



## ORIGINALES

# *Influencia de factores exógenos en la capacidad de proliferación ex vivo de las células mesoteliales obtenidas de efluente de pacientes tratados con diálisis peritoneal crónica*

M. A. Castro, M. A. Bajo, G. del Peso, C. Larrocha\*, M. J. Castro, J. A. Sánchez-Tomero\*\*, A. Cirugeda\*\*, A. Aguilera\*\*, V. Álvarez\*\*, O. Costero, F. Vara\*\*\*, J. L. Fernández-Chacón\* y R. Selgas\*\*

\*Servicio de Nefrología y Servicio de Hematología-Analítica. Hospital Universitario La Paz. \*\*Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de La Princesa. \*\*\*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. Grupo de estudios peritoneales de Madrid. Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas.

## RESUMEN

*Las células mesoteliales (CM) constituyen la primera barrera de la membrana peritoneal con lo que contacta el líquido de diálisis. El objetivo de este estudio es explorar in vitro la capacidad de determinados agentes farmacológicos de modificar la proliferación ex vivo de las CM procedentes del efluente peritoneal de pacientes tratados con diálisis peritoneal (DP).*

**Material y Métodos:** *Se han realizado 30 cultivos de CM procedentes de efluente peritoneal nocturno. Las CM tras su identificación se subcultivan en placas de 24 pocillos a las que se añadieron los agentes seleccionados. La capacidad proliferativa mesotelial se estimó en el día 16<sup>o</sup> a la vez que se evaluó la morfología celular. Los agentes fueron seleccionados por su potencial influencia en las CM y por ser utilizados en pacientes en DP. Se analizaron los efectos de la insulina, IGF-1, tamoxifeno, labetalol, carvedilol, enalapril y losartán.*

**Resultados:** *La insulina ejerció un efecto dosis respuesta sobre el crecimiento de CM aumentado por la concentración de suero bovino fetal (SBF). Este efecto cesa a concentraciones de 100 µg/ml, observándose posteriormente un efecto negativo. El IGF-1 no afectó a la proliferación mesotelial. El tamoxifeno solamente afectó a la capacidad proliferativa mesotelial a concentraciones muy elevadas. El labetalol no modifica el crecimiento mesotelial dentro del rango terapéutico, pero a concentraciones de 40 µg/ml muestra una influencia negativa protegida por el incremento en la concentración de SBF y a partir de 100 µg/ml produce un efecto letal sobre la CM. Estos efectos se reproducen con el carvedilol. El enalapril y*

Recibido: 27-V-2002.

En versión definitiva: 23-XII-2002.

Aceptado: 3-I-2003.

**Correspondencia:** Dra. M.<sup>a</sup> Auxiliadora Bajo  
Servicio de Nefrología  
Hospital Universitario La Paz  
Paseo de la Castellana, 261  
28046 Madrid  
E-mail: mabajo.hulp@salud.madrid.org

Este estudio ha sido financiado con una Ayuda a la Investigación de la Sociedad Española de Nefrología (año 1999).

*el losartán se comportaron como agentes antiproliferativos a nivel mesotelial. Este efecto se acentúa en presencia de angiotensina II, siendo letal con dosis crecientes.*

*En conclusión el estudio de los cultivos de CM tomadas del efluente peritoneal de pacientes en DP es útil para analizar los efectos sobre la proliferación celular que pueden tener diferentes agentes administrados a estos pacientes. Los agentes exógenos analizados influyen de diferente manera en la capacidad de proliferación de las células mesoteliales, siendo recomendable investigar la relación de estos hallazgos con lo que realmente ocurre in vivo.*

**Palabras clave:** *Célula mesotelial. Diálisis peritoneal. Insulina. IGF-1. Tamoxifeno. Betabloqueantes. Enalapril. Losartán.*

### **INFLUENCE OF DIFFERENT PHARMACOLOGICAL AGENTS IN THE EX VIVO PROLIFERATION OF MESOTHELIAL CELLS OBTAINED FROM THE PERITONEAL EFFLUENT OF PATIENTS TREATED WITH PERITONEAL DIALYSIS**

#### **SUMMARY**

*Mesothelial cells (MC) are the first peritoneal membrane barrier in contact with dialysate. The aim of this study was to analyze the in vitro capacity of different pharmacological agents to modify the ex vivo proliferation of MC obtained from the peritoneal effluent of patients treated with peritoneal dialysis (PD).*

**Material and Methods:** *Thirty cultures of MC taken from nocturnal peritoneal effluent were performed. After identification, MC are subcultured in 24 multi-well plates, adding the different exogenous agents. Proliferative capacity and cell morphology were estimated on day 16<sup>th</sup> of culture. The agents evaluated were insulin, IGF-1, tamoxifen, labetalol, carvedilol, enalapril and losartan.*

**Results:** *Insulin shows a dose-dependent effect on MC growth, with a limit that is stimulated by the addition of fetal bovine serum (FBS). Concentrations higher than 100 µg/ml, are not associated with further growth, even with cell damage. In contrast, the wide range of IGF-1 dose used did not affect to MC proliferation. Tamoxifen causes negative effects on MC growth just a very high doses, not resembling doses in clinical practice. Labetalol does not modify MC proliferation used under therapeutic calculated range. However, concentrations higher than 40 µg/ml showed a negative influence on growth, behaving as lethal doses that over 100 µg/ml. The addition of FBS attenuates this effect. These effects were very similar to that caused by carvedilol addition. Enalapril and losartan act as antiproliferative agents for MC. This effect is potentiated with angiotensin II, reaching lethal concentrations increasing the dose.*

*In conclusion, mesothelial cell growth ex vivo taken from nocturnal peritoneal effluent on PD patients is an useful tool to explore the effects of any pharmacological agent on the biology of the cell of the peritoneum. The agents used had any influence in the proliferation capacity of mesothelial cells.*

**Key words:** *Mesothelial cell. Peritoneal dialysis. Insulin. IGF-1. Tamoxifen. Betablockers. Enalapril. Losartan.*

## **INTRODUCCIÓN**

La estabilidad de la membrana peritoneal es esencial para el paciente en diálisis peritoneal (DP), siendo un objetivo esencial mantenerla sin dañar su estructura. Las células mesoteliales (CM) constituyen la primera barrera con la que contacta constante-

mente el líquido de diálisis<sup>1-5</sup>. La composición actual del mismo nos hace considerarlo como un fluido bioincompatible, en la medida en que es capaz de alterar la biología de las células peritoneales<sup>6-8</sup>. Esta situación supone un reto continuo para la estabilidad de las CM y por ello les exige una regeneración constante.

