

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 056**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/433** (2006.01)  
**A61K 31/718** (2006.01)  
**A61K 33/14** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61P 7/08** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2012 PCT/EP2012/076054**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13098140**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12806447 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2797596**

54 Título: **Fluido de diálisis peritoneal que comprende un inhibidor de GSK-3**

30 Prioridad:

**27.12.2011 EP 11195786**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**04.03.2020**

73 Titular/es:

**ZYTOPROTEC GMBH (100.0%)  
Mariannengasse 28/2  
1090 Wien , AT**

72 Inventor/es:

**RUSAI, KRISZTINA SZILVIA y  
AUFRICHT, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 746 056 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Fluido de diálisis peritoneal que comprende un inhibidor de GSK-3

La presente invención se refiere a un fluido de diálisis peritoneal (en lo sucesivo también denominado "PDF").

5 La diálisis peritoneal (PD, por sus siglas en inglés) es una terapia de reemplazo renal segura y rentable que también ofrece una mejor calidad de vida en comparación con la hemodiálisis. Desafortunadamente, el tratamiento con PD frecuentemente resulta en una disminución progresiva de la capacidad de ultrafiltración de la membrana generalmente asociada con cambios histológicos peritoneales y pérdida de integridad peritoneal (1).

10 En la actualidad, más de dos tercios de los pacientes sufren una complicación infecciosa o no infecciosa relacionada con la PD (como peritonitis, deterioro de la función o falla técnica de la membrana peritoneal) durante sus primeros dos años de tratamiento.

Hay diferentes tipos de fluidos disponibles para la PD. La diferencia entre estos fluidos es el tipo de agentes osmóticos, sus concentraciones y el tipo de tampón y el valor de pH en el fluido de PD.

15 Los fluidos estándar que aún representan aproximadamente el 80 % de todos los fluidos de PD en la práctica clínica contienen altas concentraciones no fisiológicas de glucosa como agente osmótico. Los cambios patológicos en el peritoneo resultan principalmente de la alta concentración hiperosmolar de glucosa y también de un bajo valor de pH (2). Las lesiones más complejas y crónicas son inducidas por los productos de degradación de la glucosa (GDP, por sus siglas en inglés), que se forman durante la esterilización por calor de fluidos de PD (3). Los fluidos de PD novedosos y más biocompatibles a base de glucosa tienen un pH normal y un bajo contenido de GDP debido al uso de un sistema de más cámaras; sin embargo, estos fluidos son muy costosos, por lo tanto, su uso clínico aún es limitado a escala mundial.

También existen en el mercado fluidos de PD alternativos, que no se basan en glucosa, como los fluidos de PD a base de icodextrina o aminoácidos, sin embargo, su uso está limitado a un único intercambio por día y su capacidad de ultrafiltración no es tan buena como la de disoluciones a base de glucosa. Además, también tienen un valor de pH más bajo que potencia cambios celulares desfavorables en el peritoneo.

25 Por lo tanto, la búsqueda de estrategias para reducir la toxicidad de los fluidos de PD sigue siendo un campo real en la nefrología experimental y clínica y tiene una importancia médica y socioeconómica inmensa.

30 Se ha demostrado previamente en una serie de estudios que las HSP tienen un impacto significativo en la supervivencia de las células mesoteliales en la PD experimental, ya que el aumento de HSP, ya sea por vía farmacológica o mediada por plásmidos, protegió a las células mesoteliales de las características tóxicas de los fluidos de PD (12,13,14).

Curiosamente, sin embargo, la incubación con fluidos de PD estándar a base de glucosa resultó en una expresión de HSP reducida en las células mesoteliales que causa un mecanismo de defensa celular debilitado.

El documento WO 2008/106702 describe un fluido de diálisis peritoneal a base de carbohidratos, que contiene un compuesto seleccionado del grupo que consiste en

- 35
- glutamina, preferiblemente L-glutamina,
  - un dipéptido capaz de liberar glutamina, L-glutamina en forma libre, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en glutaminil-glicina, glicinil-glutamina, glutaminil-alanina, alanil-glutamina
  - un oligopéptido que consiste en dos a siete glutaminas, preferiblemente residuos L-glutamina, y
  - mezclas de los mismos.

40 Todavía existe la necesidad de fluidos de diálisis peritoneal con los que se pueda prevenir o al menos inhibir la aparición de complicaciones peritoneales infecciosas y no infecciosas, como peritonitis, lesión, daño y falla de la membrana peritoneal, disfunción de la barrera y desprendimiento de células mesoteliales. Mediante la prevención de tales complicaciones peritoneales infecciosas y no infecciosas, se puede inhibir la falla técnica en un paciente que se somete a un tratamiento con PD. El término "falla técnica" es conocido por el experto en la técnica y significa la necesidad de terminar la diálisis peritoneal y cambiar a terapias de reemplazo renal alternativas como la hemodiálisis.

45

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un fluido de diálisis peritoneal con el que se pueda prevenir o inhibir la aparición de tales complicaciones peritoneales infecciosas y no infecciosas.

50 En un aspecto, la presente invención se refiere a un fluido de diálisis peritoneal que comprende un compuesto que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa cinasa (GSK, por sus siglas en inglés)-3, en particular la actividad de (GSK)-3 $\beta$  para su uso en la prevención de complicaciones peritoneales infecciosas y no infecciosas causadas por

tratamiento con un fluido de diálisis peritoneal, en donde estas complicaciones se seleccionan entre peritonitis, lesión, daño y falla de la membrana peritoneal, disfunción de barrera y desprendimiento de células mesoteliales.

5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un fluido de diálisis peritoneal a base de icodextrina, que comprende un compuesto que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3, en particular la actividad de (GSK)-3 $\beta$ .

10 En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un compuesto que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3, en particular la actividad de (GSK)-3 $\beta$  para su uso en la prevención de complicaciones peritoneales infecciosas y no infecciosas causadas por el tratamiento con un fluido de diálisis peritoneal, en donde estas complicaciones se seleccionan de peritonitis, lesión, daño y falla de la membrana peritoneal, disfunción de barrera y desprendimiento de células mesoteliales.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: expresión de p-GSK-3 $\beta$  en células mesoteliales tratadas con diferentes fluidos de PD disponibles comercialmente con diferentes agentes osmóticos y propiedades tóxicas

15 Figura 2: Liberación de LDH en células mesoteliales tratadas con diferentes fluidos de PD comercialmente disponibles con diferentes agentes osmóticos y propiedades tóxicas.

Figura 3: Viabilidad celular evaluada por captación de rojo neutro en % en comparación con células testigo.

Figura 4: Actividad del factor de choque térmico-1 evaluada mediante el ensayo de luciferasa.

Figura 5: Expresión de la proteína de choque térmico-72 (HSP-72) evaluada por transferencia Western.

Figura 6: Liberación de LDH en el sobrenadante.

20 Figura 7: Actividad de traducción del factor de choque térmico (HSF-1) evaluada mediante el ensayo de luciferasa.

Figura 8: Expresión de proteína de choque térmico-72 (HSP-72) evaluada por transferencia Western.

### Descripción detallada de la invención

25 La glucógeno sintasa cinasa-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) es una proteína cinasa de serina-treonina. La propia GSK-3 $\beta$  se regula e inhibe mediante fosforilación en el residuo serina-9 por diferentes cinasas anteriores de las cuales Akt y la cinasa regulada por suero y glucocorticoides 1 (SGK-1, por sus siglas en inglés) han ganado más atención (4). GSK-3 $\beta$  se identificó originalmente como una enzima clave que reacciona a diferentes niveles de glucosa y GDP regulando así la síntesis de glucógeno (5, 6). Sin embargo, el trabajo posterior demostró que GSK-3 $\beta$  tiene un papel central en la supervivencia celular general, la progresión del ciclo celular y la migración.

30 Aunque GSK-3 $\beta$  se describió hace aproximadamente 30 años, el interés en ella como posible diana farmacológica se hizo prominente solo a principios del presente siglo cuando se descubrió que GSK-3 $\beta$  era una cinasa multifacética involucrada en varios procesos fisiológicos y patológicos. Los estudios informaron que la inhibición de GSK-3 $\beta$ , ya sea por inhibidores selectivos de moléculas pequeñas o con litio, tiene propiedades protectoras en varios modelos de enfermedades. Se demostró que la inhibición de GSK-3 $\beta$  mejora la resistencia a la insulina en la diabetes tipo II (23, 24), tiene efectos beneficiosos en trastornos neurológicos como la enfermedad de Alzheimer (25) y reduce la hipertrofia cardíaca y la isquemia (26).

