

**EL FACTOR 2 DE LA RED DE
COMUNICACIÓN CELULAR (CCN2)
EJERCE UN PAPEL ESENCIAL EN EL
MANTENIMIENTO DE LA ESTRUCTURA
Y LAS RESPUESTAS VASCULARES DE
LA AORTA EN RATONES**

Antonio Tejera Muñoz,

Programa de Doctorado en
Farmacología y Fisiología

Centro realización Tesis/Institución
**Laboratorio de Biología Molecular y Celular en Patología Renal y Vascular
Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD)**

Departamento UAM/Facultad de Medicina

Madrid, 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Doctorado en Farmacología y Fisiología



Universidad Autónoma
de Madrid



**EL FACTOR 2 DE LA RED DE COMUNICACIÓN CELULAR
(CCN2) EJERCE UN PAPEL ESENCIAL EN EL MANTENIMIENTO
DE LA ESTRUCTURA Y LAS RESPUESTAS VASCULARES DE
LA AORTA EN RATONES**

Tesis Doctoral presentada por **Antonio Tejera Muñoz**, Graduado en Bioquímica por la Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM) y Máster en *Pharmacological Research* por la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

Trabajo dirigido por la **Dra. Marta Ruiz Ortega** y el **Dr. Raúl Rodríguez Díez**, y llevado a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Celular en Patología Renal y Vascular del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díez (IIS-FJD).



Madrid, 2023

La potencia intelectual de un hombre se mide por la dosis de humor que es capaz de utilizar.

- Nietzsche

Sabes lo que vales, así que ve y coge lo que mereces.

- Rocky

Si no puedes volar, entonces corre. Si no puedes correr, entonces camina. Si no puedes caminar, entonces arrástrate, pero haz lo que hazas, jamás dejes de intentarlo.

- Martin Luther King

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Creo que, de toda la tesis, este es el apartado al que más miedo me da enfrentarme. Siempre me gusta decir que “lo bueno, si breve, dos veces bueno”, pero se me va a hacer imposible ser todo breve que me gustaría aquí por la cantidad de gente increíble que me ha ayudado y apoyado a lo largo de este camino.

Empecé en el camino de la investigación en el momento de elegir carrera. Por aquel entonces no tenía ni idea de a qué me quería dedicar. Durante muchos años quise estudiar Fisioterapia, pero en el momento de escoger qué camino seguir, las dudas asaltaron mi cabeza y colapsé. Tal fue el caos al que me enfrentaba, que definitivamente mi primera opción era Bioquímica y la segunda Filosofía. ¡Vaya diferencia! La decisión final está clara a día de hoy, pero en aquel momento no fue nada sencilla. En esa elección y durante todo el tránsito que supuso mi formación pregrado y postgrado es donde entran las primeras personas a las que quiero dedicar este apartado: mi familia.

Empezar por la que he considerado la clave de mi personalidad: mi madre. Mamá, gracias por todo lo que me has aportado a lo largo de estos 27 años. Tu bondad, tu amor, tus consejos y tu fortaleza han sido claves en mi día a día. Me has enseñado a reír, a sobreponerme a los problemas y darme cuenta de que los altibajos de la vida son necesarios para poder pelear por el fin último de todo ser humano, que no es otro que la felicidad. Me enorgullece hablar de ti y que todo el mundo que te conozca me diga que eres “un amor”. Pero es que, literalmente, eres amor. Gracias por toda la libertad que me has permitido tener, gracias por entenderme y por ser un pilar trascendental en mi desarrollo como persona.

Papá, te toca. Gracias por enseñarme la disciplina necesaria para alcanzar cualquier de los objetivos que me proponga, por ser un apoyo sólido y fuerte que siempre ha acabado estando ahí. Todavía tengo bien claro en mi memoria muchas de esas tardes en las que te tocaba sentarte conmigo para ayudarme con los deberes, aun cuando venías de trabajar tras un día entero fuera de casa. El esfuerzo que has tenido para poder otorgarme la formación que a día de hoy se ve culminada con una tesis doctoral ha sido sobrehumano. Millones de gracias por haber sido clave en convertirme en la persona que soy hoy en día.

Además de ellos, obviamente está mi hermana María. De ti desde luego que siempre he recibido tu apoyo indispensable para todo en la vida, pero, sobre todo, lo que he aprendido de crecer a tu lado es esfuerzo, dedicación y constancia. No ha sido un camino fácil, pero puedo decir a día de hoy, que mi hermana es la mejor profesora del mundo. Más allá de las discusiones propias entre hermanos que hemos podido tener, toda la vida hemos ido juntos. Eres increíble y te mereces lo increíble. Siempre me tendrás para todo cuanto necesites.

Sumados a ellos, están el resto de mi familia. Mi tío Juanjo, un ejemplo de humor y diversión. Aún recuerdo cuando era pequeño y me preguntaba cada día cuándo volverías de Málaga para volver a verte. Fuiste quien me inspiró para ser del Real Madrid, equipo que tantas alegrías nos ha dado últimamente. Sus hijos, mis primos, Marta y Juan José. En mi cabeza siempre tendré esas visitas en casa de los abuelos cuando yo no era más que un niño pesado que quería jugar con vosotros. ¡Cuánto me habéis tenido que aguantar! Me habéis visto crecer y me llena de alegría saber que siempre os voy a tener ahí. Marta, ahora con Andrés, tu hijo, espero que nunca te arrepientas de llamarme “el primo listo”. Pasamos ahora a la rama paterna, mis tíos Jesús y Ana. También millones de gracias a vosotros, por vuestras

AGRADECIMIENTOS

visitas en casa que siempre me llenaban de ilusión. Lo que habéis tenido que aguantarme también. ¡Siempre recordaré aquella noche que nos invitasteis a dormir a vuestra casa y tuve que compartir el salón con el tío! Menudas risas. Tengo infinitos recuerdos con vosotros, toda una vida desde luego, pero rememoraré con cariño mi primer viaje a Madrid, mi primer viaje en tren. Esos trenes que luego tantas veces he tenido que coger y con los que tantas veces he compartido contigo, tío. Junto con vosotros, mis primos más cercanos: Yolanda y Raúl. Raúl, aún tengo en mente cuando naciste, cuando eras tan pequeño y te sostenía en brazos la abuela Lucía. Cuánto has crecido desde entonces. Espero que este nuevo camino en la carrera te vaya genial, aunque no me cabe duda de ello. Yolanda, en nuestro caso la relación ha sido mucho más cercana. Desde pequeños hemos compartido muchísimos momentos y deseo que sigamos haciéndolo en el futuro. ¡Muchas fiestas nos quedan aún por delante y muchos más recuerdos que ir guardando en el futuro!

Más allá de ellos, no me gustaría olvidarme de los que ya no están. Mis abuelos paternos, Félix y Lucía, y maternos, Juan José y Paz. Siempre conmigo, aunque ya no estéis físicamente. Os quiero muchísimo y esta tesis también es gracias a vosotros.

Dejando ya este pilar fundamental en mi vida que es la familia, nos movemos hacia otro, que ha supuesto una enorme parte de la persona que soy hoy en día: mis amigos.

Desde el colegio tengo a estas algunas de las personas más importantes de mi vida, como son Miguel, Álvaro, Pedrero y David, pero el resto que se ha ido sumando a lo largo de mi vida, no se queda atrás. Me dais vida y no sabéis cuánto me alegro de teneros conmigo. Miguel, eres bondad y honestidad. Te lo he dicho infinitud de veces, pero de verdad que eres de esas personas que uno no quiere perder nunca. Quiero llegar a anciano y poder seguir quedando contigo para rememorar anécdotas, reír, llorar y divagar sobre la vida. Tienes una mente más que increíble, la cual acompasa a la perfección el resto de tu personalidad. No te haces una idea de cuánto me has enseñado, de cuánto me has aportado a lo largo de toda la vida. Brindo por todos esos recuerdos que ya tenemos, desde ese increíble viaje a Suecia hasta las mañanas de “barras en el parque” más recientes. Estoy deseando tener mucho más que contar de esta increíble y duradera amistad, para llegar a tener 80 años y seguir diciéndote algo que me has dicho en numerosas situaciones: “no recuerdo un momento de mi vida en el que tú no estés a mi lado”.

Álvaro, ¡la cantidad de cosas que tenemos juntos también! Desde el interrail en Suecia en el que todo te pareció bonito, incluido el peligroso WiFi público de Gotemburgo, hasta aquellos años viviendo juntos. Han sido muchísimo tiempo el que hemos estado juntos desde la guardería, pero, ¡madre mía cuánto nos quedan aún por compartir!

Alberto, no sé hasta qué punto se puede desdibujar la línea entre la amistad y los lazos de sangre, pero contigo desde luego que se han entrecruzado ambos conceptos. No llevas toda la vida conmigo, pero como si así fuese. Hemos estado juntos en nuestros mejores y nuestros peores momentos, pero siempre con un apoyo incondicional. Para mí eres una persona fundamental e indispensable en todos los ámbitos que puede abarcar el término “amistad”. Esencial en mi vida, especial como tú solo. Mi amigo de corazón. Mi compitauer. Mi hermano.

AGRADECIMIENTOS

¿Cómo olvidarme del resto de la familia que he elegido en Alcázar? Primi, mi CorasónGay, la cantidad de momentos que hemos compartido juntos está cercana al infinito, pero con todo lo que nos queda por delante, estoy seguro de que llegaremos a esa cifra. Noelia, algún día me apuntaré a baile contigo, lo prometo, solo déjame a que acabe la tesis... Solo espero que, para entonces, sigas manteniendo y transmitiendo esa felicidad característica que emanas. David, una maravilla de persona que llevo desde el colegio a mi lado. Siempre voy a recordar lo bien que me venían las quedadas de verano en el barrio, así como lo mucho que me ayudaste y visitaste cuando me operaron. Tania, eres una hermana para mí, de esas personas que marcan desde casi el primer día en que apareciste en mi vida. Tienes esa característica, esa capacidad esencial, eres mágica. Pedrero, eres una persona maravillosa con la mayor y mejor capacidad para hacer reír y sentirse cómodo a alguien en cualquier situación, eres único. Laura, madre mía la cantidad de años que hemos estado juntos también, no soy consciente de lo mucho que hemos compartido, pero qué alegría haberlo hecho. Luis, Jaime, Fran, Peralta, Alba, Juanma, Paula, Marta... Podría hacer una tesis entera (en 1024 gigabytes, ya sabéis :3) solo hablando sobre vosotros y vosotras. A todos, de corazón, muchísimas gracias.