Toda la investigación realizada sobre las CM ha estado basada en su obtención para cultivo utilizando el epiplón como fuente de las mismas. La metodología de cultivo de CM procedentes del efluente peritoneal aporta la posibilidad de obtener información regular de pacientes en DP a través de sus células liberadas diariamente. Es por tanto una exploración incruenta que abre múltiples posibilidades para profundizar en el conocimiento de la membrana peritoneal y valorar influencias de agentes exógenos sobre la capacidad proliferativa de la CM.

Los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) en diálisis reciben numerosos fármacos para controlar su enfermedad. Nuestro grupo previamente había observado que ciertos agentes pueden influir en la actividad mitogénica del efluente peritoneal<sup>9</sup>. Esto nos ha conducido a explorar la capacidad de determinados fármacos de modificar la proliferación mesotelial. La elección de los mismos se ha realizado teniendo en cuenta su interés en el tratamiento de los pacientes en DP e incluye agentes proliferativos (insulina e IGF-1), agentes antiproliferativos (tamoxifeno), betabloqueantes (labetalol y carvedilol) y fármacos relacionados con el sistema renina/angiotensina (SRA) (enalapril y losartán). El objetivo de este estudio es explorar *in vitro* la capacidad de estos agentes exógenos de modificar la proliferación *ex vivo* de CM tomadas de forma incruenta del efluente peritoneal de pacientes con DP.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Pacientes

Los pacientes seleccionados para recoger sus CM habían demostrado previamente su capacidad de proliferación mesotelial en cultivo. Se han excluido pacientes con enfermedades sistémicas y diabetes, así como aquellos que utilizaban los fármacos analizados en el estudio. Cada experimento completo se ha realizado con las CM de tres pacientes distintos para evitar la interferencia de hallazgos individuales de cada sujeto.

### Metodología de cultivo

Se han realizado 30 cultivos de CM procedentes de efluente peritoneal nocturno. La metodología inicial de crecimiento en frasco de cultivo T-25 para obtención de CM en número suficiente ha sido descrita previamente<sup>10,11</sup>. Tras su identificación positiva para citoqueratina y negativa para vimentina y factor vW (von Willebrand), las CM se subcultivan en placas de 24 pocillos en cantidades homogéneas de 20.000 células por pocillo a las que se añade cada

uno de los agentes seleccionados. El cultivo en las multiplacas de cada paciente se ha realizado por duplicado utilizando dos concentraciones de suero bovino fetal (SBF) (5% y 10%). Con dichas concentraciones se logra obtener un crecimiento aceptable de las CM, evitando conseguir la máxima capacidad proliferativa que se logra con el 20% de SBF según la técnica de referencia. El medio de cultivo se recambia cada 3-4 días, así como las distintas concentraciones de cada uno de los agentes añadidos.

La capacidad proliferativa mesotelial ha sido estimada en el día 16<sup>o</sup> después de la siembra en las placas de 24 pocillos. Al mismo tiempo se ha evaluado la morfología celular realizando preparaciones en citocentrífuga teñidas con May Grünwald Giemsa.

### Elección y dosificación de los agentes

Las dosis de los agentes utilizadas se han calculado estimando la concentración terapéutica en sangre peritoneal de la dosis habitualmente administrada (volumen de distribución mitad del peso corporal, volumen intravascular de 5 litros, flujo sanguíneo 100 ml/min y superficie peritoneal 1-1,73 m<sup>2</sup>). Se ha calculado la equivalencia del número de CM por cm<sup>2</sup> peritoneal para finalmente corregirlo para la superficie del pocillo que contiene 20.000 CM. Esta dosis ha sufrido diluciones (100 y 10 veces inferior) y concentraciones (10, 20, 40 y 100 veces superior). El primer grupo de pocillos es el control y sólo contiene el medio habitual con las distintas cantidades de SBF. Todas las dosificaciones se han estudiado por triplicado.

Los agentes seleccionados para el estudio lo fueron por los siguientes motivos:

#### 1. Agentes proliferativos: Insulina e IGF-1.

La insulina se administra por vía intraperitoneal en algunos pacientes en DP. Añadida a las bolsas de DP produce un incremento en la mitogenicidad del efluente peritoneal en cultivos de fibroblastos de ratón<sup>12</sup>. Además la hiperinsulinemia está asociada con niveles normales o altos en suero de IGF-BP-1, lo que sugiere que la insulina no afecta a la producción de IGF-BP-1 en estos pacientes<sup>13</sup>. La dosis recomendada en cultivo para la insulina es de 5 µg/ml siendo compatible con la dosis supuestamente terapéutica. Se han ensayado las siguientes concentraciones: 0,05 µg/ml, 0,5 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml y 500 µg/ml. La concentración de IGF-1 en plasma es hasta 1.000 veces la de la insulina, pero existen factores que disminuyen su actividad. El rango de dosis aconsejado en cultivo es de 0,2 a 20 ng/ml aunque se puede usar hasta 100 ng/ml. Se han ensayado concentraciones de 0,002 ng/ml, 0,02 ng/ml, 0,2 ng/ml, 20 ng/ml, 40 ng/ml y 100 ng/ml.

2. *Agentes antiproliferativos*: tamoxifeno.

El tamoxifeno modificando la producción intracelular de TGF- $\beta$  y su utilidad puede ser de interés en la esclerosis peritoneal. En células endoteliales y de músculo liso de los vasos sanguíneos, el tamoxifeno induce un incremento en la producción de TGF- $\beta$  y una disminución en el tamaño de la placa de aterosclerótica<sup>14,15</sup>. En fibroblastos y células cancerosas disminuye la producción de TGF- $\beta$ <sup>16,17</sup>. Para la dosificación de este fármaco hemos tenido en cuenta su concentración plasmática alta 300 ng/ml. Se han ensayado concentraciones de 0,003  $\mu\text{g/ml}$ , 0,03  $\mu\text{g/ml}$ , 0,3  $\mu\text{g/ml}$ , 3  $\mu\text{g/ml}$ , 6  $\mu\text{g/ml}$ , 12  $\mu\text{g/ml}$  y 30  $\mu\text{g/ml}$ .