Muchas dianas de GSK-3 $\beta$  son factores de transcripción (HSF-1,  $\beta$ -catenina, C-Jun, CREB) que conducen a una reacción de estrés alterada, aumento de la apoptosis y cambios en la neurotransmisión. GSK-3 $\beta$  también es capaz de regular elementos del citoesqueleto (7, 8) que hacen que GSK-3 $\beta$  sea un mediador central en la señalización celular con un papel inmenso en el destino celular.

40 Una de las principales dianas de GSK-3 $\beta$  es el factor de choque térmico-1 (HSF-1, por sus siglas en inglés), el inductor clave de la expresión de la proteína de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) protectora celular (9,10). En condiciones de estrés, HSF-1 se activa en una forma de múltiples pasos que incluye hiperfosforilación, translocación en el núcleo, unión de elementos HS (HSE, por sus siglas en inglés) y posteriormente transcripción de genes respectivos. HSF-1 se fosforila y, de este modo, se inhibe mediante GSK-3 $\beta$  (11), lo que conduce a niveles reducidos de HSP. GSK-3 $\beta$  fosforila HSF-1 en el residuo serina-303 que regula negativamente su unión al ADN y la transcripción dependiente de HSF-1 que conduce a la producción suprimida de HSP-72 (21), por otro lado, la inhibición de GSK-3 $\beta$  aumenta la respuesta de choque térmico que contribuye a mejorar la defensa celular. Se considera que GSK-3 modula las citocinas pro y antiinflamatorias y se demostró que la inhibición de GSK3 reduce la cantidad de células peritoneales en un modelo murino para la peritonitis mediada por TLR2 inducida por Pam<sub>3</sub>Cys (34).

Como GSK-3 $\beta$  está fuertemente regulada por la glucosa y los GDP (15), los inventores de las presentes invenciones han considerado que podría ser un actor molecular relevante en la señalización celular asociada a la PD. Sin embargo, aún no se ha descrito una asociación directa entre GSK-3 $\beta$  y PD.

5 Se hipotetiza que un aumento en la actividad de la GSK-3 $\beta$  antisupervivencia, posiblemente mediada por la exposición a fluidos de PD, inhibe el HSF-1 prosupervivencia, el regulador clave de la transcripción de HSP durante la PD. En consecuencia, el bloqueo de la actividad de GSK-3 $\beta$  podría dar como resultado una activación mejorada de HSF-1 y, por lo tanto, una mayor expresión de HSP y una menor toxicidad celular.

10 Ahora se ha encontrado que la inhibición de GSK-3, en particular la inhibición de GSK-3 $\beta$ , disminuyó la lesión de células mesoteliales y la tasa de mortalidad en células tratadas con fluidos de PD. La protección de las células mesoteliales fue paralela a una mayor actividad de HSF-1 y expresión de HSP-72.

Este efecto es particularmente pronunciado con fluidos de PD seleccionados del grupo que consiste en fluidos de diálisis a base de carbohidratos y fluidos de diálisis a base de aminoácidos. El efecto es incluso más pronunciado con fluidos de diálisis peritoneal a base de carbohidratos con un valor de pH de 7,3 o menor, preferiblemente 7,0 o menor, lo más preferiblemente 6,0 o menor.

15 Los fluidos de diálisis peritoneal a base de carbohidratos son especialmente aquellos a base de glucosa o icodextrina. Lo más preferiblemente, el fluido de diálisis peritoneal se basa en icodextrina.

Por consiguiente, una realización particularmente preferida de la presente invención es un fluido de diálisis peritoneal a base de icodextrina, que comprende un compuesto que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3, en particular la actividad de (GSK)-3 $\beta$ .

20 Como se mencionó anteriormente, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un compuesto que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3, en particular la actividad de (GSK)-3 $\beta$  para su uso en la prevención de complicaciones peritoneales infecciosas y no infecciosas, tales como peritonitis, lesión, daño y falla de la membrana peritoneal, disfunción de barrera y desprendimiento de células mesoteliales causados por el tratamiento con un fluido de diálisis peritoneal.

25 El compuesto se administra preferiblemente junto con un fluido de diálisis peritoneal en el curso de un tratamiento de diálisis peritoneal. El fluido de PD se selecciona preferiblemente de los fluidos de PD ya descritos anteriormente.

El compuesto que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3, en particular la actividad de (GSK)-3 $\beta$  se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en litio, tideglusib, NP-103, inhibidor I de GSK-3 $\beta$  (TDZD-8, 4-Bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidina-3,5-diona), inhibidor II de GSK-3 $\beta$  (2-Tio(3-yodobencil)-5-(1-piridil)-[1,3,4]-oxadiazol), inhibidor IV de GSK-3 (SB-216763, 3-(2,4-Diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona), inhibidor IX de GSK-3 (BIO, (2'Z,3'E)-6-Bromoindirrubin-3'-oxima), inhibidor VI de GSK-3 $\beta$  (2-Cloro-1-(4,5-dibromotiofen-2-il)-etanona), inhibidor VII de GSK-3 $\beta$  (2,4'-Dibromoacetofenona), inhibidor VIII de GSK-3 $\beta$  (AR AO14418, N-(4-Metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il) urea), inhibidor X de GSK-3 (BIO-Acetoxima, (2'Z,3'E)-6-Bromoindirrubina-3'-acetoxima), inhibidor XI de GSK-3 $\beta$  (3-(1-(3-Hidroxipropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)-4-pirazin-2-il-pirrol-2,5-diona, 7AIPM), inhibidor XIII de GSK-3 (5-Metil-1H-pirazol-3-il)-(2-fenilquinazolin-4-il) amina), inhibidor XII de GSK-3 $\beta$  (TWS119, ditrifluoroacetato de 3-[[6-(3-aminofenil)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il]oxifenol), inhibidor XVIII de GSK-3 $\beta$  (2-(Cloro-4-(4-tiofen-2-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil)-(4-metil-piperazin-1-il)-metanona), inhibidor X de GSK-3 $\beta$  (BIO-acetoxima, (2'Z,3'E)-6-Bromoindirrubin-3'-acetoxima), inhibidor XI de GSK-3 $\beta$  (3-(1-(3-Hidroxipropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)-4-pirazina-2-il-pirrol-2,5-diona, 7AIPM), inhibidor XIX de GSK-3 $\beta$  (IM-12, C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, derivado de indolilmaleimida), inhibidor XVI de GSK-3 (6-(2-(4-(2,4-Diclorofenil)-5-(4-metil-1H-imidazol-2-il)-pirimidin-2-ilamino)etil-amino)-nicotinonitrilo, CHIR99021), inhibidor XVII de GSK-3 (5-Bencilamino-3-oxo-2,3-dihidro-1,2,4-tiadiazol, TDZD-20), inhibidor XXII de GSK-3, compuesto A (6-Metil-N-[3-[[3-(1-metiletoxi)propil]carbamoil]-1H-pirazol-4-il]piridina-3-carboxamida), inhibidor XXIII de GSK-3 $\beta$ , 3F8 (5-Etil-7,8-dimetoxi-1H-pirrol[3,4-c]-isoquinolina-1,3-(2H)-diona), inhibidor peptídico de GSK-3 $\beta$  (L803, H-KEAPPAPPQSpP-NH<sub>2</sub>), inhibidor peptídico de GSK-3 $\beta$  (L803-mts, Myr-N-GKEAPPAPPQSpP-NH<sub>2</sub>), GF-109203X (2-[1-(3-Dimetilaminopropil)indol-3-il]-3-(indol-3-il)maleimida) y sales y mezclas farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización preferida, el compuesto que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3 es una sal de litio, en particular cloruro de litio o carbonato de litio. La concentración de la sal de litio en el fluido de diálisis es preferiblemente de 1 mM a 10 mM, lo más preferido de 2 mM a 5 mM.

50 El litio es un conocido inhibidor de GSK-3 $\beta$  que inhibe GSK-3 $\beta$  por competencia por el magnesio (27). El litio se ha usado para el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo bipolar desde los años cincuenta sin conocer su modo de acción específico en ese momento. En 1996, se descubrió que era un potente inhibidor de GSK-3 $\beta$  y crece la evidencia de que este podría ser uno de los mecanismos básicos para los efectos estabilizadores del estado de ánimo conocidos y usados del litio en el trastorno bipolar (16,17,18,22). Además de los trastornos del estado de ánimo, el litio se encuentra ahora en un ensayo clínico de fase II para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica y para el tratamiento de la enfermedad del injerto intestinal contra el huésped después del trasplante de células madre del donante.

