

Gastroenterología y Hepatología

www.elsevier.es/gastroenterologia



XXXV CONGRESO ANUAL DE LA FUNDACIÓN/ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO

Papel del eje TGF- β -endotelina 1 en la fibrosis: lecciones del endotelio y el fibroblasto

D. Lagares, F. Rodríguez-Pascual y S. Lamas *

Laboratorio Mixto CSIC-FRIAT de Fisiopatología Molecular de la Pared Vascular, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España

Introducción

Después de una lesión, los tejidos pueden regenerarse o cicatrizar. En el primer caso, se restaura por completo la estructura y función del órgano afectado, mientras que en el segundo, la reparación tisular implica un depósito de matriz extracelular (ME) que conlleva la formación de una cicatriz. Si la lesión o el agente inicial persiste, se produce una inflamación crónica asociada a una reparación excesiva y a un aumento del depósito de ME, que en este contexto recibe el nombre de fibrosis¹⁻³. En este sentido, la fibrosis puede tener lugar tanto únicamente en un órgano como la piel, el pulmón, el hígado o el riñón, como en varios de ellos simultáneamente, caso de la esclerodermia sistémica (ES)⁴.

La esclerodermia es un trastorno sistémico de etiología desconocida que se caracteriza por un depósito excesivo de colágeno. El término esclerodermia se utiliza de forma genérica para describir tanto la enfermedad limitada a la piel (esclerodermia localizada) como la de carácter sistémico (ES)^{5,6}. Los acontecimientos iniciales implicados en la etiología de la esclerodermia son aún muy poco conocidos. Tres características patológicas que no se excluyen entre sí intervienen en el desarrollo de la enfermedad:

— **Vasculopatía.** Las alteraciones primarias del sistema vascular, tanto funcional como estructural, conducen al desarrollo de un fenómeno de Raynaud que se manifiesta como una activación patológica de la célula endotelial. Esta lesión de las células endoteliales conlleva una hiperegagregación plaquetaria y una liberación de mediadores bioactivos.

- **Inflamación.** Se produce una respuesta anormal del sistema inmune, la presencia de autoanticuerpos frente a los antígenos nucleares y celulares junto con un incremento de la actividad de los linfocitos T adyuvantes promueven el inicio de procesos fibroproliferativos.
- **Fibrosis.** En esta tercera fase de la enfermedad, se observa un aumento del depósito de componentes de la matriz extracelular, con la consiguiente destrucción de la arquitectura tisular normal, lo que constituye la base para la disfunción de los órganos y tejidos comprometidos.

Desde el punto de vista histopatológico, se observa un daño vascular y activación endotelial que precede al desarrollo de fibrosis en los tejidos de los pacientes con ES. Con objeto de comprender el inicio de la patología, es preciso conocer la fisiología del endotelio y los factores que regulan o modulan sus funciones biológicas. El endotelio es una monocapa de células que recubre la pared luminal de los vasos sanguíneos. Considerada hasta hace unos años una simple barrera física, hoy se identifica como un regulador paracrino donde se producen y liberan numerosas sustancias activas que actúan como mensajeros u hormonas locales y, en menor magnitud, sistémicas. Estos factores regulan fundamentalmente la presión arterial, la función renal y el metabolismo de los lípidos y glucosa entre otras funciones. Del equilibrio de estas funciones resulta un estado de homeostasis entre la vasodilatación y la vasoconstricción, la permeabilidad de los vasos, la trombosis y la fibrinólisis. En la ES, la vasculopatía es uno de los eventos iniciales caracterizado por la activación de la célula endotelial y la alteración del tono vascular⁵. Estos cambios patológicos se acompañan de la presencia de citocinas proinflamatorias y factores reguladores de la angiogénesis. En conjunción con ello, se observa una pérdida del estado redox dando lugar a

*Autor para correspondencia

Correo electrónico: slamas@cbm.uam.es (S. Lamas).

la formación de estrés oxidativo e hipoxia. Este complejo abanico de cambios involucra numerosos tipos celulares circundantes al endotelio, como por ejemplo los pericitos y las células del músculo liso, además de otras células implicadas en la respuesta inflamatoria. Todas ellas están sometidas a la influencia de factores de crecimiento, citocinas, quimioquinas y potentes factores vasoactivos locales. Esta diversidad de factores y su interacción conducen a un aumento de la permeabilidad vascular y a la formación de un infiltrado inflamatorio perivascular, contribuyendo al comienzo de la fibrosis. Nuestro laboratorio ha dedicado años a la comprensión de los mecanismos de regulación de uno de estos mediadores, la endotelina-1 (ET-1), cuya expresión tanto en células endoteliales como en fibroblastos de pacientes con ES parece jugar un papel patogénico en esta enfermedad.