3. *Agentes betabloqueantes*: labetalol y carvedilol (agente alfa y betabloqueante).

Estos fármacos están relacionados con efectos indeseables en la producción mesotelial de fosfolípidos. Diversos estudios han demostrado su relación con la peritonitis esclerosante<sup>18-20</sup>. Esta alteración puede ir precedida de un incremento en la permeabilidad peritoneal, lo cual puede sugerir la existencia de una modificación en las CM o la pérdida de estas<sup>21</sup>. Esto permitiría el contacto directo del líquido de diálisis con los fibroblastos provocando un estímulo en la activación fibroblástica<sup>22</sup>. Sin embargo, este efecto no se ha observado en cultivo de fibroblastos humanos y de ratón a los que se les añadió efluente peritoneal de pacientes tratados con betabloqueantes<sup>23</sup>. Para establecer la concentración de labetalol se considera 4.000  $\mu\text{g/ml}$  como dosis fisiológica. En el estudio se han ensayado concentraciones de 0,04  $\mu\text{g/ml}$ , 0,04  $\mu\text{g/ml}$ , 4  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$  y 400  $\mu\text{g/ml}$ . Para el carvedi-

lol, la dosis fisiológica es de 50 ng/cm<sup>2</sup>. Se han utilizado concentraciones de 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ , 200  $\mu\text{g/ml}$  y 500  $\mu\text{g/ml}$ .

4. *Agentes relacionados con el sistema renina/angiotensina (SRA)*: enalapril y losartán.

Los antihipertensivos que bloquean el SRA, inhibidores del enzima de conversión de la angiotensina II (AII) (IECAS) bloqueantes del receptor de la AII (ARAs), pueden producir una reducción en el volumen de ultrafiltración de los pacientes en DP al suprimir la expresión de aquaporinas en el peritoneo<sup>24</sup>. Los IECAs inhiben la producción de TGF- $\beta$  por parte de las CM y por tanto podrían prevenir la fibrosis inducida por los líquidos de diálisis hipertónicos<sup>25</sup>. La concentración fisiológica de enalapril es 0,12 ng/cm<sup>2</sup>. Se han usado las concentraciones de 0,0012  $\mu\text{g/ml}$ , 0,012  $\mu\text{g/ml}$ , 0,12  $\mu\text{g/ml}$ , 1,2  $\mu\text{g/ml}$ , 2,4  $\mu\text{g/ml}$ , 4,8  $\mu\text{g/ml}$  y 12  $\mu\text{g/ml}$ . La concentración fisiológica de losartán sería de 1  $\mu\text{g/ml}$  y las utilizadas han sido 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$ , 40  $\mu\text{g/ml}$  y 100  $\mu\text{g/ml}$ . La AII se ha utilizado sola, como control, o combinada con cada uno de los fármacos mencionados. La concentración habitual de AII para cultivo es de 10<sup>-7</sup> M a 10<sup>-9</sup> M (coincide con la fisiología). Se han usado concentraciones entre 10<sup>-5</sup> M y 10<sup>-12</sup> M.

**RESULTADOS**

1. *Agentes proliferativos*: En la figura 1 se muestra el efecto de la insulina sobre el crecimiento de CM. Se trata de un efecto dosis respuesta incre-

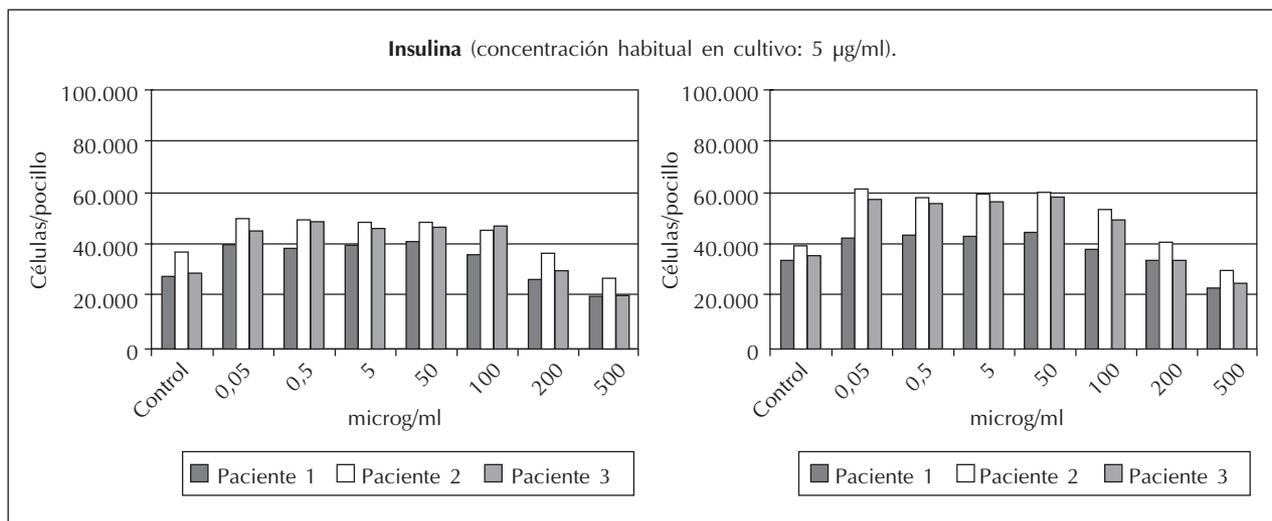


Fig. 1.—Efecto de la adición de insulina al cultivo de CM procedentes del efluente peritoneal de pacientes tratados con DP. En el lado derecho, datos correspondientes al estudio realizado con SBF al 10% y en el lado izquierdo, datos correspondientes al estudio con SBF al 5%.