Especial mención en este punto a toda esa gente que me ha acompañado en mi formación universitaria en Toledo, desde los profesores hasta todos los compañeros, pero desde luego que hay un conjunto de personas que ha estado ahí siempre y que, con suerte, continuarán su andadura conmigo. Javier, Manu, Ana Belén, Laura y Bea. Cada uno de vosotros habéis aportado algo nuevo y valioso a mi camino hasta conseguir esta tesis. Ha sido un placer compartir momentos y experiencias, muchas de ellas fiestas juntos, que, ¡madre mía! Más allá de eso, hemos podido seguir manteniendo el contacto, en especial con Manu, con el que he tenido la grandísima suerte de trabajar codo con codo en esta etapa post-universitaria. Gracias a él y a Javi, especialmente, no he perdido la razón durante la carrera. Las cervezas y torneos de cabezones mientras estudiábamos hacían mucho más interesante aprender “Determinación estructural” o “Ingeniería Genética”. Sois de lo mejorcito que tengo en esta vida, chicos. Sumados a ellos, están los miembros del Bunker: Xuxu, Javi, Adri, Jara, Losada y Jonny. Sois geniales, chicos. Os irá genial en la vida y estaré ahí para verlo. Os quiero mogollón.

Aparte de la UCLM, también di con gente maravillosa en la UAM. Gracias a Ángel y Miriam, quienes me dieron la oportunidad de poder comenzar mi formación práctica en un laboratorio y gracias a la cual he podido llegar a ser quien soy hoy en día. Infinitas gracias también a Sara, Bea y Dani, quienes me enseñaron todo. Los momentos con vosotros en el C15 con las camaritas siempre serán mágicos. Más allá del laboratorio, Dani, en específico, se ha convertido un baluarte en el mundo de la ciencia, siempre un paso por delante y dispuesto a echarme una mano con lo que fuese. Espero poder seguir sabiendo de ti y tu progreso, que, seguro que no tiene límites, porque eres ejemplo de trabajo, esfuerzo, dedicación, inteligencia y pasión. Estaré encantado de verte cumplir tus metas.

En este punto, ya hemos llegado al momento en el que ya me trasladé a Madrid y toca mencionar a aquellas personas con las que pude crear un hogar. El primero de ellos David, una persona maravillosa y de la que me llevo recuerdos y anécdotas geniales que creamos durante dos años de convivencia, con pandemia de por medio. Y tras él, Joaquín y Marina, quienes se convirtieron en mi familia de Madrid. Convivimos durante un año lleno de alegrías, risas, experiencias y anécdotas que jamás olvidaré, como aquel día que visitamos prácticamente 20

AGRADECIMIENTOS

bares hasta encontrar uno abierto, o el cumpleaños temático que nos permitió organizar 7 fiestas diferentes en una misma noche dentro de casa. *Maldonado* siempre estará conmigo y la amistad que forjamos en este tiempo perdurará. Con vosotros he podido madurar y crecer como nunca antes habría imaginado, superando juntos cualquier tipo de adversidad. Vosotros habéis aportado un “granito” de arena enorme en este camino que ha acabado con la consecución de esta tesis. ¡Muchísimas gracias, os quiero un montón!

Llegados hasta aquí, toca hablar sobre el grueso y centro de este trabajo, donde se me permitió hacer la tesis, la Fundación Jiménez Díaz. Agradecerle, en primer lugar, a Marta por la oportunidad, por su apoyo, ayuda y enseñanzas. Tengo siempre en mente esa primera entrevista contigo, los nervios de no saber a qué me iba a enfrentar, y resulta que tú ya habías tomado una decisión. La verdad que fue de las mejores noticias que pude recibir, pero ya ni hablamos cuando por fin nos informaron de la concesión de la beca. Eres ejemplo de superación, Marta, entre muchas otras cosas. Contigo al lado, mi manera de actuar era “esponja”, para poder absorber y aprender todo lo que pudiera cada vez que hablabas. Al incorporarme, pude darme cuenta de la cantidad de gente buena que se mueve en este campo. No solo me refiero en el ámbito intelectual y académico, sino en concreto en nuestro laboratorio, la sensación de familia que había, convirtiéndose en una de las mejores recompensas que uno puede recibir al ir a trabajar. Me costó un poquito aprenderme bien los nombres, sobre todo por la cantidad de Lauras que había... Laura Santos, me acogiste como el patito a tu cargo. Me enseñaste todo lo que sabías, que es muchísimo, y gracias a ti adopté una visión y un rigor genuino a la hora de realizar cualquier procedimiento. Aparte de ella, Laura Márquez, la alegría y felicidad personificada. De las personas más inteligentes y trabajadoras que me he encontrado en la vida. Millones de gracias por todos los momentos que hemos podido compartir, tanto en el labo, como con todas esas tardes de cañas y planes guays que hemos organizado, ¡incluido ese Oktoberfest! Maca, de ti aprendí la cultura del esfuerzo también, pese a las adversidades lograste un objetivo enorme, con trabajo y constancia, se puede llegar increíblemente lejos, como tú lo estás haciendo. Al cabo de unos meses llegó Lucía, para terminar su TFM y, un tiempcito después, para comenzar su tesis. Eres de las personas más transparentes que existen, buena como tú sola y con un humor estupendo que nos ha permitido compartir vídeos tan chorras que mucha gente nos llamaría idiotas. Siempre recordaré tu “herencia” del escudo del Atleti pegado en mi sitio o los momentos preparando la decoración de Navidad juntos, con ese arbolito personalizado de ciencia. Vanessa, millones de gracias a ti también, desde que llegaste fuiste una brisa de aire fresco al laboratorio y contigo he tenido vivencias únicas, como quedarnos tirados en Londres abandonados a nuestra suerte... Vaya tensión ese día, y cuantas risas ahora, como siempre contigo. Irene, te toca. Llegaste la última, pero te hiciste un huequito enorme en nuestro corazón. Te iba a decir algo, pero mejor me lo voy a callar... Porque quien tenga que entender, entendió. Te quiero mogollón, amiga. Millones de gracias a todas por cada sonrisa que hemos compartido, por cada momento complicado en el que nos hemos podido apoyar como si de una familia se tratase. Sois geniales y os quiero mogollón. No sé si me dejo a alguien... Creo que ya no... *Nah*, ¡es broma! Por supuesto que no me voy a olvidar de Raúl, mi compañero, director y amigo. La verdad que esta es una de las partes más complicadas de redactar, porque me faltan palabras para poder describir todo lo que me has enseñado, aportado y apoyado durante estos años. Tienes una cabeza privilegiada de la que, ojalá, haya podido aprender

AGRADECIMIENTOS

muchísimo. Cada conversación contigo, científica o no, era oro puro para poder aprender y avanzar como profesional y como persona. Cualquier intento de agradecimiento hacia ti se queda corto, porque eres un crack de los pies a la cabeza, un trabajador envidiable y una persona honesta y confiable. Si todo trabajo implica su recompensa, créeme que la vida entonces te tiene reservada la mejor de todas. Infinitas gracias por todo, de corazón.

No quiero dejar pasar a nadie, puesto que hay muchísima gente a la que poder darle las gracias más allá de ellos: Sandra, Lara, Ana, Fonti, Leti, Gina, Arancha, Susana, Nacho, Luna, Su, Jorge, Zaza, Dani, Juan... Con vosotros he compartido cosas geniales que nunca jamás voy a olvidar. Y obviamente dos partícipes de toda esta etapa a los que siempre voy a recordar también y con los que las risas siempre estaban aseguradas: Santi y Abel. Aún recuerdo cuando Santi me dijo: "Tú tienes cara de buena gente y eres educado, eso se agradece. ¿Cómo te llamas?". No se volvió a olvidar de mi nombre. Parecerá una tontería, pero para mí fue un detallazo que siempre rememoraré con cariño. Eres un grande, tío, y espero que todo te vaya genial en la vida. Aparte de ellos, toda la gente del animalario también: Carlos, Diego, Víctor, Marta y, más recientemente, Rubén y Jessica. ¡Muchas gracias por todo vuestro apoyo y ayuda incondicional siempre, cracks! En especial a Víctor y Diego, que son los que más me han tenido que sufrir por allí arriba día sí y día también 😊

No podía pasar por esta etapa sin mencionar a aquellos con los que he compartido más momentos en la FJD aparte de mis compañeros de laboratorio. Empezamos con Claudia 3122. Siempre te recordaré así, ya lo sabes. Primero eras solo un nombre apuntado en el cuaderno de las PCRs, pero conforme empezamos a juntarnos más *in covid* te convertiste en una amiga. Ni que decir también de Nerea, la bondad en persona, amiga y confidente. De esas personas que quieres que sigan en tu vida para siempre. Espero contar contigo como Ted Mosby cuenta con sus amigos. Luis, desde aquel mensajito inocente en instagram para que te unieses a unas cañas, has sido un fijo en casi cualquier plan y ¡yo que me alegro por ello! Eres un tío genial, de fiesta o teniendo conversaciones profundas. Sergio, aparte de bueno y divertido, creo que con lo que me quedo de ti es la espontaneidad. Eres maravilloso. Jamás permitas que nadie te haga cambiar un mínimo ápice de tu personalidad, porque es genial. Sara Hemato, que además lo pongo así para que rabies un poquito. Contigo fue el encuentro más "yo" digamos. Siendo espontáneo, directo y majo, aunque todo el mundo dijese que pareció una caña. Desde entonces, casas rurales, cañas, alguna que otra conversacioncilla más profunda (profesional y personalmente),... Eres de esas personas que merece la pena mantener. Ari, eres la alegría, la sonrisa en cualquier momento. El día que te vea sin sonreír, de verdad que me preocuparé mucho, pero sobre todo mataré a quien te haya hecho estar triste. Siempre tendré en mente los saludos desde una punta a otra del pasillo. Cris, llegaste "tarde" y solo hemos podido compartir unos meses antes de que me fuera definitivamente de la FJD, pero has conseguido en muy poquito tiempo hacer con un huequito muy especial en mi corazón. Eres parte importante y fundamental también en todo lo que he podido conseguir este último año gracias, en parte, a esos ratitos en la sala de instrumentación tomándonos un café tranquilamente con charlas trascendentales sobre la vida y el trabajo. ¡Mucho ánimo con lo que queda, que eres una crack y vas a llegar lejos! Llegamos a uno de los más importantes: Lucas. Al principio eras un hito, una leyenda que creía que jamás iba a conocer, "Lucas el chileno". Luego, por azares del destino y de la mano del Doc Egido, pudiste volver y tuve la grandísima suerte de conocerte. Creo que no he conocido persona más tolerante y, sobre

AGRADECIMIENTOS

todo, inteligente como lo eres tú. Atesoro cada momento contigo, porque de verdad que convertirías todas las situaciones a tu alrededor en oro. Y no solo las situaciones, sino a las personas que las podíamos vivir contigo. Hago alusión aquí a una expresión que alguien, no recuerdo quién ahora mismo, utilizó para definirte: eres una persona pegamento. Es decir, unes a los demás a tu alrededor. Y créeme que esa una de las características más esenciales e importantes de una persona. Espero que todo te siga yendo genial en tu nueva etapa de vuelta en Chile, aunque estoy seguro de que sí, porque tienes todos los ingredientes necesarios para triunfar en la vida y comerte el mundo.

