periods. *Perit Dial Int* 15: 305-311, 1995.