

CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE LOS
FIBROBLÁSTOS PERITONEALES DURANTE EL
TRATAMIENTO CON DIÁLISIS PERITONEAL.

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Medicina por la
Universidad de Alcalá de Henares

JOSE ANTONIO JIMÉNEZ HEFFERNAN

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Rafael Selgas Gutiérrez, Manuel López Cabrera y Jesús Cuevas Santos, directores de este trabajo.

A los distintos miembros del “Grupo de Estudios Peritoneales de Madrid” del Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas de la Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo. En especial, a los especialistas e investigadores de los Servicios de Nefrología, Inmunología y Biología Molecular de los Hospitales La Princesa y La Paz involucrados en esta área de investigación por su generosidad intelectual.

A los cirujanos, personal de enfermería y nefrólogos implicados en la obtención y procesamiento inicial de las biopsias peritoneales.

A los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital de Guadalajara y del Hospital la Zarzuela, Madrid, lugares donde se han realizado los estudios histopatológicos e inmunohistóquímicos. Especial agradecimiento a M. Ángeles Cuevas Paños, Pilar Embid Embid y Fernando Sastre Llana por toda la ayuda que me han prestado.

A mi compañero Cristian Perna, especialista en Anatomía Patológica, que ha colaborado en varios de los estudios que aquí se presentan.

A los Doctores Jaime Sánchez Fernández de la Vega y Eduardo Sanz Ortega, Jefes de los Servicios de Anatomía Patológica de los Hospital de Guadalajara y Puerta de Hierro, Madrid, respectivamente.

A mi familia por las facilidades prestadas y el tiempo robado.

ÍNDICE

1.- Abreviaturas

2.- Introducción

2.1.- La diálisis peritoneal y la membrana peritoneal normal.

2.2.- Histopatología básica del peritoneo durante la diálisis peritoneal.

2.2.1.- Formas clinicopatológicas de fibrosis peritoneal

2.2.2.- El submesotelio y los fibroblastos peritoneales

2.3.- Biología de fibroblasto.

2.3.1.- Fenotipos fibroblásticos

2.3.2.- Origen de los fenotipos fibroblásticos

2.3.3.- Funciones de los fibroblastos

2.3.4.- Destino de los fibroblastos

3.- Objetivos

4.- Pacientes y Métodos

5.- Resultados

5.1.- Capítulo I. Histopatología del peritoneo durante el tratamiento con diálisis peritoneal.

5.1.1.- “Modelos tisulares de fibrosis peritoneal”

5.1.2.- “Distribución tisular de las lesiones de vasculopatía hialinizante en pacientes en diálisis peritoneal. Un estudio autopsico”.

5.1.3.- “Cuantificación de mastocitos en el peritoneo normal y durante el tratamiento con diálisis peritoneal”.

5.2.- Capítulo II. Estudio del inmunofenotipo de los fibroblastos submesoteliales durante el tratamiento con diálisis peritoneal. Evidencia in vivo de transición epitelio-mesenquimal y diferenciación miofibroblástica.

5.2.1.- “Diálisis peritoneal y transición epitelio-mesenquimal de las células mesoteliales”.

5.2.2.- “Caracterización inmunohistoquímica de los fibroblastos en el tejido peritoneal normal y durante la fibrosis inducida por el tratamiento con diálisis peritoneal”.

5.2.3.- “Diferenciación miofibroblástica en la esclerosis peritoneal simple”.

5.3. Capítulo III. La transición epitelio-mesenquimal de la célula mesotelial y su posible relación con el transporte peritoneal a través de la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). “La conversión mesenquimal de las células mesoteliales como un mecanismo responsable del alto transporte de solutos durante la diálisis peritoneal: papel del factor de crecimiento vascular endotelial.”

5.4. Capítulo IV. Correlación morfofuncional: transición epitelio-mesenquimal y alto transporte peritoneal. “La transición epitelio-mesenquimal de las células mesoteliales es un fenómeno precoz en el tratamiento con diálisis peritoneal y se asocia con la situación de alto transporte.”

6. Discusión

7. Conclusiones

8. Bibliografía

1. ABREVIATURAS

DP: diálisis peritoneal

α -SMA: actina de músculo liso

TGF- β : factor de crecimiento transformante

TEM: transición epitelio-mesenquimal

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

VH: vasculopatía hialinizante

2. INTRODUCCIÓN

2.1.- La diálisis peritoneal y la membrana peritoneal normal

La diálisis peritoneal (DP) constituye una alternativa a la hemodiálisis en el tratamiento de la insuficiencia renal crónica. Esta técnica terapéutica se emplea desde hace más de 30 años y aprovecha la capacidad de la membrana peritoneal para actuar como una barrera permeable en la cual tiene lugar el transporte de agua o ultrafiltración y el de solutos o difusión (1-4). La DP se ve parcialmente limitada por la incapacidad de la membrana para mantener sus propiedades de transporte a largo plazo. Tanto el transporte de agua como el de sodio y el de pequeños solutos pueden verse afectados por esta limitación. La peor de las consecuencias funcionales es el fallo de ultrafiltración, que tiene como resultado la retención en el organismo de agua y sodio, aumento del volumen extracelular y un incremento del riesgo cardiovascular, que restringen el uso continuado de la técnica. El deterioro funcional del peritoneo tiene relación con la biocompatibilidad de los líquidos de diálisis, y la existencia de episodios de peritonitis, así como con la propia situación urémica del paciente (1-4). En relación a la composición de los líquidos de diálisis y su efecto negativo sobre el peritoneo, tienen especial importancia el pH, la glucosa y sus productos derivados. Estos agentes inducen una situación de daño crónico mantenido que se ve exacerbado por los episodios periódicos de peritonitis. Íntimamente ligado al fenómeno de respuesta inflamatoria se encuentra el proceso reparativo. Su activación será responsable de las anomalías estructurales descritas en la membrana peritoneal. A priori, es en el proceso

fibro-reparativo donde el fibroblasto peritoneal adquirirá su mayor protagonismo.

La histología del peritoneo es sencilla. La membrana se compone de una monocapa superficial de células mesoteliales cúbicas o ligeramente aplanadas, inmediatamente por debajo de la cual se dispone una membrana basal y la amplia región de tejido conectivo submesotelial (5,6). En el peritoneo parietal se continúa con tejido adiposo y muscular esquelético, y en el peritoneo visceral con distintas estructuras viscerales. La mayor parte de la membrana peritoneal esta constituida por la región submesotelial, que incluye venas, arterias y linfáticos. El submesotelio normal es una zona escasamente celular con predominio de matriz extracelular laxa. Entre los escasos elementos celulares, destacan fibroblastos, mastocitos y ocasionales macrófagos. El espesor de la región submesotelial es variable, con una media de unas 50 μm , admitiéndose valores extremos de normalidad en torno a las 150 μm (7).

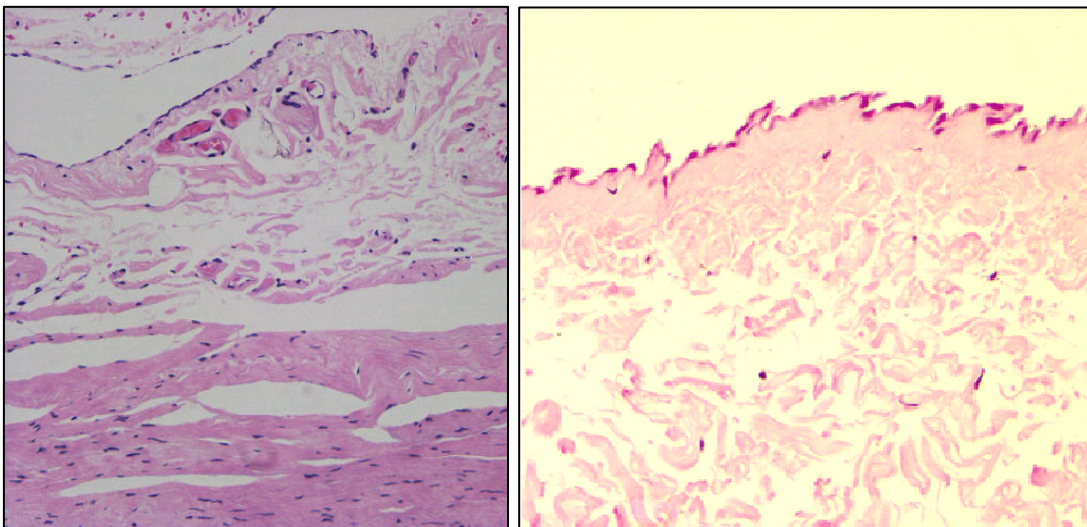


Figura 1. Peritoneo parietal normal. En la imagen de la izquierda, se observa área submesotelial laxa en contraste con la densa fascia presente en profundidad. En ambas imágenes se identifica estrato mesotelial superficial preservado y escasa celularidad submesotelial.

2.2.- Histopatología básica del peritoneo durante la diálisis peritoneal

Diversos estudios han abordado los cambios estructurales histológicos del peritoneo durante la DP (7-16). La gran mayoría de ellos coinciden en señalar como los más relevantes:

- Pérdida de la capa de células mesoteliales
- Fibrosis submesotelial
- Angiogénesis
- Vasculopatía hialinizante

Clásicamente, se ha considerado que la pérdida de celularidad mesotelial se debe tanto a muerte celular por toxicidad como a exfoliación mecánica. La fibrosis o esclerosis supone un incremento y variación cualitativa de la matriz extracelular, que progresa de forma proporcional al tiempo en diálisis. En fases avanzadas del tratamiento es frecuente que se observe fibrosis con muy escasa celularidad fibroblástica acompañante, fenómeno que se conoce como “desierto celular” (5). Se ha descrito que la membrana peritoneal de los pacientes en DP muestra además un fenómeno de angiogénesis. Los trabajos que reflejan este fenómeno se basan, mayoritariamente, en series de pacientes que abandonan la técnica como consecuencia de diferentes complicaciones y defectos en el transporte peritoneal (12-14). Estudios más recientes sugieren que en pacientes estables, sin complicaciones, no se produce tal fenómeno de angiogénesis (7,15).