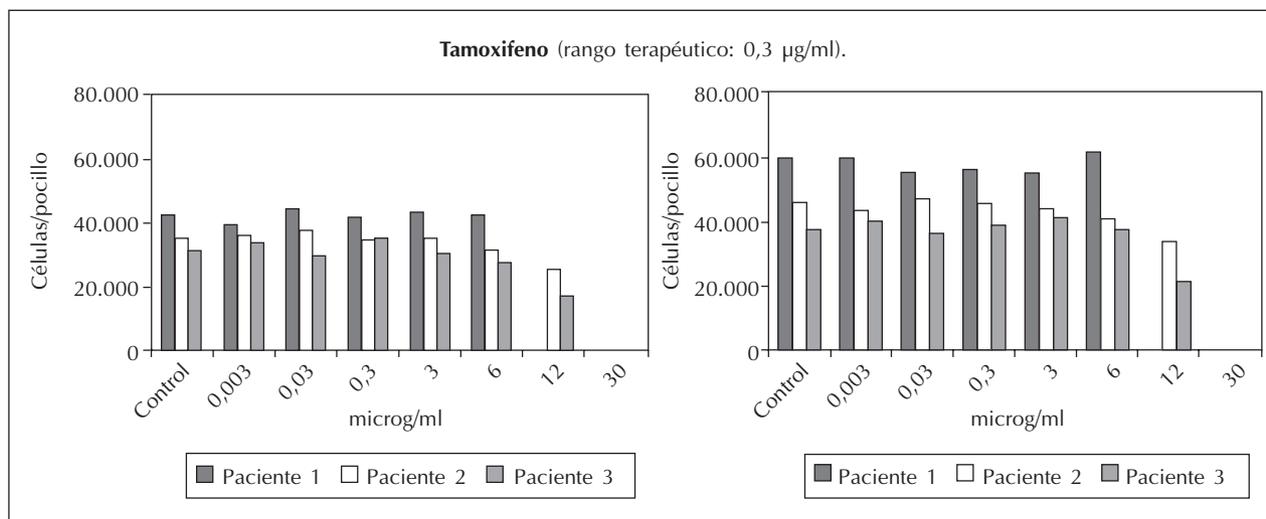


Fig. 2.—Efecto de la adición de tamoxifeno al cultivo de CM procedentes del efluente peritoneal de pacientes tratados con DP. En el lado derecho, datos correspondientes al estudio realizado con SBF al 10% y en el izquierdo, datos correspondientes al estudio con SBF al 5%.

mentado por la concentración creciente de SBF, que cesa en torno a concentraciones de insulina 100 µg/ml (40 veces superiores a la concentración terapéutica, observándose un efecto negativo progresivo sobre la capacidad proliferativa. El IGF-1 no afectó a la proliferación mesotelial con el amplio margen de dosis utilizado.

2. *Agentes antiproliferativos*: La figura 2 muestra como el tamoxifeno no influyó sobre la capacidad proliferativa de las CM excepto cuando se utilizaron concentraciones superiores a 12 µg/ml (40 veces por

encima de la dosis recomendada) y siempre con independencia de la concentración del SBF utilizada.

3. *Agentes betabloqueantes*: El labetalol (fig. 3) no produce cambios en el crecimiento mesotelial dentro del rango terapéutico, pero utilizado en concentraciones de 40 µg/ml (10 veces superiores), se aprecia una ligera influencia negativa protegida por el incremento en la concentración del SBF. Dosis más elevadas (100 µg/ml) producen un efecto letal sobre las CM. Estos efectos se reproducen con el carvedilol, que muestra una influencia negativa con dosis

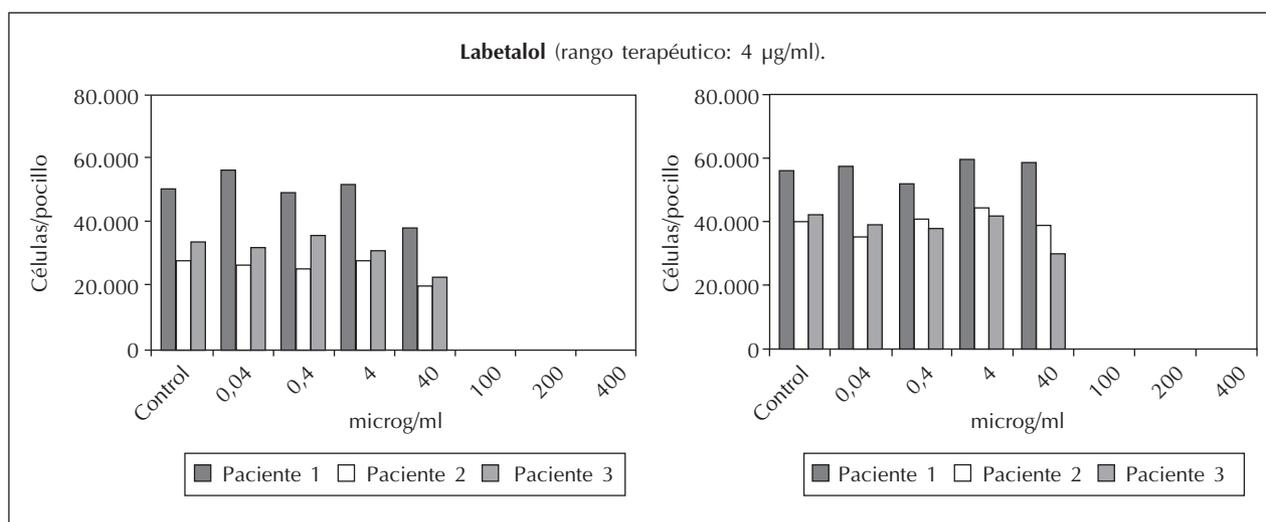


Fig. 3.—Efecto de la adición de labetalol al cultivo de CM procedentes del efluente peritoneal de pacientes tratados con DP. En el lado derecho, datos correspondientes al estudio realizado con SBF al 10% y en el izquierdo, datos correspondientes al estudio con SBF al 5%.