Papel del eje TGF- β -endotelina 1 en el endotelio

La disfunción endotelial es un componente importante y común en numerosas enfermedades humanas que incluyen inflamación y fibrosis. Una de las patologías en las que el daño endotelial contribuye a la inflamación y fibrosis del tejido conectivo es la ES⁷. El daño endotelial se inicia por varios tipos de noxa, como infecciones bacterianas o virales, estrés oxidativo, hipoxia, flujo turbulento, hiperlipidemia o tabaco. Estos factores generan una reacción inflamatoria que conduce a la activación de la célula endotelial, entendiendo como tal la expresión de moléculas de adhesión y la liberación de factores proinflamatorios y quimiotácticos. Los mecanismos que unen el daño vascular con los procesos fibróticos aún son desconocidos. Los pacientes con ES exhiben signos de vasculopatía, en muchos casos con fenómeno de Raynaud muchos años antes de desarrollar fibrosis en la piel u otros órganos. Dado que los daños iniciales son vasculares y que muchas de las manifestaciones en los pacientes también lo son (anormalidades capilares, oclusión de los vasos, fibrosis y úlceras digitales), la identificación de los componentes que unen el daño vascular con el fenotipo profibrótico es crucial. Los mediadores que son sobreexpresados por la célula endotelial de los pacientes incluyen factores de crecimiento y citocinas; entre ellos destacan la ET-1, el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), las metaloproteasas (MMP) e inhibidores de éstas (TIMP). Además, también están presentes otros reguladores de la función inflamatoria, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleucinas (IL)⁸.

Las ET son una familia de 3 péptidos vasoactivos (ET-1, ET-2 y ET-3). Están formadas por 21 aminoácidos y se unen a 2 receptores transmembrana (ET_A/ET_B). Las 3 isoformas se unen con la misma afinidad al receptor B mientras que la ET-1 se une preferentemente al receptor A⁹. Los receptores exhiben una distribución en la mayoría de los tejidos, como riñón, hígado, piel o pulmón, aunque son anormalmente expresados en diversas patologías. La disregulación del sistema de la ET está asociada a vasoconstricción, vasoespasmos e hipertrofia vascular.

La ET-1 es la isoforma más ampliamente distribuida en el organismo y es liberada continuamente por células endote-

liales. Esta ET-1 produce contracción en las células de músculo liso, contribuyendo así al control del tono vascular. Una expresión anormal de ET-1 se ha descrito en patologías como cáncer, enfermedades congénitas coronarias, hipertensión pulmonar y fibrosis¹⁰⁻¹². Asimismo, los valores elevados de ET-1 plasmática se han asociado tanto con etapas tempranas como tardías del desarrollo de la enfermedad en pacientes con ES¹³. Además, una sobreproducción de ET-1 se ha encontrado en múltiples órganos, como endotelio, pulmón, riñón y piel en estos pacientes. Por ejemplo, el lavado broncoalveolar de pacientes con esclerosis sistémica contiene valores elevados de ET-1¹⁴. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a esta sobreexpresión de ET-1 en estos pacientes son desconocidos. La expresión de ET-1 es estimulada por hipoxia, fuerzas mecánicas de rozamiento, angiotensina II y otros factores solubles, como el TGF- β . Este factor es reconocido como uno de los mayores factores profibróticos, además de jugar un papel fundamental en la regulación de la proliferación de las células endoteliales¹⁵. Nuestro laboratorio ha estudiado la regulación del gen de la ET-1 por TGF- β en células endoteliales, fibroblastos de pulmón y piel^{15,16}. Los mecanismos moleculares que gobiernan esta regulación parecen ser específicos de célula y tejido. En el endotelio, la señalización vía TGF- β 1 se inicia por la unión de éste al receptor II del TGF- β (fig.1). Tras este paso se recluta y fosforila el receptor I, también conocido como ALK (*activin receptor-like kinase*)^{17,18}. Hay 5 receptores tipo I y 7 tipo II. La señal es transmitida hasta el núcleo mediante factores de transcripción de la familia de las proteínas Smad¹⁹. La mayoría de las células expresa la forma del receptor I denominada ALK5; sin embargo, en el caso particular de la célula endotelial también se expresa la forma ALK1¹⁷. La activación de ALK5 implica normalmente la fosforilación de Smad2 y Smad3, mientras que la unión del TGF- β al receptor que contiene ALK1 conlleva la fosforilación de Smad1 y Smad5. Los efectos transcripcionales mediados por estas 2 vías son diferentes, de modo que la activación del eje ALK5/Smad3 inhibe la migración y proliferación celular asociada a un endotelio maduro que expresa colágeno tipo I y el inhibidor del activador del plasminógeno I (PAI-1). Por el contrario, el eje ALK1/Smad1/5 activa la migración y proliferación endotelial, fenotipo asociado a procesos angiogénicos^{17,20,21}. En conjunción con la activación de las vías canónicas dependientes de Smad, el factor TGF- β es capaz de activar otras vías de señalización como MAPK, p38 y JNK. Estas vías se consideran independientes de Smad y juegan un papel fundamental en la activación de factores de transcripción basales y en la amplificación de respuestas mediadas por TGF- β ²².