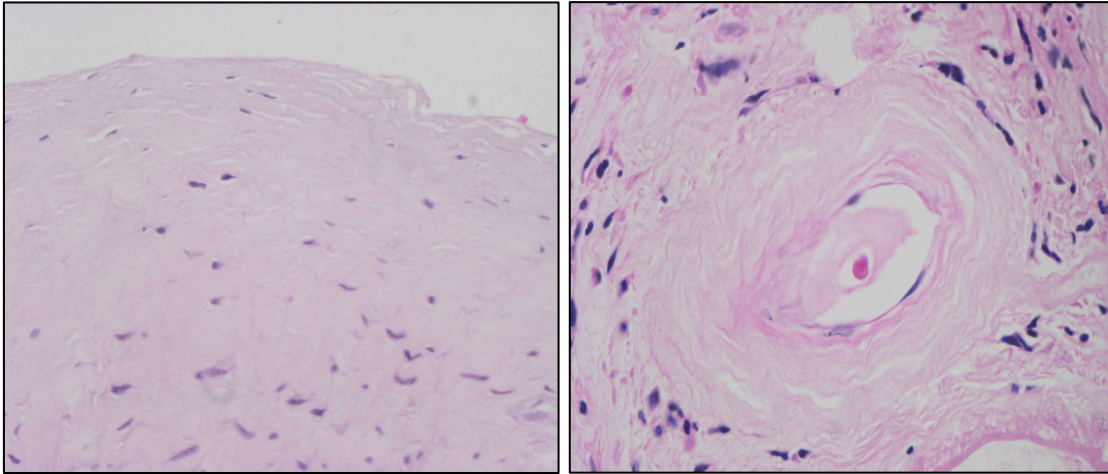


Figura 2. Imágenes características del peritoneo de pacientes en DP. En la imagen de la izquierda, se evidencia pérdida mesotelial y células fibroblásticas en un espacio submesotelial fibrosado con aspecto homogéneo. A la derecha, se observa vasculopatía hialinizante con un marcado engrosamiento vascular parietal que se debe a reduplicación de membrana basal de tipo diabetiforme.

Por último, entre las lesiones inducidas por DP, cabe destacar VH, lesión muy similar a la vasculopatía diabética y que se caracteriza por un marcado engrosamiento de la pared vascular de vénulas y capilares. Al igual que en la diabetes, se debe a la reduplicación de la membrana basal subendotelial (8,9). La intensidad y extensión de la lesión es variable y se asocia al tiempo en diálisis y a la fibrosis submesotelial (7,15). Si bien no existen estudios precisos de correlación morfo-funcional, estas alteraciones estructurales se consideran relacionadas con el fallo de ultrafiltración y pérdida de la capacidad dialítica del peritoneo.

Es importante destacar que algunos de estos estudios indican que la situación de uremia es capaz, por sí misma, de inducir lesiones similares a las observadas tras tratamiento con DP, si bien de menor intensidad (7,12,14,16).

En concreto, se ha descrito que el peritoneo de pacientes urémicos (en

hemodiálisis o pre-tratamiento dialítico) muestra ligera engrosamiento submesotelial y grados leves de VH.

2.2.1.- Formas clinicopatológicas de fibrosis peritoneal

Existen dos formas clínico-patológicas de fibrosis relacionada con la DP (17-19). La más frecuente es la esclerosis (fibrosis) peritoneal simple que aparece en la práctica totalidad de los pacientes dializados. El grado de fibrosis es en general leve y muestra relación con el tiempo en diálisis. El proceso de esclerosis simple se ve interrumpido cuando el paciente es trasplantado o derivado a hemodiálisis. En el otro extremo del espectro de fibrosis se encuentra el proceso conocido como peritonitis esclerosante. Esta es una forma infrecuente de fibrosis peritoneal que evoluciona rápidamente, con intensa fibrosis que asocia inflamación, depósitos de fibrina y en ocasiones calcificaciones distróficas y osificación. Es un proceso grave que en muchos casos evoluciona a encapsulación visceral, con compromiso vital para el paciente. En la situación de peritonitis esclerosante la fibrosis progresa incluso a pesar de la interrupción de la DP (17-19).

2.2.2.- El submesotelio y los fibroblastos peritoneales

A diferencia de las células mesoteliales, la repercusión del tratamiento con DP sobre los fibroblastos peritoneales ha sido objeto de escasos estudios. Esto se debe, en parte, a las dificultades que existen en su obtención. Las células mesoteliales se exfolian de forma abundante al líquido de diálisis y son fáciles de recoger en el efluente. Por el contrario, el estudio de fibroblastos requiere la obtención de muestras tisulares, ya sea para su análisis in vivo o in vitro. Son

pocos los grupos de trabajo que realizan de forma sistemática biopsias peritoneales de pacientes en DP. Estas biopsias no son fáciles de obtener y hay que esperar a oportunidades como el trasplante o cirugías abdominales para solicitarlas al cirujano. Además hay que esperar varios años para obtener un número lo suficientemente elevado como para extraer conclusiones significativas. Por ello, es habitual que algunos centros colaboren de forma multicéntrica, tal y como ha ocurrido con el registro de biopsias peritoneal de Cardiff (Reino Unido) (7) o el de Japón (16).

El elemento celular mayoritariamente responsable del proceso fibro-reparativo es el fibroblasto y su forma celular mas activa, el miofibroblasto (20-22).

Además de la fibrosis submesotelial, el tratamiento de DP conlleva otras importantes alteraciones vasculares (angiogénesis y VH). Existe una evidencia cada vez mayor de que la fibrosis y la angiogénesis, así como probablemente un incremento en la permeabilidad vascular, son factores clave en la pérdida de la capacidad de ultrafiltración de la membrana peritoneal. La relación entre la fibrosis peritoneal y la angiogénesis no es clara (23,24). En algunos modelos animales ha sido posible separar ambas respuestas tras inducción de daño peritoneal. No obstante en los pacientes sometidos a DP los fenómenos de fibrosis y angiogénesis aparecen íntimamente relacionados (23). Así pues, el fibro-miofibroblasto peritoneal no sólo actuaría como principal responsable del proceso de fibrosis, si no que su espectro funcional se extendería también a angiogénesis.

2.3.- Biología del fibroblasto

2.3.1.- Fenotipos fibroblásticos

Los fibroblastos representan una población celular dinámica con diversidad fenotípica y funcional (20,21). Durante los últimos años hemos asistido al descubrimiento y descripción de diferentes moléculas que son expresadas por los fibroblastos tisulares. No todos los fibroblastos expresan un perfil molecular similar en el mismo momento. Esta heterogeneidad fenotípica probablemente refleja un diferente origen, estado de activación o capacidad funcional. Es más, algunos estudios demuestran la existencia de heterogeneidad fibroblástica en función de los órganos y tejidos de procedencia. La “especificidad tisular” de los fibroblastos refleja esta diversidad fenotípica y funcional y determina que no sea posible extrapolar las funciones descritas para un tipo fibroblástico de un órgano a otro. De las diversas moléculas asociadas con los distintos fenotipos fibroblásticos, son aquellas que se relacionan con la diferenciación muscular lisa las que tienen una mayor importancia. En concreto, el término miofibroblasto define a una célula con características intermedias entre un fibroblasto y una célula muscular lisa (20,21,25,26). Desde un punto de vista inmunofenotípico se definen por la expresión de la isoforma α de la actina muscular. Los miofibroblastos fueron inicialmente descritos en el tejido de granulación presente en el modelo de reparación tisular cutáneo (25). Desde entonces, su presencia ha sido descrita en la práctica totalidad de las situaciones de fibrosis y reparación tisular que tienen lugar en patología humana (20). Su capacidad para sintetizar elementos de la matriz extracelular, factores de crecimiento ó citoquinas, así como su capacidad para participar en

la respuesta inflamatoria y su capacidad contráctil, los convierten en el fenotipo fibroblástico más importante. De hecho, los miofibroblastos son considerados el fenotipo fibroblástico de referencia, frente al cual se comparan todos los restantes (27). Según parece, no todos los fibroblastos son capaces de transformarse en miofibroblastos. Diferentes estudios, utilizando fibroblastos humanos, han demostrado que esta capacidad de conversión a miofibroblasto queda limitada a determinados subtipos fibroblásticos y parece relacionada con el tejido de origen. Thy-1 es un glicoproteína de membrana que se expresa de forma heterogénea en los fibroblastos de distintos tejidos. Su función es todavía desconocida, pero permite clasificar a los fibroblastos en Thy-1⁺ o Thy-1⁻. Estos distintos inmunofenotipos muestran igualmente una diversa capacidad fenotípica y funcional. En un estudio realizado en fibroblastos de la órbita y miometrio, únicamente aquellos con fenotipo Thy-1⁺ mostraron capacidad de diferenciación miofibroblástica tras tratamiento con TGF- β (28). Estudios con fibroblastos de origen pulmonar han demostrado que el fenotipo Thy-1⁻ tiene una capacidad proliferativa incrementada en respuesta a factores de crecimiento fibrogénico. En los focos fibroblásticos de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática no se observa expresión de Thi-1. Por contra, los fibroblastos obtenidos del pulmón normal muestran un fenotipo preferentemente Thi-1⁺. Estos hechos sugieren que la presencia de fibroblastos Thi-1⁺ en el pulmón limita el desarrollo de fibrosis (29).

En el peritoneo, la presencia del fenotipo miofibroblástico se correlaciona con la expresión de la proteína de choque térmico 47 (30). Las proteínas de choque térmico son chaperonas que se inducen en presencia de calor (stress). Su función es evitar plegamientos anómalos de las proteínas durante la síntesis

proteica. La proteína de choque térmico 47 es una chaperona específica del colágeno que resulta esencial para la síntesis y secreción de ésta molécula. En contraste con los fibroblastos peritoneales en reposo, aquellos obtenidos de pacientes en DP muestran una elevada expresión de esta proteína. Dicha expresión es mayor en pacientes con pérdida de ultrafiltración (30). La proteína no se expresa en los fibroblastos obtenidos de pacientes urémicos sin tratamiento con DP. La importancia de esta proteína ha sido demostrada utilizando un modelo de fibrosis peritoneal de rata. El grupo de animales tratados con nucleótidos anti-sentido ("antisense nucleotides") frente a la proteína no desarrolló fibrosis peritoneal (31).

Otra molécula de interés que se expresa en los fibroblastos es el CD34. Dicha molécula es un antígeno característicamente presente en las células madre totipotenciales hematopoyéticas de médula ósea. Igualmente, CD34 se expresa en numerosos fibroblastos tisulares humanos de muy diferente distribución (32). Para algunos autores, los fibroblastos tisulares CD34+ se encuentran íntimamente relacionados con los fibrocitos circulantes CD34+ y tienen un origen común en médula ósea (33). Los fibrocitos circulantes fueron descritos por Bucala et al como un nuevo subtipo de leucocitos circulantes (34,35). Suponen el 0,1-0,5 % de los leucocitos circulantes, y además de CD34, expresan colágeno I, CD45RO, CD13, CD11b, CD86 y moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad. En cultivo tienen una morfología fusiforme y se transforman en miofibroblastos tras exposición a TGF- β . Distintos estudios han mostrado pérdida de expresión fibroblástica de CD34 en situaciones de fibrosis (32,33,35,36). Su significado es desconocido, pero la

pérdida de CD34 parece correlacionarse con la aparición del fenotipo miofibroblástico.