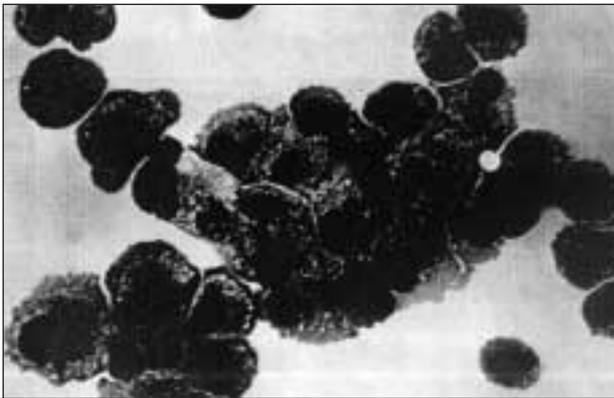


Fig. 4.—Aspecto morfológico de las células mesoteliales procedentes del efluente peritoneal teñidas con May-Grünwald-Giemsa (160x) en presencia de labetalol.

de 50 µg/ml (10 veces por encima de la terapéutica), confirmada a dosis de 100 µg/ml (20 veces superior), con efecto dosis-respuesta y protección parcial del SBF al 10%. Dosis iguales o superiores a 50 µg/ml producen muerte celular. La utilización de estos agentes conlleva también la aparición de importantes alteraciones de la morfología de las CM. Los cambios observados son displasias consistentes en aparición de células de aspecto blastoide, hiperbasófilas con citoplasmas «granulientos» (fig. 4). Estas alteraciones aparecen con el labetalol desde dosis terapéuticas y con el carvedilol a dosis 10 veces por encima del rango fisiológico, siendo el grado de displasia más intenso a medida que aumenta la dosis.

4. *Agentes relacionados con el SRA:* El estudio de All como control muestra que el crecimiento mesotelial no se afecta, por lo que se decidió utilizar la dosis de  $10^{-8}$  M en los experimentos con los agentes. Al analizar el comportamiento del enalapril añadido al cultivo en ausencia de All observamos que los efectos sobre la disminución de la proliferación celular no se manifiestan hasta 4,8 µg/ml (40 veces la dosis terapéutica), existiendo una acción protectora del SBF (fig. 5). Cuando el enalapril se utiliza en presencia de All el efecto inhibitor sobre las CM es semejante a concentraciones de 4,8 µg/ml. Sin embargo, la dosis de 12 µg/ml (100 veces la concentración terapéutica) resulta ser más letal que en ausencia de All (fig. 6). El losartán afecta negativamente a la proliferación de las CM en ausencia de All. Esto se comprueba con dosis de 20 µg/ml (20 veces superior a la dosis terapéutica), existiendo un efecto protector del SBF. Con concentraciones crecientes se produce muerte celular, observándose también un efecto beneficioso del SBF. Esta acción letal del losartán es mucho más llamativa cuando se combina con la All, ya que desde dosis terapéuticas se observan síntomas de muerte celular.

## DISCUSIÓN

Los riesgos que implican la ingesta crónica de algunos fármacos utilizados habitualmente por pacientes en DP, sobre la CM y su capacidad reproductiva están todavía por determinar. Los estudios realizados hasta la actualidad con los agentes aquí evaluados se

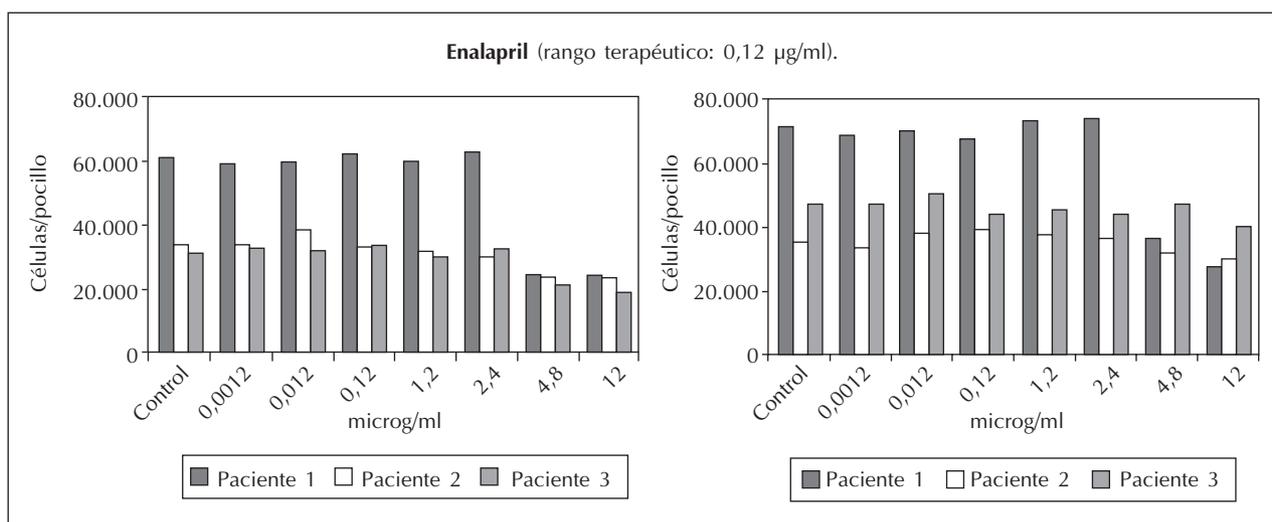


Fig. 5.—Efecto de la adición de enalapril al cultivo de CM procedentes del efluente peritoneal de pacientes tratados con DP. En el lado derecho, datos correspondientes al estudio realizado con SBF al 10% y en el izquierdo, datos correspondientes al estudio con SBF al 5%.