Se sabe mucho menos acerca de si las acciones posteriores de la inhibición de GSK-3 $\beta$  por litio involucran directamente a las HSP. Sin embargo, recientemente, se demostró que los efectos protectores del litio están asociados con niveles mejorados de HSP en modelos experimentales como de daño cerebral isquémico (30,31) y los efectos neuroprotectores del litio también se debieron directamente a la actividad inducida de HSF-1 (32,33).

5 Se ha agregado litio a los fluidos de PD a base de glucosa en el entorno clínico para tratar los síntomas bipolares de un paciente en PD ambulatoria continua; sin embargo, esta modalidad de aplicación no se introdujo como administración de rutina (28). En este estudio, se administró litio en una disolución de Dianeal® al 2,5 % en una dosis final de 0,9 mM en una bolsa de 2L y la disolución se cambió 3 veces al día proporcionando, de este modo, una exposición continua al litio.

10 Más tarde, en un modelo experimental de PD de rata, se administró carbonato de litio junto con el fluido de PD a base de glucosa para investigar sus efectos sobre la tasa de ultrafiltración aguda, sin embargo, los resultados demostraron el efecto opuesto de que el litio disminuyó la tasa de ultrafiltración (29). En este estudio, se aplicó Li 5 mM.

15 La inhibición de GSK-3 $\beta$  también puede lograrse mediante inhibidores farmacológicos alternativos específicos (inhibidores de GSK-3 o GSK-3 $\beta$ ). Hay varios inhibidores disponibles en el mercado. Algunos de estos agentes se encuentran actualmente en investigaciones clínicas para el tratamiento de afecciones especiales, pero ninguno de ellos se ha administrado ni en la disolución de PD ni para el tratamiento de la disminución de la función peritoneal causada por la PD.

20 Fuera de los inhibidores específicos de GSK-3, tideglusib ((Zentylor), inhibidor no competitivo de ATP) es el único aprobado para uso clínico. Zentylor obtuvo la aprobación de la FDA en 2010 para el tratamiento de la parálisis supranuclear progresiva y está en un ensayo de fase II para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Otros inhibidores específicos son los nombrados anteriormente.

En el caso de inhibidores de GSK-3 que no sean litio o sales de litio, el experto en la técnica puede determinar fácilmente las dosis adecuadas del inhibidor respectivo en el fluido de PD.

## 25 Ejemplos

### Métodos

#### *Cultivo celular*

30 La línea celular Met-5a humana se adquirió de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Todas las células se cultivaron en medio de cultivo M199 suplementado con L-glutamina (0,1 g/L), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100  $\mu$ g/mL), suero bovino fetal al 10 % (FBS, por sus siglas en inglés) y se propagaron a 37°C en una incubadora con aire humidificado que contenía CO<sub>2</sub> al 5 %. Los productos químicos estándar se adquirieron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.) a menos que se indique lo contrario. Se usaron plásticos de cultivo de tejidos Falcon™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) para todos los procedimientos de cultivo celular.

#### *Exposición a PDF*

35 Para la incubación con PDF, se usaron fluido a base de glucosa de pH bajo (5,5) al 3,86 % (disolución en Dianeal PD4), fluido a base de icodextrina de pH bajo (5,5) (Extraneal); fluido a base de aminoácidos (pH 6,7) (Nutrineal), a base de glucosa, pH neutro, tamponado con lactato/bicarbonato (Physioneal) de Baxter AG, Viena, Austria. Se obtuvo una disolución de pH neutro a base de glucosa, tamponada con lactato (Balance) de Fresenius, Austria.

40 La disolución testigo fue medio de cultivo M199 suplementado con L-glutamina (0,1 g/L), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100  $\mu$ g/mL) sin suero fetal bovino.

Modelo de exposición a PDF: Los cultivos confluentes en placas de 12 pocillos se expusieron durante los tiempos indicados (30 min o 1 h) a la disolución de fluido de PD o se mantuvieron en paralelo en medio testigo.

45 Para el ensayo de actividad de HSF-1, las células se cosecharon y se lisaron inmediatamente después de los tiempos de exposición, mientras que para las mediciones de LDH y HSP-72, análisis de transferencia Western de p-GSK-3 $\beta$ , se permitió que las células se recuperaran por incubación con medio de cultivo normal que contenía FBS al 10 % durante 16 h.

#### *Tratamiento con LiCl*

El cloruro de litio (LiCl) se adquirió a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.) y se aplicó a una dosis indicada.

#### *Liberación de LDH*

50 Para los análisis de LDH, se extrajeron alícuotas de 200  $\mu$ L de sobrenadantes después de la configuración experimental descrita y se mantuvieron a -20°C hasta que se analizaron dentro de las 48 h. Las mediciones se

realizaron por duplicado con el kit Sigma TOX-7 LDH según las instrucciones del fabricante. El flujo de salida de LDH se normalizó para el contenido de proteínas.

#### *Captación de rojo neutro*

5 Para evaluar la viabilidad celular por captación de rojo neutro, las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se expusieron a diferentes protocolos de tratamiento como se describió anteriormente. La captación de rojo neutro se midió usando un reactivo estándar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) según el protocolo del fabricante.

#### *Ensayo de luciferasa*

10 Para determinar la unión específica del factor de choque térmico-1 (HSF-1), se transfectaron células MeT-5a con un vector informador de luciferasa disponible comercialmente (LR0038, Panomics, Italia) que contenía el elemento de choque térmico [5'CTGGAATTTTCTAGACTGGAATTTTCTAGACTGGAATTTTCTAGA3'], así como con un vector testigo vacío. 24 h antes de la transfección, las MC se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos y se dejó alcanzar aproximadamente 80-90 % de confluencia el día de la transfección. Antes de la transfección por pocillo, se diluyeron 0,15  $\mu$ l de reactivo de transfección Fugene6 (Roche) y 0,1  $\mu$ l de vector indicador de HSE o vector testigo con 5  $\mu$ l de medio de crecimiento normal sin FCS y se incubaron durante 5 minutos. Las disoluciones se incubaron mezcladas durante 30 minutos. De esta mezcla, se añadieron 10  $\mu$ l a cada pocillo incubado durante 24 h con CO<sub>2</sub> al 5 % y 37°C en una atmósfera humidificada. Las exposiciones experimentales se llevaron a cabo como se describió anteriormente y se dejó que las células se recuperaran durante 6 h para facilitar la síntesis de proteínas de la enzima luciferasa. Las células se lavaron y se lisaron usando un tampón disponible comercialmente (E1531, Promega). Los lisados celulares se transfirieron a microplacas blancas de fondo plano (Nunc). El reactivo de luciferasa (E1500, Promega) se añadió usando una pipeta automática en intervalos de 3 s y la señal producida se midió después de 2 minutos usando un lector de placa de luminómetro (Flx800, BioTek).

#### *Análisis de transferencia Western*

25 Para la transferencia Western, el contenido de proteína se determina mediante el ensayo de Bradford (Biorad, Viena, Austria) y se separan cantidades iguales de muestras de proteína (2  $\mu$ g/banda) mediante SDS-PAGE estándar usando una unidad Pharmacia Multiphore II. Las proteínas fraccionadas por tamaño se transfieren después a membranas de PVDF mediante transferencia semiseca en una unidad Pharmacia Multiphore II Novablot. Las membranas se bloquean en leche seca al 5 % en TBS-Tween (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 %, pH 7,4). Las membranas se incuban con el anticuerpo primario respectivo (HSP-72, p-GSK-3 $\beta$ ) durante 16 h. La detección se realiza mediante incubación con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (IgG antirratón o anticonejo, ambas de Dako Cytomation, CA, EE. UU.) y quimioluminiscencia mejorada (ECL) usando el sistema de análisis de transferencia Western ECL (Renaissance, NEN-Life Science Productos, Boston, MA, EE. UU.).

#### *Análisis de los datos*

35 Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Sigmaplot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Alemania). Los valores de diferentes grupos se compararon mediante pruebas de la t o ANOVA cuando fue apropiado. En el caso de ANOVA, se usó HSD de Tukey como prueba post-hoc. Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . Los resultados se presentan como medias  $\pm$  EEM.

#### *Resultados*

##### *La incubación con fluido de PD convencional induce lesiones y muerte de células mesoteliales*

40 La incubación de las células mesoteliales con un fluido de diálisis peritoneal (PDF, Dianeal) a base de glucosa con pH bajo tamponado con lactato y un PDF a base de icodextrina de pH bajo (Extraneal) dio como resultado una lesión celular grave reflejada por la contracción, desprendimiento y, en parte, por la fragmentación de células que se demostró por microscopía óptica y tinción de vivas-muertas (no se muestran los datos).

Esto se produjo en paralelo a una alta liberación de LDH (no se muestran los datos), una viabilidad celular significativamente reducida y una alta tasa de células muertas.

