

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF): factor clave en el inicio y la progresión del daño renal

E. Sánchez-López¹, R. Rodríguez Díez¹, J. Rodríguez Vita¹, S. Rayego Mateos¹, R.R. Rodríguez Díez¹, E. Rodríguez García¹, C. Lavoz Barria¹, S. Mezzano², R. Selgas³, J. Egido⁴, A. Ortiz⁵, M. Ruiz-Ortega¹

¹Laboratorio de Biología celular en Enfermedades Renales. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. ²División de Nefrología. Escuela de Medicina. Universidad Austral. Valdivia (Chile). ³Servicio de Nefrología. Hospital La Paz. Madrid, ⁴Laboratorio de Investigación Renal. Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid. ⁵Unidad de Diálisis. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Nefrología 2009;29(5):382-391.

RESUMEN

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) aparece aumentado en diferentes patologías asociadas a fibrosis, incluidas múltiples enfermedades renales. CTGF participa en procesos biológicos, como la regulación del ciclo celular, migración, adhesión y angiogénesis. Su expresión está regulada por diversos factores implicados en el daño renal, entre los que destacan el factor la angiotensina II, el factor de crecimiento transformante-beta, altas concentraciones de glucosa y situaciones de estrés celular. CTGF participa en el inicio y progresión del daño renal al ser capaz de inducir una respuesta inflamatoria y promover la fibrosis, señalándole como una posible diana terapéutica en el tratamiento de patologías renales. En este trabajo revisamos las principales acciones de CTGF en la patología renal, los mecanismos intracelulares de actuación y las estrategias terapéuticas para su bloqueo.

Palabras clave: CTGF, fibrosis, inflamación, nefropatía.

ABSTRACT

Connective tissue growth factor (CTGF) is increased in several pathologies associated with fibrosis, including multiple renal diseases. CTGF is involved in biological processes such as cell cycle regulation, migration, adhesion and angiogenesis. Its expression is regulated by various factors involved in renal damage, such as Angiotensin II, transforming growth factor-beta, high concentrations of glucose and cellular stress. CTGF is involved in the initiation and progression of renal damage to be able to induce an inflammatory response and promote fibrosis, identified as a potential therapeutic target in the treatment of kidney diseases. In this paper we review the main actions of CTGF in renal disease, the intracellular action mechanisms and therapeutic strategies for its blocking.

Key words: CTGF, fibrosis, inflammation, kidney disease.

INTRODUCCIÓN

Diversas enfermedades, como desordenes proliferativos y lesiones fibróticas, afecciones de la piel, aterosclerosis, fibrosis pulmonar y diversas patologías renales, presentan niveles elevados de CTGF tisular, localizado principalmente en áreas fibróticas¹⁻⁵. Aunque clásicamente CTGF se ha considerado como un factor profibrótico, se trata de un factor multifuncional, cuyas actividades biológicas varían según el tipo

celular, y que incluyen la regulación de la proliferación/apoptosis celular, angiogénesis, migración, adhesión y fibrosis^{2,3}. En este trabajo hemos revisado el papel de CTGF centrándonos en su importancia en la patología renal.

ESTRUCTURA

CTGF es una proteína secretable, rica en cisteínas, con un peso molecular de 38 KDa, que fue identificada en el medio condicionado de células endoteliales de vena de cordón umbilical⁶. CTGF, también conocido como CCN2, pertenece a la familia de genes de respuesta temprana CCN, la cual se

Correspondencia: Marta Ruiz-Ortega

Departamento de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.

Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

mruizo@fjd.es

compone de otros cinco miembros: Cyr61 (proteína rica en cisteína 61), Nov (gen sobreexpresado en nefroblastoma), WISP-1 (proteína secretada inducida por Wnt-1), WISP-2 y WISP-3^{1,2,7,8}. Todos los miembros de esta familia se caracterizan por un alto porcentaje de homología en su secuencia de aminoácidos, que oscila entre un 50 y 90%, y presentan 38 residuos de cisteína que se agrupan en dos segmentos (22 en la región N-terminal y 16 en la C-terminal), característico de otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento del nervio y el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β)^{3,9}.

Las proteínas de esta familia poseen un péptido señal secretor en la región NH₂-terminal y cuatro dominios o módulos conservados⁹. Estos dominios son: 1) dominio de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), con la secuencia de unión conservada Gly-Cys-Gly-Cys-Cys-X-X-Cys que se localiza dentro de la región amino-terminal de todas las proteínas de unión a IGF¹⁰⁻¹²; 2) dominio del factor Von Willebrand tipo C, que participa en la oligomerización y formación de las proteínas¹³; 3) dominio trombospondina-1, implicado en la unión de macromoléculas solubles y de matriz¹⁴; y 4) dominio C-terminal: dominio de dimerización, está implicado en la unión a la superficie celular, posee actividad mitogénica para fibroblastos y es el responsable de la interacción con fibronectina¹⁵.

REGULACIÓN

Según el tipo celular, una gran variedad de factores y moléculas están implicadas en la regulación de la expresión de CTGF. Los agonistas de receptores acoplados a proteínas G, factores de crecimiento como TGF- β , la angiotensina II (AngII), la proteína morfogenética del hueso (BMP), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), IGF, el factor de estimulación de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), la interleucina-4 (IL-4), las altas concentraciones de glucosa, la hipoxia, el estrés mecánico y el estrés oxidativo aumentan rápidamente la expresión de CTGF (figura 1)¹⁶⁻²⁴. Sin embargo, otros factores como el factor de necrosis tumoral- α , (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), AMPc y el tratamiento con agonistas del receptor activado por la proliferación de peroxisomas- γ (PPAR- γ), inhiben la expresión de CTGF inducida por TGF- β , y AngII en algunos tipos celulares²⁵⁻²⁹. Diversos mecanismos de señalización se han relacionado con el aumento de CTGF. Entre ellos, se encuentran la vía de señalización de las proteínas Smad, las especies reactivas de oxígeno (ROS), la proteína G pequeña RhoA, la proteína quinasa C (PKC), la quinasa Janus (JAK), la quinasa 3-fosfatidil inositol (PI3K) y las cascadas de quinasas activadas por mitógenos (MAPK)³⁰⁻³³.