En este sentido, nuestro laboratorio describió el mecanismo molecular mediante el cual el TGF- β promovía un incremento de los valores de ARNm y de péptido ET-1 en células endoteliales^{15,23,24}. Encontramos que el TGF- β producía un aumento de la actividad transcripcional del promotor de ET-1 y que este efecto se debía a la presencia de elementos de respuesta en el promotor de ET-1: un elemento AP-1 (*activator protein-1*) en la posición 108/102, importante para la expresión constitutiva e inducida, y un elemento de respuesta a SMAD localizado en el 193/171. La mutación de ambos elementos cisreguladores impidió la unión tanto del factor de transcripción c-Jun al sitio AP-1

como de los factores SMAD3/SMAD4. Ambas mutaciones impiden el efecto de TGF- β sobre la expresión de ET-1 en células endoteliales bovinas^{15,23}.

Posteriormente, describimos que el antagonismo de los receptores de ET-1 con bosentan, inhibidor no selectivo de los receptores A/B de ET-1, bloqueaba el efecto antiangiogénico del TGF- β . Asimismo, este antagonismo revertía parcialmente el efecto antimigratorio del TGF- β sobre las células endoteliales. De este modo, concluimos que TGF- β incrementaría la producción de ET-1, que se comportaría como un efector parcial de aquel²⁵.

Papel del eje TGF- β -endotelina 1 en fibroblastos

La reparación de heridas en la piel es ilustrativa de los principios de reparación en la mayoría de los tejidos. En este sentido, heridas leves y superficiales cursan con una reconstitución de la barrera epitelial asociada a la formación de una pequeña cicatriz. Sin embargo, en heridas profundas, el resultado final del proceso de reparación puede no ser perfecto, los anexos (pelo y glándulas) no se regeneran y la cicatriz de tejido conectivo sustituye al entramado de colágeno eficiente y elástico de la dermis^{1,2}. En el proceso normal de reparación de heridas, inicialmente se produce una respuesta inflamatoria que elimina el tejido lesionado, después los fibroblastos migran y proliferan formando el tejido de granulación. La angiogénesis precede a la sustitución del tejido de granulación por una matriz de colágeno. Finalmente, los miofibroblastos (fibroblastos activados, ver más abajo), contraen esta matriz dando lugar al cierre de la herida y posterior recuperación de la función del órgano afectado^{1,26-28}. En cicatrizaciones aberrantes, el programa de reparación no termina adecuadamente, lo que conlleva un depósito excesivo de ME. Este fenómeno origina el inicio de la fibrosis y la pérdida de la función del órgano²⁹. En pacientes con ES hay fibrosis sistémica, afectando tejidos como la piel o el pulmón^{5,6}. Los mecanismos patogénicos de esta enfermedad fibroproliferativa permanecen desconocidos. Uno de los procesos mejor conocidos en la patología es la activación de los fibroblastos a un fenotipo activado llamado miofibroblasto^{26,30}. La diferenciación de fibroblastos a miofibroblasto es un episodio crucial en los procesos normales de reparación de heridas y en patologías fibroproliferativas. Los miofibroblastos secretan gran cantidad de ME y promueven su contracción gracias a la expresión de alfa actina de músculo liso, proteína que les confiere la capacidad contráctil sobre la matriz durante la reparación. Una vez cerrada la herida, los miofibroblastos entran en un programa de muerte celular programada, apoptosis. Sin embargo, en procesos fibróticos estos miofibroblastos no sufren apoptosis permaneciendo en la herida, secretando MA y promoviendo el desarrollo de un tejido fibrótico^{27,29}. Aunque la formación y la función de estos miofibroblastos no están completamente explicadas, el desarrollo de fármacos dirigidos a inhibir la activación de los fibroblastos es una estrategia novedosa para el desarrollo de nuevas terapias antifibróticas²⁹.