Desde aquí empiezo a hablar de tres de las personas más importantes en mi etapa en Madrid: la FJuanpaD. ¡Cuántas ampollas levantamos al principio! Y qué bien nos lo hemos pasado. Juanpa, el primer doctor de nosotros, tranquilo y callado, sí, pero cuánto has podido transmitirme en tan pocas palabras. Eres un hermano, y ya sea en Suecia, en Madrid o donde tú quieras y te apetezca estar, triunfarás. Emilio, siempre te lo he dicho y seguiré haciéndolo, una de las cabezas más brillantes que he conocido en mi vida, siendo que aún no has terminado de formarte, de crecer ni de aprender. Al igual que he dicho con Lucas, tú eres también de esas personas que tiene todo lo necesario para comerse el mundo. Llegarás a donde tú quieras llegar, tu único límite será ese que te impongas a ti mismo, aunque con la ambición que acostumbras a llevar y emanar, llegarás hasta el infinito. Espero poder acompañarte hasta allí, hermano. Ismael, el corazón de este grupo. Nuestra primera toma de contacto fue jugando al fútbol al hablar de que teníamos en común a Mart... No, espera, a Sand... No, ¿cómo era? ¡Ah, Sara! ¡Eso! Fuera de bromas, desde ese día, creo que no ha habido un recuerdo de mi etapa en Madrid en la que no estuvieras presente. Bien porque físicamente lo haya vivido contigo o porque fueses la primera persona a la que iba a contárselo o a pedirle consejo. Eres pura pasión, hermano, de esas personas que pelean por lo que quieren con constancia y perseverancia, pero además con un talento innato para la ciencia. Ni que hablar de la música y las turras, para eso también tienes talento... Gracias a ti, especialmente, por hacer de mi paso por la FJD, infinitamente especial. Vosotros tres habéis logrado que recuerde a Madrid como mi propia casa, mi propio hogar. No sé qué nos deparará el futuro ni dónde estaremos cada uno de nosotros de aquí en adelante, pero allá donde estéis, me tendréis siempre. Sois los mejores, tenedlo claro.

Una parte genial que me ha aportado la FJuanpaD, además de todo lo ya mencionado, ha sido la posibilidad de conocer gente maravillosa a través de vosotros, entre los que destacan muchísimo Óscar, Mario y Bea. Los momentos que he podido compartir con vosotros son más que inolvidables, pero lo más importante también son todos esos que quedan aún por vivir. ¡Nos esperan muchas vacaciones juntos! Óscar, en especial tú, estoy deseando volver a jugar al baloncesto contigo y poder demostrarte que el rey de "El reto" soy yo. ¡Ya verás! Eres un grande, *quillo*.

En última instancia, pero no menos importante, la gente que me ha acompañado estos últimos meses y que ha tenido que soportar como cada día cuando se acercaba el final me quejaba del "estrés" de tener que maquetar en Word. Ángel, eres un referente, que te quede claro, pienso aprender de ti todo lo que pueda y más. A todos los demás, Óscar, Lucía, Pilar, Isabel, Pilarín, Neli, Jose María y Estela, ¡gracias también a vosotros!

AGRADECIMIENTOS

Seguro que muchísima gente se me queda colgada en este apartado, espero no me lo tengáis en cuenta. Por suerte, he tenido siempre personas a mi alrededor que me han aportado muchísimo, pero me resulta imposible mencionarlos a todos. No obstante, aunque mi memoria es escasa, creedme, me acuerdo de todos y cada uno de vosotros y vosotras. Cada pequeño grano de arena ha sido fundamental en la construcción de la persona que soy y que hoy llega a un *checkpoint*. Todo esto ha sido gracias a vosotros. Hay una frase que me encanta de un filósofo llamado Boecio que dice así: *“Si quieres ser feliz, no bases tu felicidad en un principio tan frágil como es la suerte.”* Bien, pues creedme que todos sois un pilar todo lo opuesto a frágil, sois la base de una felicidad más que sólida. Acabar con un simple y sórdido **GRACIAS.**

Antonio Temu :3

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

| | |
|---|-------------|
| RESUMEN | XXI |
| ABSTRACT | XXV |
| LISTA DE ABREVIATURAS | XXIX |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.- LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR | 3 |
| 1.1.- Definición y prevalencia | 3 |
| 1.2.- Impacto socioeconómico de las enfermedades cardiovasculares | 4 |
| 2.- FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR: la hipertensión arterial | 6 |
| 2.1.- Sistema Renina - Angiotensina II - Aldosterona e hipertensión | 7 |
| 2.1.1.- Angiotensina II | 8 |
| 2.1.2.- Aldosterona | 10 |
| 2.2.- Tratamiento de la hipertensión | 11 |
| 2.2.1.- Antihipertensivos relacionados con la Ang II | 11 |
| 2.2.2.- Antihipertensivos relacionados con la aldosterona | 12 |
| 2.2.3.- Terapias antihipertensivas combinadas | 12 |
| 3.- ANEURISMAS AÓRTICOS | 13 |
| 3.1.- Definición, clasificación y prevalencia | 13 |
| 3.2.- Papel y regulación de la MEC en la homeostasis vascular y en la patología aneurismática | 16 |
| 3.3.- Factores de riesgo en el desarrollo de AA | 18 |
| 4.- FACTORES GENÉTICOS COMO ORIGEN DE LOS AA | 19 |
| 5.- FACTORES MOLECULARES EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL AA | 21 |
| 5.1.- El Factor de Crecimiento Transformante β | 21 |
| 5.2.- El factor 2 de la red de comunicación celular | 24 |
| OBJETIVOS | 29 |

| | |
|---|-----------|
| OBJETIVO GENERAL | 31 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 31 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| 1.- Diseño de los modelos experimentales | 35 |
| 1.1.- Deleción del gen <i>Ccn2</i> | 35 |
| 1.2.- Descripción de los distintos modelos experimentales | 36 |
| 1.2.1.- Modelo de infusión sistémica de Ang II | 36 |
| 1.2.2.- Modelo de infusión sistémica de CCN2(IV) recombinante humano y de Ang II | 37 |
| 1.2.3.- Modelo de infusión sistémica de Ang II y tratamiento con SP | 37 |
| 2.- Medidas de la presión arterial sistólica | 39 |
| 3.- Evaluación del tamaño y la estructura aórtica por IRM | 39 |
| 4.- Estudio del tamaño de la aorta por imagen adquirida mediante ultrasonidos | 40 |
| 5.- Preparación del tejido aórtico para los diferentes estudios posteriores | 41 |
| 6.- Estudios mecánicos de la aorta <i>ex vivo</i> | 41 |
| 7.- Ensayos de reactividad vascular de la aorta <i>ex vivo</i> | 41 |
| 8.- Estudios en CMLVs de ratón <i>in vitro</i> | 42 |
| 8.1.- Obtención y crecimiento de las CMLVs | 42 |
| 8.2.- Estudios de la migración celular <i>in vitro</i> | 43 |
| 8.3.- Estudios de cierre de herida <i>in vitro</i> | 43 |
| 8.4.- Estudios de estimulación con CCN2(IV) | 44 |
| 9.- Estudios de histología y estructura en secciones aórticas | 44 |
| 9.1.- Tinciones histoquímicas | 44 |
| 9.2.- Evaluación de la estructura aórtica por MET | 45 |
| 10.- Evaluación de los niveles y la actividad de diversas proteínas a nivel aórtico | 45 |
| 10.1.-Western blot | 45 |
| 10.2.- Zimografía | 46 |
| 10.3.- Zimografía <i>in situ</i> | 47 |
| 10.4.- Espectrometría de masas por MRM | 47 |

| | |
|---|------------|
| 11.- Evaluación de la expresión génica | 48 |
| 11.1.- ARNsec48 | |
| 11.2- Evaluación de la expresión génica por RT-qPCR | 49 |
| 12.- Análisis estadístico | 49 |
| RESULTADOS | 52 |
| OBJETIVO 1.- Evaluar la estructura y la función aórtica, así como diversos parámetros generales como supervivencia y presión arterial, en ratones deficientes en CCN2, tanto en condiciones fisiológicas como en un contexto de daño vascular inducido por la infusión sistémica de angiotensina II | 54 |
| OBJETIVO 2.- Determinar si la administración sistémica del CCN2(IV) recombinante modifica los efectos observados por la delección génica de CCN2 en el modelo de daño vascular | 67 |
| OBJETIVO 3.- Realizar una transcriptómica de las aortas del modelo experimental de daño vascular para analizar los potenciales mecanismos implicados en los efectos observados | 68 |
| OBJETIVO 4.- Estudiar si el bloqueo farmacológico de alguno de los potenciales mecanismos encontrados en el análisis transcriptómico presenta efectos beneficiosos en el modelo preclínico de daño vascular utilizado | 77 |
| OBJETIVO 5. Evaluar el efecto del tratamiento con CCN2(IV) recombinante en la activación y la expresión de los componentes de la vía de TGF- β en CMLVs de aorta de ratón <i>in vitro</i> | 79 |
| DISCUSIÓN | 82 |
| CONCLUSIONES | 96 |
| BIBLIOGRAFÍA | 100 |
| ANEXO | 134 |

RESUMEN

La prevalencia y la mortalidad de las enfermedades cardiovasculares (ECVs) han aumentado sustancialmente durante las últimas décadas. Un claro ejemplo de ello los aneurismas aórticos (AA), para los cuales no existen, actualmente, biomarcadores de fácil detección que permitan su diagnóstico precoz ni de dianas terapéuticas directas para su tratamiento. En este sentido, existen diversas alteraciones en genes esenciales para el mantenimiento funcional y estructural de los vasos sanguíneos descritas en patologías que cursan AA, como los síndromes de Marfan o Loeys-Dietz, que han cobrado una mayor importancia en los últimos años en el contexto aneurismático, siendo un claro ejemplo la vía molecular de TGF- β .