La mayor parte de los estudios realizados se han centrado en el estudio de la regulación de CTGF inducida por TGF- β . En el promotor de CTGF se ha descrito un elemento de unión a

Smad necesario para su inducción por TGF- β ³⁴. En células tubuloepteliales proximales y en células mesangiales, TGF- β aumenta la producción de CTGF en un proceso regulado por las proteínas Smad y la cascada de señalización Ras/MEK/ERK^{36,37}. Sin embargo, en fibroblastos renales se trata de un proceso mediado por la activación de Rho³⁵. La cascada de señalización de MAPK también desempeña un papel importante en la regulación de CTGF. En hepatocitos, TGF- β induce la expresión y la producción de CTGF a través de ERK1/2³⁸, mientras que en fibroblastos de pulmón se trata de un proceso mediado mayoritariamente por la quinasa JNK1/2³⁹. Los estudios realizados por nuestro grupo se han centrado en la regulación causada por AngII. En células tubuloepteliales humanas, AngII induce la producción de CTGF a través de la activación de MAPK (ERK, p38 y JNK) y de la proteína quinasa de Rho, ROCK³⁹. La implicación de Rho en la regulación de CTGF se ha descrito en muchos tipos celulares, incluyendo fibroblastos de pulmón y células de músculo liso vascular^{34,41}. En estas últimas, CTGF aumenta en respuesta a AngII a través de otras vías como ROS, las proteínas Smad y las quinasas p38, JNK1/2, ROCK, PKC y PTK^{34,42}. En fibroblastos, los inhibidores de ERK1/2 y JNK1/2, pero no p38, disminuyen la expresión de CTGF estimulada por AngII⁴³. Sin embargo, en células mesangiales de rata, entre las rutas implicadas en la producción de CTGF causada por AngII encontramos la producción de ROS y p38³⁹. Estudios moleculares recientes han revelado la presencia de un sitio de unión NF- κ B altamente conservado en la región proximal del promotor de CTGF⁴⁴. En células mesangiales hemos observado que el bloqueo del NF- κ B disminuye la producción de CTGF causada por AngII (datos no publicados), lo que sugiere que la activación del factor de transcripción NF- κ B está implicada en la regulación del CTGF en el riñón.

TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL Y FUNCIONES BIOLÓGICAS DE CTGF

Aún no se conoce un receptor específico para CTGF. Sin embargo, se ha descrito que interactúa con diversas proteínas, como receptores tirosín-quinasa e integrinas, que activan múltiples sistemas de señalización. Los primeros estudios de interacción revelaron que existen complejos «receptor-CTGF» con un peso molecular de unos 280 KDa en condrocitos, osteoblastos y células endoteliales⁴⁵. En diversos tipos celulares, CTGF actúa a través de su unión a diversas integrinas, como la integrina α 5 β 1 o α IIb β 3, a receptores de proteoglicanos heparan sulfato, activando varias quinasas como la quinasa de adhesión focal (FAK), ERK y Rac^{16,47-49}, y al receptor macroglobulina de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LPR)⁴⁶ (figura 1). A través de su dominio rico en cisteínas se une de forma directa a BMP-4 y TGF- β ⁵⁰ por su dominio carboxilo-terminal interactúa con fibronectina⁵¹ y mediante el dominio amino-terminal se une a IGF⁵². En células mesangiales humanas, el CTGF interactúa con el sistema dual de receptores