El TGF- β es una citocina multifuncional que juega un papel clave en el proceso normal de reparación de heridas y

en el desarrollo de fibrosis, incluyendo la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto, la síntesis de ME y su remodelado^{31,32}. El bloqueo de los receptores del TGF- β se ha demostrado como un tratamiento antifibrótico efectivo en numerosos modelos animales y en células en cultivo³²⁻³⁶. Sin embargo, dado el papel pleiotrópico del TGF- β en muchas funciones celulares (p. ej., supresor de tumores en el sistema inmunitario), el desarrollo de terapias antifibróticas basadas en la inhibición de la señalización vía TGF- β es, a priori, problemático. De este modo, hay un mayor interés en el desarrollo de terapias basadas en la inhibición de mediadores secundarios más específicos de algunos efectos del TGF- β , como por ejemplo la ET-1 o el CTGF³⁷.

La ET-1 es un mediador clave en la reparación de algunos tejidos, como por ejemplo el hígado. El proceso normal de reparación del hígado se caracteriza por la diferenciación de las células estrelladas o células de Ito a un fenotipo miofibroblástico. Estas células activadas secretan gran cantidad de ME jugando un papel fundamental durante la reparación del órgano y en fibrosis hepática. En este sentido, el antagonismo de los receptores A/B de ET-1 con bosentan se ha descrito como un tratamiento efectivo para reducir la fibrosis hepática³⁸. Recientemente, se ha elucidado el mecanismo molecular que da lugar a una sobreexpresión de ET-1 en células estrelladas. La fibronectina, un componente de la ME depositado durante los primeros estadios del proceso de reparación de heridas, es un potente estímulo que induce la expresión de ET-1 en células estrelladas³⁹. Además del preeminente papel de la ET-1 en la fibrosis hepática, la ET-1 se ha implicado en el desarrollo de fibrosis cutánea y pulmonar. De este modo, una mayor unión de ET-1 a sus receptores ha sido demostrada por autorradiografía en biopsias de piel y pulmón de pacientes con ES, sugiriendo que el bloqueo de los receptores de ET es una estrategia a priori efectiva para el tratamiento de la fibrosis pulmonar y dérmica⁴⁰. Los fibroblastos producen normalmente ET-1, y es sobreexpresada por fibroblastos de piel y pulmón de pacientes con ES⁴¹ promoviendo su diferenciación a miofibroblasto. Estos fibroblastos estimulados con ET-1 sintetizan, depositan y contraen la ME⁴², procesos íntimamente asociados a fibrosis. Nuestro laboratorio describió inicialmente los mecanismos moleculares por los cuales los fibroblastos de pulmón de pacientes con ES sobreexpresaban ET-1. Encontramos que el TGF- β producía un aumento de la síntesis y expresión de ET-1, tanto en células de sujetos sanos como de pacientes a través de un mecanismo independiente de SMAD3 y dependiente de ALK5/JNK/AP-1¹⁶. Además, encontramos que la incubación de estos fibroblastos con TGF- β promovía la diferenciación de estos a miofibroblastos en un proceso dependiente de ET-1, sugiriendo que este péptido era un mediador secundario de los efectos profibróticos del TGF- β en fibroblastos de pulmón⁴³.