Considerando que CCN2 es uno de los genes más sobreexpresados por TGF- β y su aumento en diversas patologías cardiovasculares, la primera parte del objetivo principal de esta tesis doctoral se centró en investigar los efectos a nivel aórtico inducidos por la delección inducida de *Ccn2* en ratones en condiciones fisiológicas y en un contexto de daño vascular. Para ello, se utilizaron ratones CCN2^{flox/flox}ROSA26-ERT/Cre (CCN2-KO), a los que se implantó una minibomba de infusión sistémica con angiotensina II (Ang II) o suero salino durante 15 días. Así, se demostró que aquellos ratones CCN2-KO infundidos con Ang II presentaban una elevada tasa de mortalidad debida a un desarrollo temprano de AA y un elevado índice de rotura. Además, la ausencia de CCN2 generó la interrupción de las fibras de elastina en la pared aórtica, variaciones en la función vascular y un incremento de la actividad metaloproteinasas, viéndose exacerbado con la infusión de Ang II. Curiosamente, la aproximación experimental para mantener los niveles de CCN2 elevados en los ratones CCN2-KO mediante la infusión sistémica del fragmento C terminal de CCN2 (CCN2(IV)) recombinante no modificó el desarrollo de AA ni los ratios de mortalidad tras la infusión de Ang II. Posteriormente, se realizó una secuenciación masiva del ARN mensajero del tejido aórtico que reflejó la existencia de un patrón de expresión génica diferencial entre los ratones CCN2-KO y los ratones control. El subsecuente análisis ontológico de los resultados de la secuenciación masiva reflejó que la biosíntesis de aldosterona era uno de los procesos biológicos más enriquecidos, por lo que se realizó un nuevo modelo experimental en el que un grupo de ratones CCN2-KO fue tratado de manera preventiva con un bloqueante del receptor de mineralocorticoides, espironolactona. Los resultados obtenidos determinaron que el bloqueo de la vía de aldosterona inducía una bajada en el número de aneurismas aórticos generados en estos ratones, así como una reducción de la mortalidad asociada a ellos, debido, en parte, a la prevención del incremento de la actividad metaloproteinasas y a una mejora de la función vascular. La segunda parte del objetivo principal consistió en investigar el efecto de CCN2 en la regulación de los niveles de los receptores de TGF- β (TGF β R1 y TGF β R2) en una línea de células de músculo liso vascular de aorta de ratón. De esta manera, se observó que el tratamiento durante 48 horas con el fragmento CCN2(IV) aumentaba los niveles génicos y proteicos de TGF β R2, mientras que no generaba diferencias en los niveles de TGF β R1. Además, se comprobó que este incremento en los niveles de TGF β R2 estaba mediado directamente por la activación del receptor de EGF y de la ruta SMAD inducida directamente por CCN2 de manera independiente de TGF- β .

Los datos obtenidos en esta tesis demuestran, por tanto, el papel crítico que desempeña CCN2 en el mantenimiento de la homeostasis vascular, tanto funcional como estructural, y su papel directo en la activación de la ruta de TGF- β , lo cual supone un cambio en el paradigma de la función que ejerce CCN2 en las patologías vasculares.

ABSTRACT

ABSTRACT

The prevalence and mortality of cardiovascular diseases (CVDs) have increased substantially during the last decades. A clear example of this is aortic aneurysms (AA), for which there are currently no easily detected biomarkers that allow early diagnosis or direct therapeutic targets for treatment. In this sense, there are various alterations in essential genes for the functional and structural maintenance of blood vessels described in pathologies that cause AA, such as Marfan or Loeys-Dietz syndromes, which have become more important in recent years in the context of AA development, being a clear example TGF- β molecular pathway.

Considering that CCN2 is one of the most overexpressed genes after the activation of the TGF- β pathway, as well as the increased levels of CCN2 in various CVDs, the first part of the main objective of this doctoral thesis focused on researching the effects at the aortic cells induced by the induced deletion of *Ccn2* in mice under physiological and in vascular damage conditions. For this purpose, CCN2^{flox/flox}ROSA26-ERT/Cre (CCN2-KO) mice were used, as well as their respective controls, which were implanted a systemic infusion minipump filled with angiotensin II (Ang II) or saline for 15 days. The first results showed that CCN2-KO mice infused with Ang II had a high rate of mortality induced by early development of AA and a high rate of rupture. A more exhaustive analysis allowed us to discover that the absence of CCN2 generated the disruption of elastin fibers in the aortic wall, variations in vascular function, and an increase in metalloproteinase activity, which was exacerbated by Ang II infusion. Interestingly, the experimental approach to keep circulating CCN2 levels elevated in CCN2-KO mice by an approach using systemic infusion of the recombinant C-terminal fragment of CCN2 (CCN2(IV)) did not modify AA development or mortality rates after Ang II infusion. Afterwards, massive sequencing of the messenger RNA of the aortic tissue was performed, which revealed the existence of a differential gene expression pattern between CCN2-KO and Control mice. The subsequent ontological analysis of the massive sequencing results showed that aldosterone biosynthesis was one of the most enriched biological processes. Then, a new experimental model was carried out in which a group of CCN2-KO + Ang II mice was treated preventively with a mineralocorticoid receptor blocker, spironolactone. The results obtained determined that the blockade of the aldosterone pathway induced a decrease in the number of aortic aneurysms generated in these mice, as well as a reduction in mortality associated, due, in part, to the prevention of increased metalloproteinase activity and an improvement in vascular function. The second part of the main objective was to investigate the effect of CCN2 on the regulation of TGF- β receptor levels (TGF β R1 and TGF β R2) in a mouse aortic vascular smooth muscle cell line. In this way, it was observed that the treatment for 48 hours with CCN2(IV) increased the gene and protein levels of TGF β R2, while it did not generate differences in the levels of TGF β R1. In addition, it was found that this increase in TGF β R2 levels was directly mediated by the activation of the EGF receptor and the SMAD pathway directly induced by CCN2 independently of TGF- β .

The data obtained in this doctoral thesis demonstrate the critical role that CCN2 plays in the maintenance of vascular homeostasis, both functional and structural, and its direct role in the activation of the TGF- β pathway, which implies a change in the paradigm of the function that CCN2 exerts in vascular pathologies.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – aneurisma aórtico

AbA – Aorta abdominal

ACCORD – estudio clínico en inglés *Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*

Ach – Acetilcolina

ACTA – *Alpha* actina de músculo liso

ACTB – *Beta* actina

ADAMTS – Desintegrina, del inglés *A disintegrin-like and metalloprotease with thrombospondin*

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADNc – ADN copia

AMPc - Adenosín monofosfato cíclico

AMS – Aorta mesentérica superior

Ang – Angiotensina

ApoE – Apolipoproteína E

ARAI – Antagonistas del receptor de Ang II

ARN – Ácido ribonucleico

ARNm – ARN mensajero

AT1/2/4 – Receptor de Ang II 1, 2 o 4

BCA – Ácido binconínico

BMP – Proteínas morfogenéticas del hueso, del inglés *Bone Morphogenic Protein*

BSA – Albúmina sérica bovina, del inglés *Bovine Serum Albumin*

CC – Componentes celulares

CCN2(IV) – Fragmento C-terminal de CCN2

CMLV – Células de músculo liso vascular

COX – Ciclooxygenasa

CTGF/CCN2 – Factor de crecimiento de tejido conectivo/factor 2 de red de comunicación celular, del inglés *Connective tissue growth factor/Cellular communicating network factor 2*

DALY - Años de vida ajustados por discapacidad, del inglés *Disability Adjusted Life Years*

DMEN –del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

LISTA DE ABREVIATURAS

DTT – Ditioneitol

ECA – Enzima convertidora de Angiotensina

ECV – Enfermedad cardiovascular

EDS – Síndrome de Ehlers-Danlos, del inglés *Ehlers-Danlos Syndrome*

EDTA - ácido etilendiaminatetraacético

EGF – Factor de crecimiento epidérmico, del inglés *Epidermal Growth Factor*

EGFR – receptor del EGF

EP – Eplerenona

ET1 – Endotelina 1

FATZ – del inglés *Filamin-, α -actinin-, and telethonin-binding protein of the Z-disk*

FBN1 – Fibrilina

FM – Función molecular

FOV – Campo de visión, del inglés *Field Of View*

GAPDH - Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GBD - Estudio de la Carga mundial de una Enfermedad, del inglés *Global Burden of Disease*

GDF – Factor de crecimiento de diferenciación, del inglés *Growth differentiation factor*

GM-CSF - Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*

GO – Ontología genética, del inglés *Gen Ontology*

GTE_x – Proyecto *Genotype-Tissue Expression*

GTPasa - Guanosin trifosfatasa

HCTD – Enfermedades hereditarias derivadas de tejido conectivo, del inglés *Hereditary Connective Tissue Disorders*

ICAM-1 – Moléculas de adhesión intercelulares

IDR – Inhibidores directos de la renina

iECA – Inhibidor de ECA

IGF – Factor de crecimiento similar a insulina, del inglés *Insulin-Like Growth Factor*