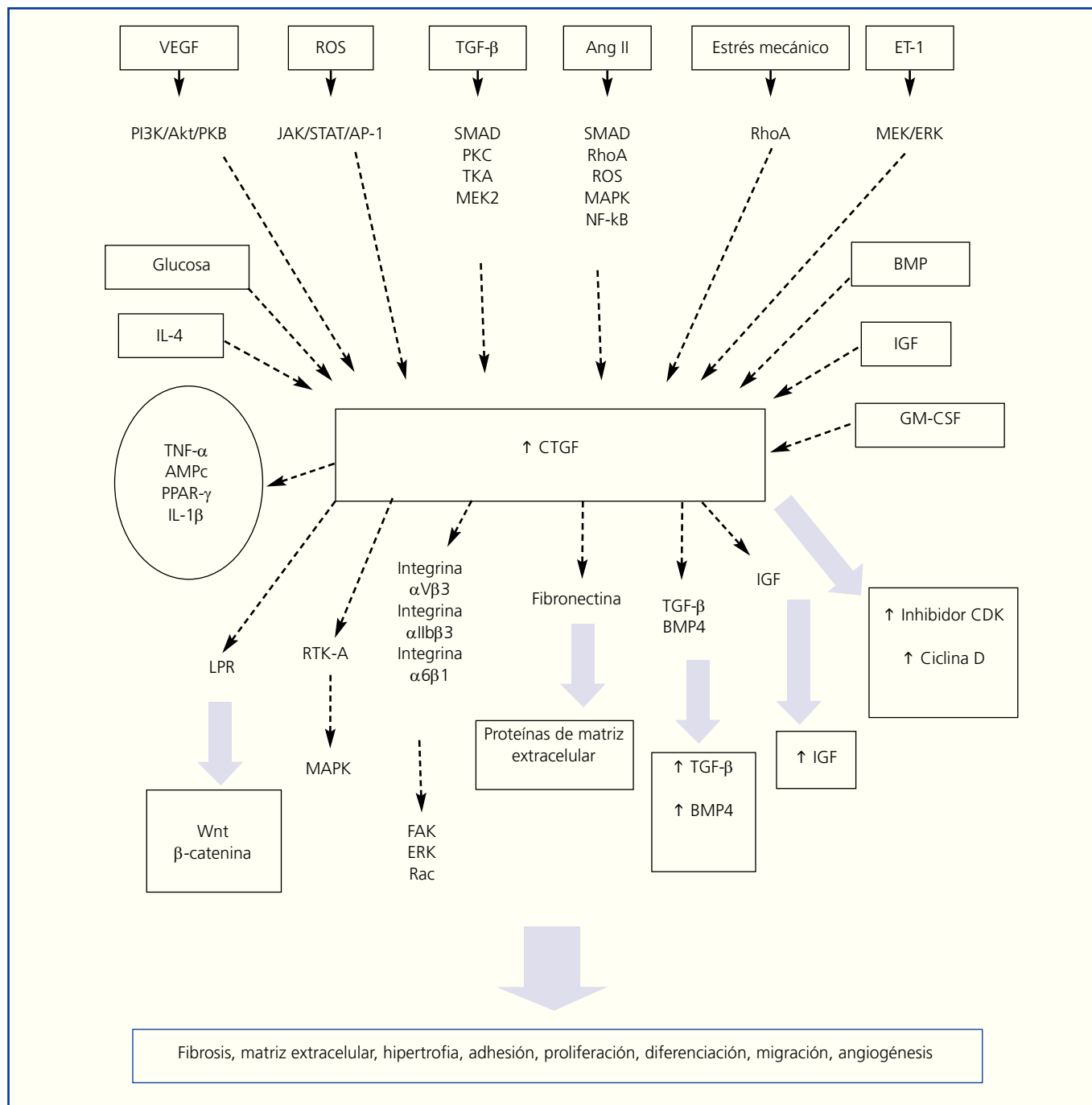


Figura 1. Moléculas y mecanismos de señalización implicados en la regulación y función de CTGF.

tirosín-quinasa A (RTK-A) y p75_{NTR} que participa en la transducción de señales de neurotrofina (figura 1). Los receptores de tirosín-quinasa unen una gran cantidad de proteínas adaptadoras y activan múltiples vías de señalización intracelular, lo que estaría en concordancia con las propiedades multifuncionales de CTGF⁶⁶, que incluyen la regulación y la síntesis de matriz extracelular (MEC)^{4,33,54}, migración de células endoteliales y angiogénesis, re-

gulación del ciclo celular⁵⁵, apoptosis de células mesoteliales⁵⁶, supervivencia de células hepáticas y mesangiales^{57,58}, proliferación y diferenciación de fibroblastos y condrocitos^{59,60}. En riñón, CTGF participa de forma activa en la fibrosis y la transición epitelio mesenquimal (TEM) y, como hemos descrito recientemente, en la regulación de la respuesta inflamatoria, como se comenta con más profundidad a continuación.

RELACIÓN ENTRE EL CTGF Y EL TGF- β

Hay numerosas evidencias que demuestran que el TGF- β participa en los procesos fibróticos *in vivo*. Se ha descrito que CTGF y TGF- β actúan de manera sinérgica para promover fibrosis crónica (figura 2). En ratones, la coinyección subcutánea de ambos produce una fibrosis sostenida y persistente. En varios modelos experimentales, como la obstrucción unilateral del uréter, nefritis por anticuerpos anti-Thy1, glomerulosclerosis diabética, infusión de AngII⁶¹⁻⁶³, TGF- β y CTGF, se encuentran aumentados en etapas avanzadas de fibrosis, indicando que estos factores contribuyen a la progresión del daño renal (figura 3). Se ha descrito que el CTGF se une directamente al TGF- β . Esta unión lleva a una potenciación de la actividad del TGF- β . El mecanismo se basa en una función de chaperona del CTGF que incrementa la afinidad del TGF- β por sus diferentes receptores, por lo que sus respuestas son más intensas y prolongadas⁶⁴. Esta no es la única forma por la que el CTGF ayuda a las respuestas del TGF- β . La producción endógena de CTGF por el TGF- β lleva a una supresión transcripcional del Smad-7 a través de la inducción del factor

de transcripción del gen de respuesta temprana inducible por TGF- β (TIEG-1). Mediante este mecanismo, el TGF- β bloquea la regulación por retroalimentación a través del Smad-7, perpetuando la activación de la señalización del TGF- β ³². Esto puede ser relevante en condiciones patológicas en las que la expresión del CTGF está aumentada.

El bloqueo de la actividad del TGF- β con anticuerpos neutralizantes y/o decorina, un secuestrador de su forma activa, ha demostrado una reducción de la fibrosis en modelos experimentales de daño renal. Sin embargo, el ratón deficiente en TGF- β es letal, desarrollando un defecto en la reparación de herida, con problemas en los depósitos de colágeno, y presenta un fenotipo hiperinflamatorio⁶⁵. Esto sugiere que se debe encontrar una diana terapéutica que sea más específica para las enfermedades fibróticas. Los ratones heterocigotos para la delección del gen del CTGF presentan defectos en la organización y la síntesis de la matriz durante la osteogénesis, teniendo como resultado un defecto mayor en el desarrollo del componente esquelético de la caja torácica y, consecuentemente, mueren inmediatamente después del nacimiento⁶⁶.

