



FORMACIÓN CONTINUADA

Transición epitelio-mesenchimal en procesos fibrosantes. Células mesoteliales obtenidas ex vivo de pacientes tratados con diálisis peritoneal como modelo de transdiferenciación

R. Selgas, M.^a A. Bajo, A. Aguilera, J. A. Sánchez-Tomero, A. Cirugeda, G. del Peso, V. Álvarez, J. A. Jiménez-Heffernan, C. Díaz y M. López-Cabrera

Servicios de Biología Molecular y Nefrología del Hospital Universitario de La Princesa. Servicio de Nefrología. Hospital Universitario de la Paz. Madrid. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario de Guadalajara: «Grupo de estudios peritoneales de Madrid del IRSIN (FRIAT)».

La transición epitelio-mesenchimal (o transdiferenciación) (TEM) es un proceso complejo y generalmente reversible que comienza con la rotura de las uniones intercelulares y la pérdida de polaridad apico-basal típica de las células epiteliales, las cuales se transforman en células fibroblásticas con características migratorias, invasivas y fibrogénicas¹. Aunque la transdiferenciación se puede inducir en cultivo en la mayoría de las células epiteliales con una amplia gama de estímulos, *in vivo* este proceso ocurre sólo durante el desarrollo embrionario y en algunas condiciones patológicas como la reparación de heridas o la progresión tumoral^{1,2}. La transdiferenciación hacia miofibroblasto ha sido identificada como un factor que promueve fibrosis en diversos órganos como pulmón³, hígado^{4,5}, y riñón. En este último caso, el fenómeno ha sido descrito tanto para células tubulares^{6,7} como para células glomerulares (podocitos)⁸⁻¹⁰. En todos estos casos la transdiferenciación que se ha descrito ha sido la conversión de las células epiteliales hacia miofibroblastos. Los miofibroblastos pueden ser considerados como fibroblastos activados, con características de miocitos, capaces de proliferar y sintetizar matriz extracelular^{3,11,12}.

Recientemente nuestro grupo ha demostrado, tanto *in vivo* como *ex vivo*, que las células mesoteliales de pacientes sometidos a diálisis peritoneal sufren una transición epitelio-mesenchimal¹³. La gran ventaja del modelo *ex vivo* empleado en este estudio respecto a los modelos anteriores, es la accesibilidad no invasiva a las

células implicadas (células mesoteliales que son eliminadas diariamente con el efluente peritoneal). Los cambios moleculares representativos de TEM hallados en las células mesoteliales de efluente son equivalentes a los encontrados en biopsias peritoneales de pacientes en DP. Los marcadores del cambio molecular representan una excelente herramienta para el diagnóstico precoz de intolerancia peritoneal a la DP y para el análisis de la biocompatibilidad real de futuras soluciones.

ALTERACIONES PERITONEALES INDUCIDAS POR DP

La diálisis peritoneal ambulatoria (DP) es una alternativa a la hemodiálisis para el tratamiento de la insuficiencia renal en estadio terminal¹⁴. La membrana peritoneal está recubierta por una monocapa de células mesoteliales, que poseen características de células epiteliales, y actúan como barrera de permeabilidad y secretan diversas sustancias implicadas en la homeostasis peritoneal y en la defensa inmune local^{14,15}. Desafortunadamente, la exposición reiterada a soluciones de diálisis ácidas, hiperosmóticas e hiperglicémicas causa una inflamación crónica de bajo grado y un daño al peritoneo, que progresivamente se denuda de células mesoteliales y degenera en fibrosis y vascularización tisular¹⁴. Estos cambios estructurales parecen ser la principal causa del fracaso de ultrafiltración, que afecta al 20% de los pacientes en DP¹⁶. Estas alteraciones morfológico-funcionales pueden verse además aceleradas por episodios severos o recurrentes de peritonitis o hemoperitoneo^{16,17}.