##### *La incubación con fluidos de PD aumenta el nivel de GSK-3 $\beta$ activada*

La incubación con PDF disminuyó el nivel de GSK-3 $\beta$  fosforilada en Ser-9 inactiva (p-GSK-3 $\beta$ ) analizado por tinción inmunofluorescente (no se muestran los datos) y por transferencia Western (Figura 1), mientras que el nivel de GSK-3 $\beta$  total permaneció sin cambios (Figura 1), lo que conduce a un mayor nivel neto de GSK-3 $\beta$  cinasa activa en comparación con las células testigo.

50 La expresión celular y, en particular, la localización de p-GSK-3 $\beta$  se analizaron mediante tinción inmunofluorescente. Después de la incubación con diferentes fluidos de PD, hubo una expresión general más baja de p-GSK-3 $\beta$  especialmente en células tratadas con PDF a base de glucosa con pH bajo y fluido a base de icodextrina, esto se produjo en paralelo con una marcada condensación alrededor del núcleo (no se muestran los datos). Sin embargo, también en los otros grupos de tratamiento (fluidos de PD tamponados con lactato, tamponados con

lactato/bicarbonato y a base de aminoácidos), se observó una disminución y condensación en comparación con las células testigo.

5 El impacto de diferentes fluidos de PD disponibles comercialmente en Ser-9 p-GSK-3 $\beta$  mostró que los fluidos de PD a base de icodextrina de pH bajo (Extraneal) tuvieron un efecto similar al de la disolución de pH bajo a base de glucosa, es decir, una expresión significativamente menor de p-GSK-3 $\beta$ . El efecto es menos pronunciado en fluidos de PD de pH normal a base de glucosa (tamponados con lactato o lactato/bicarbonato; Balance y Physioneal, respectivamente) y fluido de PD a base de aminoácidos (Nutrineal) con un pH ácido moderado (pH 6,7) (Figura 1). Estos resultados están en línea con las observaciones previas sobre glucosa y GDP (19,20). Estos estudios informaron que la glucosa alta disminuyó (19), mientras que los productos finales de los GDP aumentaron la actividad de GSK-3 $\beta$  (20).

10 Descripción de la Figura 1: expresión de p-GSK-3 $\beta$  en células mesoteliales tratadas con diferentes fluidos de PD comercialmente disponibles con diferentes agentes osmóticos y propiedades tóxicas. Las células testigo se trataron con medio de cultivo celular normal, las células tratadas con PDF se trataron con fluido de PD de pH bajo a base de glucosa con alto contenido de GDP (PDF, Dianeal). Fluido de PD a base de icodextrina (Extraneal), tamponado con lactato, bajo contenido de GDP, pH 7,4 (Balance), tamponado con lactato/bicarbonato, bajo contenido de GDP, pH 7,4 (Physioneal), fluido de PD a base de aminoácidos (Nutrineal). (1 hora de exposición sin recuperación). \*P <0,01 con respecto al testigo.

*El litio inhibe GSK-3 $\beta$ , lo que reduce la lesión celular y la muerte en las células mesoteliales después de la incubación con fluido de PD*

20 Los fluidos de PD a base de glucosa de pH bajo, con alto contenido de GDP y a base de icodextrina con pH bajo causaron una elevación marcada de LDH, que se produjo en paralelo con una reducción significativa en la viabilidad celular en comparación con los testigos (Figura 2). Los fluidos de PD con pH normal a base de glucosa y a base de aminoácidos causaron una liberación de LDH significativa más moderada (Figura 2) que no se asoció con una muerte celular significativa (no se muestran los datos).

25 En estos sistemas de exposición a fluidos de PD, la inhibición de la actividad de GSK-3 $\beta$  con la adición de LiCl 10 mM, redujo la lesión celular después del tratamiento con todos los fluidos de PD observados, como se refleja en la liberación atenuada de LDH (Figura 2). La protección más prominente se observó después de la incubación con disoluciones a base de glucosa y icodextrina de pH bajo (Figura 2).

30 Por lo tanto, los efectos protectores de LiCl en estos sistemas de exposición se investigaron más a fondo utilizando tinción de vivas-muertas y medición de células viables por captación de rojo neutro. El tratamiento con LiCl dio como resultado una estructura celular preservada (no se muestran los datos), una tasa reducida de células muertas (no se muestran los datos) y un mayor número de células viables (Figura 3) después de la incubación, ya sea con fluidos de PD a base de glucosa o icodextrina de pH bajo.

35 Explicación de la Figura 2: Liberación de LDH en células mesoteliales tratadas con diferentes fluidos de PD comercialmente disponibles con diferentes agentes osmóticos y propiedades tóxicas. Las células testigo se trataron con medio de cultivo celular normal, las células tratadas con PDF se trataron con fluido de PD de pH bajo a base de glucosa con alto contenido de GDP (Dianeal). Fluido de PD a base de icodextrina (Extraneal), tamponado con lactato, con bajo contenido de GDP, pH 7,4 (Balance), fluido de PD tamponado con lactato/bicarbonato, con bajo contenido de GDP, pH 7,4 (Physioneal), fluido de PD a base de aminoácidos (Nutrineal). Se aplicó LiCl a una dosis de 10 mM. #P <0,05 con respecto al testigo, \*P <0,01 con respecto a ausencia de tratamiento con LiCl. (1 hora de exposición, 16 horas de recuperación)

40 Explicación de la Figura 3: Viabilidad celular evaluada por captación de rojo neutro en % en comparación con las células testigo. Las células se trataron con PDF (fluido de PD a base de glucosa de pH bajo con alto contenido de GDP (Dianeal)) o con fluido de PD a base de icodextrina de pH bajo (Extraneal). Se aplicó LiCl a una dosis de 10 mM. #P <0,01 con respecto al testigo, \*P <0,01 con respecto a la ausencia de tratamiento con LiCl. (1 h de exposición, 16 h de recuperación). Las células testigo se trataron con medio de cultivo celular normal.

*LiCl conduce a una mayor actividad de HSF-1*

45 El ensayo de luciferasa mostró que el tratamiento con LiCl aumentó significativamente la actividad transcripcional de HSF-1 en las células testigo y ambas después de la incubación con fluidos de PD a base de glucosa de pH bajo, alto contenido de GDP y a base de icodextrina de pH bajo (Figura 4).

55 Explicación de la Figura 4: Actividad del factor de choque térmico-1 por el ensayo de luciferasa. Las células testigo se trataron con medio de cultivo celular normal, las células tratadas con PDF se trataron con fluido de PD de pH bajo a base de glucosa con alto contenido de GDP (Dianeal). Fluido de PD a base de icodextrina de pH bajo (Extraneal). Se aplicó LiCl a una dosis de 10 mM. (Exposición de 30 min, recuperación de 6 h), #P <0,01 con respecto al testigo, \*P <0,01 con respecto a la ausencia de tratamiento con LiCl, respectivamente.

*El tratamiento con LiCl da como resultado una mayor expresión de HSP-72*

HSP-72 se evaluó en células tratadas con fluido de PD a base de glucosa y pH bajo con alto contenido de GDP o con fluido de PD a base de icodextrina con o sin administración de LiCl después de 30 minutos o 1 h de incubación.

5 La expresión de HSP-72 aumentó ligeramente después de una incubación de 30 minutos y disminuyó significativamente después de una incubación de 1 h con fluido a base de glucosa, de pH bajo y un alto contenido de GDP en comparación con las células testigo (Figura 5). La expresión de HSP-72 aumentó después de 30 minutos de incubación, pero no cambió después de 1 h de incubación con fluido de PD a base de icodextrina en comparación con los testigos (Figura 5). El tratamiento con LiCl aumentó significativamente el nivel de HSP-72 en cada entorno de incubación en comparación con las respectivas células no tratadas.

10 Explicación de la Figura 5: Expresión de proteína de choque térmico-72 (HSP-72) evaluada por transferencia Western. Las células testigo se trataron con medio de cultivo celular normal, las células tratadas con PDF se trataron con fluido de PD de pH bajo a base de glucosa con alto contenido de GDP (Dianeal). Fluido de PD a base de icodextrina de pH bajo (Extraneal). Se aplicó LiCl a una dosis de 10 mM. (30 min - diagrama izquierdo - o 1 h de exposición - diagrama derecho, 16 h de recuperación). \*P <0,05 con respecto al testigo, %P <0,001 con respecto al testigo, &P <0,05 con respecto a ausencia de tratamiento con LiCl, respectivamente.