Entre otras moléculas de expresión variable en fibroblastos y con implicaciones etiopatogénicas, destacaríamos la ciclooxigenasa 2 y la telomerasa. Los fibroblastos obtenidos de tejido peritoneal fibrótico (en adherencias peritoneales postquirúrgicas) muestran elevada expresión de ciclooxigenasa 2, en contraste con la ausencia de expresión de los fibroblastos peritoneales en reposo (37). Esta inducción de ciclooxigenasa 2 se acompaña de prostaglandina E₂, ofreciendo la posibilidad de intervenir terapéuticamente. Por último, mencionaremos la variable expresión fibroblástica de la enzima telomerasa implicada en la integridad de los telómeros y la estabilidad de la división celular. En situaciones de fibrogénesis se observa una expresión fibroblástica incrementada de este enzima, hecho que se postula como parcialmente responsable de un aumento en la longevidad del fibro-miofibroblasto y mayor actividad pro-fibrogénica (38).

2.3.2.- Origen de los fenotipos fibroblásticos

En la actualidad, existe evidencia de que los fibro-miofibroblastos tiene distintos orígenes celulares (20,21,26,27). En primer lugar, pueden derivar de células madre tisulares o fibroblastos quiescentes (en el caso de los miofibroblastos). En segundo lugar, pueden originarse de células epiteliales localizadas en vecindad gracias a un fenómeno conocido como transición epitelio-mesenquimal (TEM). Por último, la médula ósea y células circulantes en sangre pueden ser responsables de la generación de fibro-miofibroblastos. Estos circularían por el torrente sanguíneo hacia su destino tisular final.

La TEM fue descrita inicialmente como una importante fuente de fibro-miofibroblastos en el modelo de fibrosis renal (39). Este proceso ha sido igualmente involucrado en la formación de cataratas y, recientemente, en la fibrosis pulmonar y cirrosis hepática (40,41). Por este mecanismo, la célula epitelial estimulada se modifica morfológicamente perdiendo la polaridad apical-basal, las uniones intercelulares (adherencia a otras células) y, tras romper la membrana basal y adquirir capacidad migratoria, penetra en el compartimento estromal subepitelial. Parte de la evidencia de la participación del fenómeno de TEM en fibrogénesis deriva de estudios in vivo, que demuestran como un porcentaje variable de fibroblastos localizados en el estroma expresan marcadores epiteliales y viceversa. La expresión de citoqueratinas y otras moléculas mesoteliales en los fibroblastos pleurales se conoce desde hace tiempo (6). Hasta ahora, dicha expresión ha sido interpretada como un fenómeno de diferenciación de células madre tisulares residentes o fibroblastos a células mesoteliales (6,42). Aún queda por establecer qué proporción de miofibroblastos resulta del fenómeno de TEM, así como la dinámica por la cual dicho fenómeno tiene lugar. Con mayor probabilidad dicho fenómeno no sería uniforme, si no que variaría según la presencia de diversos factores estimulantes e inhibitorios. El fenómeno de TEM involucra a diferentes mecanismos moleculares y resulta una importante diana para el desarrollo de nuevas terapéuticas farmacológicas.

La médula ósea, así como los fibrocitos circulantes, constituyen una tercera fuente de fibro-miofibroblastos. En la cirrosis hepática, asma bronquial y fibrosis pulmonar una proporción variable de fibro-miofibroblastos derivan de la médula ósea (43). Igualmente, en el tejido de granulación secundario al implante de un

cuerpo extraño en peritoneo se ha demostrado la presencia de miofibroblastos peritoneales de origen en médula ósea (44). Las grandes similitudes que existen en el proceso fibrogénico, independientemente de su agente causal, nos permite sospechar una similar contribución de la médula ósea a la fibrosis peritoneal inducida por el tratamiento con diálisis.

2.3.3.- Funciones de los fibroblastos

La función más importante y mejor conocida de los fibro-miofibroblastos es la producción de elementos de la matriz extracelular (20), que mantienen la integridad y renuevan el tejido conectivo. Dicha función es la responsable de la aparición de fibrosis tisular. Además de esta función bien conocida, los fibro-miofibroblastos son capaces de inducir angiogénesis, modular la respuesta inflamatoria y producir contracción tisular (20). Esta capacidad funcional heterogénea muestra una notable concordancia con la patología peritoneal secundaria al tratamiento con DP: fibrosis, angiogénesis, peritonitis y los raros casos de encapsulación visceral progresiva. En casi todas las enfermedades que cursan con fibrosis, el miofibroblasto ha sido identificado como el principal componente celular responsable del depósito de matriz (20-22), y su presencia se correlaciona con la progresión de enfermedad. Además de colágeno, los miofibroblastos producen múltiples otros elementos de la matriz extracelular, así como factores de crecimiento. Estos últimos inducen proliferación celular y diferenciación celular Terminal, así como movilidad celular. Entre estos factores, y dada su importancia en la patología peritoneal, cabe mencionar el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β). La importancia de los fibroblastos y este factor de crecimiento en la génesis de la fibrosis peritoneal

ha sido ampliamente descrita en modelos experimentales animales (45). La eliminación artificial de los fibroblastos peritoneales previene la aparición morfológica de fibrosis y anomalías funcionales del peritoneo (46). Utilizando un modelo de transferencia génica por adenovirus se ha demostrado que el TGF- β 1 causa fibrosis peritoneal y angiogénesis (47).

Durante los últimos años, tanto la angiogénesis como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) han sido reconocidos como importantes protagonistas de la patología peritoneal. VEGF es capaz de inducir angiogénesis, así como de aumentar la permeabilidad celular endotelial.

Ambos hechos son potencialmente responsables del incremento en el transporte de solutos peritoneales y de la pérdida de ultrafiltración. Resulta de especial interés determinar qué elementos celulares del peritoneo son los principalmente involucrados en la producción de VEGF y cuáles son los mecanismos que estimulan dicha producción. Estudios puntuales han demostrado que no sólo las células mesoteliales y endoteliales, sino también los fibro-miofibroblastos peritoneales son capaces de producir VEGF (24).

Los miofibroblastos son capaces de participar en la respuesta inflamatoria (20).

Tienen capacidad tanto de activar como de inhibir la respuesta inflamatoria mediante la producción y secreción de diferentes mediadores químicos.

Estudios en fibro-miofibroblastos peritoneales han demostrado que dichas células son capaces de producir la proteína quimiotáctica de monocitos-1, que tiene efecto quimiotáctico sobre los macrófagos. La pérdida selectiva de dichos fibroblastos reduce el número de macrófagos que infiltran el peritoneo, lo que sugiere un papel importante de los mismos en el reclutamiento macrofágico (46). Los macrófagos serían capaces de producir numerosas moléculas

fibrogénicas y de esta manera perpetuar un ciclo profibrogénico. Consideramos especialmente interesante el papel de los miofibroblastos como una célula reguladora de la inflamación en la situación de fibrosis peritoneal, ya que en condiciones estables de tratamiento es un escenario con escasa celularidad inflamatoria. La última de las funciones miofibroblásticas que mencionamos tiene relación con su capacidad contráctil (20,22). Un importante hecho del tejido fibrótico es que posee diferentes capacidades mecánicas cuando se compara con tejido normal, siendo esto especialmente relevante en el pulmón. De nuevo, el fenotipo miofibroblástico ayuda a explicar estas diferentes características mecánicas. El modelo de contracción in vivo de heridas así como la contracción de geles de colágeno in vitro se correlaciona con la aparición del fenotipo miofibroblástico y en concreto de α -actina (20). En relación con la patología peritoneal, algunas formas de peritonitis esclerosante se caracterizan por una encapsulación progresiva y de creciente intensidad de las vísceras abdominales, preferentemente las asas de intestino delgado. Tal fenómeno de encapsulación progresiva refleja la existencia de contracción tisular y señalan al miofibroblasto como el fenotipo celular más probablemente responsable de dicha contracción.

Por todo lo mencionado anteriormente, podemos concluir que los fibroblastos activados, así como los miofibroblastos, son con mayor probabilidad elementos celulares claves en el desarrollo de las anomalías estructurales peritoneales observadas en relación con el tratamiento con DP.

2.3.4.- Destino de los fibroblastos

Una vez que el agente causal y responsable del daño celular y tisular desaparece, las señales de activación de la inflamación y respuesta reparativa desaparecen igualmente de forma gradual (20,22,45). En el modelo de curación de heridas, los miofibroblastos desaparecen de forma progresiva, muy posiblemente mediante un mecanismo de apoptosis. En claro contraste, las situaciones de cicatrización exagerada se observa una persistencia de miofibroblastos, a pesar del cese del estímulo lesional (45). Esta situación de cicatrización cutánea anómala muestra similitudes con la enfermedad fibrótica progresiva que se observa en la cirrosis hepática, enfermedad renal terminal y fibrosis pulmonar idiopática, así como en la peritonitis esclerosante (20,45).

Todas estas situaciones se caracterizan por una progresión irreversible de la fibrosis a pesar de la eliminación del agente etiológico causal. Este comportamiento celular autónomo remeda lo que se observa en la proliferación celular neoplásica. Una de las características del crecimiento neoplásico es la capacidad que muestran las células transformadas para escapar de la apoptosis, y una similar capacidad ha sido descrita en los fibro-miofibroblastos obtenidos de órganos fibróticos (22,45). Existe un considerable interés en establecer las señales in vivo de apoptosis, así como los fenotipos fibroblásticos que son capaces de escapar a la muerte celular. Al comparar las dos formas clínico-patológicas de fibrosis peritoneal (esclerosis peritoneal simple y peritonitis esclerosante), parece posible inferir que los fibroblastos de los pacientes con peritonitis esclerosante se encuentren parcialmente protegidos de los mecanismos de muerte celular (apoptosis). Además de la vía apoptótica, debe considerarse la posibilidad de reversibilidad del fenómeno de

transformación miofibroblástica. En este sentido, la plasticidad fibroblástica ha sido bien documentada, así como la posibilidad de transición fibroblasto-epitelial en fibroblastos renales (48).

3. OBJETIVOS

- 1.-** Describir y validar morfológicamente una serie de biopsias peritoneales de pacientes en DP.
- 2.-** Analizar la expresión en fibroblastos peritoneales de diferentes moléculas implicadas en fibrogénesis.
- 3.-** Evaluar in vivo el fenómeno transición epitelio-mesenquimal de la célula mesotelial y su posible implicación en los mecanismos patogénicos asociados al tratamiento con DP.
- 4.-** Evaluar la posible relación entre fibroblastos submesoteliales, producción de VEGF y neoangiogénesis en la membrana peritoneal.
- 5.-** Establecer si existe correlación morfo-funcional entre los cambios histopatológicos e inmunofenotípicos de los fibroblastos y la función peritoneal.

4. PACIENTES Y METODOS

La totalidad de los materiales empleados, datos de pacientes, así como la metodología se describen en cada uno de los apartados correspondientes de cada uno de los capítulos de resultados. Conviene, no obstante, hacer especial énfasis en el método de obtención de las biopsias peritoneales así como su manejo, dado lo inhabitual de este tipo de muestras.

Las biopsias de pacientes en diálisis o urémicos provienen del peritoneo parietal de la pared abdominal anterior. En la actual serie han sido obtenidas por cirujanos en una de las siguientes situaciones: a) durante la realización de un trasplante renal, b) durante la inserción o retirada de catéter de DP, c) durante la realización de cirugía abdominal. Las muestras de controles sanos proceden de una doble población. Por un lado, donantes de órganos, a los que se les toma una muestra de peritoneo parietal y en segundo lugar casos de autopsia en los que no existe patología abdominal o renal. En estos casos la muestra es igualmente de la pared abdominal anterior.