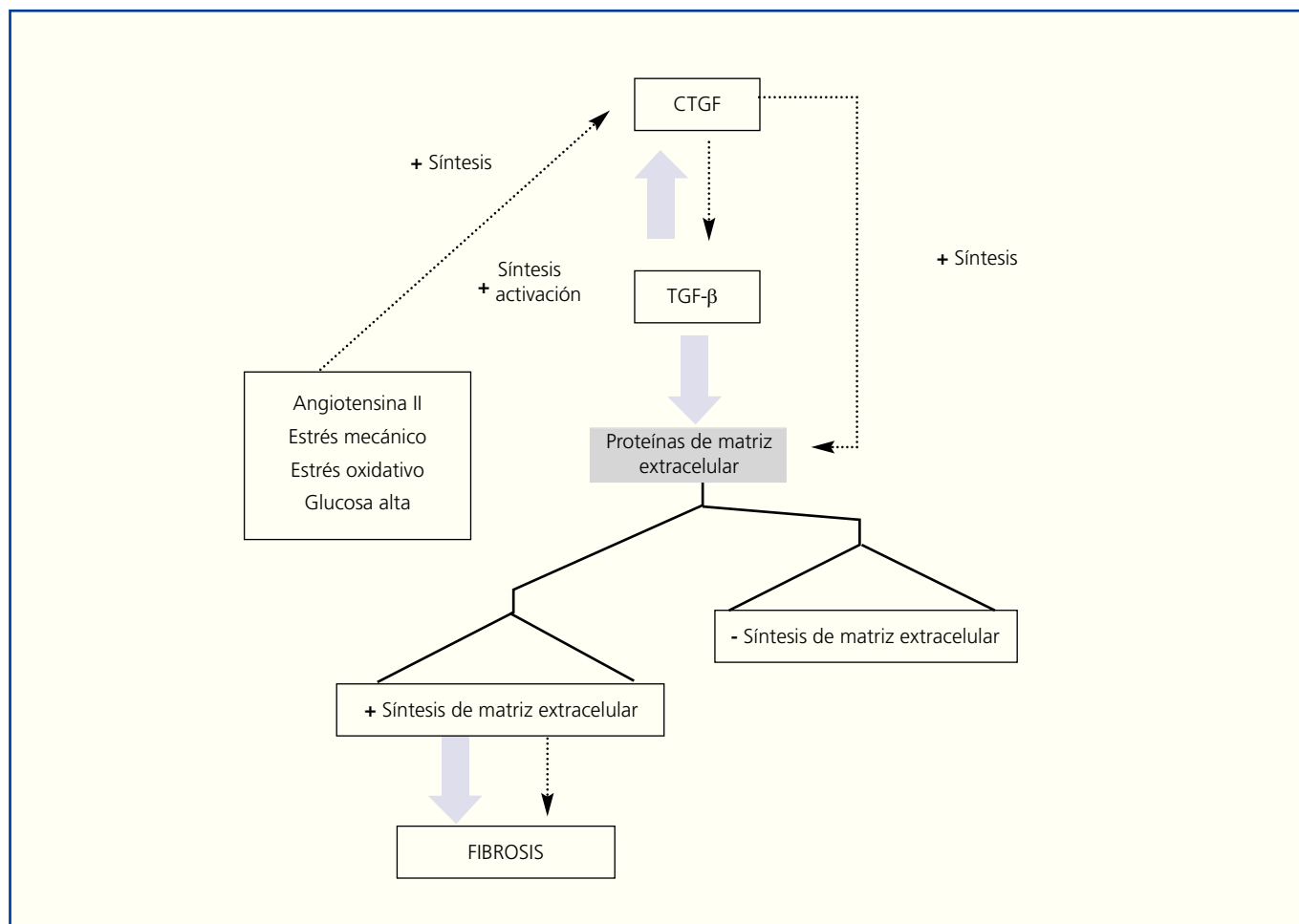


Figura 2. Esquema de la regulación y las acciones de CTGF en la fibrosis. Varios factores regulan CTGF, incluido TGF- β . Ambos son capaces de producir fibrosis. CTGF, a su vez, potencia las acciones de TGF- β para producir una fibrosis más relevante.

Además, es un mediador de la fibrosis causada por TGF-β y otros factores implicados en daño tisular, por lo que CTGF podría ser una diana nueva más útil en las terapias antifibróticas.

CTGF COMO MEDIADOR DE LA FIBROSIS RENAL y TRANSDIFERENCIACIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA (TEM)

En el riñón sano, CTGF no se expresa, pero este factor se induce en patologías renales humanas, incluyendo glomerulonefritis, glomerulosclerosis y nefropatía diabética, correlacionándose sus niveles de expresión con la gravedad y la progresión de la fibrosis renal^{5,67-69}. Nuestro grupo ha utilizado el modelo de daño renal causado por la infusión sistémica de AngII en ratas para estudiar el papel de CTGF en el inicio y progresión del daño renal *in vivo*.

La infusión de AngII induce la expresión de CTGF renal rápidamente, apareciendo a los tres días, y se mantiene elevada hasta las dos semanas, tiempo final del estudio (figura 3). La aparición de CTGF, observada a los tres días de infusión en células tubuloepiteliales y glomerulares, precede en el tiempo a la acumulación de MEC (caracterizado por aumento en el depósito de fibronectina), observada tras una semana, indicando que CTGF puede actuar como mediador de la fibrosis renal causada por AngII *in vivo*⁷⁰. Mediante estudios *in vitro* en células mesangiales de rata hemos observado que el bloqueo de la síntesis endógena de CTGF, mediante el uso de oligonucleótidos antisentido, previene la producción de fibronectina y colágeno IV causada por AngII⁴³. Estos datos de-

muestran que CTGF es un mediador de la respuesta fibrótica de AngII en el riñón.

La infusión de AngII también aumenta la expresión de TGF-β en el riñón. Este factor es sintetizado como una proteína inactiva, la cual es anclada a la membrana antes de su activación⁷¹. En células en cultivo, AngII incrementa la expresión del ARNm de TGF-β, la producción de proteína y la activación de TGF-β latente, en un proceso mediado por trombospondina-1⁷². Los niveles de expresión renal de TGF-β, pero no los de trombospondina-1, aparecen aumentados después de tres días de infusión con AngII. Sin embargo, los niveles proteicos de TGF-β activo no aumentaron hasta las dos semanas⁷³. Esto sugiere que CTGF se induce con anterioridad a TGF-β, participando en el inicio de la fibrosis, y que permanece aumentado hasta etapas avanzadas, contribuyendo a la perpetuación del daño renal (figura 3).

Muchas evidencias sugieren que en condiciones patológicas las células tubuloepiteliales pueden sufrir transición epitelio-mesénquima (TEM), convirtiéndose en fibroblastos productores de matriz extracelular y contribuyendo a la fibrosis renal y la progresión de la enfermedad⁷⁴. En este proceso participan diversos factores, entre los que destacan CTGF, TGF-β, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), IL-1, EGF, productos terminales de glucosilación avanzada (AGES) y AngII^{39,73,75-78}. CTGF promueve transdiferenciación de células tubuloepiteliales humanas a miofibroblastos *in vitro* y el bloqueo de CTGF da lugar a la inhibición de la transdiferenciación inducida por TGF-β⁷⁹, por productos terminales de glucosilación avanzada⁷⁵ y AngII³⁹. En el modelo de daño renal por AngII, el aumento en la expresión de CTGF se man-