*Análisis de la curva de dosis de la administración de LiCl*

Para examinar en qué concentraciones el litio mejora eficazmente la lesión de las células mesoteliales, se analizó una curva de dosis durante las incubaciones con fluidos a base de glucosa (PDF) o icodextrina de pH bajo. Se examinó una dosis de LiCl 1 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM.

20 En el fluido a base de glucosa con pH bajo (PDF), el LiCl a una dosis de 1 mM a 5 mM no alteró la liberación de LDH en el sobrenadante (Figura 6), pero como se detectó previamente, el LiCl 10 mM redujo significativamente la liberación de LDH en comparación con los testigos (Figura 6). Durante la incubación con el fluido a base de icodextrina, hubo una curva de respuesta de LDH dependiente de la dosis: el LiCl 1 mM no cambió significativamente, mientras que el LiCl 2 mM ya disminuyó los niveles de LDH y la disminución fue aún más significativa administrando LiCl 5 mM y 10 mM (Figura 6).

25 Explicación de la figura. 6: Liberación de LDH en el sobrenadante. Las células testigo se trataron con medio de cultivo celular normal, las células tratadas con PDF se trataron con fluido de PD de pH bajo a base de glucosa con alto contenido de GDP (Dianeal). Fluido de PD a base de icodextrina con pH bajo (Extraneal). Se aplicó LiCl a una dosis de 1 mM, 2 mM, 5 mM o 10 mM. (30 min de exposición, 6 h de recuperación). #P <0,001 con respecto al testigo, \*P <0,05 con respecto a ausencia de tratamiento con LiCl, respectivamente.

La actividad de HSF-1 evaluada mediante el ensayo Luciferasa mostró que en las células incubadas con PDF a base de glucosa de pH bajo o con PDF a base de icodextrina, hubo un aumento de la actividad de HSF-1 dependiente de la dosis en comparación con las células testigo respectivas (Figura 7).

35 Explicación de la Figura 7: Actividad traslacional del factor de choque térmico (HSF-1) evaluada mediante el ensayo de luciferasa. Las células testigo se trataron con medio de cultivo celular normal, las células tratadas con PDF se trataron con fluido de PD de pH bajo a base de glucosa con alto contenido de GDP (Dianeal). Fluido de PD a base de icodextrina con pH bajo (Extraneal). Se aplicó LiCl a una dosis de 1 mM, 2 mM, 5 mM o 10 mM. (30 min de exposición, 6 h de recuperación). #P <0,01 con respecto al testigo, \*P <0,01 con respecto a ausencia de tratamiento con LiCl, respectivamente.

40 En las células incubadas con PDF de pH bajo a base de glucosa, la expresión de HSP-72 aumentó solo después de la administración de LiCl 2 mM o 10 mM en comparación con las células no tratadas (Figura 8). Por otro lado, después de la incubación con fluido de PD a base de icodextrina, todas las dosis de LiCl aplicadas aumentaron la expresión de la proteína HSP-72 (Figura 8).

45 Explicación de la Figura 8: Expresión de proteína de choque térmico-72 (HSP-72) evaluada por transferencia de Western. Las células testigo se trataron con medio de cultivo celular normal, las células tratadas con PDF se trataron con fluido de PD de pH bajo a base de glucosa con alto contenido de GDP (Dianeal). Fluido de PD a base de icodextrina con pH bajo (Extraneal). Se aplicó LiCl a una dosis de 1 mM, 2 mM, 5 mM o 10 mM. (30 min de exposición, 16 h de recuperación). #P <0,05 con respecto al testigo, \*P <0,05 con respecto a ausencia de tratamiento con LiCl, respectivamente.

**50 Compendio:**

En el presente estudio, el cloruro de litio (LiCl) disminuyó la liberación de LDH, redujo la tasa de mortalidad celular y mejoró la viabilidad celular. El efecto es más pronunciado con las células mesoteliales tratadas con fluidos de PD a base de glucosa de pH bajo y a base de icodextrina, los fluidos de PD comercialmente disponibles con los efectos más significativos sobre la activación de GSK-3β.



**Bibliografia:**

- (1) Davies SJ, Phillips L, Russell GI. *Peritoneal solute transport predicts survival on CAPD independently of residual renal function*. Nephrol Dial Transplant. 1998; 13: 962-68.
- 5 (2) Leung JC, Chan LY, Li FF, Tang SC, Chan KW, Chan TM *et al*. *Glucose degradation products downregulate ZO-1 expression in human peritoneal mesothelial cells: the role of VEGF*. Nephrol Dial Transplant. 2005; 20: 1336-49.
- (3) Amore A, Cappelli G, Cirina P, Conti G, Gambaruto C, Silvestro L *et al*. *Glucose degradation products increase apoptosis of human mesothelial cells*. Nephrol Dial Transplant. 2003;18: 677-88.
- 10 (4) Juhaszova M, Zorov DB, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. *Role of glycogen synthase kinase-3beta in cardioprotection*. Circ Res. 2009; 104: 1240-52. Revisión.
- (5) Pugazhenthii S, Khandelwal RL. *Regulation of glycogen synthase activation in isolated hepatocytes*. Mol Cell Biochem. 1995; 149-150:95-101.
- (6) Cuzzocrea S, Di Paola R, Mazzon E, Crisafulli C, Genovese T, Muià C *et al*. *Glycogen synthase kinase 3beta inhibition reduces the development of nonseptic shock induced by zymosan in mice*. Shock. 2007; 27: 97-107.
- 15 (7) Hatakeyama D, Kozawa O, Niwa M, Matsuno H, Ito H, Kato K, Tatematsu N, Shibata T, Uematsu T. *Upregulation by retinoic acid of transforming growth factor-beta-stimulated heat shock protein 27 induction in osteoblasts: involvement of mitogen-activated protein kinases*. Biochim Biophys Acta. 2002; 1589: 15-30.
- (8) Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. *GSK-3beta regulates cyclin D1 expression: a new target for chemotherapy*. Cell Signal. 2008; 20: 581-9.
- 20 (9) Kline MP, Morimoto RI. *Repression of the heat shock factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation*. Mol Cell Biol. 1997; 17: 2107-15.
- (10) He, Y.H. Meng and N.F. Mivechi. *Glycogen synthase kinase 3β and extracellular signal-regulated kinase inactivate heat shock transcription factor 1 by facilitating the disappearance of transcriptionally active granules after heat shock*. Mol. Cell Biol. 1998; 18: 6624-6633.
- 25 (11) Chu, R. Zhong, F. Soncin, M.A. Stevenson and S.K. Calderwood, *Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 degrees C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases Ca and Cγ*. J. Biol. Chem. 1998; 273: 18640-18646.
- (12) Riesenhuber A, Kasper DC, Vargha R, Endemann M, Aufricht C. *Quercetin protects human mesothelial cells against exposure to peritoneal dialysis fluid*. Pediatr Nephrol. Agosto 2007; 22(8):1205-8.
- 30 (13) Bidmon B, Endemann M, Arbeiter K, Ruffingshofer D, Regele H, Herkner K, Eickelberg O, Aufricht C. *Overexpression of HSP-72 confers cytoprotection in experimental peritoneal dialysis*. Kidney Int. Diciembre 2004;66(6):2300-7.
- (14) Kratochwill K, Boehm M, Herzog R, Lichtenauer A, Salzer E, Lechner M, Kuster L, Bergmeister K, Rizzi A, Mayer B, Aufricht C. *Alanyl-Glutamine dipeptide restores the cytoprotective stress proteome of mesothelial cells exposed to peritoneal dialysis fluids*. Nephrol Dial Transplant in press.
- 35 (15) Mariappan MM, Shetty M, Sataranatarajan K, Choudhury GG, Kasinath BS. *Glycogen synthase kinase 3beta is a novel regulator of high glucose- and high insulin-induced extracellular matrix protein synthesis in renal proximal tubular epithelial cells*. J Biol Chem. 2008; 283: 30566-75.
- (16) Cohen P, Goedert M. *GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov. 2004; 3:479-87.
- 40 (17) Jope RS, Yuskaitis CJ, Beurel E. *Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics*. Neurochem Res. 2007; 32: 577-95.
- (18) Ryves WJ, Harwood AJ. *Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium*. Biochem Biophys Res Commun 2001; 280: 720-725.
- 45 (19) Zhou Y, Mao H, Li S, Cao S, Li Z, Zhuang S *et al*. *HSP72 inhibits Smad3 activation and nuclear translocation in renal epithelial-to-mesenchymal transition*. J Am Soc Nephrol. 2010; 21: 598-609.
- (20) Lin KH, Guh JY, Mo JF, Chiou SJ, Hwang CC, Chuang LY. *Advanced glycation end-product-inhibited cell proliferation and protein expression of beta-catenin and cyclin D1 are dependent on glycogen synthase kinase 3beta in LLC-PK1 cells*. Arch Biochem Biophys. 2008; 477: 27-32.