IL – Interleuquina

LISTA DE ABREVIATURAS

IRM – Imagen por resonancia magnética

JAK - Quinasa Janus

KHS – Hidrosulfito de potasio

KO – *knockout*

LAP – péptido de Latencia

LDS – Síndrome de Loeyes-Dietz, del inglés *Loyes-Dietz Syndrome*

MAPK - Proteína quinasa activada por mitógenos

MCP-1 - Proteína quimiotáctica de monocitos-1

MEC – Matriz extracelular

MHY9 – Cadena pesada de miosina 9

MIP – proyección de máxima intensidad

MIP – Proyección de máxima intensidad, del inglés *Maximum Intensity Projection*

MMP – Metaloproteinasa de matriz

MR – Receptor de mineralocorticoides, del inglés *Mineralocorticoid Receptor*

MRM – Monitoreo de reacciones múltiples

MS – Síndrome de Marfan, del inglés *Marfan Syndrome*

MS-MRM - Espectrometría de masas por monitoreo de reacciones múltiples

NF- κ B - Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NICE – Instituto Nacional para la Excelencia en el Cuidado de la Salud, del inglés *National Institute for Health Care Excellence*

NOX – NAD(P)H oxidasa

OMS – Organización mundial de la salud (WHO en inglés, *World Health Organization*)

PAI-1 – inhibidor del activador de plasminógeno 1, del inglés *Plasminogen Activator Inhibitor 1*

PB – Pares de bases

PB – Procesos biológicos

PCR – Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *Polymerase Chain Reaction*

PDGF – Factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés *Platelet-Derived Growth Factor*

PFA – Paraformaldehído

LISTA DE ABREVIATURAS

Phe – Fenilefrina

PI3K – Fosfoinositol 3-quinasa

PKC – Proteína quinasa C

RANTES - Proteína expresada y secretada por células T normales reguladas tras la activación

ROS – Especies reactivas del oxígeno

RT-qPCR – PCR cuantitativa a tiempo real, del inglés *Real Time quantitative PCR*

SAA – Del inglés *Serum Amyloid A*

SDS - Dodecilsulfato sódico

SDS - Dodecilsulfato sódico

ARNsec – Secuenciación de ARN mensajero

SFB – Suero fetal bovino

SP – Espironolactona

Spp1 – Osteopontina

SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TAsA – Aorta torácica ascendente

TBS - Tris buffer salino

TDsA – Aorta torácica descendente

TE – Tiempo de eco

MET – Microscopía electrónica de transmisión

TGF- β – Factor de crecimiento transformante β , del inglés *Transforming Growth Factor beta*

TGF β R1/2 – Receptor de TGF- β tipo 1 y 2

TIMP – Inhibidores de tejido de metaloproteinasas, del inglés *Tissue Inhibitors of MMP*

TLR - Receptor tipo Toll

TNF- α – Factor de necrosis tumoral α , del inglés *Tumor Necrosis Factor α*

TR – Tiempo de repetición

TSP-1 – Trombospondina 1

VCAM-1 – Molécula de adhesión de células vasculares-1

LISTA DE ABREVIATURAS

VEGF – Factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*

VWC - Factor Von Willebrand tipo C

WT – Fenotipo salvaje, del inglés *Wild Type*

α -SMA - α -actina de músculo liso

INTRODUCCIÓN

1.- LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

1.1.- Definición y prevalencia

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) engloban todo el amplio abanico de desórdenes que están relacionados con el corazón y los vasos sanguíneos, entre los que se incluyen patologías tan importantes como la cardiopatía coronaria, las enfermedades cerebrovasculares, las arteriopatías, la cardiopatía reumática, las cardiopatías congénitas o las trombosis venosas, entre otras (1).

La prevalencia global de las ECVs se ha duplicado en las últimas décadas, ascendiendo de 271 millones en 1990 a 523 millones en 2019 (2). Actualmente, las muertes derivadas de ECVs presentan una distribución asimétrica a lo largo de todo el mundo (**Figura 1**), aunque continúan siendo la primera causa de muerte a nivel global, presentando también un crecimiento muy pronunciado durante los últimos años. De esta manera, el número de muertes derivadas de ECVs ha aumentado de 12,1 millones en 1990 hasta 18,6 millones en 2019 (3), lo que supone aproximadamente un 32% de todas las muertes del mundo. Más concretamente, en España, las ECVs representan la primera causa de muerte desde hace más de 30 años (**Figura 2**). Dentro de este elevado número de personas que sufrieron *exitus* por ECVs, un gran porcentaje puede agruparse en las dos ECVs con mayor prevalencia actualmente: el infarto agudo de miocardio y el ictus (2).

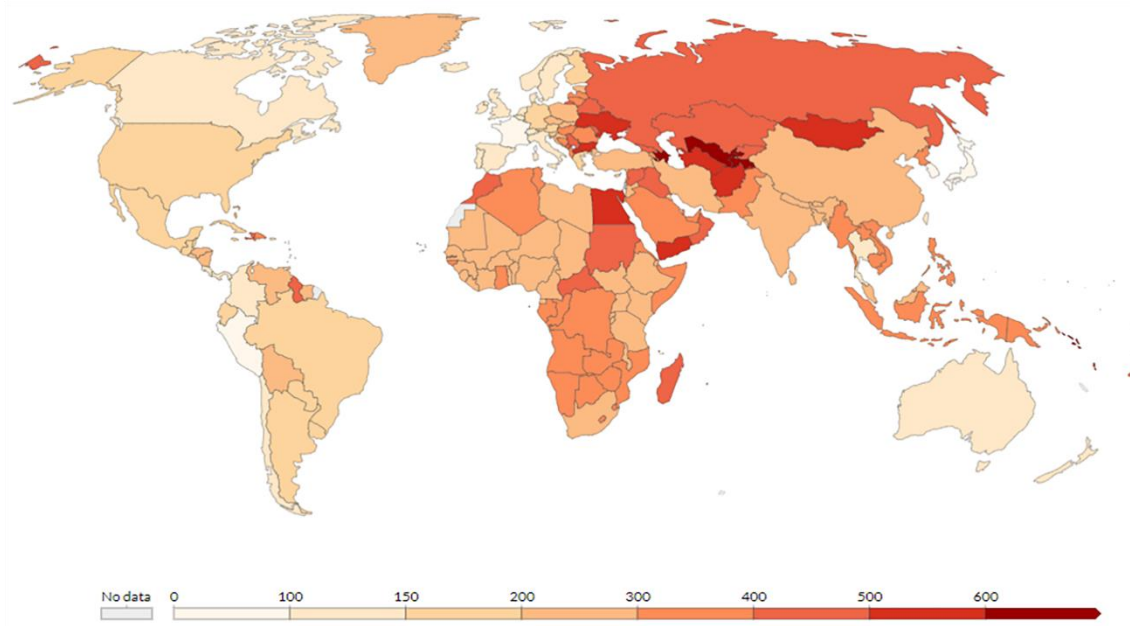


Figura 1.- Ratio de muertes derivadas de enfermedades cardiovasculares (ECVs) por países de todo el mundo en el año 2019. Fuente: IHME, Global Burden of Disease (GBD) (2).

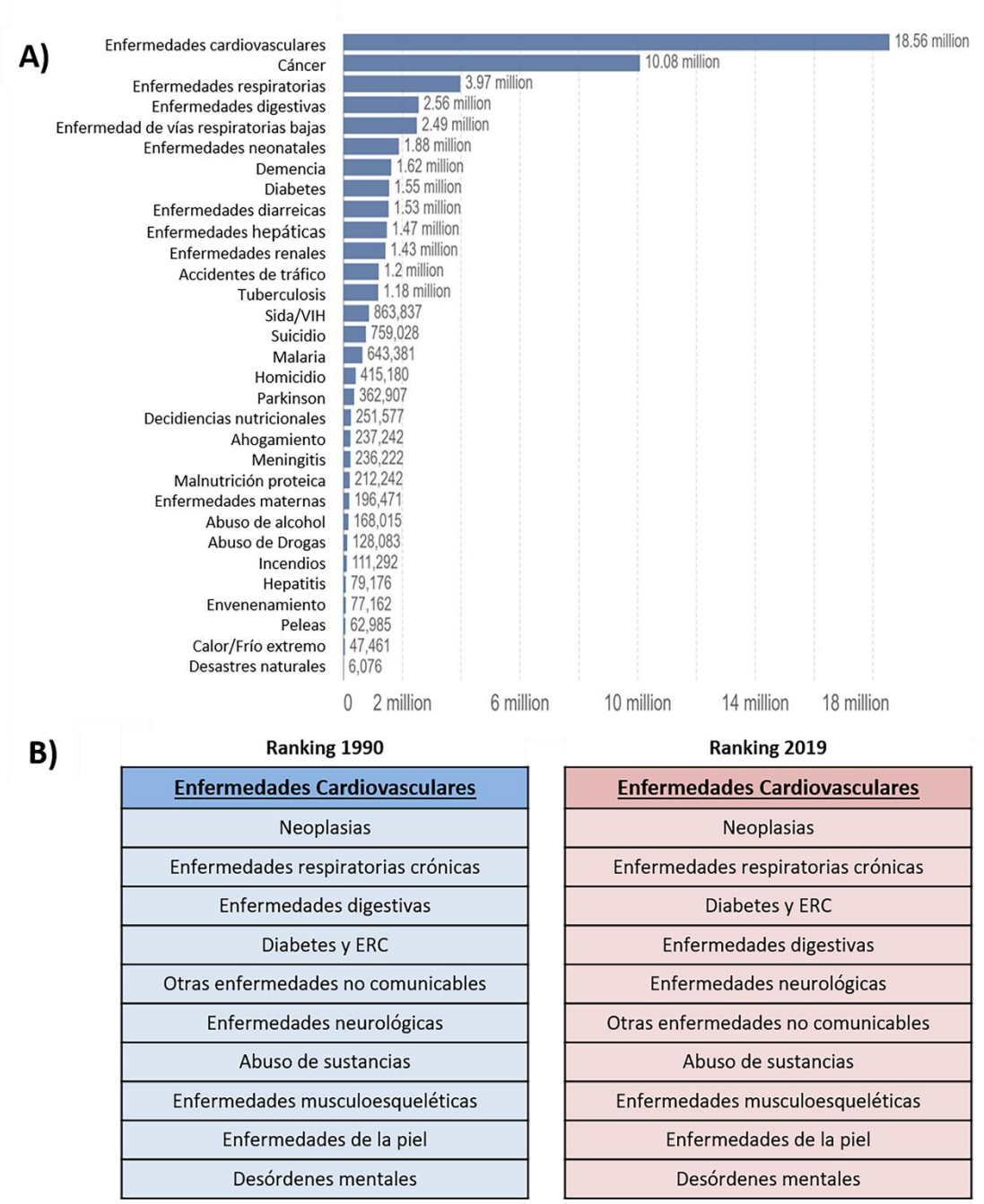


Figura 2.- A) Clasificación de enfermedades según el número de muertes en el año 2019. Fuente: (4). **B)** Clasificación durante las últimas tres décadas de las enfermedades con mayor cantidad de DALYs. Fuente IHME. VizHub - GBD Compare (5)

1.2.- Impacto socioeconómico de las enfermedades cardiovasculares

Una de las principales problemáticas a la que se enfrentan los profesionales sanitarios a la hora de afrontar una ECV radica en que, habitualmente, los pacientes no presentan síntomas aparentes de que exista una patología subyacente. Desafortunadamente, en la gran mayoría de las ocasiones, el primer síntoma se manifiesta directamente como un infarto o un ictus, lo cual supone que, en muchos casos, el paciente no sea consciente de que está

INTRODUCCIÓN

padeciendo una ECV hasta que ya es demasiado tarde (6). Este tipo de patologías es lo que se conoce como enfermedades silenciosas.