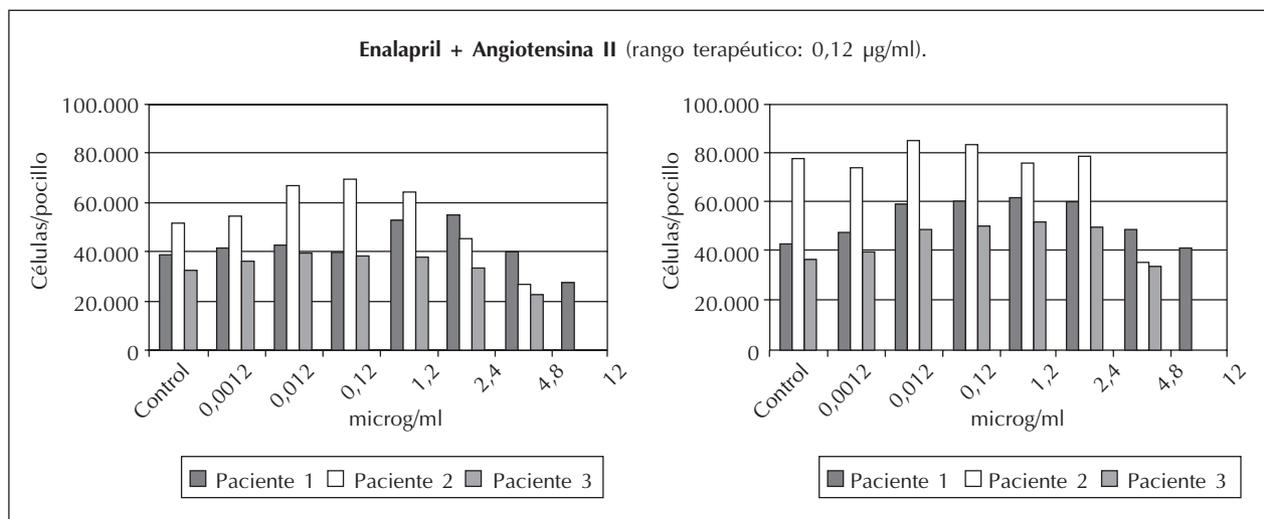


Fig. 6.—Efecto de la adición de enalapril y All al cultivo de CM procedentes del efluente peritoneal de pacientes tratados con DP. En el lado derecho, datos correspondientes al estudio realizado con SBF al 10% y en el izquierdo, datos correspondientes al estudio con SBF al 5%.

han dirigido a analizar alteraciones en la permeabilidad peritoneal y la posibilidad de inducir o prevenir fenómenos de fibrosis peritoneal. La repercusión de la utilización reiterada de estos fármacos sobre la proliferación de las CM en pacientes en DP y el grado de agresividad de cada uno de ellos sobre la CM no ha sido analizado. Los datos de este estudio muestran que todos los agentes evaluados tienen, en mayor o menor grado, efectos sobre la capacidad de proliferación *in vitro* de las CM. Estos efectos se han observado fundamentalmente con concentraciones suprafiológicas. Este hecho debe ser tenido en cuenta a la hora de extrapolar los resultados de las células *in vivo*, donde existen otros múltiples factores implicados como son el entorno, la matriz, el aporte vascular, el líquido de diálisis etc.

1. **Agentes proliferativos:** La insulina actúa como un coadyuvante para algunos agentes mitogénicos<sup>26</sup>. La contribución de la insulina a incrementar la capacidad mitogénica del efluente peritoneal<sup>2,28</sup> obliga a considerarla como un factor potencialmente influyente a largo plazo para la viabilidad peritoneal. Este incremento indiscriminado de la capacidad mitogénica puede favorecer la activación y desarrollo de fibroblastos peritoneales y consecuentemente inducir un deterioro del peritoneo como membrana funcional<sup>12</sup>. Por otro lado, los diabéticos muestran una correlación inversa entre la capacidad mitogénica y las concentraciones de creatinina en plasma y efluente, lo que sugiere que la presencia de estas moléculas puede estar relacionada con la inhibición del crecimiento celular<sup>23</sup>. En nuestro trabajo se confirma el efecto positivo dosis-dependiente de la insulina sobre

el crecimiento de la CM, comportándose como un verdadero agente proliferativo capaz de estimular el crecimiento de las CM en cultivo. Sin embargo, esta acción cesa a medida que aumentamos la dosis, transformándose en un progresivo efecto negativo sobre la CM. En cuanto a IGF-1 no se observaron modificaciones en el crecimiento celular con las diferentes dosis utilizadas. Sabemos que las CM pleurales expresan IGF-1 receptor<sup>29</sup> y que su efecto proliferativo puede estar relacionado con la transformación maligna<sup>30</sup>. El receptor I del IGF-1 es muy parecido al receptor de la insulina, pero su afinidad por la insulina es unas cien veces menor que la de los IGFs<sup>31</sup>. Por lo tanto, el posible efecto carcinogénico de la insulina al activar este receptor sería mínimo.

2. **Agentes antiproliferativos:** El tamoxifeno tiene efectos sobre el TGF- $\beta$ . Esta citoquina está presente en el efluente peritoneal<sup>32</sup> y se ha relacionado con la fibrosis peritoneal<sup>33</sup>. Su producción puede estar estimulada por la glucosa, a través de la expresión de TGF- $\beta$ mRNA<sup>34</sup>, el bajo pH de las soluciones de DP y las infecciones. Las células humanas expresan moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) y otras citoquinas pro-fibrosis tales como IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  y IL- $\beta$ <sup>35,36</sup>. Altos niveles de TGF- $\beta$  aumentan el remodelado de la matriz extracelular<sup>37</sup>, aumentando la actividad de metaloproteinasas (MMP) y disminuyendo sus inhibidores (TIMP). El equilibrio entre MMP/TIMP es responsable del mantenimiento de un adecuado recambio de la matriz<sup>38</sup>. Tanto *in vivo* como *in vitro*<sup>39,40</sup> se ha demostrado que aumentos de TGF- $\beta$  son beneficiosos y contribuye a la regeneración de la matriz extracelular. Es posible que el

tamoxifeno induzca un aumento en la producción de TGF- $\beta$  en las CM e incrementa la regeneración mesotelial favoreciendo la remesotelización. Nuestros resultados aseguran un amplio margen terapéutico para su utilización y confirman que no se trata de un agente antiproliferativo para las CM.

3. *Agentes betabloqueantes*: El uso de betabloqueantes se ha relacionado con el desarrollo de peritonitis esclerosante<sup>41</sup>. El desarrollo de este cuadro puede estar precedido de una hipermeabilidad peritoneal y de la activación de los fibroblastos al contactar con el líquido de diálisis<sup>42-44</sup>. El aumento de la permeabilidad peritoneal puede deberse a fenómenos anatómicos relacionados con la desaparición o incompetencia de las CM, cambios en el estroma conectivo o bien fenómenos funcionales que implicarían una tendencia a la hipervascularización capilar peritoneal o a cambios en la producción del surfactante peritoneal<sup>22</sup>. Nuestros datos confirman que tanto el labetalol como el carvedilol ejercen un efecto negativo sobre la capacidad proliferativa y el aspecto morfológico de las CM, mostrándose como tóxicos para estas células.