- (21) Rowe MK, Wiest C, Chuang DM. *GSK-3 is a viable potential target for therapeutic intervention in bipolar disorder*. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007;31(6):920-31.
- 5 (22) Chuang DM, Wang Z, Chiu CT. *GSK-3 as a Target for Lithium-Induced Neuroprotection Against Excitotoxicity in Neuronal Cultures and Animal Models of Ischemic Stroke*. *Front Mol Neurosci*. 2011;4:15. Epub 9 de Agosto de 2011.
- (23) Gum RJ, Gaede LL, Koterski SL, Heindel M, Clampit JE, Zinker BA *et al*. *Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice*. *Diabetes* 2003; 52: 21-28.
- 10 (24) Ring DB, Johnson KW, Henriksen EJ, Nuss JM, Goff D, Kinnick TR *et al*. *Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo*. *Diabetes* 2003; 52: 588-595.
- (25) Hsiung SC, Adlersberg M, Arango V, Mann JJ, Tamir H, Liu KP. *Attenuated 5-HT1A receptor signaling in brains of suicide victims: involvement of adenylyl cyclase, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and mitogen-activated protein kinase*. *J Neurochem* 2003; 87: 182-194.
- 15 (26) Morisco C, Seta K, Hardt SE, Lee Y, Vatner SF, Sadoshima J. *Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes*. *J Biol Chem* 2001; 276: 28586-28597.
- (27) Ryves WJ, Dajani R, Pearl L, Harwood AJ. *Glycogen synthase kinase-3 inhibition by lithium and beryllium suggests the presence of two magnesium binding sites*. *Biochem Biophys Res Commun*. Enero 2002 25;290(3):967-72.
- 20 (28) Flynn CT, Chandran PK, Taylor MJ, Shadur CA. *Intraperitoneal lithium administration for bipolar affective disorder in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis*. *Int J Artif Organs*. Marzo 1987;10(2):105-7.
- (29) Lal SM, Moore HL, Groshong TD, Nolph KD. *Lithium carbonate decreases ultrafiltration rates in an experimental model of PD*. *Int J Artif Organs*. Noviembre 1994;17(11):573-5.
- 25 (30) Xu XH, Zhang HL, Han R, Gu ZL, Qin ZH. *Enhancement of neuroprotection and heat shock protein induction by combined prostaglandin A1 and lithium in rodent models of focal ischemia*. *Brain Res*. 2 de agosto de 2006;1102(1): 154-62.
- (31) Xu XH, Hua YN, Zhang HL, Wu JC, Miao YZ, Han R, Gu ZL, Qin ZH. *Greater stress protein expression enhanced by combined prostaglandin A1 and lithium in a rat model of focal ischemia*. *Laboratory of Aging and Nervous Disease, Soochow University School of Medicine, Suzhou, China*.
- 30 (32) Ren M, Senatorov VV, Chen RW, Chuang DM. *Postinsult treatment with lithium reduces brain damage and facilitates neurological recovery in a rat ischemia/reperfusion model*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 13 de mayo de 2003;100(10):6210-5.
- (33) Rowe MK, Chuang DM. *Lithium neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications*. *Expert Rev Mol Med*. 18 de octubre de 2004;6(21):1-18.
- 35 (34) Hu X, Paik PK, Chen J, Yrilina A, Kockeritz L, Lu TT, Woodgett JR, Ivashkiv LB. *IFN-γ suppresses IL-10 production and synergizes with TLR2 by regulating GSK3 and CREB/AB-1 proteins*. *Immunity*. Mayo 2006; 24:563-574.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Fluido de diálisis peritoneal que comprende un compuesto que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3, en particular la actividad de (GSK)-3 $\beta$ , para su uso en la prevención de complicaciones peritoneales infecciosas y no infecciosas causadas por el tratamiento con un fluido de diálisis peritoneal, en donde estas complicaciones se seleccionan entre peritonitis, lesión, daño y falla de la membrana peritoneal, disfunción de barrera y desprendimiento de células mesoteliales.
2. Fluido de diálisis peritoneal para su uso según la reivindicación 1, caracterizado por que el fluido de diálisis peritoneal se selecciona del grupo que consiste en fluidos de diálisis a base de carbohidratos y fluidos de diálisis a base de aminoácidos.
- 10 3. Fluido de diálisis peritoneal para su uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que el valor de pH del fluido de diálisis peritoneal es 7,3 o menor, preferiblemente 7,0 o menor, lo más preferiblemente 6,0 o menor.
4. Fluido de diálisis peritoneal para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el fluido de diálisis peritoneal se basa en icodextrina.
- 15 5. Fluido de diálisis peritoneal a base de icodextrina, que comprende un compuesto que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3, en particular la actividad de (GSK)-3 $\beta$ .
6. Un compuesto que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3, en particular la actividad de (GSK)-3 $\beta$  para su uso en la prevención de complicaciones peritoneales infecciosas y no infecciosas causadas por el tratamiento con un fluido de diálisis peritoneal, en donde estas complicaciones se seleccionan de peritonitis, lesión, daño y falla de la membrana peritoneal, disfunción de barrera y desprendimiento de células mesoteliales.
- 20 7. Compuesto para su uso según la reivindicación 6, caracterizado por administrarse junto con un fluido de diálisis peritoneal en el curso de un tratamiento con diálisis peritoneal.
8. Compuesto para su uso según la reivindicación 6 o 7, caracterizado por que el fluido de diálisis peritoneal se selecciona del grupo que consiste en fluidos de diálisis a base de carbohidratos y fluidos de diálisis a base de aminoácidos.
- 25 9. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, caracterizado por que el valor de pH del fluido de diálisis peritoneal es 7,3 o menor, preferiblemente 7,0 o menor, lo más preferiblemente 6,0 o menor.
- 30 10. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado por que el fluido de diálisis peritoneal se basa en icodextrina.
- 35 11. Fluido de diálisis peritoneal para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, fluido de diálisis peritoneal según la reivindicación 5, o compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, caracterizado por que el compuesto que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3 se selecciona del grupo que consiste en litio, tideglusib, NP-103, inhibidor I de GSK-3 $\beta$  (TDZD-8,4-Bencil-2-metil-1,2,4-tiadiazolidina-3,5-diona), inhibidor II de GSK-3 $\beta$  (2-Tio(3-yodobencil)-5-(1-piridil)-[1,3,4]-oxadiazol), inhibidor IV de GSK-3 (SB-216763, 3-(2,4-Diclorofenil)-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2,5-diona), inhibidor IX de GSK-3 (BIO, (2'Z,3'E)-6-Bromindirrubin-3'-oxima), inhibidor VI de GSK-3 $\beta$  (2-Cloro-1-(4,5-dibromo-tiofen-2-il)-etanona), inhibidor VII de GSK-3 $\beta$  (2,4'-Dibromoacetofenona), inhibidor VIII de GSK-3 $\beta$  (AR AO14418, N-(4-Metoxibencil)-N'-(5-nitro-1,3-tiazol-2-il)urea), inhibidor X de GSK-3 (BIO-Acetoxima, (2'Z,3'E)-6-Bromindirrubin-3'-acetoxima), inhibidor XI de GSK-3 $\beta$  (3-(1-(3-Hidroxipropil)-1H-pirrol[2,3-b] piridin-3-il)-4-pirazin-2-il-pirrol-2,5-diona, 7AIPM), inhibidor XIII de GSK-3 (5-Metil-1H-pirazol-3-il)-(2-fenilquinazolin-4-il)amina), inhibidor XII de GSK-3 $\beta$  (TWS119, ditrifluoroacetato de 3-[[6-(3-aminofenil)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il]oxifenol), inhibidor XVIII de GSK-3 $\beta$  (2-(Cloro-4-(4-tiofen-2-il-pirimidin-2-ilamino)-fenil)-(4-metil-piperazin-1-il)-metanona), inhibidor X de GSK-3 $\beta$  (BIO-Acetoxima, (2'Z,3'E)-6-Bromindirrubina-3'-acetoxima), inhibidor XI de GSK-3 $\beta$  (3-(1-(3-Hidroxipropil)-1H-pirrol[2,3-b]piridin-3-il)-4-pirazin-2-il-pirrol-2,5-diona, 7AIPM), inhibidor XIX de GSK-3 $\beta$  (IM-12, C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, derivado de indolilmaleimida), inhibidor XVI de GSK-3 (6-(2-(4-(2,4-Diclorofenil)-5-(4-metil-1H-imidazol-2-il)-pirimidin-2-ilamino)etil-amino)-nicotinonitrilo, CHIR99021), inhibidor XVII de GSK-3 (5-Bencilamino-3-oxo-2,3-dihidro-1,2,4-tiadiazol, TDZD-20), inhibidor XXII de GSK-3, compuesto A (6-Metil-N-[3-[[3-(1-metiletoxi)propil]carbamoil]-1H-pirazol-4-il]piridina-3-carboxamida), inhibidor XXIII de GSK-3 $\beta$ , 3F8 (5-Etil-7,8-dimetoxi-1H-pirrol[3,4-c]-isoquinolina-1,3-(2H)-diona), inhibidor peptídico de GSK-3 $\beta$  (L803, H-KEAPPAPPQSpP-NH<sub>2</sub>), inhibidor peptídico de GSK-3 $\beta$  (L803-mts, Myr-N-GKEAPPAPPQSpP-NH<sub>2</sub>), GF-109203X (2-[1-(3-Dimetilaminopropil)indol-3-il]-3-(indol-3-il)maleimida) y sales y mezclas farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 55 12. Fluido de diálisis peritoneal para su uso, fluido de diálisis peritoneal o compuesto para su uso según la reivindicación 11, caracterizado por que el compuesto que inhibe la actividad de la glucógeno sintasa cinasa (GSK)-3 es una sal de litio, en particular cloruro de litio o carbonato de litio.