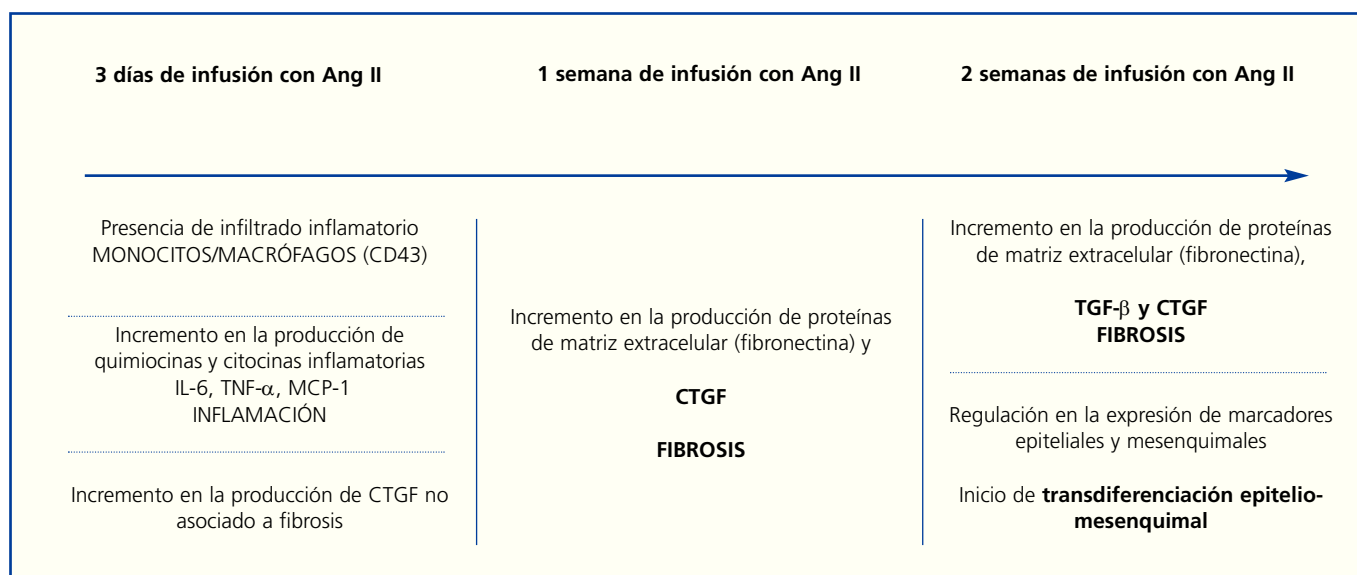


Figura 3. Esquema del daño renal inducido por Ang II. Tras tres días de infusión sistémica con Ang II, se produce un aumento en la expresión de factores inflamatorios como IL-6, TNF-α y MCP-1, que contribuyen al reclutamiento de células inflamatorias infiltrantes; éste coincide con el aumento de CTGF, que se mantiene elevado hasta etapas avanzadas del daño renal. Tras dos semanas, se produce el aumento de TGF-β, el cual contribuye a la acumulación de proteínas de matriz y al inicio del proceso de la TEM.

tiene a las dos semanas, coincidiendo con el inicio de la TEM, caracterizada por el aumento en la expresión del marcador mesenquimal α -SMA y la disminución del marcador epitelial E-cadherina⁷³ (figura 3). Además, el incremento de la expresión de CTGF en el riñón diabético colocaliza sobre el epitelio tubular en sitios de TEM⁷⁵. Estos datos se han confirmado en otros modelos experimentales, como nefrectomía 5/6 en ratas, donde el aumento de CTGF se asocia con la sobreexpresión de TGF- β y PDGF en fibroblastos intersticiales y con el aumento de la fibrosis y la gravedad del daño renal⁸⁰. Con estos datos podemos concluir que CTGF es un inductor de la fibrosis y TEM renal *in vivo*, actuando como mediador de las acciones de factores profibróticos como TGF- β y AngII. Además, contribuye a la perpetuación de la fibrosis, al interactuar con TGF- β .

CTGF PARTICIPA EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL

Utilizando el modelo de infusión de AngII, hemos observado que a los tres días hay una clara respuesta inflamatoria en el riñón⁸¹, caracterizada por la presencia de células inflamatorias infiltrantes (células T, macrófagos y granulocitos) en áreas tubulointersticiales y glomerulares (figura 3). En estos animales se observa también un aumento en la producción de mediadores inflamatorios clásicos como IL-6, TNF- β y MCP-1, y en la producción de CTGF en células mesangiales y podocitos, y en células tubuloepiteliales⁷⁰, lo que sugiere que CTGF podría estar implicado en la regulación de la respuesta inflamatoria en situaciones de daño renal. Varios estudios *in vitro*, en células mesangiales glomerulares, tubuloepiteliales, pancreáticas y hepáticas, han demostrado que CTGF regula mediadores inflamatorios^{58,82,83}.

Nuestro grupo ha demostrado recientemente que la administración sistémica de CTGF en ratones causó una respuesta inflamatoria renal pasadas 24 horas, caracterizada por reclutamiento de células inflamatorias (macrófagos y células T) al intersticio, producción de factores quimiotácticos (MCP-1 y RANTES), citocinas proinflamatorias (INF- γ , IL-6 y IL-4), y activación del factor de transcripción NF- κ B⁸⁴. El tratamiento con parthenolide, inhibidor de NF- κ B (24 horas antes de la inyección de CTGF), redujo la respuesta inflamatoria renal, demostrando que este factor es clave en las acciones de CTGF en el riñón⁸⁴.

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS FRENTE A LA PROGRESIÓN DEL DAÑO RENAL

En pacientes con nefropatía diabética, se ha descrito que niveles elevados de CTGF en plasma podrían considerarse como un marcador temprano de la progresión de la disfunción

renal en el riñón diabético⁸⁵, y predicen la evolución de la enfermedad renal⁸⁶. Estudios en pacientes con nefropatía IgA han observado que niveles elevados en orina de CTGF y TGF- β se correlacionan con el grado de daño tubulointersticial⁸⁷. Por otro lado, en pacientes con daño cardíaco crónico, los niveles de CTGF en plasma dan información sobre la aparición de fibrosis miocárdica, pudiendo considerarlo como nuevo marcador de disfunción cardíaca⁸⁸. Estos datos sugieren que CTGF podría ser un marcador de la fibrosis y progresión del daño en diferentes enfermedades.