Los mecanismos fisiopatológicos que dan lugar al deterioro peritoneal y al fracaso de ultrafiltración no están claramente establecidos y son objeto de deba-

Correspondencia: Dr. Rafael Selgas
Servicio de Nefrología
Hospital Universitario de La Princesa
Diego de León, 62
28006 Madrid
E-mail: rselgas.hlpr@salud.madrid.org

te hoy en día. Los fibroblastos residentes en el estroma peritoneal han sido clásicamente considerados los principales responsables del desarrollo de la fibrosis¹⁸.

LAS CÉLULAS MESOTELIALES COMO VÍCTIMAS O CULPABLES DE LAS ALTERACIONES PERITONEALES

Las células mesoteliales han sido consideradas, durante mucho tiempo, como meras víctimas de la agresión peritoneal producida por la diálisis y su posible participación en los procesos de fibrosis no ha sido examinada en detalle. En este contexto, las células mesoteliales en cultivo tienen la capacidad de cambiar su morfología y de producir componentes de la matriz extracelular en respuesta a distintos estímulos¹⁹⁻²⁵. Además, el tratamiento de las células mesoteliales *in vitro* con medios con alta concentración de glucosa o citoquinas proinflamatorias inducen la expresión de TGF- β ²⁶ y disminuyen la expresión de E-cadherina²⁷. La molécula de adhesión intercelular E-cadherina desempeña un papel central en el control de la transición epitelio-mesenquimal, ya que la pérdida de su expresión o función correlaciona con la capacidad de las células epiteliales de adoptar una morfología invasiva y migratoria típicamente mesenquimal^{28,29}. El factor de transcripción Snail es un potente represor de la transcripción de E-cadherina e inductor de la transdiferenciación³⁰⁻³². La relevancia del factor profibrótico TGF- β ³³ en el fracaso de ultrafiltración producido por DP, ha sido recientemente puesto de manifiesto en un modelo *in vivo* de rata, en el que el gen de TGF- β fue transducido al peritoneo y causó una peritonitis esclerosante a través de una neo-angiogénesis³⁴. Por tanto, los cambios fenotípicos de las células mesoteliales durante la DP pueden estar relacionados directamente con el fallo de la función de barrera del peritoneo, sugiriendo un papel fundamental de estas células en el desarrollo del fracaso de ultrafiltración en pacientes en diálisis peritoneal.

METODOLOGÍA EMPLEADA PARA LA DEMOSTRACIÓN EX VIVO E IN VIVO DE LA TEM¹³

Las células mesoteliales humanas derivadas de efluente (25,569 células \pm 2,971 SE por bolsa) se obtuvieron por centrifugación del efluente de 54 pacientes clínicamente estables, elegidos al azar, que habían realizado intercambio nocturno con soluciones de diálisis con 2,27% glucosa, 1,25/1,75 mM calcio. Tras 10-15 días las preparaciones llegaban a confluencia y se amplificaron (1:2) 2-3 veces. La morfología de los cultivos se comparó en monocapas celulares confluentes, y permanecía estable durante los

2-3 pases. El 85% de los cultivos se obtuvieron antes del primer episodio de peritonitis del paciente. De 116 cultivos de efluente analizados 62 tenían una morfología epitelioide, 28 eran transicionales, 20 fibroblásticos y 6 cultivos con poblaciones mixtas.

Las biopsias peritoneales se obtuvieron a partir de tres grupos de pacientes: 1) Grupo control de muestras de peritoneo parietal (n = 15) obtenido a partir de autopsias (n = 5) o de donantes de riñón (n = 10); 2) Pacientes urémicos que no habían estado en DP con anterioridad (n = 17); 3) Pacientes urémicos que estaban recibiendo tratamiento de DP (n = 27). Las muestras se obtuvieron a partir de peritoneo parietal de la pared abdominal anterior de pacientes intervenidos quirúrgicamente durante trasplantes renales, inserción o retirada de catéter de DP, o debido a incidentes abdominales (e.g. hernia abdominal). Las muestras, de 10-20 x 10-20 mm, se fijaron en 3,7% formalina (pH 7.3) durante 12-24 horas. Posteriormente, se cortaron las muestras y se incluyeron en parafina.