13. Fluido de diálisis peritoneal para su uso, fluido de diálisis peritoneal o compuesto para su uso según la reivindicación 12, caracterizado por que la concentración de la sal de litio en el fluido de diálisis es de 1 mM a 10 mM, preferiblemente de 2 mM a 5 mM.

FIGURA 1

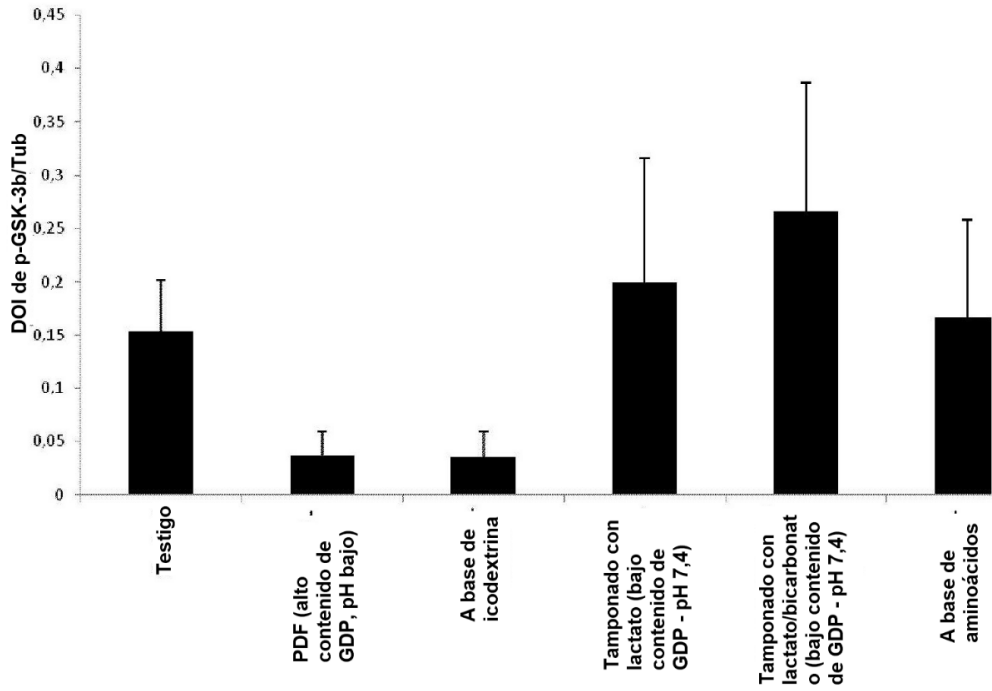