Entre los tratamientos clínicos existentes para detener la progresión del daño renal, el bloqueo de AngII es una de las opciones farmacológicas más extendidas, con probados efectos órgano-protectores⁸⁹. El tratamiento con antagonistas del receptor AT₁ e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina^{89,90} disminuyen la expresión renal de CTGF y la fibrosis en varios modelos experimentales de daño renal⁷⁰. Sin embargo, estos fármacos sólo retardan el progreso de la enfermedad, y es necesaria una nueva opción terapéutica para conseguir que regrese la fibrosis renal e impida el proceso de la TEM.

Entre las nuevas opciones terapéuticas, el bloqueo del CTGF es una de las más prometedoras. Actualmente, los estudios de inhibición de CTGF están dirigidos hacia el desarrollo de oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia o anticuerpos neutralizantes que bloqueen CTGF endógeno. Estudios experimentales han demostrado que el bloqueo de CTGF, mediante oligonucleótidos antisentido, reduce la acumulación de MEC en ratones transgénicos para TGF- β 1 sometidos a nefrectomía⁹¹ y en ratones con nefropatía diabética⁹². En un modelo de fibrosis hepática, el tratamiento con un ARN de interferencia para CTGF vía vena intraportal atenuó la fibrosis hepática⁹³. Sin embargo, los efectos del bloqueo de CTGF en la respuesta inflamatoria renal aún no se han estudiado, lo que hace necesario profundizar en este campo. Todos estos datos sugieren que el bloqueo de CTGF endógeno podría ser una buena alternativa en el tratamiento de patologías renales asociadas a inflamación y fibrosis.

CONCLUSIÓN FINAL

En esta revisión se muestra la gran complejidad de las vías de señalización intracelular que regulan CTGF, que varían dependiendo del tipo celular y el factor inductor y, además, la existencia de factores activadores y reguladores negativos que condicionan su síntesis y el desarrollo de sus respuestas. Con respecto a la patología renal, CTGF está implicado en todas las etapas del daño renal: participando en la respuesta inflamatoria (a través de la activación del factor NF- κ B regulando quimiocinas y citocinas) y promoviendo la fibrosis y la TEM, lo que le señala como una buena diana terapéutica en el tratamiento de las enfermedades renales.

Agradecimientos

Los trabajos del grupo mencionados en esta revisión han sido financiados por: Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2005-03378), Sociedad Española de Nefrología, FIS (PI020822, PI 06/0046 y PI081564), Red temática de Investigación Renal, REDINREN (ISCI-RETIC RD06/0016) del Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo, EU project DIALOK: LSHB-CT-2007-036644, PCI Iberoamérica (A/9571/07) y FONDECYT, Chile (1080083). Programa Intensificación Actividad Investigadora (ISCI/Agencia Lain-Entralgo/CM) a AO.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gupta S, Clarkson MR, Duggan J, Brady HR. Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 2000;58(4):1389-99.
2. Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection. *Exp Cell Res* 1999;248(1):44-57.
3. Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 2004;363:62-4.
4. Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Nagae T, Makino H, et al. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002;282(5):F933-42.
5. Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ, et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 1998;53:853-61.
6. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 1991;114:1285-94.
7. Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev* 1999;20:189-206.
8. Perbal B. NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. *Mol Pathol* 2001;54:57-79.
9. Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* 1993;327:125-30.
10. Albiston AL, Herington AC. Cloning and characterization of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3) in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;166:892-7.
11. Binkert C, Landwehr J, Mary JL, Schwander J, Heinrich G. Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding a novel insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-2). *EMBO J* 1989;8:2497-502.
12. Brinkman A, Groffen C, Kortleve DJ, Geurts van Kessel A, Drop SL. Isolation and characterization of a cDNA encoding the low molecular weight insulin-like growth factor binding protein (IBP-1). *EMBO J* 1988;7:2417-23.
13. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, et al. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1989;264:19514-27.
14. Holt GD, Pangburn MK, Ginsburg V. Properdin binds to sulfatide [Gal(3-SO4)beta 1-1 Cer] and has a sequence homology with other proteins that bind sulfated glycoconjugates. *J Biol Chem* 1990;265:2852-5.
15. Hoshijima M, Hattori T, Inoue M, Araki D, Hanagata H, Miyauchi A, et al. CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin $\alpha 5 \beta 1$. *FEBS Lett* 2006;580:1376-82.
16. Babic AM, Chen CC, Lau LF. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin $\alpha V \beta 3$, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biol* 1999;19:2958-66.
17. Chen G, Grotendorst G, Eichholtz T, Khalil N. GM-CSF increases airway smooth muscle cell connective tissue expression by inducing TGF-beta receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284(3):L548-56.
18. Hoshijima M, Hattori T, Inoue M, Araki D, Hanagata H, Miyauchi A, et al. CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin $\alpha 5 \beta 1$. *FEBS Lett* 2006;580:1376-82.
19. Liu X, Luo F, Pan K, Wu W, Chen H. High glucose upregulates connective tissue growth factor expression in human vascular smooth muscle cells. *BMC Cell Biol* 2007;16:8:1.
20. Murphy M, Godson C, Cannon S, Kato S, Mackenzie HS, Martin F, et al. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. *J Biol Chem* 1999;274(9):5830-4.
21. Park SK, Kim J, Seomun Y, Choi J, Kim DH, Han IO, Lee EH, et al. Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;284(4):966-71.
22. Rimón E, Chen B, Shanks AL, Nelson DM, Sadovsky Y. Hypoxia in human trophoblasts stimulates the expression and secretion of connective tissue growth factor. *Endocrinology* 2008.
23. Rishikof DC, Ricupero DA, Kuang PP, Liu H, Goldstein RH. Interleukin-4 regulates connective tissue growth factor expression in human lung fibroblasts. *J Cell Biochem* 2002;85(3):496-504.
24. Zhou G, Li C, Cai L. Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor beta-independent pathway. *Am J Pathol* 2004;165(6):2033-43.
25. Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal, and scleroderma fibroblast. *J Biol Chem* 2000;275:1520-5.
26. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta induced collagen synthesis: downregulation by cAMP. *FASEB J* 1999;13:1774-86.
27. Fu M, Zhang J, Zhu X, Myles DE, Willson TM, Liu X, et al. Peroxisome proliferators activated receptor gamma inhibits transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor expression in human aortic smooth muscle cells by interfering with smad3. *J Biol Chem* 2001;276:45888-94.
28. Wang W, Liu F, Chen N. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) agonists attenuate the profibrotic response