LAS CÉLULAS MESOTELIALES SUFREN CAMBIOS MORFOLÓGICOS DURANTE LA DIÁLISIS PERITONEAL. ICAM-1 COMO MARCADOR MESOTELIAL

Los cultivos de células mesoteliales obtenidos de efluentes de DP muestran morfologías claramente distinguibles, desde epitelioideas, similares a las células mesoteliales obtenidas de omento, a fibroblásticas e incluso poblaciones mixtas. La prevalencia de células no epitelioideas parece estar relacionada tanto con el tiempo que el paciente ha estado sometido a DP, como con los procesos de hemoperitoneo o peritonitis. Las células fibroblásticas aparecían de forma esporádica en muestras que presentaban hemorragia o células linfoides infiltrantes en el efluente, y se observó (en 8 casos de 8) una reversión a un fenotipo epitelioide o transicional en cultivos analizados del mismo paciente una vez que se había resuelto el proceso patológico.

Para determinar la naturaleza de las células derivadas de efluente, se analizó la expresión de citoqueratinas, un marcador típicamente epitelial, y de ICAM-1, que se expresa de forma constitutiva en células mesoteliales³⁵. Se observó una alta expresión de citoqueratinas tanto en células derivadas de omento como en células de efluente con apariencia epitelioide. Las células de efluente mostraban una reducción progresiva en la expresión de citoqueratinas, aunque incluso en muestras fibroblásticas se mantenía una pequeña población de células positivas. En cultivos mixtos se observaban una expresión bimodal, mientras que la queratina estaba totalmente ausente en fibroblastos de omento. Sin embargo,

todas las preparaciones obtenidas de efluente mostraban una alta y homogénea expresión de ICAM-1 independientemente de su morfología, incluso los cultivos mixtos. Por el contrario, la expresión de ICAM-1 era indetectable en fibroblastos obtenidos tanto de omento como de piel, lo cual demuestra que las células fibroblásticas de efluente tienen un origen mesotelial y no se trata de una contaminación con fibroblastos de la muestra biológica.

ANÁLISIS EX VIVO DE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES DURANTE LA DP

Los cambios morfológicos y la disminución en la expresión de queratinas de las células mesoteliales derivadas de efluente podrían ser indicativos de una transición epitelio-mesenquimal¹. Analizamos por western-blot la expresión de cadherina-E y de las proteínas de filamentos intermedios citoqueratinas y vimentina como marcadores de transdiferenciación. La expresión de cadherina-E disminuía de forma dramática desde las células mesoteliales de omento a las epitelioideas y no epitelioideas de efluente. La expresión de citoqueratinas seguía el mismo patrón mientras que la expresión de vimentina aumentaba.

Ensayos mediante microscopía confocal demostraron la pérdida de cadherina-E intercelular así como la reorganización del citoesqueleto de actina de la banda cortical típica de las células epiteliales a un patrón de fibras de tensión fibroblástico. La citoqueratina fue reemplazada por vimentina, aunque algunas células fibroblásticas eran aún citoqueratina positivas. Las preparaciones teñidas con anti-CD9, que se expresa tanto en las microvellosidades apicales como en los contactos intercelulares³⁶, mostraban una pérdida gradual en la morfología cúbica epitelial, que era ya evidente en las células mesoteliales epitelioideas, las cuales eran aproximadamente la mitad de altas que las células de omento en secciones confocales verticales. Las células fibroblásticas pierden la inhibición por contacto y frecuentemente se apilan en varias capas.