Una vez extraído, el tejido peritoneal es rápidamente sumergido en formol para evitar su desecación. Las muestras tienen coloración blanquecina y morfología laminar, cuadrangular con dimensiones entre 10-25 x 10-25 mm y espesor aproximado entre 1 y 2 mm. Pueden acompañarse de una escasa cantidad de tejido adiposo. Con objeto de evitar plegamientos conviene estirar suavemente la muestra. Para esto resulta ideal usar una base de corcho y aguas, evitando manipular la superficie dada la fragilidad del revestimiento mesotelial. Tras una fijación aproximada de 12 a 24 horas se procede al procesamiento tisular rutinario. Para ello la muestra es seccionada en segmentos similares, paralelos

de unos 15 x 4-5 mm para su inclusión en parafina. El técnico responsable de las secciones con el microtomo debe ser avisado para que disponga el tejido de forma adecuada para realizar cortes perpendiculares.

5.- RESULTADOS

Capítulo 5.1. Histopatología del peritoneo durante el tratamiento con diálisis peritoneal

5.1.1 “Modelos tisulares de fibrosis peritoneal”

Jiménez-Heffernan JA, Cirugeda A, Bajo MA, del Peso G, Pérez-Lozano ML, Perna C, Selgas R, López-Cabrera M.

The International Journal of Artificial Organs 2005;28:105-111

Este trabajo responde a los objetivos 1 y 3

Modelos tisulares de fibrosis peritoneal.

Objetivo: Evaluar la utilidad de muestras patológicas de tejido peritoneal no relacionadas con tratamiento de DP, para el estudio de la fibrosis e inflamación peritoneal. Este tipo de muestras, a diferencia de las biopsias peritoneales de pacientes en diálisis, son abundantes y fáciles de obtener

Métodos: Estudio morfológico e inmunohistoquímico comparativo de muestras peritoneales patológicas tanto de pacientes en tratamiento con DP como de pacientes sin dicho tratamiento. Se analiza con especial interés la expresión de marcadores miofibroblásticos, así como de TEM.

Resultados: En relación con los cambios histopatológicos, la fibrosis relacionada con la DP mostró menor celularidad, con una mayor hialinización estromal, determinando un aspecto hipocelular, homogéneo del submesotelio. En contraste, la fibrosis no relacionada con DP mostró un aspecto más celular, con una matriz extracelular de aspecto denso y fibrilar con anchas bandas de colágeno. Las lesiones de VH se encontraron exclusivamente en el grupo de pacientes en DP.

La diferenciación miofibroblástica y el fenómeno de TEM fueron hallazgos frecuentes en todas las distintas situaciones de fibrosis peritoneal independientemente de su origen. La calponina y la calretinina son marcadores moleculares útiles en el estudio de los mecanismos fibrogénicos y su expresión se correlaciona con otros conocidos marcadores tales como α -SMA y citoqueratinas, respectivamente. Su expresión fue mucho más intensa en aquellas muestras que asociaban inflamación aguda (peritonitis).

Conclusiones: Los modelos tisulares de fibrosis peritoneal no asociada a tratamiento con DP son útiles para evaluar importantes características de la patología peritoneal en humanos relacionada con fibrogénesis e inflamación. Mecanismos implicados en fibrogénesis tales como la diferenciación miofibroblástica y la TEM son evidentes en estas muestras, lo que nos permite utilizarlas como una fuente accesible para estudios tanto in vivo como ex vivo. Ambos fenómenos muestran su máxima expresión en situaciones de inflamación aguda lo cual apoya un importante papel etiopatogénico en los episodios de peritonitis en relación con la progresión de la fibrosis peritoneal.

5.1.2. “Distribución tisular de las lesiones de vasculopatía hialinizante en pacientes en diálisis peritoneal. Un estudio autopsico”.

Jiménez-Heffernan JA, Perna C, Bajo MA, Picazo ML, Tejerina E, del Peso G, Aroeira L, Aguilera A, López-Cabrera M, Selgas R.

Pathology Research and Practice 2008;204:563-567

Este trabajo responde al objetivo 1

Distribución tisular de las lesiones de vasculopatía hialinizante en pacientes en diálisis peritoneal. Un estudio autopsico.

Se considera que la uremia es capaz, por si misma, de inducir anomalías estructurales del peritoneo incluyendo lesiones de VH. Con el objetivo de estudiar la contribución de la uremia a la severidad de las lesiones de VH hemos realizado un estudio autopsico de pacientes sometidos a tratamiento con DP que mostraban intensas lesiones peritoneales de VH. La uremia es una condición sistémica y por lo tanto, si es capaz de inducir lesiones de VH, resultaría esperable detectar dichas lesiones no sólo en el peritoneo sino en tejidos extraperitoneales. Se evaluaron muestras tisulares de siete casos de autopsia correspondientes a pacientes con largo periodo de tiempo en DP que mostraban a éste nivel intensas lesiones de VH. Se revisaron preparaciones histológicas del peritoneo, la totalidad de los órganos abdominales, corazón y pericardio, pulmones, pleura visceral y sistema nervioso central.

A nivel peritoneal las lesiones de VH eran intensas. Igualmente, se observó intensa fibrosis así como variable presencia de inflamación, fibrina y calcificaciones. Salvo por la presencia focal de lesiones de VH en la submucosa intestinal de un paciente diabético, estas se disponían de forma exclusiva en la membrana peritoneal. No se observaron lesiones de VH en ninguno de los restantes tejidos extraperitoneales.

En conclusión, los tejidos extraperitoneales de los pacientes en tratamiento con DP no mostraron lesiones relevantes de VH. Esta observación sugiere que, de forma mayoritaria, la severidad de la vasculopatía depende de factores directamente relacionados con el tratamiento de DP. La uremia podría

participar en el desarrollo de la lesión pero no parece directamente responsable de su intensidad.

5.1.3. “Cuantificación de mastocitos en el peritoneo normal y durante el tratamiento con diálisis peritoneal”.

Jiménez-Heffernan JA, Bajo MA, Perna C, del Peso G, Larrubia JR, Gamallo C, Sánchez-Tomero JA, López-Cabrera M, Selgas R.

Archives of Pathology and Laboratory Medicine 2006;130:1188-1192

Este trabajo responde al objetivo 1

Cuantificación de mastocitos en el peritoneo normal y durante el tratamiento con diálisis peritoneal.

Introducción: Los mastocitos han sido implicados en fibrogénesis, angiogénesis y defensa inmunitaria frente a infección bacteriana. Estos tres mecanismos participan en la patología peritoneal secundaria al tratamiento con DP. A pesar de la potencial relevancia de los mastocitos en la patología relacionada con la DP existen muy pocos estudios a este respecto.

Objetivo: Evaluar posibles variaciones en el número de mastocitos tisulares peritoneales durante el tratamiento con DP.

Métodos: Un estudio cuantitativo de mastocitos tisulares en el peritoneo normal y en el peritoneo patológico relacionado con la DP. Se analizaron muestras correspondientes a biopsias de peritoneo parietal de cuatro grupos de pacientes: (1): Controles normales (n=9), (2): Pacientes urémicos sin tratamiento con DP (n=16), (3): Pacientes urémicos en DP (n=26), y (4): Pacientes con hernia inguinal sin patología renal (n=20). Los mastocitos fueron evaluados mediante detección inmunohistoquímica de triptasa. Igualmente se evaluó el número de secciones de estructuras vasculares en las biopsias peritoneales de 22 de los 26 pacientes en DP.

Resultados: Las muestras tisulares de pacientes en DP evidenciaron fibrosis, pérdida de células mesoteliales y presencia variable de VH. El número de mastocitos fué similar en los controles normales y pacientes urémicos sin tratamiento con DP ($7,13 \pm 0,67$ y $7,74 \pm 0,74$, respectivamente). Los pacientes en DP mostraron una reducción ($4 \pm 0,38$, $P < 0.001$) en el número de mastocitos mientras que las muestras correspondientes a los sacos herniarios revelaron

un incremento en dicha celularidad ($10,59 \pm 3,48$). La reducción en el número de mastocitos no mostró correlación con el tiempo de diálisis, fibrosis, número de vasos o episodios previos de peritonitis.

Conclusiones: El peritoneo de los pacientes que reciben tratamiento con DP muestra una reducción en el número de mastocitos. A pesar de dicha reducción se sigue produciendo fibrosis submesotelial lo cual sugiere que los mastocitos no juegan un papel crítico en la génesis de la fibrosis peritoneal. La pérdida de mastocitos pudiera ser un factor que contribuye al desarrollo de episodios de peritonitis en pacientes en DP.

Capítulo 5.2. Estudio del inmunofenotipo de los fibroblastos submesoteliales durante el tratamiento con diálisis peritoneal. Evidencia in vivo de transición epitelio-mesenquimal y diferenciación miofibroblástica

5.2.1. “Diálisis peritoneal y transición epitelio-mesenquimal de las células mesoteliales”.

Yañez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, Bajo MA, Álvarez V, Castro MA, del Peso G, Cirugeda A, Gamallo C, Sánchez-Madrid F, López-Cabrera M.

New England Journal of Medicine 2003;348:403-413

Este trabajo responde al objetivo 3

Este estudio ha recibido el Premio de la Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo (FRIAT) al mejor trabajo de investigación básica en el año 2003 (concedido a D. Manuel López Cabrera).

Diálisis peritoneal y transición epitelio-mesenquimal de las células mesoteliales.

Introducción: Durante el tratamiento con DP el peritoneo es expuesto a líquidos de diálisis bioincompatibles lo cual causa denudación de células mesoteliales y fibrosis tisular con fallo de ultrafiltración. Los mecanismos relacionados con dicho fenómeno están aún por determinar.

Métodos: Se aislaron células mesoteliales del líquido de diálisis efluente de pacientes sometidos a tratamiento con DP continua ambulatoria que fueron fenotípicamente caracterizados mediante citometría de flujo, inmunofluorescencia confocal, Western blotting, y PCR transcriptasa-inversa. Dichas células fueron comparadas con células mesoteliales obtenidas del omento y tratadas in vitro mediante varios factores estimulantes, con objeto de activar la transdiferenciación observada durante el tratamiento con DP. Los resultados fueron confirmados in vivo mediante análisis inmunohistoquímico realizado en biopsias peritoneales.