A pesar del papel aceptado de la ET-1 en procesos fibróticos, los mecanismos moleculares que unen una reparación patológica de un tejido con procesos fibróticos permanecen aún desconocidos. Recientemente, hemos estudiado el papel del eje TGF- β /ET-1 en la reparación patológica de heridas en piel y en el desarrollo de fibrosis dérmica. En este sentido, la autorradiografía de ET-1 marcada radiactivamente demostró una unión elevada de ET-1 a sus receptores en secciones histológicas de piel de pacientes con ES, infi-

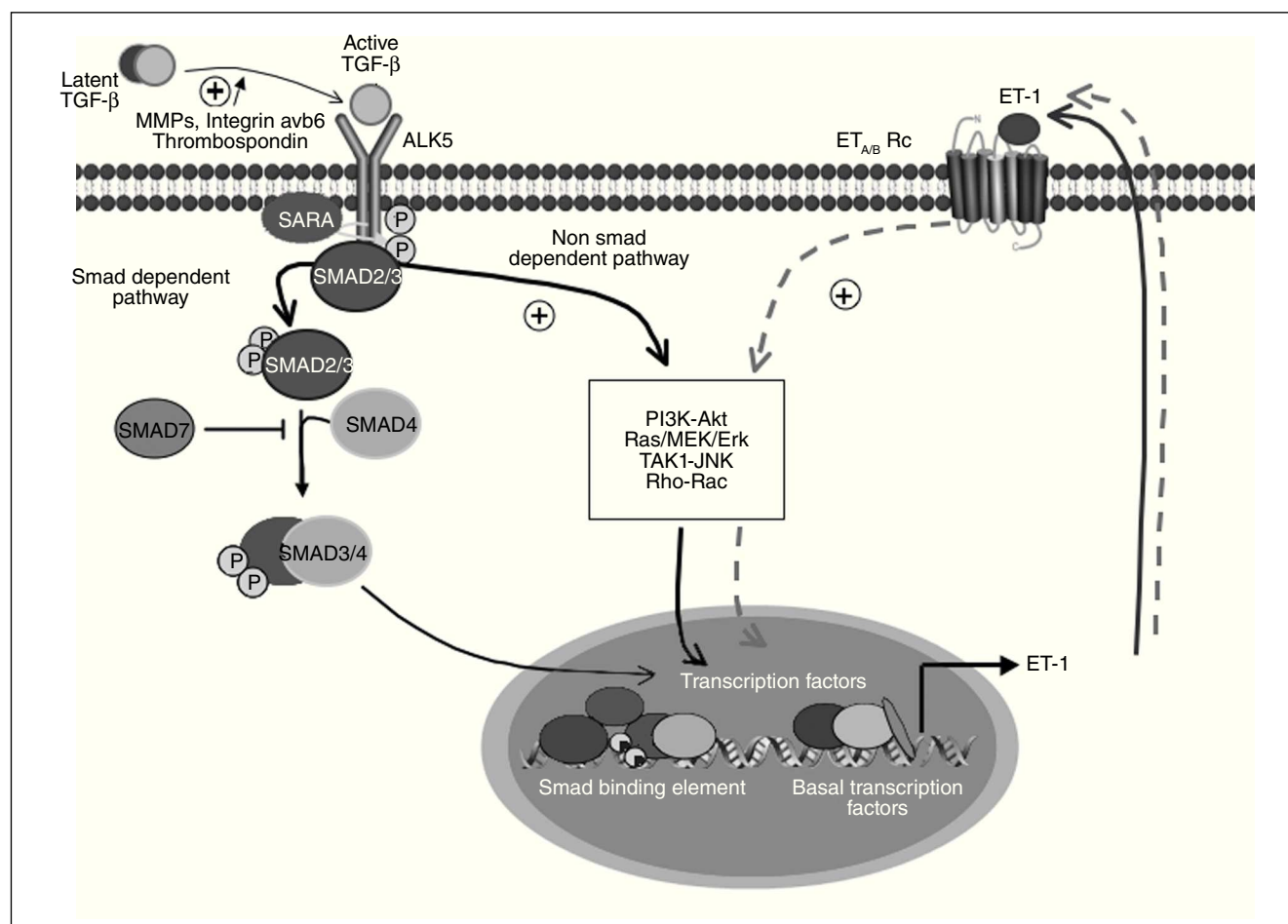


Figura 1 La fibrosis es una enfermedad del tejido conectivo donde los mecanismos moleculares que subyacen a esta patología son aún desconocidos. El TGF- β es uno de los mediadores más potentes en procesos fibróticos, incluyendo la esclerodermia sistémica. Importantes avances en la señalización mediada por TGF- β han permitido dilucidar el papel tanto de las vías dependientes de los factores de transcripción Smad como de las independientes de éstos. En este sentido, la inducción de ET-1 por TGF- β es dependiente tanto de la vía canónica de Smad como de *jun-kinase* (JNK) en células endoteliales bovinas y en fibroblastos de piel humanos. Sin embargo, en el caso de fibroblastos de pulmón humanos, la expresión de ET-1 por TGF- β es un proceso independiente de Smads y dependiente de JNK. De este modo, el TGF- β incrementaría la producción de ET-1 que se comportaría como un mediador secundario de sus efectos profibróticos. En nuestro modelo, el eje TGF- β /ET-1 opera activamente en la fibrosis pulmonar y dérmica y el antagonismo de los receptores de ET-1 representa una estrategia selectiva para el tratamiento de esta patología.

riéndose así una sobreexpresión de los receptores de ET-1. Este hecho se confirmó en los fibroblastos de piel de estos pacientes⁴¹, sugiriendo que el antagonismo de los receptores de ET podría ser una estrategia válida para el tratamiento de la fibrosis dérmica. Recientemente, hemos explorado esta hipótesis analizando el papel del eje TGF- β /ET-1 en procesos de reparación de heridas en piel y en modelos de fibrosis dérmica en ratón. Inicialmente, encontramos que la incubación de fibroblastos dérmicos humanos con TGF- β indujo la expresión del ARNm y péptido de ET-1. Este incremento era debido a un aumento de la actividad transcripcional del promotor de ET-1 y respondía a un mecanismo dependiente de ALK5/SMAD3/JNK. Los resultados refuerzan el papel fundamental de Smad3 en la expresión de ET-1 por TGF- β , hecho confirmado por la incapacidad del TGF- β de inducir ET-1 en fibroblastos embrionarios murinos deficientes