EL DAÑO MECÁNICO Y EL TRATAMIENTO CON TGF- β E IL-1 INDUCEN LA TRANSDIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MESOTELIALES REPRODUCIENDO LA TRANSICIÓN OBSERVADA EX VIVO

Tras la denudación mecánica *in vitro* de una monocapa confluyente de células de omento se observó que el estímulo mecánico era suficiente para inducir la migración de las células mesoteliales, y que las células que migraban sufrían una transdiferenciación transitoria mostrando una morfología mesenquimal

que revertía a un aspecto epitelial una vez cerrada la herida. Este efecto estaba localmente confinado al borde de la herida y zonas adyacentes, mientras que células que se encontraban distanciadas de la zona dañada no se modificaban, reforzando la idea de que el estímulo mecánico era por sí solo suficiente para inducir la transdiferenciación.

Para determinar si TGF- β e IL-1 β , dos citoquinas detectadas en efluentes de DP fundamentalmente durante episodios de peritonitis³⁷, eran capaces de reproducir *in vitro* los cambios fenotípicos observados *ex vivo*, cultivos mesoteliales derivados de omento fueron tratados con TGF- β sólo o en combinación con IL-1 β . Se observó un efecto aditivo de ambos estímulos sobre la morfología celular. La expresión de cadherina-E desapareció casi totalmente, y su localización en las uniones intercelulares era prácticamente indetectable por inmunofluorescencia. La expresión de citoqueratinas también disminuyó, y la IL-1 β mostró también un efecto aditivo. Por el contrario, estos tratamientos indujeron un aumento en la expresión de vimentina.

EXPRESIÓN DE SNAIL EN CÉLULAS MESOTELIALES QUE SUFREN UNA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL

Recientemente, ha sido descrito un factor de transcripción denominado Snail que actúa como potente represor de la expresión de cadherina-E y por tanto, como inductor de la transición epitelio-mesenquimal³⁰⁻³². Para determinar si la expresión de Snail estaba asociada con los cambios fenotípicos observados en células de la membrana peritoneal en pacientes de DP, se realizaron análisis por RT-PCR para estimar la expresión de dicho factor de transcripción, así como de la cadherina-E, en células mesoteliales de efluente y omento. No se detectó señal de RNAm de Snail en células de omento, mientras que la totalidad de las preparaciones de células mesoteliales fibroblásticas de efluente expresaban RNAm de Snail. Sin embargo, la expresión del RNAm de Snail en las preparaciones de efluentes con morfología epitelioidea o transicional fue más variable, aunque se observó un incremento en el porcentaje de preparaciones que expresaban RNAm de Snail en los estadios más avanzados del proceso de transdiferenciación. Una dramática disminución en el RNAm de cadherina-E era observable ya en células de efluente con apariencia epitelioidea, consistente con los datos de expresión de proteína.

La estimulación de los cultivos mesoteliales con TGF- β más IL-1 β produjo una inducción rápida y transitoria del RNAm de Snail. El RNAm de cadherina-E estaba ya disminuido en el primer tiempo ensayado y permaneció casi indetectable incluso cuando la ex-

presión de Snail ya había decaído. De forma similar, tras denudación mecánica de las células, se observó una inducción transitoria del RNAm de Snail, seguramente correspondiente a las células que sufren la transición en el borde del área dañada. Debido a que la mayoría de las células no estaban involucradas en el proceso de reparación, no se observó disminución del RNAm de la cadherina-E en la población total.

LA TRANSDIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES VIENE ACOMPAÑADA POR UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE LA INTEGRINA $\alpha 2$ Y LA ADQUISICIÓN DE UN FENOTIPO MIGRATORIO

El fracaso de ultrafiltración en DP está acompañada de fibrosis peritoneal. Por ello analizamos las características de las preparaciones mesoteliales respecto a los receptores de matriz extracelular. Ya en las células de efluente con aspecto epitelioide se observó un aumento en la expresión de la integrina $\alpha 2$. Por el contrario, la integrina $\alpha 3$ aumentó su expresión en células epitelioideas y disminuyó en los últimos estadios de la transición epitelio-mesenquimal (preparaciones transicionales y fibroblásticas). Del mismo modo, las tetraspaninas CD9 y CD151, que se asocian a integrinas, vieron disminuida su expresión según progresaba la transdiferenciación. De forma similar, el TGF- β más IL-1 β indujeron la expresión de la integrina $\alpha 2$ en todas las preparaciones mesoteliales, mientras que la integrina $\alpha 3$ aumentó en las de omento y disminuyó en las células ya en transición. La IL-1 β potenció los efectos del TGF- β .