4. *Agentes relacionados con el SRA*: Los antihipertensivos que bloquean el SRA producen una disminución del volumen de ultrafiltración de los pacientes en DP<sup>24</sup>. También se ha descrito que los IECAs previenen la fibrosis inducida por las soluciones hipertónicas de DP<sup>25</sup>. En nuestro trabajo no se confirma este efecto regenerativo ya que el enalapril a dosis 40 veces superiores a la terapéutica se comporta como un agente antiproliferativo, fenómeno que se reproduce de una manera más acentuada en presencia de AII. Esto es así aunque la AII no modifica de forma aislada la proliferación mesotelial. No existe contradicción entre ambas acciones ya que no es lo mismo proteger frente a un efecto que actuar sin existir una agresión previa. El losartán a concentraciones 20 veces superiores a la terapéutica se muestra como antiproliferativo protegido probablemente por la AII del SBF y a dosis superiores se comporta como un agente letal. Cuando se añade el losartán a las CM en presencia de AII, tiene un efecto letal para las células incluso a dosis terapéuticas. La AII se asocia con la proliferación celular y con la apoptosis mediadas por el receptor tipo 1 de AII (AT1R) y el receptor tipo 2 de AII (AT2R) respectivamente<sup>45,46</sup>. Por tanto, en CM el bloqueo de AT1R y la activación de AT2R por la AII provoca apoptosis de las CM. Recientemente Wolf ha revisado las diferencias existentes entre los AT1R y AT2R y sus relaciones con la AII. La AII no infrarregula el AT2R, en contraste con el subtipo AT1. Además se ha visto que la unión de la AII a los AT2R inhibe, en ciertas células, la proliferación e induce incluso apoptosis<sup>47</sup>.

En conclusión el estudio de los cultivos de CM tomadas del efluente peritoneal de pacientes en DP es útil para analizar los efectos sobre la proliferación celular que pueden tener diferentes agentes administrados a estos pacientes. Los agentes exógenos analizados influyen de diferente manera en la capacidad de proliferación de las células mesoteliales, siendo recomendable investigar la relación de estos hallazgos con lo que realmente ocurre *in vivo*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. 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.
2. Rippe B: Pathophysiological description of the ultrastructural changes of the peritoneal membrane during long-term continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Blood Purif* 12: 211-220, 1994.
3. Selgas R, Bajo MA, Del Peso G, Jiménez C: Preserving the peritoneal dialysis membrane in long-term peritoneal dialysis patients. *Seminars Dial* 8: 326-332, 1995.
4. Selgas R, Bajo MA, Paiva A, Del Peso G, Díaz C, Aguilera A, Hevia C: Stability of the peritoneal membrane in long-term dialysis patients. *Adv Ren Replac Ther* 5: 168-178, 1998.
5. Krediet R: The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 55: 341-356, 1999.
6. Mistry CD, Gokal R, Peers E, and the MIDAS Study Group: A randomized multicenter clinical trial comparing isosmolar icodextrin with hyperosmolar glucose solutions in CAPD. *Kidney Int* 46: 496-503, 1994.
7. Garosi G, Gaggiotti E, Monaci G, Brardi S, Di Paolo N: Biocompatibility of a peritoneal dialysis solution with aminoacids: histological evaluation in the rabbit. *Perit Dial Int* 18: 610-619, 1998.
8. Jones MR, Gehr TW, Burkart JM, Hamburger RJ, Kraus AP, Piraino B, Hagen T, Ogrinc FG, Wolfson M: Replacement of aminoacid and protein loss with 1,1% aminoacid peritoneal dialysis solution. *Perit Dial Int* 18: 210-216, 1998.
9. Molina S, Selgas R, López-Rivas A, Bajo MA, Vara F: Effects of the addition to dialysate of calcitriol H-R-erythropoietin (EPO) and interferon-alpha-2B (IFN) on mitogenic activity of peritoneal effluent. *Adv Perit Dial* 7: 230-233, 1991.
10. Castro MA, Díaz C, Bajo MA, Sánchez-Cabezudo MJ, Fernández de Castro M, Del Peso G, Martínez ME, Selgas R: Metodología para evaluar la capacidad de crecimiento *ex vivo* de las células mesoteliales obtenidas directamente del efluente peritoneal. *Nefrología* XX: 277-283, 2000.
11. Díaz C, Selgas R, Castro MA, Bajo MA, Fernández de Castro M, Molina S, Jiménez C, Ortiz A, Vara F: *Ex vivo* proliferation of mesothelial cells directly obtained from peritoneal effluent. Its relation with peritoneal antecedents and functional parameters. *Adv Perit Dial* 14: 19-24, 1998.
12. Selgas R, López-Rivas A, Álvaro F y cols.: Insulin influence (used as an additive to dialysate) on the mitogenic-induced effect of the peritoneal effluent in CAPD patients. *Adv Perit Dial* 5: 161-164, 1989.
13. Iglesias P, Grande C, Méndez J, Fernández-Reyes MJ, Bajo MA, Selgas R, Díez JJ: Serum insulin and insulin-like growth factor binding protein-1 levels in adult patients undergoing peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial* 12: 71-76, 1996.