en Smad3. La mutación del sitio de respuesta a AP-1 en el promotor de ET-1 abolía, a su vez, la acción del TGF- β , demostrando el papel de JNK en este efecto transcripcional. Funcionalmente, la capacidad del TGF- β de inducir genes profibróticos como la α actina de músculo liso y colágeno tipo I era dependiente de la expresión de ET-1. De este modo, la preincubación de fibroblastos de piel humanos con bosentan era capaz de prevenir la expresión de estos 2 marcadores y la contracción in vitro de geles de colágeno inducida por TGF- β . Posteriormente, describimos el papel del eje TGF- β /ET-1 in vivo, utilizando un modelo de herida en piel basado en biopsias cutáneas de 6 mm de diámetro. Encontramos que la sobreexpresión del TGF- β mediada por adenovirus en la herida era capaz de acelerar el cierre de ésta de modo patológico, observándose una cicatrización aberrante asociada a un incremento de colágeno. Además,

los valores de ET-1 aumentaban en la fase proliferativa y de remodelado de la herida, y eran aún mayores en el caso de sobreexpresión de TGF- β . Este hecho sugiere que este eje TGF- β /ET-1 opera básicamente en fibroblastos y está implicado en la producción y depósito de ME más que en procesos inflamatorios. Acorde con esta hipótesis, el bloqueo de los receptores de ET-1 con bosentan sería una estrategia selectiva para prevenir los efectos patológicos del TGF- β en reparación de heridas en piel. De este modo, encontramos que el bosentan prevenía el cierre y el excesivo depósito de colágeno en la herida inducido por el TGF- β . Finalmente, con el objeto de trasladar el papel de este eje desde una reparación patológica de una herida cutánea a un modelo de fibrosis dérmica, se inyectó a ratones C57BL6 con bleomicina por vía subcutánea. Este fármaco es un antibiótico usado en quimioterapia y también experimentalmente para desarrollar fibrosis en piel y otros órganos de un modo dependiente de TGF- β ⁴⁴. A través de este modelo fuimos capaces de demostrar cómo no sólo el bloqueo de los receptores de TGF- β con el inhibidor GW788388 prevenía el desarrollo de fibrosis dérmica, sino también que el bosentan prevenía parcialmente el desarrollo de fibrosis en piel. Estos resultados demuestran que el eje TGF- β /ET-1 participa en la reparación de heridas cutáneas y fibrosis dérmica, y señala que el antagonismo de los receptores de ET-1 con bosentan representa una estrategia antifibrótica selectiva para el control de fibrosis dérmica en los pacientes con ES. En este sentido, estudios recientes han validado el uso del bosentan para el tratamiento de las úlceras digitales en estos pacientes, que además muestran una mejora significativa de los síntomas cutáneos⁴⁵⁻⁴⁸.