Las tetraspaninas están funcionalmente asociadas a migración celular³⁸. Los cambios en el repertorio de integrinas y el paso de un citoesqueleto basado en queratinas a uno formado por vimentina podría también alterar la capacidad migratoria de las células mesoteliales. Así, en ensayos de quimiotaxis y haptotaxis, observamos que el proceso de transdiferenciación va acompañado de una mayor capacidad migratoria de las células mesoteliales. Además, el tratamiento con TGF- β más IL-1 aumentó la haptotaxis a colágeno, el principal ligando de la integrina $\alpha 2\beta 1$. La migración hacia laminina-5 siguió los cambios en la expresión de su receptor, la integrina $\alpha 3\beta 1$.

EVIDENCIA DE LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES *IN VIVO* EN EL TEJIDO PERITONEAL DE PACIENTES EN DP

Nuestros datos sugieren que las células mesoteliales sufren una transición epitelio-mesenquimal du-

rante el curso de la DP. Para confirmar este hecho *in vivo*, se realizaron tinciones por inmunohistoquímica de biopsias peritoneales de pacientes en DP que confirmaron la pérdida de morfología epitelial de la monocapa mesotelial en los estadios tempranos de DP (n = 9, 0-9 meses en DP). En 18 biopsias de pacientes que habían sido dializados de 9 a 77 meses, la monocapa mesotelial había desaparecido y las células mesoteliales citoqueratina e ICAM-1 positivas aparecían embebidas en el tejido fibrótico y con apariencia elongada, correspondiéndose con cultivos de efluente no epiteliales. Las biopsias obtenidas de pacientes urémicos pero que no habían recibido nunca diálisis peritoneal (n = 17), no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control (n = 15) (datos no mostrados). Asimismo, cuando se analizó el patrón de expresión de E-cadherina, se observaron células mesoteliales fibroblásticas (E-cadherina +) invadiendo el tejido fibrótico tanto en pacientes tempranos (0-9 meses) como en pacientes que llevaban más tiempo en DP (9-77 meses).

EVIDENCIA DE LA CONVERSIÓN A MIOFIBROBLASTO DE LAS CÉLULAS MESOTELIALES EN EL TEJIDO PERITONEAL DE PACIENTES EN DP

Recientemente, se ha demostrado que las células mesoteliales de omento transdiferenciadas *in vitro* mediante tratamientos con TGF- β adquieren características de miofibroblastos, entre ellas la expresión de α -SMA (actina de músculo liso- α -)³⁹. Para confirmar este hecho *in vivo*, realizamos análisis inmunohistoquímicos en biopsias peritoneales empleando un anticuerpo anti- α -SMA. Pacientes tempranos de diálisis peritoneal mostraron expresión de α -SMA en células mesoteliales que aún permanecían en la superficie. Las biopsias de pacientes sometidos a diálisis peritoneal durante largos períodos de tiempo, mostraron un claro gradiente de expresión de α -SMA, estando ésta confinada a las células fibroblásticas de las capas más superficiales de la membrana peritoneal. Asimismo, se observó una clara expresión de α -SMA en los vasos peritoneales (pericitos).

MECANISMOS Y POSIBILIDAD DE INTERVENCIÓN SOBRE EL PROCESO

Oldfield⁴⁰ ha demostrado en un modelo de transdiferenciación de célula tubular renal en miofibroblasto que la exposición a productos de la glicosi-

lación avanzada (AGEs) indujo la transformación de manera dosis-dependiente. Este fenómeno dependió de la presencia de receptores (RAGE) en la superficie celular. No es difícil invocar semejante mecanismo para la célula mesotelial peritoneal en un ambiente de elevada concentración de AGEs como es el peritoneo en DP. Sin embargo, todavía no ha sido demostrada la presencia de RAGEs en estas células.