Dentro de los inconvenientes más importantes que pueden generarse a raíz de este tipo de patologías, se encuentra la pérdida de años con calidad de vida, definidos por el término “Años de vida ajustados por discapacidad” (DALYs, de sus siglas en inglés *Disability-adjusted life year*), el cual hace referencia a los años perdidos debido a una enfermedad, discapacidad o muerte prematura (7). En relación a este término, se ha estimado que, sólo en el año 2019, el número de muertes derivadas de ECVs correspondieron a 34,4 millones de DALYs perdidos (2).

Tal y como se puede apreciar en la **Figura 3**, la ECV que mayor peso tiene en el ámbito social es el infarto agudo de miocardio. En términos numéricos, esta patología implica 174 millones de DALYs, seguida del ictus con 116 millones, lo que se corresponde porcentualmente con un 49,2% y un 17,7% respectivamente. Aparte de estas patologías, existen también otras ECVs que suponen un gran número de DALYs, entre las que se encuentran la enfermedad cardíaca hipertensiva, las fibrilaciones auriculares, la endocarditis o los aneurismas aórticos (2).

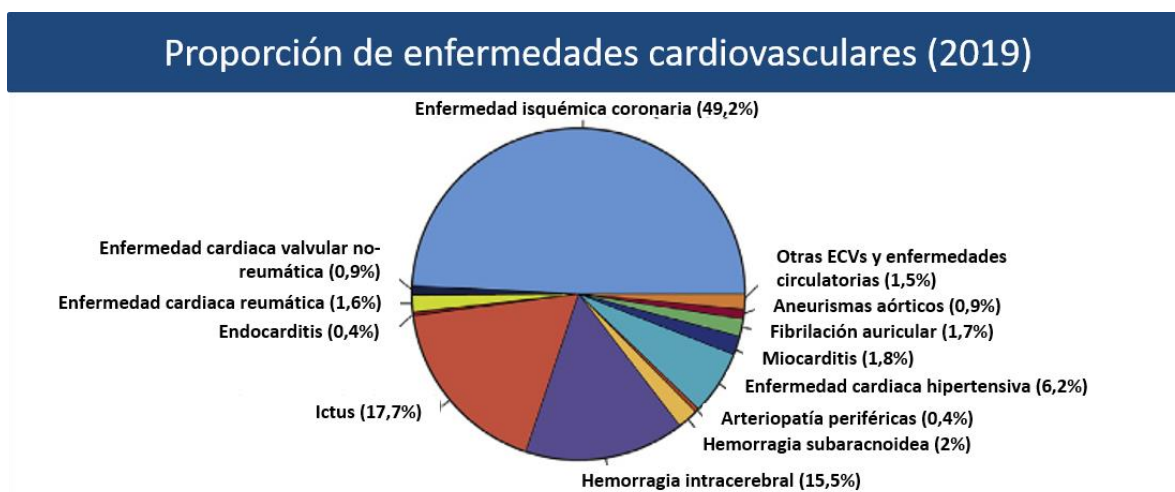


Figura 3.- Proporción de muertes derivadas de ECVs en 2019. Modificada de IHME, Global Burden of Disease (GBD) (2).

A nivel económico, las ECVs también suponen un grave problema para los sistemas sanitarios. Entre los diversos factores de riesgo que contribuyen al desarrollo y la progresión de las ECVs, los cuales se explican más detalladamente a continuación, la hipertensión arterial supuso, por sí sola, un gasto anual global de 370.000 millones de euros en la década de los 2000, lo que implicaba cerca del 10% del gasto mundial total en cuidados para la salud (8). Además, se estima que, en términos de gasto hospitalario, las personas hipertensas suponen un coste adicional de 131.000 millones de euros por año en comparación con las personas normotensas (9). Respecto al gasto farmacéutico de los pacientes con hipertensión, la inversión anual en medicamentos para tratar esta enfermedad asciende a 68.000 millones de euros (10). Por lo tanto, en base a estos datos, las ECVs constituyen una de las patologías que más gasto requiere actualmente, tanto en términos médicos como sociales (11).

2.- FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR: la hipertensión arterial

Existen múltiples factores que pueden contribuir al desarrollo de las ECVs y, aunque algunos de ellos no son modificables, como las alteraciones genéticas propias de cada individuo, muchos otros factores están asociados al estilo de vida de las personas, por lo que se puede inferir, en cierto modo, sobre ellos (12). Entre los más importantes se encuentran una dieta insalubre, un estilo de vida sedentario, el tabaquismo y el consumo de alcohol. Los efectos más claros de estos factores de riesgo se traducen en un incremento de la presión arterial, de los niveles de glucosa y lípidos en sangre, sobrepeso y obesidad. Estos factores pueden medirse en la práctica clínica habitual y ayudan a predecir si existe un incremento en el riesgo de padecer algún tipo de ECV. Dentro del amplio espectro enfermedades que conforman las ECVs, existe una distinción principal en función de si afecta a las arterias coronarias o no, diferenciando estrictamente entre ECVs coronarias, siendo aquellas que promueven un endurecimiento de las arterias que suministran sangre al músculo cardíaco, y no coronarias, donde se engloban aquellas que afectan al resto de vasos sanguíneos del organismo (13). Más específicamente, dentro de este último grupo, se encuentran una gran variedad de enfermedades muy heterogéneas (14) y con una elevada prevalencia y mortalidad en la población general, entre las que tiene una especial relevancia la hipertensión arterial ya que es una de las más comunes.

La tensión o presión arterial se define como la fuerza que ejerce la sangre circulante contra las paredes de los vasos sanguíneos y se expresa con dos valores: presión sistólica, correspondiente al valor de tensión arterial cuando el corazón se contrae, y presión diastólica, correspondiente al valor de tensión entre latidos (15). Según las guías europeas actuales establecidas por la Sociedad Europea de Cardiología, la Sociedad Europea de Hipertensión y las guías NICE (del inglés *National Institute for Health Care Excellence*), el punto de corte para diagnosticar una hipertensión arterial se fija en un valor superior a 140 mmHg de presión sistólica y/o 90 mmHg de presión diastólica obtenido en dos medidas de días diferentes, aunque en caso de padecer algún otro tipo de ECV, se recomienda que el valor no supere los 120 mmHg (16–19). Tal y como han establecido diversos estudios, tanto revisiones sistemáticas como estudios observacionales, la hipertensión es el factor de riesgo modificable más determinante para padecer ECVs (20–22), siendo suficiente su presencia para aumentar significativamente el riesgo de padecer un infarto de miocardio o un ictus, entre otros (21,23,24), incluso por delante del tabaco, de la dislipidemia y de la diabetes (22). En este sentido, un metaanálisis que incluyó 11 estudios de cohortes prospectivos demostró cómo las medidas de presión arterial pueden predecir la aparición de ECVs a largo plazo (25). En términos numéricos, en el año 2015, la cantidad de muertes totales asociadas con hipertensión sistólica supuso prácticamente el 20% de todas las muertes globales, independientemente de la patología cardiovascular asociada (26).

Desafortunadamente, la prevalencia de la hipertensión no ha parado de aumentar globalmente en las últimas décadas debido, principalmente, al incremento de la edad media poblacional y a un estilo de vida que incluye factores de riesgo como dietas insalubres y falta de actividad física (27). Por todo ello, y teniendo en cuenta la íntima relación existente entre la hipertensión y el desarrollo de otras ECVs, la mayoría de los tratamientos actuales para muchas de estas patologías se centran, fundamentalmente, en paliar la hipertensión o evitar la

subida de tensión arterial (28,29). En este sentido, existe cierto tipo de controversia debido a la existencia de algunos reportes que sugieren que el tratamiento con fármacos que disminuyen la hipertensión arterial no implican un descenso significativo en el riesgo de padecer ECVs, como se concluyó en el estudio ACCORD (de sus siglas en inglés *Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*) (30). Sin embargo, hay muchos ensayos clínicos que sí han demostrado la efectividad del tratamiento de la hipertensión para prevenir la aparición de ECVs (28,29,31,32). A pesar de esta disyuntiva, lo que sí es un hecho demostrado es que, independientemente de su efectividad, el control de la hipertensión se mantiene muy por debajo de los estándares esperados, como se mostró en el estudio de *Mills KT et al.* (27), en el cual se reflejó que solo el 13,8% de los pacientes estudiados alcanzaron un control de la tensión arterial, entendiéndose este término como el hecho de mantener una presión sistólica por debajo de 120 mmHg y una diastólica por debajo de 90 mmHg (27). Estos datos han sido corroborados en el último informe de 2021 de la OMS, en el que se incluye la guía farmacológica actualizada para el tratamiento de la hipertensión en adultos (19). Esta falta de control de la hipertensión puede tener un origen multifactorial, incluyendo desde características del propio paciente hasta particularidades propias de los sistemas de salud de cada región (33,34). Además, la hipertensión por sí misma, también está asociada a una serie de factores de riesgo como la edad avanzada, la obesidad, la dieta insalubre (principalmente una ingesta alta de sodio y baja de potasio), el consumo de alcohol y la baja actividad física (35–37), por lo que resulta complicado asociar la falta de control únicamente a los tratamientos usados.