- induced by TGF-beta1 in renal interstitial fibroblasts. *Mediators Inflamm* 2007;62641.
29. Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Cartier C, Rupérez M, Esteban V, Carvajal G, et al. Inhibitory effect of interleukin-1beta on angiotensin II-induced connective tissue growth factor and type IV collagen production in cultured mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294(1):F149-60.
 30. Chen Y, Blom IE, Sa S, Goldschmeding R, Abraham DJ, Leask A. CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int* 2002;62(4):1149-59.
 31. Iwanciw D, Rehm M, Porst M, Goppelt-Struebe M. Induction of connective tissue growth factor by angiotensin II: integration of signaling pathways. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol* 2003;23:1782-7.
 32. Lee CI, Guh JY, Chen HC, Lin KH, Yang YL, Hung WC, et al. Leptin and connective tissue growth factor in advanced glycation end-product-induced effects in NRK-49F cells. *J Cell Biochem* 2004;93(5):940-50.
 33. Wahab NA, Weston BS, Mason RM. Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Exp Cell Res* 2005;307(2):305-14.
 34. Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Esteban V, Rupérez M, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II Activates The Smad Pathway In Vascular Smooth Muscle Cells. Potential role in vascular fibrosis. *Circulation* 2005;111:2509-17.
 35. Heusinger-Ribeiro J, Eberlein M, Wahab NA, Goppelt-Struebe M. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblast: Regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1853-1.
 36. Chen Y, Blom IE, Sa S, Goldschmeding R, Abraham DJ, Leask A. CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int* 2002;62(4):1149-59.
 37. Phanish MK, Wahab NA, Hendry BM, Dockrell ME. TGF-beta1-induced connective tissue growth factor (CCN2) expression in human renal proximal tubule epithelial cells requires Ras/MEK/ERK and Smad signalling. *Nephron Exp Nephrol* 2005;100:e156-e165.
 38. Wickert L, Chatain N, Kruschinsky K, Gressner AM. Glucocorticoids activate TGF-beta induced PAI-1 and CTGF expression in rat hepatocytes. *Comp Hepatol* 2007;2;6:5.
 39. Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T, Masubuchi K, Shimizu Y, Nakazawa T, et al. C-Jun-NH2-terminal kinase mediates expression of connective tissue growth factor induced by transforming growth factor-beta1 in human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28(6):754-61.
 40. Rodríguez-Díez R, Carvajal-González G, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Díez RR, Selgas R, et al. Pharmacological modulation of epithelial mesenchymal transition caused by Angiotensin II. Role of ROCK and MAPK pathways. *Pharmaceutical Research* 2008;25(10):2447-61.
 41. Rupérez M, Rodríguez-Díez R, Blanco-Colio LM, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Esteban V, et al. HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced vascular fibrosis: role of RhoA/Rock and MAPK pathway. *Hypertension* 2007;50:377-83.
 42. Ruperez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation* 2003;108(12):1499-505.
 43. Liu B, Yu J, Taylor L, Zhou X, Polgar P. Microarray and phosphokinase screenings leading to studies on ERK and JNK regulation of connective tissue growth factor expression by angiotensin II 1a and bradykinin B2 receptors in Rat1 fibroblasts. *J Cell Biochem* 2006;97:1104-20.
 44. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor-b in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994;331:1286-92.
 45. Nishida T, Nakanishi T, Shimo T, Asano M, Hattori T, Tamatani T, et al. Demonstration of receptors specific for connective tissue growth factor on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:905-9.
 46. Segarini PR, Nesbitt JE, Li D, Hays LG, Yates JR III, Carmichael DF. The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor. *J Biol Chem* 2001;276:40659-67.
 47. Chen CC, Chen N, Lau LF. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblast. *J Biol Chem* 2001;276:10443-52.
 48. Gao R, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin alpha5beta1 as a novel CCN2 receptor. *Gastroenterology* 2005;129(3):1019-30.
 49. Jedsadayanmata A, Chen CC, Kireeva ML, Lau LF, Lam SC. Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). *J Biol Chem* 1999;274:24321-7.
 50. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective tissue growth factor (CTGF) modulates cell signaling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2000;275:15220-5.
 51. Hoshijima M, Hattori T, Inoue M, Araki D, Hanagata H, Miyauchi A, et al. CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin alpha5beta1. *FEBS Lett* 2006;580:1376-82.
 52. Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT Jr, Rosenfeld RG. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:12981-6.
 53. Crean JK, Finlay D, Murphy M, Moss C, Godson C, Martin F, Brady HR. The role of p42/44 MAPK and protein kinase B in connective tissue growth factor induced extracellular matrix protein production, cell migration, and actin cytoskeletal rearrangement in human mesangial cells. *J Biol Chem* 2002;277(46):44187-94.
 54. Matsui Y, Sadoshima J. Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:477-81.
 55. Wahab NA, Weston BS, Roberts T, Mason RM. Connective tissue growth factor and regulation of the mesangial cell cycle: role in cellular hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2437-45.
 56. Szeto CC, Chow KM, Lai KB, Szeto CY, Kwan BC, Li PK. Connective tissue growth factor is responsible for transforming growth factor-beta-induced peritoneal mesothelial cell apoptosis. *Nephron Exp Nephrol* 2006;103(4):e166-74.
 57. Wahab N, Cox D, Witherden A, Mason RM. Connective tissue growth factor (CTGF) promotes activated mesangial cell survival via up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1). *Biochem J* 2007;406:131-8.
 58. Gao R, Brigstock DR. Activation of nuclear factor kappa B (NF-