La regulación y detención de la TEM puede hacerse con mecanismos embrionarios. Una proteína llamada Proteína Morfogénica Ósea-7 (Bone Morphogenic Protein-7 o BMP-7), regula naturalmente el fenómeno preservando y estabilizando el fenotipo epitelial una vez terminado su desarrollo⁴¹. Es esencial en etapa embrionaria para la epitelización del mesenquima metanéfrico. En procesos de reparación tisular, su ausencia determina una falta de epitelización del tejido restaurado y en nefropatía diabética ayuda definitivamente a restaurar el epitelio del túbulo colector. Su mecanismo fundamental de acción es inhibir naturalmente la promoción transicional del TGF- β . En consecuencia, aumenta expresión de E-caderina y disminuye expresión de vimentina y apoptosis de la célula epitelial.

INVERSIÓN DEL FENÓMENO DE LA TRANSICIÓN EPITELIO A MESÉNQUIMA: TRANSICIÓN DE MESÉNQUIMA A EPITELIO

Unos datos intrigantes sobre transformación celular en este modelo son los publicados por Amari y cols.⁴². En su estudio, fibroblastos de pleura de rata son transformados en células mesoteliales mediante la adición al cultivo de FGF. Los anticuerpos anti-FGF bloquearon totalmente tal transición. El fenómeno abre una nueva vía de investigación para nuestro modelo¹³ y para la completa interpretación de la fisiopatología peritoneal.

COMENTARIOS

La diálisis peritoneal se está convirtiendo en una alternativa cada vez más común a la hemodiálisis. Sin embargo, durante el procedimiento de diálisis las células mesoteliales están sometidas a una gran presión osmótica y a sustancias bioincompatibles. Estudios previos realizados mediante técnicas inmunohistológicas estándar del peritoneo de pacientes en DP, muestran una pérdida total de la monocapa de células mesoteliales y fibrosis tisular, que puede ser responsable del fallo de la funcionalidad de la membrana peritoneal¹⁴. Nuestros datos muestran que las células mesoteliales sufren una transición desde un fenotipo epitelial a me-

senquimal (miofibroblasto) durante la diálisis peritoneal con inducción de la expresión de Snail, y una dramática pérdida de expresión de cadherina-E. Además estos descubrimientos sugieren un papel directo y activo de las células mesoteliales en la fibrosis tisular y en el fracaso en ultrafiltración, mediante la generación local de nuevas células fibroblásticas que causan la fibrosis del peritoneo. Por otro lado, nuestros datos (no mostrados) también sugieren que las células mesoteliales podrían tener un papel importante en la neovascularización peritoneal, debido al incremento de la expresión de VEGF en estas células durante la transdiferenciación inducida por DP, contribuyendo, de igual manera, al deterioro funcional de la membrana peritoneal.

Estudios previos han caracterizado las células epitelioideas derivadas de efluente como indistinguibles de aquellas obtenidas de muestras de omento²². Sin embargo, ya en los primeros estadios de la DP las células mesoteliales muestran una pérdida importante de su morfología cúbica, observada tanto *in vivo* como *ex vivo*, acompañada de la inducción de Snail que reprime la expresión de cadherina-E, aún cuando las células todavía presentan una apariencia epitelioidea. Si la diálisis peritoneal continúa, la exposición crónica a la denudación mecánica y a factores profibróticos como el TGF- β y citoquinas inflamatorias pueden inducir la transición completa de estas células, la cual puede ser responsable de la fibrosis y angiogénesis tisular y el subsecuente fracaso en ultrafiltración. En este sentido, pacientes con episodios recurrentes de peritonitis, en los cuales se expresan altos niveles de TGF- β ?³⁷, sufren el fallo en ultrafiltración de forma más prematura¹⁷.