Resultados: De forma precoz tras el inicio del tratamiento con DP las células mesoteliales sufren un proceso de transición de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal con una pérdida progresiva de morfología epitelial y disminución en la expresión de citoqueratinas y cadherina E, todo ello a través de la inducción del represor de la transcripción snail. Las células mesoteliales también adquieren un fenotipo migratorio con sobre-regulación de la expresión de α_2 integrina. El estudio in vitro señala al fenómeno de reparación tisular y a las citoquinas profibróticas e inflamatorias como los factores que inician la transdiferenciación mesotelial. Los estudios inmunohistoquímicos en biopsias

peritoneales de pacientes en tratamiento con DP continua ambulatoria demostraron la expresión de marcadores mesoteliales, tales como ICAM-1 y citoqueratinas, en células fibroblásticas de localización en el estroma submesotelial, sugiriendo que dichas células derivan de la conversión local de las células mesoteliales.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que las células mesoteliales tienen un papel activo en las alteraciones estructurales y funcionales del peritoneo durante la DP. Estos hallazgos establecen potenciales dianas en el diseño de nuevas soluciones de diálisis así como marcadores para el seguimiento de éstos pacientes.

5.2.2. “Caracterización inmunohistoquímica de las poblaciones fibroblásticas en el tejido peritoneal normal y durante la fibrosis inducida por el tratamiento con diálisis peritoneal”.

Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira L, Lara-Pezzi E, Bajo MA, del Peso G, Ramírez M, Gamallo C, Sánchez-Tomero JA, Alvarez V, López-Cabrera M, Selgas R.

Virchow Archives 2004;444:247-256

Este trabajo responde a los objetivos 2,3

Caracterización inmunohistoquímica de las poblaciones fibroblásticas en el tejido peritoneal normal y durante la fibrosis inducida por el tratamiento con diálisis peritoneal.

Introducción: La fibrosis peritoneal es uno de los cambios morfológicos más frecuentemente observados en el peritoneo de los pacientes sometidos a tratamiento con DP. Tanto los fibroblastos residentes como nuevas células fibroblásticas derivadas del mesotelio mediante el mecanismo de TEM se ven involucradas en el fenómeno de fibrogénesis.

Objetivo: Estudiar marcadores inmunohistoquímicos de daño peritoneal así como claves patogénicas para explicar el proceso de fibrogénesis.

Métodos: Estudio inmunohistoquímico centrado en fibroblastos peritoneales. Se estudiaron biopsias de peritoneo parietal de cuatro grupos de pacientes: controles normales (n=15), pacientes urémicos no sometidos a tratamiento con DP (n=17), pacientes urémicos en tratamiento con DP (n=27) y pacientes con hernia inguinal, sin patología renal (n=12). Con objeto de evaluar la conversión miofibroblástica de células mesoteliales se estudió la expresión de α -SMA, desmina, citoqueratinas y cadherina E. La expresión fibroblástica del marcador CD34 fue igualmente analizada.

Resultados: Los fibroblastos de pacientes controles y urémicos sin tratamiento con DP mostraron una intensa expresión de CD34, sin presencia de marcadores miofibroblásticos o mesoteliales. En las muestras de fibrosis peritoneal asociada al tratamiento con DP el patrón inmunohistoquímico observado fue el inverso.

Conclusiones: La expresión de citoqueratinas, y cadherina-E por células fibroblásticas así como α -SMA por células mesoteliales y estromales sugiere que el fenómeno de transición mesotelio-miofibroblasto tiene lugar durante el tratamiento con DP. La pérdida de expresión de CD34 se correlaciona con el grado de fibrosis peritoneal. El inmunofenotipo de los fibroblastos varía durante la progresión de la fibrosis. Los miofibroblastos parecen derivar tanto de la activación de fibroblastos residentes locales así como de la conversión local de células mesoteliales.

5.2.3. “Diferenciación miofibroblástica en la esclerosis peritoneal simple”.

del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, Bajo MA, Hevia C, Aguilera A, Castro MJ, Sánchez-Tomero JA, López-Cabrera M, Selgas R.

Internacional Journal of Artificial Organs 2005;28:135-140

Este trabajo responde a los objetivos 2,3

Diferenciación miofibroblástica en la esclerosis peritoneal simple.

Objetivo: Analizar la presencia de miofibroblastos en una serie de pacientes con esclerosis peritoneal simple secundaria al tratamiento con DP así como en pacientes urémicos que no reciben dicho tratamiento. En este último grupo de pacientes se ha descrito fibrosis peritoneal inducida por la uremia. Dado que existe una estrecha correlación entre fibrosis y presencia de miofibroblastos se pretende evaluar si los miofibroblastos se encuentran presentes en las muestras peritoneales de pacientes urémicos sin tratamiento con DP.

Determinar si existe correlación entre la presencia de miofibroblastos y otros parámetros peritoneales morfológicos y funcionales.

Métodos: Se recogieron biopsias de peritoneo parietal de tres grupos de pacientes: Controles normales (n=15), pacientes urémicos sin tratamiento de DP (n=16) y pacientes urémicos en tratamiento con DP (n=32). En cada caso, se analizaron parámetros peritoneales funcionales y morfológicos así como la expresión inmunohistoquímica de α -SMA. En un subgrupo de pacientes se evaluó la expresión del VEGF, la proteína antiapoptótica bcl-2 así como el receptor de progesterona.

Resultado: Se observaron miofibroblastos en el 56,3% de las muestras de pacientes con esclerosis peritoneal simple secundaria al tratamiento con DP. En la mayoría de los casos dichos miofibroblastos se distribuían en el área submesotelial superficial. Ninguna de las biopsias de los controles normales así como pacientes urémicos sin tratamiento con DP evidenció miofibroblastos. En el grupo de pacientes en DP, la presencia de miofibroblastos no mostró correlación con el tiempo en diálisis, coeficientes de transferencia de masas

(MTC) para la creatinina, episodios de peritonitis, engrosamiento submesotelial, vasculopatía hialinizante o presencia de capa mesotelial preservada. En un subgrupo de pacientes en DP se identificó expresión de VEGF en células fibroblásticas submesoteliales. No se observó expresión del receptor de progesterona o proteína bcl-2.

Conclusiones: Los miofibroblastos son un marcador simple y fiable de fibrosis, ya que aparecen en el peritoneo de forma temprana en relación al tratamiento con DP, incluso en pacientes con leves anomalías estructurales. Su presencia no es exclusiva de pacientes con peritonitis esclerosante, pérdida de ultrafiltración o en larga estancia en DP. La ausencia de miofibroblastos en los pacientes urémicos sin DP sugiere que la fibrosis relacionada con la uremia tiene lugar sin una participación significativa de miofibroblastos.

Capítulo 5.3. La transición epitelio-mesenquimal de la célula mesotelial y su posible relación con el transporte peritoneal a través de la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

“La conversión mesenquimal de las células mesoteliales como un mecanismo responsable del alto transporte de solutos durante la diálisis peritoneal: papel del factor de crecimiento vascular endotelial”.

Aroeira LZ, Aguilera A, Selgas R, Ramirez M, Perez-Lozano ML, Bajo MA, del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, López-Cabrera M.

American Journal of Kidney Diseases 2005;46:938-948

Este trabajo responde al objetivo 4

Este trabajo, en forma resumida (“vascular endothelial growth factor upregulation during transdifferentiation of mesothelial cells as a mechanism responsible of high peritoneal solute transport rate in peritoneal dialysis patients”), recibió el premio al mejor abstract de investigación básica presentado en el 1st North American chapter meeting of the International Society for Peritoneal Dialysis (Chicago 2005)

La conversión mesenquimal de las células mesoteliales como un mecanismo responsable del alto transporte de solutos durante la diálisis peritoneal: papel del factor de crecimiento vascular endotelial.

Introducción: Durante el tratamiento con DP el peritoneo es expuesto a líquidos de diálisis bioincompatibles que determinan TEM de las células mesoteliales, fibrosis y angiogénesis. El fallo de ultrafiltración se asocia con una alta tasa de transporte así como incremento en la superficie vascular, lo que sugiere implicación del VEGF. El origen del VEGF in vivo, en los pacientes en DP, es desconocido. Hemos analizado la correlación entre TEM de las células mesoteliales con los niveles de VEGF y con el fallo funcional peritoneal.

Métodos: Se aislaron células mesoteliales del efluente de 37 pacientes en DP y se analizó la conversión mesenquimal de dichas células. Para evaluar la función peritoneal se midieron el MTC para la creatinina. La concentración de VEGF fue medida mediante procedimiento normalizado. Se evaluó mediante inmunohistoquímica la expresión de VEGF así como de citoqueratinas en biopsias peritoneales de 12 pacientes en DP y 6 controles sanos.

Resultado: Las células mesoteliales de morfología no-epitelioide procedentes del efluente produjeron una mayor cantidad de VEGF que las células mesoteliales con morfología epitelial conservada ($P < 0.001$).

En aquellos pacientes en los que el efluente drenaba células de morfología no epitelioide se observó un mayor nivel sérico de VEGF, en comparación con los pacientes que mostraban células mesoteliales de morfología epitelial conservada ($P < 0.01$). La producción de VEGF, ex vivo, por las células

mesoteliales del efluente se correlacionó con los niveles séricos de VEGF ($R=0,6$; $P < 0.01$). El MTC de creatinina se correlacionó, en cultivo, con los niveles de VEGF ($R=0,8$; $P < 0.01$), así como niveles séricos ($R= 0,35$; $P < 0.05$). El MTC de creatinina se asoció igualmente con el fenotipo de las células mesoteliales. En las biopsias peritoneales de los pacientes con alto transporte se observó, en células fibroblásticas estromales, coexpresión de VEGF y marcadores mesoteliales (citoqueratinas).

Conclusión: Estos resultados sugieren que la célula mesenquimal resultante de la TEM de la célula mesotelial es la principal productora de VEGF en los pacientes en DP y es responsable de la situación de alto transporte peritoneal.

Capítulo 5.4. Correlación morfo-funcional: transición epitelio-mesenquimal y alto transporte peritoneal.

“La transición epitelio-mesenquimal de las células mesoteliales es un fenómeno precoz durante el tratamiento con diálisis peritoneal y se asocia con la situación de alto transporte”.

del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, Bajo MA, Aroeira LS, Aguilera A, Fernández-Perpén A, Cirugeda A, Castro MJ, de Gracia R, Sánchez-Villanueva R, Sánchez-Tomero JA, López-Cabrera M, Selgas R.

Kidney International Suppl 2008;73:S26-S33

Este trabajo responde al objetivo 5

Este estudio ha recibido el Premio de la Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo (FRIAT) al mejor trabajo de investigación clínica en el año 2009 (concedido a Gloria del Peso).

La transición epitelio-mesenchimal de las células mesoteliales es un fenómeno precoz en el tratamiento con diálisis peritoneal y se asocia con la situación de alto transporte.

Introducción: El fallo de ultrafiltración es una consecuencia del tratamiento a largo plazo de los pacientes en DP. La fibrosis, angiogénesis y vasculopatía hialinizante son lesiones evidentes tras largos periodos en DP (3-8 años) y se asocian a esta anomalía. El fenómeno de TEM de la célula mesotelial ha sido descrito recientemente como un proceso clave en la aparición de fibrosis peritoneal y deterioro funcional.

Objetivo: Evaluar cambios estructurales peritoneales, incluyendo evidencia de TEM, durante los primeros meses del tratamiento con DP y correlacionarlos con parámetros peritoneales funcionales.