Conclusiones

- Se ha descrito una expresión anormal de ET-1 en patologías como cáncer, enfermedades congénitas coronarias, hipertensión pulmonar y fibrosis. En el caso particular de los pacientes con ES se han encontrado valores elevados de ET-1 en plasma y en múltiples órganos, como endotelio, pulmón, riñón y piel.
- En la ES, la vasculopatía es uno de los eventos iniciales que se caracteriza por la activación de la célula endotelial y la alteración del tono vascular. La expresión de ET-1 en este contexto es estimulada por el TGF- β . El mecanismo molecular que subyace a esta sobreexpresión de ET-1 en células endoteliales responde a un mecanismo dependiente de la vía ALK5/SMAD3/JNK.
- El antagonismo de los receptores de ET-1 con bosentan, inhibidor no selectivo de los receptores A/B de ET-1, es capaz de bloquear el efecto antiangiogénico y antimigratorio del TGF- β en células endoteliales. De este modo, el TGF- β incrementa la producción de ET-1, que se comporta como un efector parcial de aquel.
- La diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos es un evento crucial en los procesos normales de reparación de heridas y en patologías fibroproliferativas como la ES. El TGF- β es una citocina multifuncional que juega un papel clave en el proceso normal de reparación de heridas y en el desarrollo de fibrosis incluyendo la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto, la síntesis de ME y su remo-

delado. El TGF- β produce un aumento de la síntesis y expresión de ET-1, tanto en fibroblastos de pulmón de sujetos sanos como de pacientes, a través de un mecanismo independiente de SMAD3 y dependiente de ALK5/JNK/AP-1. Finalmente, la diferenciación de fibroblasto a miofibroblasto y el depósito de colágeno promovido por el TGF- β es un proceso dependiente de ET-1 en fibroblastos de pulmón humanos.

- En los estadios tempranos de la esclerodermia, la fibrosis afecta esencialmente a la piel. La capacidad del TGF- β de inducir genes profibróticos como la alfa actina de músculo liso y colágeno tipo I es dependiente de la expresión de ET-1 en fibroblastos dérmicos humanos. El eje TGF- β /ET-1 opera activamente en la reparación patológica de heridas en piel y en el desarrollo de fibrosis dérmica en modelos murinos. Así, el bosentan no sólo previene el cierre y el excesivo depósito de colágeno en la herida inducido por el TGF- β , sino que también es capaz de prevenir la fibrosis dérmica inducida por bleomicina.
- El bloqueo de los receptores de ET con bosentan es una estrategia a priori selectiva y efectiva para el tratamiento de la fibrosis pulmonar y dérmica.

Bibliografía

1. Martin P, Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276:75-81.
2. Ferguson MW, O'Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004;359:839-50.
3. Turck CW, Dohlman JG, Goetzel EJ. Immunological mediators of wound healing and fibrosis. *J Cell Physiol Suppl*. 1987; Suppl 5:89-93.
4. LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2001;28:1573-6.
5. Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol*. 2005;26:587-95.
6. LeRoy EC, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988;15:202-5.
7. Denton CP, Black CM, Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2006;2:134-44.
8. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
9. Anggard EE, Botting RM, Vane JR. Endothelins. *Blood Vessels*. 1990;27:269-81.
10. Davenport AP, Maguire JJ. Endothelin. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;176:295-329.
11. Abraham D, Ponticos M, Nagase H. Connective tissue remodeling: cross-talk between endothelins and matrix metalloproteinases. *Curr Vasc Pharmacol*. 2005;3:369-79.
12. Beghetti M, Black SM, Fineman JR. Endothelin-1 in congenital heart disease. *Pediatr Res*. 2005;57:16R-20R.
13. Kawaguchi Y, et al. Increased endothelin-1 production in fibroblasts derived from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 1994;53:506-10.
14. Cambrey AD, et al. Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994;11:439-45.
15. Rodríguez-Pascual F, Redondo-Horcajo M, Lamas S. Functional cooperation between Smad proteins and activator protein-1