14. Vargas R, Hewes B, Rego A, Farhat MY, Suárez R, Ramwell PW: Estradiol effect on rate proliferation of rat carotid segments: effect of gender and tamoxifen. *J Cardiovasc Pharmacol* 27: 495-499, 1996.
15. Granger DJ, Wittchell CM, Metcalfe JC: Tamoxifen elevates transforming growth factor- $\beta$  and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nature Medicine* 1: 1067-1073, 1995.
16. Chau D, Mancoll JS, Lee S, Zhao J, Phillips L, Gittes G, Longaker MT: Tamoxifen downregulates TGF- $\beta$  production in keloid fibroblasts. *Ann Plast Surg* 40: 490-493, 1989.
17. Lindner DJ, Borden EC: Effect of tamoxifen and interferon- $\beta$  or the combination on tumor-induced angiogenesis. *Int J Cancer* 71: 456-461, 1997.
18. Harty RF: Sclerosing peritonitis and propranolol. *Arch Intern Med* 138: 1424, 1978.
19. Marigold JH, Pounder RE, Pemberton J, Thompson RPH: Propranolol, oxprenolol and sclerosing peritonitis. *British Med J* 284: 870, 1982.
20. Clark CV, Terris R: Sclerosing peritonitis associated with metoprolol. *Lancet* i: 937, 1983.
21. 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.
22. Selgas R, Muñoz J, Huarte E, Escuín F, Sanz A, López-Reuvelta K, Ramos P, Sánchez-Sicilia L: Influencia de la toma de betabloqueantes sobre los parámetros de capacidad difusiva peritoneal en pacientes tratados con DPCA. *Nefrología* VII: 350-355, 1987.
23. Selgas R, López-Rivas A, Miranda B, Muñoz J, Riñón C, Borrego F, Molina S, Sánchez-Sicilia L: Characterisation of the mitogenic induced capacity of peritoneal effluent on human and mice fibroblasts in culture. *Nephrol Dial Transplant* 6: 44-50, 1991.
24. Imai H, Nakamoto H, Ishida Y, Yamanouchi Y, Inoue T, Okada H, Suzuki H: Renin-angiotensin system plays an important role in the regulation of water transport in the peritoneum. *Adv Perit Dial* 17: 20-24, 2001.
25. Duman S, Günel A, Sen S, Asçi G, Özkahya M, Terzioglu E, Akçiçek F, Atabay F: Does enalapril prevent fibrosis induced by hypertonic (3,86%) peritoneal dialysis solution? *Perit Dial Int* 21: 219-224, 2001.
26. Todaro GJ, Green H: Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and development into established lines. *J Cell Biol* 17: 299-313, 1963.
27. Lamperi S, Carozzi S: Lymphomonokyne disorders and ultrafiltration loss in CAPD patients. *Adv Int Dial* 3: 7-12, 1987.
28. Selgas R, Muñoz J, Cuesta MV y cols.: Caracterización de la capacidad difusiva peritoneal mediante los coeficientes de transferencia de masas peritoneales en pacientes en DPCA. *Nefrología* VIII (Supl. 3): 94-97, 1988.
29. Lee TC, Zhang Y, Aston C, Hintz R, Jagirdar P, Perle MA, Burt M: Normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines express insulin-like growth factor I and associates molecules. *Cancer Res* 2858-2864, 1993.
30. Van der Wall BC, Hofland LJ, Marquet RL, Van Koetsveld PM: Paracrine interactions between mesothelial and colon-carcinoma cells in a rat model. *Int J Cancer* 73: 885-890, 1997.
31. Massague J, Czech MP: The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *J Biol Chem* 257: 5038-5045, 1982.
32. Takazoe K, Nakayama M, Utsunomiya Y, Osaka N, Hayakawa H, Kubo H, Kawaguchi Y, Sakai O: Detection of TGF- $\beta$  1 and CAPD effluents. *Clin Nephrol* 47: 67-69, 1997.
33. Lin CY, Chen WP, Fu LW, Yang LY, Huang TP: Persistent transforming growth factor beta 1 expression may predict peritoneal fibrosis in CAPD patients with frequent peritonitis occurrence. *Adv Perit Dial* 13: 64-71, 1997.
34. Wang T, Chen YG, Ye RG, Li SL, Li HQ, Chen YX: Effect of glucose on TGF- $\beta$  1 expression in peritoneal mesothelial cell. *Adv Perit Dial* 11: 7-10, 1995.
35. Chegini N: The role of growth factors in peritoneal healing: transforming growth factor beta (TGF-beta). *Eur J Surg* 163: S17-S23, 1997.
36. Kwan G, Neugarten J, Sherman M, Ding Q, Fotadar U, Lei J, Silbiger S: Effects of sex hormones on mesangial cell proliferation and collagen synthesis. *Kidney Int* 50: 1173-1179, 1996.
37. Lenz O, Elliot S, Stertler-Stevenson WG: Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *J Am Soc Nephrol* 11: 574-581, 2000.
38. Allison E: Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 13: 2495-2508, 1996.
39. Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Crainger DJ: Proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells in culture is modulated by active TGF- $\beta$ . *Cardiovasc Res* 29: 848-855, 1995.
40. Grainger DJ, Wittchell CM, Metcalfe JC: Tamoxifen elevates transforming growth factor- $\beta$  and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Natural Medicine* 1: 1067-1073, 1995.
41. Brown P, Read AE, Baddeley H, Davies JD, MacGarry J: Sclerosing peritonitis, an unusual reaction to a beta-adrenergic blocking drug (practolol). *Lancet* ii: 1477-1481, 1974.
42. Huarte-Loza E, Selgas R, Rodríguez-Carmona A: Peritoneal membrane failure as a determinant of the CAPD future. An epidemiological, functional and pathological study. *Contrib Nephrol* 57: 219-229, 1987.
43. Slingeneyer A, Mion C, Mourad G, Ganaud B, Faller B, Beraud JJ: Progressive sclerosing peritonitis: late and severe complication of maintenance peritoneal dialysis. *Trans Am Soc Artif Organs* 24: 633-638, 1983.
44. Shaldon S, Koch KM, Quellhorst E, Dinarello CA: Pathogenesis of sclerosing peritonitis in CAPD. *Trans Am Soc Artif Intern Organ* 30: 193-194, 1984.
45. Cao Z, Kelly DJ, Cox A, Casley D, Forbes JM, Partinello P, Dean R, Gilbert RE, Cooper ME: Angiotensin type 2 receptor is expressed in the adult rat kidney and promotes cellular proliferation and apoptosis. *Kidney Int* 58 (6): 2437-2451, 2000.
46. Nagashima H, Sakomura Y, Aoka Y, Uto K, Kameyama K, Ogawa M, Aomi S, Koyonagi H, Ishizuka N, Naruse M, Kawana M, Kasanuki H: Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis in cystic medial degeneration associated with Marfan's syndrome. *Circulation* 18; (Supl. 1): 1282-1287, 2001.
47. Wolf G: The road not taken: role of angiotensin II type 2 receptor in pathophysiology. *Nephrol Dial Transplant* 17: 195-198, 2002.