Métodos: Se estudiaron 35 pacientes en tratamiento estable con DP durante dos años. La edad media fue de $45,3 \pm 14,5$ años. El 74% de las biopsias mostró pérdida del estrato celular mesotelial, el 46% fibrosis (espesor submesotelial mayor de $150 \mu\text{m}$) y el 17% evidencia in situ de TEM (expresión submesotelial de citoqueratinas en células fibroblásticas). Todos los pacientes con evidencia de TEM mostraron miofibroblastos. Por el contrario, únicamente en el 36% de los pacientes sin evidencia de transición se identificaron miofibroblastos. El número de vasos peritoneales no varió en función del tiempo en diálisis. El 17% de las muestras peritoneales mostraron lesiones de VH. Se utilizaron estudios funcionales para definir la situación de transporte peritoneal. Los pacientes en el cuartil superior de MTC de creatinina ($>$ de $11,8 \text{ ml por minuto}$) mostraron mayor prevalencia de TEM ($P = 0,016$), pero un similar número de vasos. En el

análisis multivariante, el cuartil superior de MTC de creatinina se mantuvo como un factor predictivo independiente de presencia de TEM (Oddsratio 12,4; intervalo de confianza: 1,6 - 92; $P = 0.013$), tras ajustar para la presencia de fibrosis ($P = 0.018$).

Conclusión: La TEM de las células mesoteliales es un fenómeno frecuente en la membrana peritoneal durante los dos primeros años de tratamiento con DP. La situación de alto transporte de solutos se asocia a la presencia de TEM, pero no a un número aumentado de vasos peritoneales.

6. DISCUSIÓN

Histopatología del peritoneo durante el tratamiento con diálisis peritoneal.

Con objeto de determinar la representatividad de la actual serie de biopsias peritoneales se procedió a su estudio histopatológico convencional. Las lesiones morfológicas asociadas al tratamiento con DP y descritas en otras series (5,7,10-16) aparecen claramente representadas en la nuestra. En concreto, hemos observado pérdida de células mesoteliales, fibrosis submesotelial y VH (49,50). En relación con la fibrosis submesotelial, realizamos un estudio morfológico comparativo frente a otras situaciones de fibrosis peritoneal (hernias, adherencias), observando que la fibrosis asociada a DP tiene una menor celularidad fibroblástica y mayor hialinización estromal (51). Este hallazgo se encuentra en consonancia con el concepto de “desierto celular”, con el que se describió la situación de fibrosis peritoneal evolucionada inducida por el tratamiento con DP (1,5). Estas diferencias cualitativas muy probablemente reflejan variaciones en la composición de la matriz extracelular. En nuestra serie, que incluye un amplio número de controles sanos y urémicos sin DP, no se observó fibrosis relevante asociada a la uremia. En relación a este fenómeno, los datos obtenidos por otros grupos son contradictorios, existiendo algunos que si describen ligera fibrosis submesotelial en pacientes urémicos sin DP (7,16). Por el contrario otros grupos, incluyendo estudios en modelo animal, no han constatado dicho engrosamiento submesotelial por uremia (10,49,52). La VH peritoneal es una lesión relativamente específica del tratamiento con DP. Al igual que en el caso de la fibrosis submesotelial, también se han descrito lesiones leves de VH en pacientes urémicos sin DP

(7,16). No todos los grupos han observado este fenómeno, que para muchos aparece exclusivamente en pacientes en DP (10,14). En nuestra serie, no observamos VH en pacientes urémicos sin DP (49). Con objeto de aclarar la etiopatogenia de esta lesión, realizamos un estudio autopsico de pacientes en DP, observándose que el desarrolló de VH se limita a los vasos de la cavidad peritoneal, en contacto con los líquidos de diálisis, y no se identifica en tejidos u órganos extraperitoneales (53). Este hallazgo sugiere que la génesis de la VH tiene una mayor relación con agentes relacionados con los líquidos de DP que con la situación de uremia. Por último, y en relación con el fenómeno de angiogénesis descrito en la membrana peritoneal de los pacientes en DP, realizamos un estudio cuantitativo de vasos peritoneales en 35 pacientes estables en tratamiento con DP. En dicho estudio no se observó angiogénesis asociada al tiempo en DP (54). La angiogénesis de la membrana peritoneal se ha descrito asociada al tratamiento con DP (13), si bien estudios recientes revelan que en pacientes estables (como en nuestra serie) no llega a producirse (7,15).

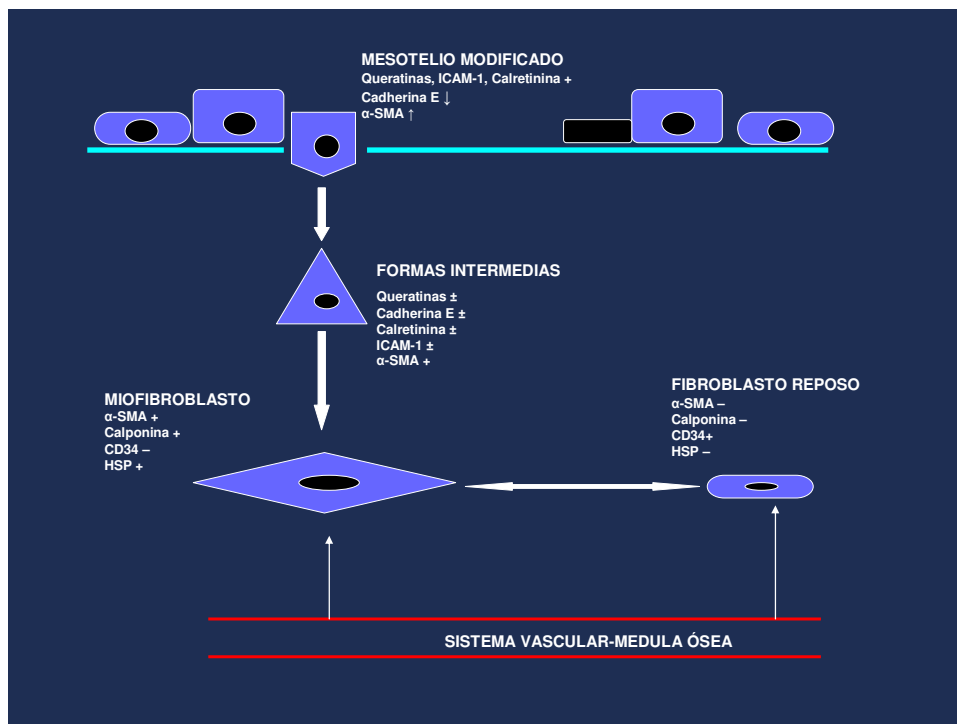
Estudio del inmunofenotipo de los fibroblastos submesoteliales durante el tratamiento con diálisis peritoneal. Evidencia in vivo de transición epitelio-mesenquimal y diferenciación miofibroblástica.

Una vez establecida la representatividad de nuestra serie de muestras, en especial la presencia de fibrosis peritoneal, procedimos al estudio inmunohistoquímico de los fibroblastos peritoneales. Se establecieron tres grupos de muestras en relación con su origen: 1) controles sanos (muestras de pacientes sin diálisis ni uremia); 2) pacientes urémicos sin DP (ya sea de

hemodiálisis o prediálisis), y 3) pacientes urémicos en DP. Se evaluaron marcadores moleculares habitualmente asociados a fibrosis tisular, en concreto α -SMA, desmina, vimentina y CD34. La activación fibroblástica conlleva muy frecuentemente la aparición de expresión de α -SMA, hecho que redefine al fibroblasto como miofibroblasto (20,25). En ocasiones también asocia expresión de desmina. En sentido inverso, se ha descrito en otros tejidos y órganos que, en situaciones de fibrosis, los fibroblastos pierden la habitual expresión de CD34 (32,33,36,55). Hasta ahora, han sido muy escasos los estudios de activación miofibroblástica en muestras peritoneales de pacientes en DP (12,19,30), sin existir ninguno que evalúe la expresión de CD34. Nuestros resultados establecen que el fenotipo del fibroblasto peritoneal en reposo, inactivo, es CD34+/ α -SMA -. En situaciones de fibrosis los fibroblastos muestran tendencia a la inversión de este fenotipo, con pérdida de expresión de CD34 y ganancia de α -SMA. Este mismo fenómeno ha sido constatado en otros tejidos y órganos (32,33,36,55). Algunos de los autores de dichos estudios equiparan el fibroblasto residente tisular CD34+ con los fibrocitos circulantes CD34+ descritos por Bucala et al. en 1994 (34,35), asumiendo para ellos un origen en médula ósea (32,33,55). En nuestra opinión tal equiparación puede resultar simplista, necesitándose estudios concretos que lo prueben. Entre otros datos, los fibrocitos circulantes expresan otros marcadores, entre ellos moléculas clase II de histocompatibilidad, CD45RO, CD13, CD11b y CD86, que no han sido constatadas en los fibroblastos CD34 tisulares. Previamente a la realización de este estudio inmunohistoquímico, el grupo de Biología Molecular e Inmunología del Hospital La Princesa inició estudios, in vitro, dirigidos a probar la hipótesis de que la célula mesotelial estimulada

reacciona, parcialmente, mediante un fenómeno de TEM. Así pues, y a sugerencia de dicho grupo, se analizó la posible expresión de marcadores mesoteliales en células fibroblásticas submesoteliales (56). La evaluación in vivo mediante inmunohistoquímica del fenómeno de TEM se basa en probar la expresión de marcadores epiteliales en células mesenquimales y viceversa (39-41,57). En el modelo de fibrosis renal, la expresión de proteínas de estirpe fibro-miofibroblástica en células epiteliales tubulares, así como la expresión de citoqueratinas epiteliales en células fibroblásticas, se considera testimonio de TEM (39,57). Al iniciarse el fenómeno de transición la célula expresa nuevos genes e inhibe la transcripción de otros. Entre estos últimos se encuentran genes que codifican proteínas propias de los epitelios. Por ejemplo, la célula mesotelial contiene en su citoplasma, como parte de su citoesqueleto, grandes cantidades de queratina, y en condiciones normales ninguna otra célula peritoneal las contiene. Al ser la TEM un fenómeno de modificaciones graduales, y a pesar de haberse inhibido la producción de queratinas, las previamente presentes en el citoplasma celular aún resultarán detectables, al menos en las fases iniciales. Una vez completada la conversión, la inmunoexpresión desaparecerá. Por lo tanto, la presencia de proteínas epiteliales en células de morfología fibroblástica (mesenquimales) y ubicadas en localización propia de células fibroblásticas (submesotelio) es evidencia de la plasticidad y estrecha relación entre ambos compartimentos celulares. Evaluamos además de queratinas otros marcadores presentes en células mesoteliales y no en fibroblastos o miofibroblastos, entre ellos ICAM-1 y cadherina E. Tal y como se había observado in vitro, los estudios inmunohistoquímicos sobre biopsias peritoneales revelaron que un pequeño

subgrupo de fibroblastos peritoneales expresa marcadores mesoteliales, tanto queratinas, ICAM-1 como cadherina-E. Nuestros estudios revelaron igualmente la existencia de un gradiente topográfico de expresión: los fibroblastos positivos para marcadores mesoteliales son más abundantes en la región submesotelial superficial (la más próxima al mesotelio), disminuyendo su número en profundidad (49).