- regulates transforming growth factor-beta-mediated induction of endothelin-1 expression. *Circ Res.* 2003;92:1288-95.
16. Shi-Wen X, et al. Constitutive ALK5-independent c-Jun N-terminal kinase activation contributes to endothelin-1 overexpression in pulmonary fibrosis: evidence of an autocrine endothelin loop operating through the endothelin A and B receptors. *Mol Cell Biol.* 2006;26:5518-27.
 17. Oh SP, et al. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:2626-31.
 18. Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci.* 2001;114:4359-69.
 19. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J.* 2000;19:1745-54.
 20. Ota T, et al. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2002;193:299-318.
 21. Goumans MJ, et al. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J.* 2002;21:1743-53.
 22. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003;113:685-700.
 23. Rodríguez-Pascual F, et al. Transforming growth factor-beta induces endothelin-1 expression through activation of the Smad signaling pathway. *J Cardiovascular Pharmacol.* 2004;44:S39-42.
 24. Kurihara H, et al. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;159:1435-40.
 25. Castaneres C, et al. Signaling by ALK5 mediates TGF-beta-induced ET-1 expression in endothelial cells: a role for migration and proliferation. *J Cell Sci.* 2007;120:1256-66.
 26. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003;200:500-3.
 27. Gabbiani G. The myofibroblast: a key cell for wound healing and fibrocontractive diseases. *Prog Clin Biol Res.* 1981;54:183-94.
 28. Desmouliere A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Int.* 1995;19:471-6.
 29. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 2005;13:7-12.
 30. Desmouliere A, Gabbiani G. Myofibroblast differentiation during fibrosis. *Exp Nephrol.* 1995;3:134-9.
 31. Desmouliere A, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122:103-11.
 32. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb J.* 2004;18:816-27.
 33. Bonniaud P, et al. Progressive transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis is blocked by an orally active ALK5 kinase inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:889-98.
 34. Grygielko ET, et al. Inhibition of gene markers of fibrosis with a novel inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptor kinase in puromycin-induced nephritis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;313:943-51.
 35. Ashcroft GS, et al. Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nat Cell Biol.* 1999;1:260-6.
 36. Petersen M, et al. Oral administration of GW788388, an inhibitor of TGF-beta type I and II receptor kinases, decreases renal fibrosis. *Kidney Int.* 2008;73:705-15.
 37. Leask A. Targeting the TGFbeta, endothelin-1 and CCN2 axis to combat fibrosis in scleroderma. *Cell Signal.* 2008;20:1409-14.
 38. Rockey DC, Chung JJ. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J Clin Invest.* 1996;98:1381-8.
 39. Zhan S, et al. Fibronectin stimulates endothelin-1 synthesis in rat hepatic myofibroblasts via a Src/ERK-regulated signaling pathway. *Gastroenterology.* 2009;136:2345-55 e1-4.
 40. Leask A. Signaling in fibrosis: targeting the TGF beta, endothelin-1 and CCN2 axis in scleroderma. *Front Biosci (Elite Ed).* 2009;1:115-22.
 41. Shi-Wen X, et al. Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J Invest Dermatol.* 2001;116:417-25.
 42. Shi-Wen X, et al. Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 2004;15:2707-19.
 43. Shi-wen X, et al. Endothelin is a downstream mediator of pro-fibrotic responses to transforming growth factor beta in human lung fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2007;56:4189-94.
 44. Yamamoto T, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol.* 1999;112:456-62.
 45. Roldan R, et al. Efficacy of bosentan in treatment of unresponsive cutaneous ulceration in disabling pansclerotic morphea in children. *J Rheumatol.* 2006;33:2538-40.
 46. Suzuki E, et al. Systemic lupus erythematosus, complicated with refractory skin ulcers, treated successfully with bosentan. *Mod Rheumatol.* 2009;19:447-51.
 47. Tsifetaki N, et al. Bosentan for digital ulcers in patients with systemic sclerosis: a prospective 3-year followup study. *J Rheumatol.* 2009;36:1550-2.
 48. Tiso F, et al. Digital ulcers in a cohort of 333 scleroderma patients. *Reumatismo.* 2007;59:215-20.