FIGURA 2

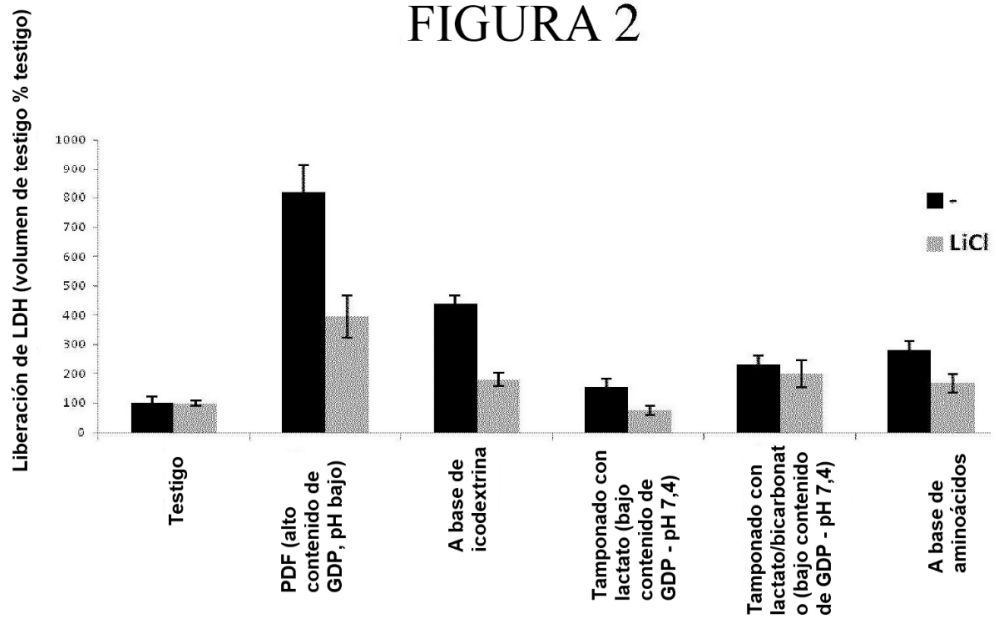


FIGURA 3

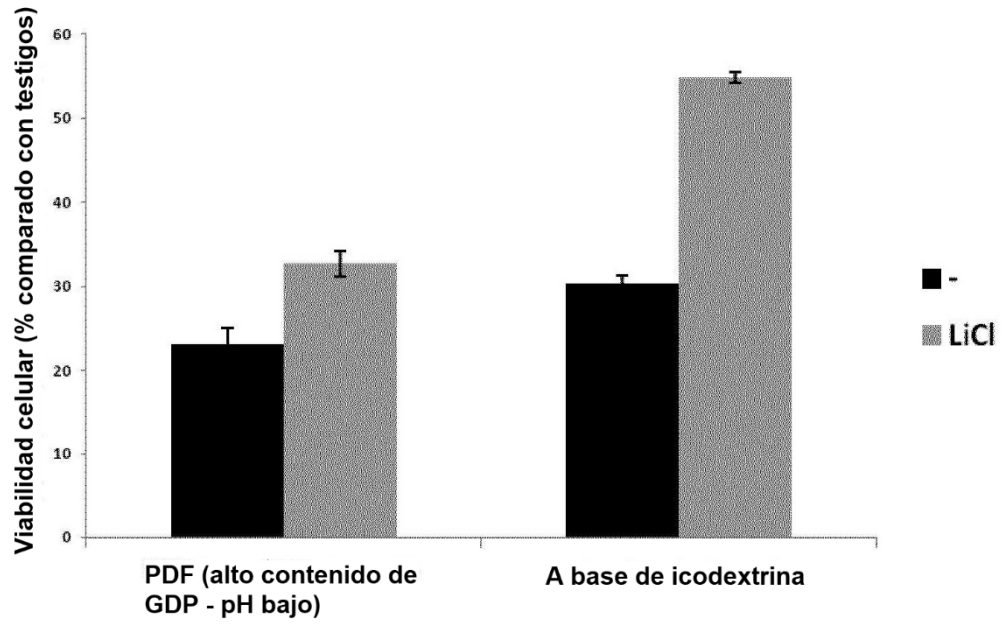


FIGURA 4

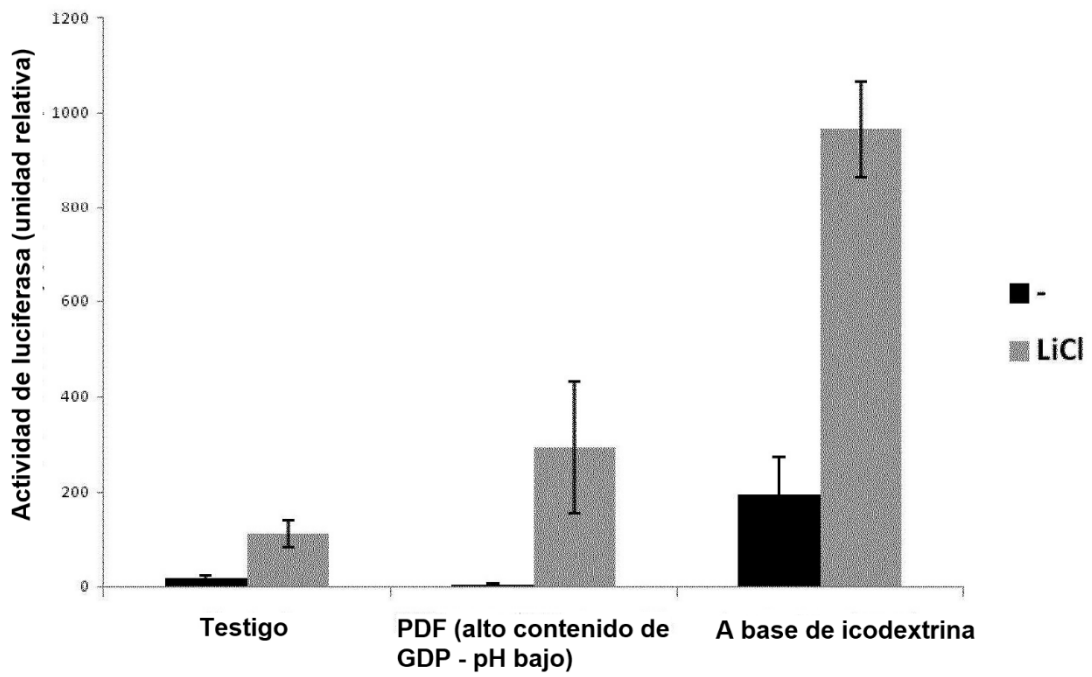


FIGURA 5

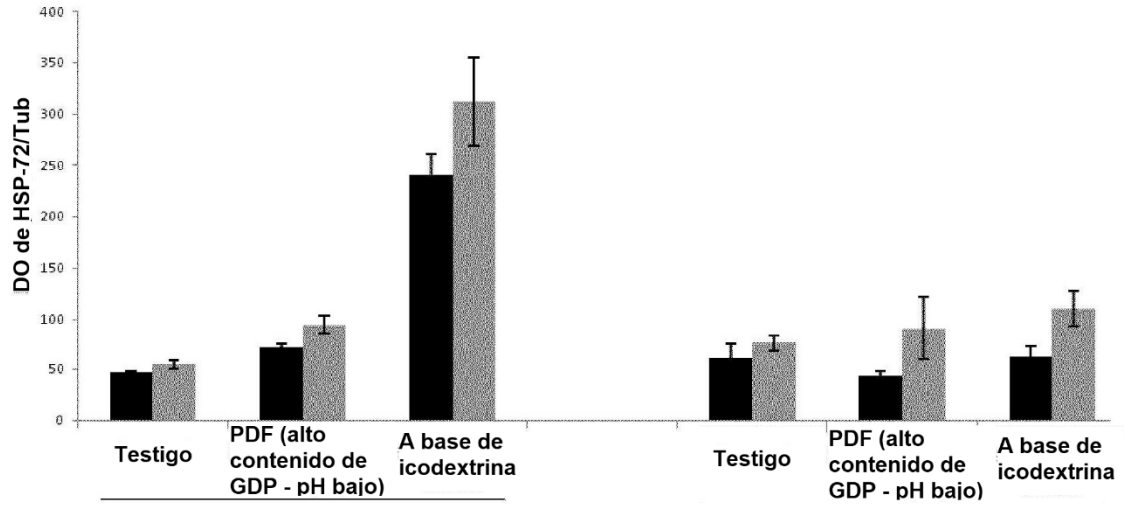


FIGURA 6

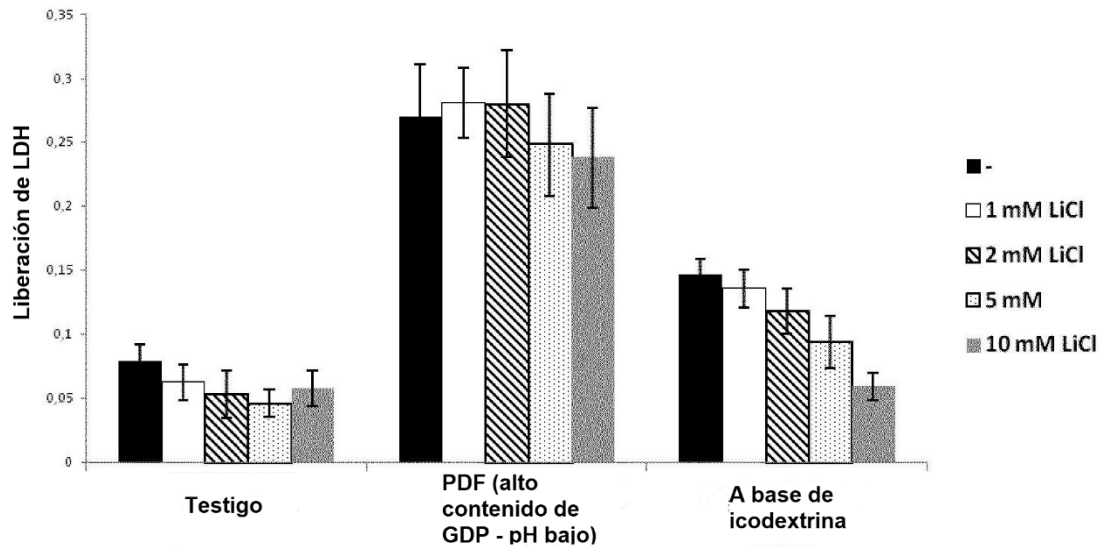


FIGURA 7

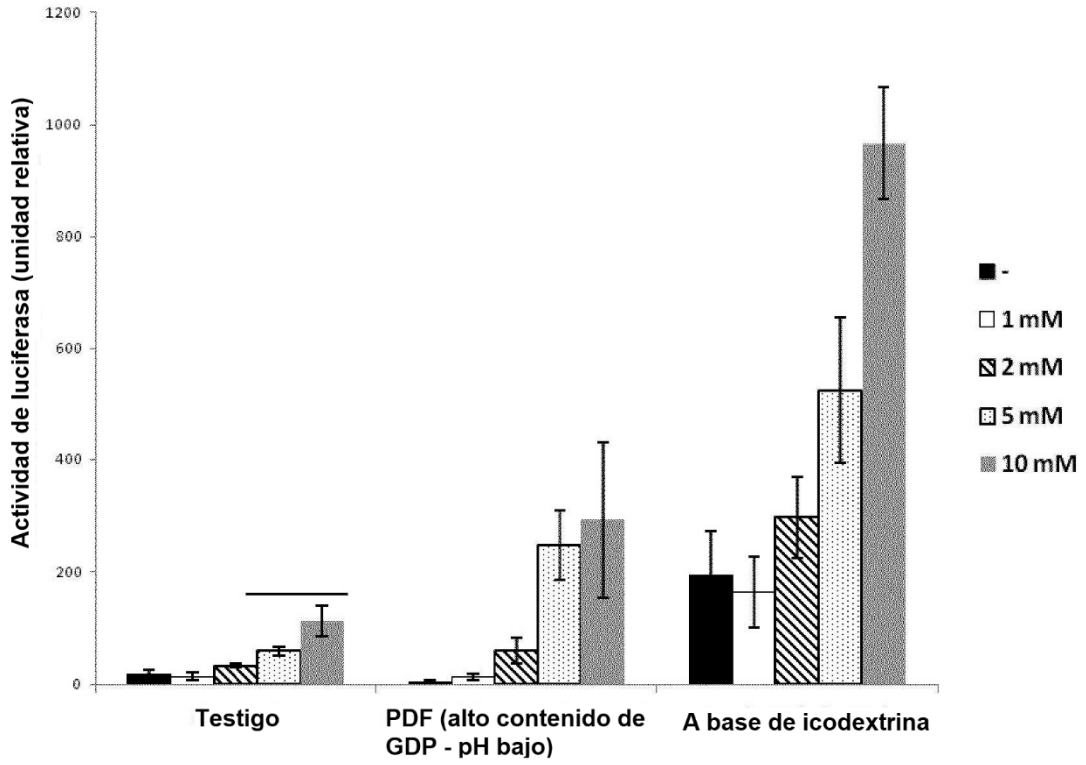


FIGURA 8