El hecho de que las células mesoteliales sufran una transición epitelio-mesenquimal durante la DP cambia nuestra perspectiva de la fisiopatología de la respuesta peritoneal a la diálisis y en su caso al fracaso en ultrafiltración. Nuestros datos revelan una serie de marcadores tales como Snail, cadherina-E, integrina α 2, CD9 y VEGF, algunos de los cuales aparecen ya alterados en las primeras fases del proceso de transdiferenciación. Además, la molécula de adhesión ICAM-1 aparece como un marcador potencial para discriminar las células mesoteliales de los fibroblastos. Todos estos marcadores deberían ser útiles en el seguimiento de los pacientes en DP así como en el desarrollo de nuevas soluciones de diálisis. Además, los datos sugieren nuevas dianas terapéuticas que podrían prevenir la fibrosis y/o angiogénesis asociadas a DP.

La posibilidad de manipular el fenómeno de la TEM mediante estabilizantes epiteliales naturales (BMP-7)⁴¹ o inducción de transición inversa desde fibroblastos (con FGF)⁴² abre expectativas ilimitadas en el campo de la reparación regulada de muchos tejidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hay ED: An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat* 154: 8-20, 1995.
2. Birchmeier C, Birchmeier W, Brand-Saberi B: Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat* 156: 217-226, 1996.
3. Zhang K, Reikter MD, Gordon D y cols: Myofibroblasts and their role in the lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and *in situ* hybridation study. *Am J Pathol* 145: 114-125, 1994.
4. Tang L, Tanaka Y Marumo F, Sato C: Phenotypic change in portal fibroblasts in biliary fibrosis. *Liver* 14: 76-84, 1994.
5. Gressner A: Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myfibroblasts: a key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int* 54: S39-S45, 1996.
6. Ng YY, Huang TP, Yang WC y cols.: Tubular epithelial-myfibroblast differentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* 53: 864-876, 1998.
7. Jinde K, Nikolic-Paterson DJ, Huang XR y cols.: Tubular phenotypic changes in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 38: 761-769, 2001.
8. Bariéty J, Nochy D, Mandet C y cols.: Podocytes undergo phenotypic changes and express macrophagic-associated markers in idiopathic collapsing glomerulopathy. *Kidney Int* 53: 918-925, 1998.
9. Bariéty J, Brunevald P, Hill G y cols.: Posttransplantation relapse of FSGS is characterized by glomerular epithelial cell transdifferentiation. *J Am Soc Nephrol* 12: 261-274, 2001.
10. Bariéty J, Bruevald P, Mandet C y cols.: Glomerular and tubular cell transdifferentiation into myfibroblast in Wegener's crescentic GN (Abstract). *J Am Soc Nephrol* 12: 3779A, 2001.
11. Hogemann B, Gillessen A, Bocker W y cols.: Myfibroblast-like cells produce mRNA for type I and III procollagen in chronic active hepatitis. *Scand J Gastroenterol* 28: 591-594, 1993.
12. Tang WW, Van GY, Qi M. Myfibroblast and $\alpha 1$ (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 51: 926-931, 1997.
13. Yáñez-Mó M, Lara-Pezzi E, Selgas R y cols.: Peritoneal dialysis and epithelial-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 348: 403-413, 2003.
14. Krediet RT: The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 55: 341-356, 1999.
15. Brulez HF, Verbrugh HA: First-line defense in the peritoneal cavity during peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 15 (Supl. 7): S24-S33, 1995.
16. Chaimovitz C: Peritoneal dialysis. *Kidney Int* 45: 1226-1240, 1994.
17. Selgas R, Fernández-Reyes MJ, Bosque E, Bajo MA, Borrego F, Jiménez C, Peso GD, De Alvaro 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.
18. Dobbie JW: Pathogenesis of peritoneal fibrosing syndromes (sclerosing peritonitis) in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 12: 14-27, 1992.
19. Connell ND, Rheinwald JG: Regulation of the cytoskeleton in mesothelial cells: reversible loss of keratin and increase in vimentin during rapid growth in culture. *Cell* 34: 245-253, 1983.