Esquema representativo de la membrana peritoneal. Se describen los distintos orígenes miofibroblásticos y el fenómeno de TEM de la célula mesotelial. Los distintos marcadores evaluados por inmunohistoquímica aparecen representados al lado de las poblaciones celulares.

Es importante recalcar que fue únicamente en el grupo de pacientes en DP donde se observó evidencia in vivo de TEM. El peritoneo de los controles sanos y los urémicos sin DP no mostró dicho fenómeno. Como era de esperar,

sí se detectó TEM en otras situaciones de fibrosis peritoneal no relacionada con DP. En concreto, y con este objetivo, evaluamos muestras de sacos herniarios y piezas quirúrgicas de segmentos intestinales con patología adherencial e inflamatoria. En este tipo de muestras, en las que existe notable intensidad lesional, tanto fibrosante como inflamatoria, la presencia de TEM resultó mas generalizada e intensa. De hecho, constatamos una estrecha relación entre la intensidad del fenómeno de TEM y la presencia de inflamación por peritonitis (51). Esta observación resulta de especial importancia, pues relaciona fibrosis asociada a TEM con episodios de inflamación aguda, un hecho de conocida trascendencia en la práctica clínica. Del mismo modo, apunta a los episodios de peritonitis como momento especialmente crítico para intervenir farmacológicamente sobre el proceso de TEM.

De forma paralela a los marcadores mesoteliales de transición antes mencionados, evaluamos marcadores fibro-miofibroblásticos, con atención a α -SMA y CD34. La presencia de miofibroblastos (fibroblastos α -SMA +) resultó ser un hecho frecuente en los pacientes en DP, no así en los grupos controles, donde fue siempre negativo. El número de miofibroblastos era mayor que el de células con evidencia de TEM. Esto es lógico por dos razones: en primer lugar, la TEM no es el único origen posible de miofibroblastos y, en segundo lugar, el número de células que detectamos en transición es obligadamente menor al número real de ellas. Muchos de los miofibroblastos de origen mesotelial se encuentran en una fase avanzada del proceso, habiendo perdido la expresión residual de moléculas epiteliales, no siendo por lo tanto detectables. Al igual que con queratinas, la expresión de α -SMA mostró un evidente gradiente de distribución topográfica, más intenso conforme más cerca del mesotelio. A

pesar de la existencia de similares observaciones in vitro (58), la existencia del fenómeno de TEM en biopsias de pacientes en DP fue acogida con escepticismo y de forma crítica por parte del grupo responsable del mayor banco de biopsias peritoneales existente en la actualidad (Grupo de Cardiff, Reino Unido). En un artículo de revisión, los responsables de dicho grupo, comentaron no haber observado este cambio en el fenotipo fibroblástico a pesar de su amplia serie de biopsias (59). En nuestra opinión, esta afirmación se basa en el hecho de que en sus estudios morfológicos peritoneales no han empleado inmunohistoquímica, resultando ésta imprescindible para la evaluación in vivo de moléculas (60). Con posterioridad a nuestros trabajos, el grupo de Margetts en Canada obtuvo similares resultados in vivo (61). Utilizando un modelo murino, observaron como en situaciones de daño y fibrosis peritoneal se produce un fenómeno de TEM totalmente superponible al previamente descrito en pacientes en DP. En la actualidad el fenómeno de TEM de la célula mesotelial se admite como evidencia en la patología peritoneal inducida por el tratamiento con DP, y está siendo demostrado en otras patologías fibrosantes como, por ejemplo, fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, formación de cataratas oculares y adherencias peritoneales (62-67).

La transición epitelio-mesenquimal de la célula mesotelial y su relación con el transporte peritoneal a través de la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

Desde hace varios años se conoce que la producción de VEGF se encuentra aumentada en el peritoneo de los pacientes en DP (68). Se ha propuesto que la producción local de VEGF y otras moléculas proangiogénicas jugarían un papel

clave en la aparición de angiogénesis en la membrana, con la consecuente pérdida de la capacidad dialítica peritoneal. El VEGF, además de ser un potente inductor de la formación de nuevos vasos (angiogénesis), actúa aumentando la permeabilidad endotelial. Ambos hechos tendrían como resultado un aumento de la superficie de intercambio y mayor permeabilidad, con el consiguiente aumento en el transporte de solutos, rápida pérdida del gradiente osmótico y disminución de la capacidad de ultrafiltración. La célula mesotelial es capaz de producir VEGF, pero queda por esclarecer qué elemento celular es la principal fuente de VEGF. Uno de los estudios que describió (in vitro) la conversión de células mesoteliales a miofibroblastos demostró, mediante análisis de expresión génica, que dicho fenómeno de transición conlleva un importante incremento en la expresión del gen de VEGF (58). En estudios in vitro y ex vivo de células mesoteliales obtenidas del efluente de pacientes en DP, los Servicios de Biología Molecular del Hospital La Princesa y Nefrología del Hospital la Paz constataron que la célula mesenquimal miofibroblástica resultante de la conversión de células mesoteliales producía grandes cantidades de VEGF. Con objeto de corroborar in vivo dichos hallazgos, así como su posible relación con la situación de alto transporte peritoneal, decidimos evaluar mediante inmunohistoquímica la expresión de VEGF y citoqueratinas (como testimonio de TEM) en biopsias de 18 pacientes, divididos en tres grupos: 6 altos transportadores, 6 pacientes con transporte normal o bajo y 6 controles sanos. En este análisis se observó que en condiciones normales la membrana peritoneal muestra expresión de VEGF en células mesoteliales y endoteliales. Algunas de las muestras de pacientes en DP evidenciaron intensa expresión de VEGF en fibroblastos

submesoteliales, muchos de los cuales expresaban igualmente citoqueratinas (testimonio de su origen mesotelial). La expresión de VEGF así como la evidencia de TEM fue más abundante en el grupo de pacientes con alto transporte (69). Esta capacidad del miofibroblasto resultante de TEM de la célula mesotelial de producir grandes cantidades de VEGF ha sido recientemente corroborada por otros autores (70). Por lo tanto, la célula mesotelial, a través de su transformación en miofibroblastos, jugaría un importante papel tanto en fibrogénesis como en angiogénesis y permeabilidad vascular peritoneal.

La transición epitelio-mesenquimal de las células mesoteliales es un fenómeno precoz en el tratamiento con diálisis peritoneal y se asocia con la situación de alto transporte.

Esta parte del estudio se centró en 35 pacientes estables en DP por un espacio de tiempo no superior a dos años. Las muestras de dichos pacientes mostraron fibrosis peritoneal (definida por un grosor submesotelial $> 150 \mu\text{m}$) en el 46%, miofibroblastos un 47%, y evidencia de TEM en el 17%. El número de vasos peritoneales no mostró variación con el tiempo en diálisis. Estos datos se compararon a variables de función peritoneal observándose una relación estadísticamente significativa entre aquellos pacientes con alto transporte y la presencia de TEM (71). El porcentaje de biopsias que muestran TEM entre los pacientes del alto cuartil de transporte peritoneal es 4-5 veces mayor que los de los otros tres cuartiles. La falta de correspondencia entre este fenómeno y un mayor número de vasos peritoneales, permite una vez más independizar la idea del alto transporte de la necesidad de angiogénesis. Por ello se propone

que sean los efectos vasodilatadores del VEGF derivado de la TEM los que determinen el alto transporte.

7. CONCLUSIONES

- 1.-** El tratamiento con DP induce una serie de anomalías estructurales en la membrana peritoneal entre las que destacan la pérdida mesotelial, la fibrosis submesotelial y la vasculopatía hialinizante (al objetivo 1).
- 2.-** Los fibroblastos peritoneales muestran un fenotipo variable, según su estado de activación, similar al descrito en otros tejidos y órganos. En condiciones normales los fibroblastos expresan intensamente CD34, sin observarse presencia de miofibroblastos (CD34+/ α -SMA-). Este patrón se invierte con la aparición de fibrosis y miofibroblastos (CD34-/ α -SMA+) (al objetivo 2).
- 3.-** Existe evidencia in vivo de TEM de la célula mesotelial. Ésta, en respuesta a la DP, se transformaría en miofibroblastos de localización submesotelial (al objetivo 3).
- 4.** No hemos observado fibrosis peritoneal significativa, miofibroblastos ni evidencia de TEM en el peritoneo de pacientes urémicos sin DP (a objetivos 1-3).
- 5.-** Los miofibroblastos peritoneales resultantes del proceso de TEM producen VEGF. En nuestra serie, mayoritariamente constituida por pacientes estables, con poco tiempo en DP, no se observó angiogénesis peritoneal (al objetivo 4).
- 6.-** La TEM de la célula mesotelial ya se observa en las fases iniciales del tratamiento y su presencia se correlaciona con la situación de alto transporte peritoneal (al objetivo 5).

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Gokal R, Khanna R, Krediet RT, Norph KD. The Textbook of Peritoneal Dialysis, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000.
2. Selgas R, Fernandez-Reyes MJ, Bosque E, Bajo MA, Borrego F, Jimenez C, Del Peso G, 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* 1994;23:64-73.
3. Krediet RT, Lindholm B, Rippe B. Pathophysiology of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int* 2000;20 Suppl 4:22-42.
4. De Vriese AS, Mortier S, Lameire NH. What happens to the peritoneal membrane in long-term peritoneal dialysis? *Perit Dial Int* 2001;21 Suppl 3:9-18.
5. Di Paolo N, Sacchi G. Atlas of peritoneal histology. *Perit Dial Int* 2000;20 Suppl 3:37-63.
6. Carter D, True L, Otis CN. Serous membranes. In: *Histology for Pathologists*. Sternberg S, editor. Raven Press, New York, 1992;499-514.
7. Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, MacKenzie RK, Williams GT. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:470-479.
8. Gotloib L, Bar Sella P, Shostak A. Reduplicated basal lamina of small venules and mesothelium of human parietal peritoneum. *Perit Dial Bull* 1985;5:212-215.
9. N Di Paolo, G Sacchi. Peritoneal vascular changes in continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD): an in vivo model for the study of diabetic microangiopathy. *Perit Dial Int* 1989;9:41-45.