2.1.- Sistema Renina - Angiotensina II - Aldosterona e hipertensión

El mantenimiento de los fluidos corporales resulta esencial para tener una correcta homeostasis en el organismo, desde el ámbito celular hasta la funcionalidad de los distintos sistemas, por lo que este dispone de múltiples mecanismos moleculares que participan en el mantenimiento de un equilibrio de estos fluidos, afectando inherentemente a la regulación de la presión arterial. Dentro de estos mecanismos, tienen una especial relevancia los que forman parte del conocido sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (**Figura 4**) (38,39), el cual ha jugado un papel fundamental en la regulación de la homeostasis durante la evolución humana (40).

A nivel molecular, el SRAA comienza con la síntesis de la renina, la cual es secretada por unas células especializadas del riñón llamadas células granulares, pertenecientes al aparato yuxtaglomerular. La renina es una enzima que degrada a su sustrato específico, el angiotensinógeno, una glucoproteína sintetizada en el hígado, para así producir el péptido conocido como angiotensina I (Ang I), el cual, a su vez, es sustrato de acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), para dar lugar, finalmente, a la angiotensina II (Ang II), considerada como el mayor efector del SRAA. La Ang II actúa a nivel celular mediante su unión a su principal receptor, el receptor de Ang II tipo 1 (AT1), desencadenando la mayor parte de las acciones conocidas de este péptido. La Ang II hace las veces de un potente vasoconstrictor, ya no solo por la acción directa que ejerce sobre los vasos sanguíneos, sino también porque contribuye a que los túbulos renales retengan agua y sodio. Además, a través de su unión al AT1, también induce la liberación de aldosterona, una hormona esteroidea que actúa a nivel de los túbulos distales y colectores de las nefronas provocando una retención sinérgica de

INTRODUCCIÓN

sodio y de agua, una secreción de potasio y, como consecuencia, un aumento de la tensión arterial. Sumado a ello, la Ang II ha demostrado tener también efectos proinflamatorios, profibróticos y proliferativos en diversos estudios en células en cultivo y en modelos preclínicos (41,42).

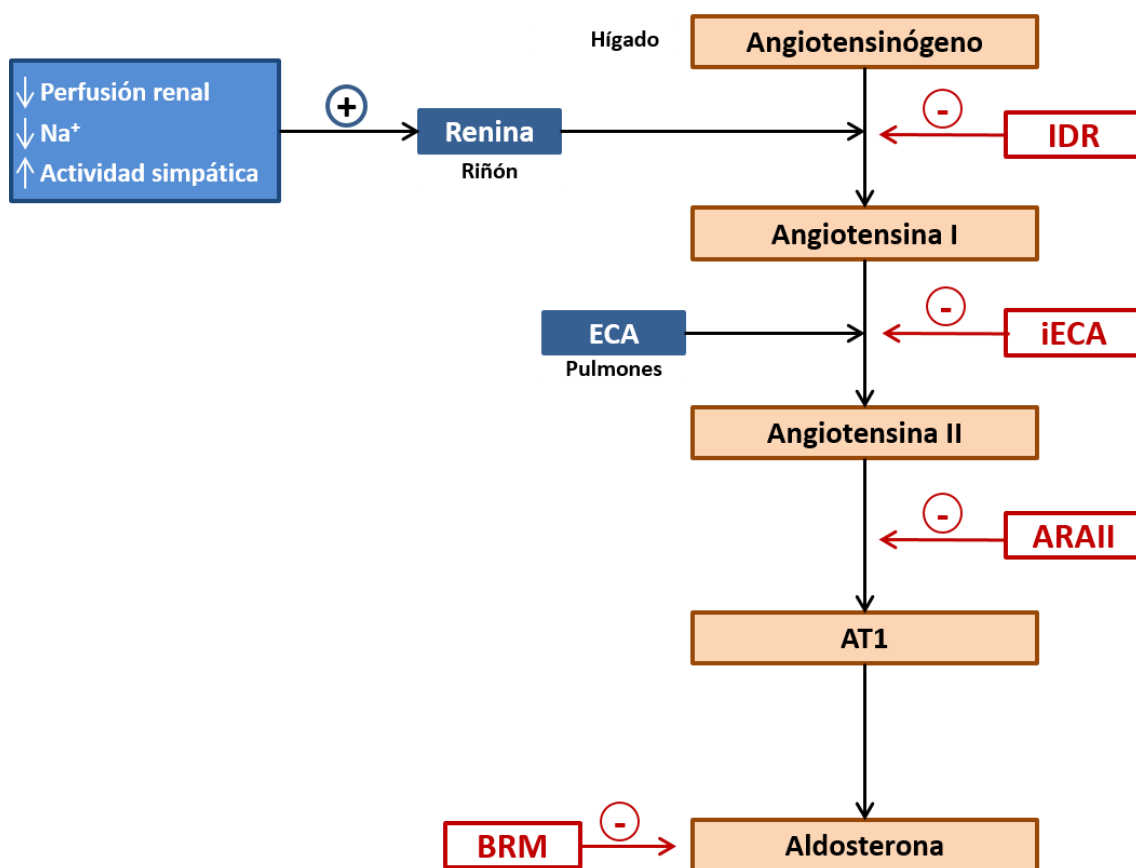


Figura 4.- Esquema del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), especificando puntos de inhibición y fármacos utilizados para ello. ECA – enzima convertidora de angiotensina; IDR – inhibidores directos de renina; iECA – inhibidores del enzima convertidora de angiotensina; ARAII – Antagonista del receptor de Ang II; AT1 – receptor tipo 1 de Ang II; BRM – bloqueantes del receptor de mineralocorticoides.

2.1.1.- Angiotensina II

Serendípicamente, en 1898, Robert Tigerstedt y su estudiante, Per Gunna Bergman, descubrieron la presencia de un compuesto vasopresor en el córtex renal al que denominaron renina (43). Aunque durante los años venideros no hubo mucho interés por este compuesto, la publicación realizada en 1934 por Harry Goldblatt en la que se mencionaba el aumento en la presión arterial debido a una isquemia renal, hizo crecer el interés por esta molécula. De este modo, en 1940, Irvine H. Page y Eduardo Braun-Menéndez demostraron que la renina no era la responsable del aumento en la presión arterial, si no que era una enzima cuyo rol era transformar su sustrato en un péptido vasoactivo que sí que podía aumentar la presión arterial, al cual denominaron Angiotensina (44). Ya en 1958, el Dr. Leonard T. Skeggs Jr. descubrió que este péptido se encontraba presente en la sangre en dos formas distintas, a las

INTRODUCCIÓN

que denominó Angiotensina I y Angiotensina II (45), siendo la Ang II producto de la acción de la ECA sobre la Angiotensina I (46).

Todo esto sentó las bases que dieron lugar a que actualmente se sepa que la Ang II es un octapéptido producido a raíz del sustrato angiotensinógeno mediante la actuación, primero de la renina, dando lugar a la Ang I, y posteriormente de la ECA, generando el compuesto final, Ang II. De manera adicional, la ECA presenta además una fracción circulante que también es capaz de degradar un sustrato vasodilatador fisiológico conocido como bradiquinina en fragmentos inactivos, reduciendo por tanto los efectos vasculares endógenos que promueven la vasodilatación (47). Opuestamente, existe otra enzima relacionada, denominada ECA2, que puede cortar la Ang II y generar un heptapéptido vasodilatador denominado Ang 1-7 (48,49). De esta manera, el balance entre la ECA y la ECA2 resulta crucial para el correcto funcionamiento y el mantenimiento de los niveles de Ang II (50).

A nivel funcional, la Ang II tiene dos receptores canónicos: el ya mencionado AT1 y el AT2. Alternando los efectos sobre uno y otro, este importante péptido hipertensivo contribuye activamente al incremento de la presión arterial, siendo este su principal efecto en el organismo, pero no el único, tal y como se especifica en la **Figura 5**. Los receptores AT1 y AT2 pertenecen a una familia de receptores con 7 dominios transmembrana que están acoplados a proteínas G. El receptor AT1 media muchas de las acciones más destacables e importantes de la Ang II a nivel cardiovascular, entre las que destacan la vasoconstricción, el remodelado cardíaco y la muerte o supervivencia celular (51,52). La regulación de estas acciones por los receptores AT1 se consigue mediante la activación de diferentes señales intracelulares, destacando la ruta de las proteínas Smad, la vía NF- κ B, la movilización de calcio o la activación de otras proteínas quinasas, como la proteína quinasa C (PKC) o las MAPK (51,53,54). La Ang II también induce una disfunción endotelial a través de la activación de COX-2, la cual, a su vez, está directamente relacionada con la secreción de prostaglandinas y especies reactivas de oxígeno (ROS, de sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*) en las distintas capas de la pared vascular (55,56). En este sentido, este aumento de ROS también se ha demostrado que es dependiente de la activación de la NAD(P)H oxidasa (51,57).

Adicionalmente, la activación de la ruta de NF- κ B por Ang II puede inducirse a través de ambos receptores AT1 y AT2 (58–62) y, dependiendo del tipo y del contexto celular, se genera la producción de diversas citoquinas como RANTES, IL-8, MCP-1 e IL-6, las cuales contribuyen a generar un fenotipo proinflamatorio (63–65). En este sentido, la activación de MCP-1 e IL-6 inducida por Ang II en las células de músculo liso vascular (CMLVs) también resulta dependiente de la activación de la NAD(P)H oxidasa (54). En las células vasculares, la Ang II es capaz de generar un fenotipo proinflamatorio, que se ve incrementado por una activación local del SRAA (66), lo que implica la síntesis local de Ang II en el vaso sanguíneo, promoviendo la extravasación de leucocitos y otras células del sistema inmune al interior de la pared vascular, como monocitos y macrófagos (67), debido a un incremento de la permeabilidad y de la expresión de moléculas de adhesión, como P- y E-Selectinas, VCAM-1 e ICAM-1 (62,68–71). Otra de las acciones locales más importantes mediadas por la Ang II consiste en el aumento de la producción de diferentes factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β , de sus siglas en inglés

INTRODUCCIÓN

Transforming Growth Factor β) o el factor 2 de la red de comunicación celular (CCN2), además de otras proteínas de la matriz extracelular (MEC), lo cual contribuye al desarrollo de un fenotipo profibrótico (54); (72); (73) ; (74); (75)).