- kappaB) by connective tissue growth factor (CCN2) is involved in sustaining the survival of primary rat hepatic stellate cells. *Cell Commun Signal* 2005;22;3:14.
59. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libada DE, Stepheson RC, et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 2003;130:2779-91.
60. Nawachi K, Inoue M, Kubota S, Nishida T, Yosimichi G, Nakanishi T, et al. Tyrosine Kinase-type receptor ErbB4 in chondrocytes: interaction with connective tissue growth factor and distribution in cartilage. *FEBS Lett* 2002;528:109-13.
61. Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 2001;276:10594-601.
62. Hlubocka Z, Umnerova V, Heller S, et al. Circulating intercellular cell adhesion molecule-1, endothelin-1 and von Willebrand factor-markers of endothelial dysfunction in uncomplicated essential hypertension: the effect of treatment with ACE inhibitors. *J Hum Hypertens* 2002;16(8):557-62.
63. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. *Hypertension* 1992;19(6 Pt 2):753-7.
64. Peifley KA, Winkles JA. Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242(1):202-8.
65. Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000;102(19):2434-40.
66. Rich S, McLaughlin VV. Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation* 2003;108(18):2184-90.
67. Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, Narins RG. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:25-38.
68. Ito Y, Goldschmeding R, Bende RJ, Claessen N, Chand MA, Kleij L, et al. Kinetics of connective tissue growth factor expression during experimental proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:472-84.
69. Makino H, Mukoyama M, Sugawara A, Mori K, Suganami T, Yahata K, et al. Role of connective tissue growth factor and prostanoids in early streptozotocin-induced diabetic rat kidney: The effect of aspirin treatment. *Clin Exp Nephrol* 2003;7:33-40.
70. Rupérez M, Ruiz-Ortega M, Esteban V, Lorenzo O, Mezzano S, Plaza JJ, et al. Angiotensin II increases connective tissue growth factor in the kidney. *Am J Pathol* 2003;163:1937-47.
71. Grainger DJ. Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:399-404.
72. Naito T, Masaki T, Nikolic-Paterson DJ, Tanji C, Yorioka N, Kohno N. Angiotensin II induces thrombospondin-1 production in human mesangial cells via p38 MAPK and JNK: a mechanism for activation of latent TGF-beta1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286(2):F278-F287.
73. Carvajal G, Rodríguez-Vita J, Rodrigues-Díez R, Sánchez-López E, Rupérez M, Cartier C, et al. Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation. *Kidney Int* 2008;74(5):585-95.
74. Roberts AB, Tian F, Byfield SD, et al. Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:19-27.
75. Burns WC, Twigg SM, Forbes JM, Pete J, Tikellis C, Thallas-Bonke V, et al. Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: implications for diabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(9):2484-94.
76. Liu BC, Li MX, Zhang JD, Liu xc, Zhang XL, Phillips AO. Inhibition of integrin-linked kinase via siRNA expression plasmid attenuates connective tissue growth factor-induced human proximal tubular epithelial cells to mesenchymal transition. *Am J Nephrol* 2008;28(1):143-51.
77. Shi-Wen X, Leask A, Abraham D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19(2):133-44.
78. Zhang A, Ding G, Huang S, Wu Y, Pan X, Guan X, et al. c-Jun NH2-terminal kinase mediation of angiotensin II-induced proliferation of human mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F1118-F1124.
79. Zhang C, Meng X, Zhu Z, Yang X, Deng A. Role of connective tissue growth factor in renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation and extracellular matrix accumulation in vitro. *Life Sci* 2004;75:367-79.
80. Frazier KS, Paredes A, Dube P, Styer E. Connective tissue growth factor expression in the rat remnant kidney model and association with tubular epithelial cells undergoing transdifferentiation. *Vet Pathol* 2000;37:328-35.
81. Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Lorenzo O, Esteban V, Blanco J, Mezzano S, et al. Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl* 2002;12-22.
82. Wu SH, Wu XH, Lu C, Dong L, Zhou GP, Chen ZQ. Lipoxin A4 inhibits connective tissue growth factor-induced production of chemokines in rat mesangial cells. *Kidney Int* 2006;69:248-56.
83. Karger A, Fitzner B, Brock P, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S, et al. Molecular insights into connective tissue growth factor action in rat pancreatic stellate cells. *Cellular Signalling* 2008;20:1865-72.
84. Sánchez-López E, Rayego S, Rodrigues-Díez R, Rodríguez JS, Rodrigues-Díez R, Rodríguez-Vita J, et al. CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kappaB. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1513-26.
85. Thomson SE, McLennan SV, Kirwan PD, Heffernan SJ, Hennessy A, Yue DK, et al. Renal connective tissue growth factor correlates with glomerular basement membrane thickness and prospective albuminuria in a non-human primate model of diabetes: possible predictive marker for incipient diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications*
86. Jaffa AA, Usinger WR, McHenry MB, Jaffa MA, Lipstiz SR, Lackland D, et al. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Group. Connective Tissue Growth Factor and Susceptibility to Renal and Vascular Disease Risk in Type 1 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(5):1893-900.

87. Nonaka Takahashi S, Fujita T, Takahashi T, Wada Y, Fuke Y, Satomura A, et al. TGF-beta1 and CTGF mRNAs are correlated with urinary protein level in IgA nephropathy. *J Nephrol* 2008;21(1):53-63.
88. Koitabashi N, Arai M, Niwano K, Watanabe A, Endoh M, Suguta M, et al. Plasma connective tissue growth factor is a novel potential biomarker of cardiac dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2008;10(4):373-9.
89. Wolf G, Ritz E. Combination therapy with ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers to halt progression of chronic renal disease: pathophysiology and indications. *Kidney Int* 2005;67:799-812.
90. Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Carvajal G, et al. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:16-20.
91. Okada H, Kikuta T, Kobayashi T, Inoue T, Kanno Y, Takigawa M, et al. Connective tissue growth factor expressed in tubular epithelium plays a pivotal role in renal fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:133-43.
92. Li GM, Li DG, Xie Q, Shi Y, Jiang S, Zhou HJ, et al. Effect of silencing connective tissue growth factor on rat liver fibrosis and the accumulation of extracellular matrix. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2008;16(3):188-92.
93. Guha M, Xu ZG, Tung D, Lanting L, Natarajan R. Specific down-regulation of connective tissue growth factor attenuates progression of nephropathy in mouse models of type 1 and type 2 diabetes. *FASEB J* 2007;21:3355-68.