10. Pollock CA, Ibels LI, Eckstein RP, Graham JC, Caterson RJ, Mahony JF, Sheil AG. Peritoneal morphology on maintenance dialysis. *Am J Nephrol* 1989;9:198-204.
11. Dobbie JW, Lloyd JK, Gall CA. Categorization of ultrastructural changes in peritoneal mesothelium, stroma and blood vessels in uremia and CAPD patients. *Adv Perit Dial* 1990;6:3-12.
12. Mateijssen MA, van der Wal AC, Hendriks PM, Zweers MM, Mulder J, Struijk DG, Krediet RT. Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int* 1999;19:517-525.
13. Krediet RT, Zweers, MM, van der Wal AC, Struijk DG. Neoangiogenesis in the peritoneal membrane. *Perit Dial Int* 2000;20 Suppl 2:19-25.
14. Plum J, Hermann S, Fusholler A, Schoenicke G, Donner A, Rohrborn A, Grabensee B. Peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis patients related to dialysis settings and peritoneal transport properties. *Kidney Int* 2001;78 Suppl: 42-47.
15. Sherif AM, Nakayama M, Maruyama Y, Yoshida H, Yamamoto H, Yokoyama K, Kawakami M. Quantitative assessment of the peritoneal vessel density and vasculopathy in CAPD patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:1675-1681.
16. Honda K, Hamada C, Nakayama M, Miyazaki M, Sherif AM, Harada T, Hirano H; Peritoneal Biopsy Study Group of the Japanese Society for Peritoneal Dialysis. Impact of uremia, diabetes, and peritoneal dialysis itself on the pathogenesis of peritoneal sclerosis: a quantitative study of peritoneal membrane morphology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:720-728.
17. Kawaguchi Y, Kawanishi H, Mujais S, Topley N, Oreopoulos DG.

Encapsulating peritoneal sclerosis: definition, etiology, diagnosis, and treatment. International Society for Peritoneal Dialysis Ad Hoc Committee on Ultrafiltration Management in Peritoneal Dialysis. *Perit Dial Int* 2000;20 Suppl 4:43-55.

18. Garosi G, Di Paolo N. Peritoneal sclerosis: one or two nosological entities? *Semin Dial* 2000;13:297-308.

19. Honda K, Nitta K, Horita S, Tsukada M, Itabashi M, Nihei H, Akiba T, Oda H. Histologic criteria for diagnosing encapsulating peritoneal sclerosis in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2003;19:169-175.

20. Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999;277:C1-C19.

21. Pham SH. Biology of fibroblasts and myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:334-337.

22. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199-210.

23. Fielding CA, Topley N. Piece by piece: solving the puzzle of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int* 2008;28:477-479.

24. Yoshio Y, Miyazaki M, Abe K, Nishino T, Furusu A, Mizuta Y, Harada T, Ozono Y, Koji T, Kohno S. TNP-470, an angiogenesis inhibitor, suppresses the progression of peritoneal fibrosis in mouse experimental model. *Kidney Int* 2004;66:1677-1685.

25. Schürch W, Seemayer TA, Gabbiani G. The myofibroblast. A quarter century after its discovery. *Am J Surg Pathol* 1998;22:141-147.

26. Hinz B, Pham SH, Thannickal VJ. The myofibroblast. One function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007;170:1807-1816.
27. Pham SH. Fibroblast phenotype in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29 Suppl 3:87-92.
28. Koumas L, Smith TJ, Feldon S, Blumberg N, Phipps RP. Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. *Am J Pathol* 2003;163:1291-1300.
29. Sanders YY, Kumbla P, Hagood JS. Enhanced myofibroblastic differentiation and survival in Thy-1(-) lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;36:226-235.
30. Shiohita K, Miyazaki M, Ozono Y, Abe K, Taura K, Harada T, Koji T, Taguchi T, Kohno S. Expression of heat shock proteins 47 and 70 in the peritoneum of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2000;57:619-631.
31. Nishino T, Miyazaki M, Abe K, Furusu A, Mishima Y, Harada T, Ozono Y, Koji T, Kohno S. Antisense oligonucleotides against HSP47 suppress peritoneal fibrosis in rats. *Kidney Int* 2003;23:14-22.
32. Chauhan H, Abraham A, Phillips JR, Pringle JH, Walker RA, Jones JL. There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions. *J Clin Pathol* 2003;56:271-276.
33. Barth PJ, Ebrahimsade S, Hellinger A, Moll R, Ramaswamy A. CD34+ fibrocytes in neoplastic and inflammatory pancreatic lesions. *Virchows Arch* 2003;220:440:128-133.

34. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994;1:71-81.
35. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 2001;166:7556-7562.
36. Aiba S, Tagami H. Inverse correlation between CD34 expression and proline-4-hydroxylase immunoreactivity on spindle cells noted in hypertrophic scars and keloids. *J Cutan Pathol* 1997;24:65-69.
37. Saed GM, Munkarah AR, Diamond MP. Cyclooxygenase-2 is expressed in human fibroblasts isolated from intraperitoneal adhesions but not from normal peritoneal tissues. *Fertil Steril* 2003;79:1404-1408.
38. Liu T, Chung MJ, Ullenbruch M, Yu H, Jin H, Hu B, Choi YY, Ishikawa F, Phan SH. Telomerase activity is required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2007;117:3800-3809.
39. Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1-12.
40. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002;110:341-350.
41. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112:1776-1784.

42. Bolen JW, Hammar SP, McNutt MA. Reactive and neoplastic serosal tissue: a light, ultrastructural and immunocytochemical study. *Am J Surg Pathol* 1986;10:34-47.
43. Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2004;113:243-252.
44. Campbell JH, Efendy JL, Han C, Girjes AA, Campbell GR. Haematopoietic origin of fibroblasts formed in the peritoneal cavity in response to a foreign body. *J Vasc Res* 2000;37:364-371.
45. Margetts PJ, Bonniaud P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int* 2003;23:530-541.
46. Okada H, Inoue T, Kanno Y, Kobayashi T, Watanabe Y, Ban S, Neilson EG, Suzuki H. Selective depletion of fibroblasts preserves morphology and the functional integrity of peritoneum in transgenic mice with peritoneal fibrosis syndrome. *Kidney Int* 2003;64:1722-1732.
47. Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gauldie J. Gene transfer of transforming growth factor-beta1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:2029-2039.
48. Rubio D, Garcia S, De la Cueva T, Paz MF, Lloyd AC, Bernad A, Garcia-Castro J. Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition. *Exp Cell Res* 2008;314:691-698.
49. Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Azoeira L, Lara-Pezzi E, Bajo MA, del Peso G, Ramírez M, Gamallo C, Sánchez-Tomero JA, Alvarez V, López-Cabrera M, Selgas R. Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneum and peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Archiv* 2004;444:247-256.

50. del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, Bajo MA, Hevia C, Aguilera A, Castro MJ, Sánchez-Tomero JA, López-Cabrera M, Selgas R. Myofibroblastic differentiation in simple peritoneal sclerosis. *Int J Artif Org* 2005;28:135-140.
51. Jiménez-Heffernan JA, Cirugeda A, Bajo MA, Del Peso G, Pérez-Lozano ML, Perna C, Selgas R, Lopez-Cabrera M. Tissue models of peritoneal fibrosis. *Int J Artif Organs* 2005;28:105-111.
52. Zareie M, De Vriese AS, Hekking LH, Ter Wee PM, Schalkwijk CG, Driesprong BA, Schadee-Eestermans IL, Beelen RH, Lameire N, van den Born J. Immunopathological changes in a uremic rat model for peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1350-1361.
53. Jiménez-Heffernan JA, Perna C, Bajo MA, Picazo ML, Tejerina E, del Peso G, Aroeira L, Aguilera A, López-Cabrera M, Selgas R. Tissue distribution of hyalinizing vasculopathy lesions in peritoneal dialysis patients. *Pathol Res Pract* 2008;204:563-567.
54. Jiménez-Heffernan JA, Bajo MA, Perna C, del Peso G, Larrubia JR, Gamallo C, Sánchez-Tomero JA, López-Cabrera M, Selgas R. Mast cell quantification in normal peritoneum and during peritoneal dialysis. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1188-1192.
55. Nakayama H, Enzan H, Miyazaki E, Kuroda N, Naruse K, Hiroi M. Differential expression of CD34 in normal colorectal tissue, peritumoral inflammatory tissue, and tumor stroma. *J Clin Pathol* 2000;53:626-629.
56. Yañez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, Alvarez V, Castro MA, del Peso G, Cirujeda A, Gamallo C, Sanchez-Madrid F

Lopez-Cabrera M. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003;348:403-413.

57. Strutz F, Müller GA. Transdifferentiation comes of age. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1729-1731.

58. Yang AH, Chen JY, Lin JK. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* 2003;63:1530-1539.

59. Williams JD, Craig KJ, von Rulland C, Topley N, Williams GT. Biopsy Registry Study Group. The natural course of peritoneal membrane biology during peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2003;88 Suppl;43-49.

60. Selgas R, Jiménez-Heffernan JA, López-Cabrera M. On the epithelial-mesenchymal transition of mesothelial cells. *Kidney Int* 2004;65:866-870.

61. Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, Hoff CM, Holmes CJ, West-Mays JA, Kelly, MM. Transient overexpression of TGF- β 1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:425-436.

62. Demir AY, Groothuis PG, Napp AW, Punyadeera C, de Goeij AF, Evers JL, Dunselman GA. Menstrual effluent induces epithelial-mesenchymal transitions in mesothelial cells. *Hum Reprod* 2004;19:21-29.

63. Decolonne N, Kolb M, Margetts PJ, Menetrier F, Artur Y, Garrido C, Gaudie J, Camus P, Bonniaud P. TGF- β 1 induces progressive pleural scarring and subpleural fibrosis. *J Immunol* 2007;179:6043-6051.

64. Willis BC, Borok Z. TGF- β -induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L525-534.

65. Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2007;282:23337-23347.
66. Rygiel KA, Robertson H, Marshall HL, Pekalski M, Zhao L, Booth TA, Jones DE, Burt AD, Kirby JA. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease. *Lab Invest* 2008;88:112-123.
67. de longh RU, Wederell R, Lovicu FJ, McAvoy JWW. Transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in the lens: a model for cataract formation. *Cells Tissues Organs* 2005;179:43-55.
68. Zweers MM, de Waart DR, Smit W, Struijk DG, Krediet RT. Growth factors VEGF and TGF-beta1 in peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med* 1999;134:124-132.
69. Aroeira LZ, Aguilera A, Selgas R, Ramirez M, Perez-Lozano ML, Bajo MA, del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, López-Cabrera M. Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible of high solute transport rate in peritoneal dialysis: role of vascular endothelial growth factor. *Am J Kidney Dis* 2005;46:938-948.
70. Zhang J, Oh KH, Xu H, Margetts PJ. Vascular endothelial growth factor expression in peritoneal mesothelial cells undergoing transdifferentiation. *Perit Dial Int.* 2008;28:497-504.
71. Del Peso G, Jiménez-Heffernan JA, Bajo MA, Aroeira LS, Aguilera A, Fernández-Perpén A, Cirugeda A, Castro MJ, de Gracia R, Sánchez-Villanueva R, Sánchez-Tomero JA, López-Cabrera M, Selgas R. Epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells is an early event during peritoneal

dialysis and is associated with high peritoneal transport. *Kidney Int Supp*
2008;108:26-33.