20. Fang CC, Yen C-J, Chen Y-M, Shyu R-S, Tsai T-J, Lee PH, Hseih B-S: Pentoxifylline inhibits human peritoneal mesothelial cell growth and collagen synthesis: effects on TGF- β . *Kidney Int* 57: 2626-2633, 2000.
21. Faull RJ, Stanley JM, Fraser S, Power DA, Leavesley DI: HB-EGF is produced in the peritoneal cavity and enhances mesothelial cell adhesion and migration. *Kidney Int* 59: 614-624, 2001.
22. Leavesley DI, Stanley JM, Faull RJ: Epidermal growth factor modifies the expression and function of extracellular matrix adhesion receptors expressed by peritoneal mesothelial cells from patients on DP. *Nephrol Dial Transplant* 14: 1208-1216, 1999.
23. Medcalf JF, Walls J, Pawluczki ZA, Harris KPG: Effects of glucose dialysate on extracellular matrix production by human peritoneal mesothelial cells (HPMC). The role of TGF- β . *Nephrol Dial Transplant* 16: 1885-1892, 2001.
24. Rampino T, Cancarini G, Gregorini M, Guallini P, Maggio M, Ranghino A, Soccio G, Canton AD: Hepatocyte growth factor/Scatter factor released during peritonitis is active on mesothelial cells. *Am J Pathol* 159: 1275-1285, 2001.
25. Yang WS, Kim BS, Lee SK, Park JS, Kim SB: Interleukin 1b stimulates the production of extracellular matrix in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 19: 211-220, 1999.
26. Ha H, Yu MR, Lee HB: High glucose-induced PKC activation mediates TGF- β 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 59: 463-470, 2001.
27. Ito T, Yorioka N, Yamamoto M, Kataoka K, Yamakido M: Effect of glucose on intercellular junctions of cultured human peritoneal mesothelial cells. *J Am Soc Nephrol* 11: 1969-1979, 2000.
28. Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G: A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392: 190-193, 1998.
29. Takeichi M: Morphogenic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 7: 619-627, 1995.
30. Batlle E, Sancho E, Franci C, Domínguez D, Monfar M, Baulida J, García-Herreros A: The transcription factor snail is a repressor of E-Cadherin gene expression in epithelial tumor cells. *Nat Cell Biol* 2: 84-89, 2000.
31. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, Barrio MGD, Portillo F, Nieto A: The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transition by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2: 76-83, 2000.
32. Carver EA, Jiang R, Lan Y, Oram KF, Gridley T: The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 21: 8184-8188, 2001.
33. Massagué J: TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-791, 1998.
34. Margetts P, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gauldie J: Gene transfer of transforming growth factor- β 1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol* 12: 2029-2039, 2001.
35. Suassuna JH, Neves FCD, Hartley RB, Ogg CS, Cameron JS: Immunohistochemical studies of the peritoneal membrane and infiltrating cells in normal subjects and in patients on DP. *Kidney Int* 46: 433-454, 1994.
36. Yáñez-Mó M, Tejedor R, Rousselle P, Sánchez-Madrid F: Tetraspanins in intercellular adhesion of polarized epithelial cells: spatial and functional relationship to integrins and cadherins. *J Cell Sci* 114: 577-587, 2001.
37. Lai KN, Lai KB, LAm CW, Chan TM, Li FK, Leung JC: Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 35: 644-652, 2000.
38. Hemler ME: Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 10: 578-585, 1998.
39. Yang AH, Chen JY, Lin JK: Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* 63: 1530-1539, 2003.
40. Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM y cols.: Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE) *J Clin Invest* 108: 1853-1863, 2001.
41. Wang S, Cheb Q, Simon TC y cols.: Bone morphogenic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int* 63: 2037-2049, 2003.
42. Amari M, Taguchi K, Iwakura M y cols.: Immunohistochemical and ultrastructural study on effect of fibroblast growth factor on transformation of fibroblasts to regenerated mesothelial cells. *Med Electron Microsc* 35: 225-233, 2002.