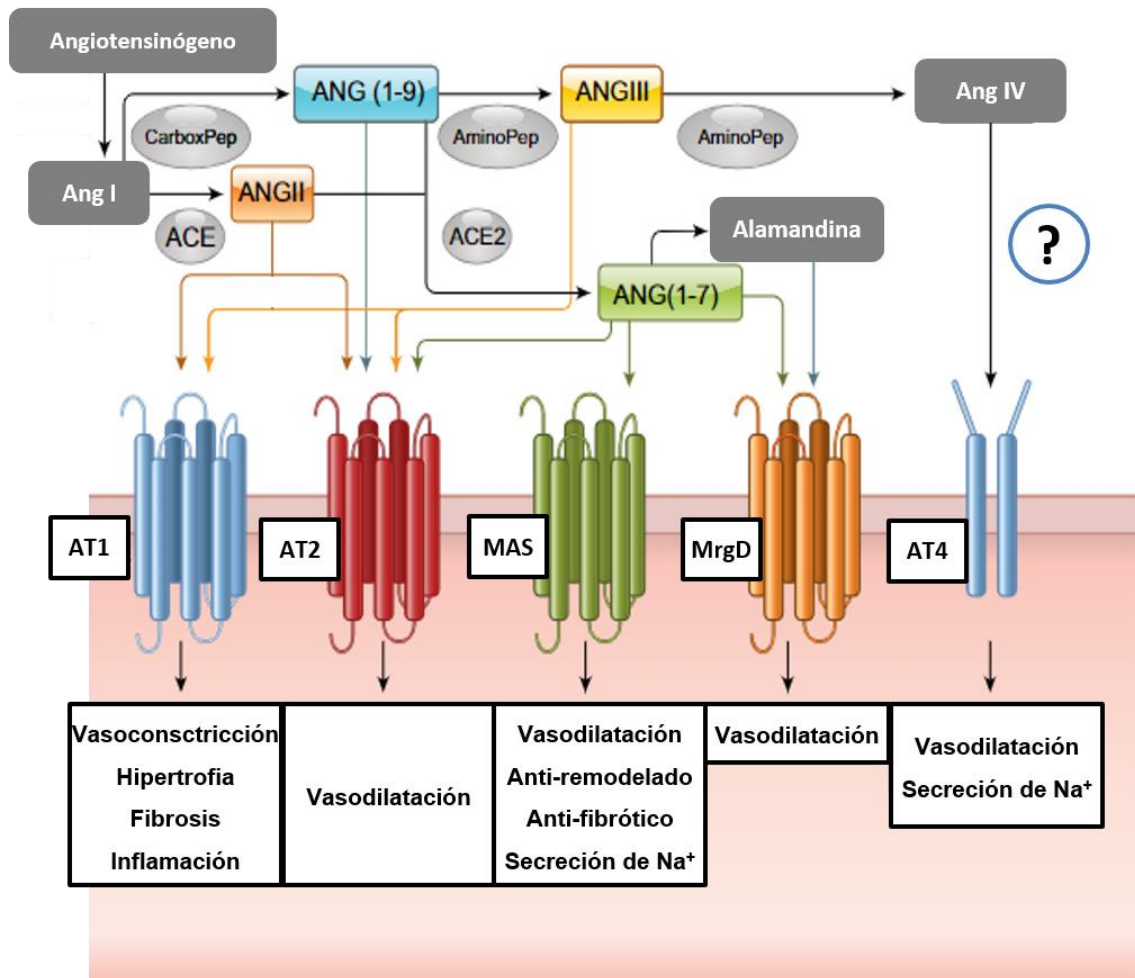


Figura 5.- Representación de los péptidos derivados del metabolismo Ang II y receptores hasta ahora descritos por los cuales ejerce sus funciones. Ang I se transforma a Ang II gracias a la acción de la ECA, la cual es capaz de estimular los receptores AT1 y AT2. La Ang II puede transformarse tanto en Ang (1-7) a través de la ACE2, como en Ang III a través de la aminopeptidasa. La Ang (1-7) puede unirse al receptor AT2, al receptor MAS y al receptor MrgD, pero además puede ser sustrato de la alamandina e interactuar específicamente con el receptor MrgD. La Ang III puede unirse tanto al receptor AT1, como al AT2, y además se puede transformar en Ang IV y unirse al receptor AT4. Modificada de *Forrester SJ et al.* (76).

2.1.2.- Aldosterona

En 1952, Grundy, Simpson y Tait descubrieron, por primera vez, la aldosterona, a la que bautizaron en primera instancia como “Electrocortina” (77). La aldosterona es una hormona esteroidea de la familia de los mineralocorticoides producida por las células de la

zona granulosa de la glándula adrenal en respuesta a Ang II y/o subidas de los niveles extracelulares de potasio (78). La principal acción de la aldosterona se realiza en el riñón, a nivel de los túbulos distales y colectores de las nefronas, actuando sobre los receptores de mineralocorticoides (MR, del inglés *Mineralocorticoid Receptor*). Los efectos de la aldosterona sobre este receptor resultan esenciales para un correcto funcionamiento y mantenimiento de la homeostasis de fluidos en el organismo, participando en la regulación de la osmolaridad renal al regular las concentraciones de sodio y potasio extra e intracelulares, lo cual implica también un control sobre el volumen plasmático y, por tanto, sobre la presión sanguínea (79).

Además de sus ampliamente conocidos efectos en el riñón, al igual que sucede con la Ang II, la aldosterona puede ejercer también efectos sistémicos y locales, ya que el MR también se expresa en multitud de células, como los cardiomiocitos, las células endoteliales y las CMLVs (80). Una desregulación de la activación del MR en estas células, ha sido relacionada con alteraciones cardiovasculares debido al consecuente aumento del estrés oxidativo, de la inflamación, de la fibrosis, a modificaciones en el control de la presión arterial y a una disfunción endotelial (81). Además, varios estudios han demostrado que la aldosterona, de nuevo de forma similar a la Ang II, además de participar en el metabolismo iónico y en el control de los fluidos corporales, también es capaz de inducir la expresión de citoquinas proinflamatorias que reclutan células del sistema inmune, así como de aumentar la producción del TGF- β y del inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1), siendo ambos factores importantes en el desarrollo y en la progresión de la fibrosis vascular y cardíaca (82–84).

2.2.- Tratamiento de la hipertensión

2.2.1.- Antihipertensivos relacionados con la Ang II

Debido a la importancia capital que tiene la Ang II en el control de la tensión arterial y teniendo en cuenta la elevada prevalencia de esta patología en la sociedad actual, muchos de los fármacos más ampliamente comercializados para su tratamiento tienen como diana farmacológica este péptido y la vía molecular principal en la que participa: el SRAA. De esta manera, existen dos grupos generalizados de fármacos enfocados a impedir la actividad de la Ang II: los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA) y los antagonistas de los receptores AT1 de angiotensina II (ARAI).

El principal efecto que inducen los iECAs es un descenso de la presión arterial, fundamentalmente relajando los vasos sanguíneos, tanto venas como arterias, sin aumentar la frecuencia cardíaca ni promover la natriuresis. Su acción se basa en inhibir la actividad de la ECA y, por tanto, de la síntesis de Ang II y de la degradación de bradiquinina, alterando el balance entre los efectos de este péptido hipertensivo y las acciones vasodilatadoras de las bradiquininas (85). Los cuadros clínicos en los que se utilizan este grupo de fármacos son hipertensión, insuficiencia cardíaca, diabetes, infartos o migrañas. Sin embargo, a pesar de sus efectos beneficiosos, los iECAs, como por ejemplo el captopril, el enalapril o el benazepril, también pueden generar algunos efectos secundarios que incluyen tos seca, hiperkalemia, fatiga, dolores de cabeza o mareos.

En el caso de los ARAII, su efecto primario consiste en bloquear los efectos de la Ang II sobre receptor AT1. Al igual que los iECAs, los ARAII ayudan a relajar el estado vasomotor de

las venas y arterias del organismo, haciendo más fácil al corazón el bombeo de sangre. Además del tratamiento de la hipertensión, los ARAll también se prescriben para tratar algunas enfermedades renales y la insuficiencia cardiaca (86,87). Del mismo modo que los iECAs, los pacientes tratados con ARAll, como el irbesartán, el losartán o el valsartán, también pueden presentar algunos efectos secundarios, como mareos, hiperkalemia y angioedemas (88).

2.2.2.- Antihipertensivos relacionados con la aldosterona

Los fármacos utilizados para bloquear la vía de la aldosterona se fundamentan en inhibir competitivamente su unión al MR. Los dos antagonistas del MR más ampliamente utilizados son la espironolactona (SP) y la eplerenona (EP), los cuales se diferencian en cuanto a su potencia y especificidad, de forma que mientras que la SP tiene un efecto más potente, la EP tiene mayor especificidad por el MR (89). El principal efecto ejercido por estos fármacos es la diuresis, lo cual, indirectamente, tiene efectos hipotensores. Por otro lado, más allá de este efecto, dos estudios recientes también han reportado otras funciones beneficiosas que pueden ejercer estos fármacos a nivel cardiovascular. De esta forma, el grupo de *Matsumoto et al.* (90) mostró que el tratamiento de pacientes en hemodiálisis con dosis diarias de 25 mg de SP reducía la muerte y la hospitalización derivadas de eventos cardiovasculares. De igual manera, *Lin et al.* (91) demostraron que el tratamiento de pacientes en diálisis, tanto hemodiálisis como diálisis peritoneal, con 25 mg de SP diaria daba lugar a una reducción de los eventos cardíacos, entre los que se incluía la muerte. Sin embargo, ninguno de los dos estudios estableció una vía de acción concreta a través de la cual la aldosterona era capaz de alcanzar estos efectos, por lo que, a día de hoy, sigue siendo una potencial y muy prometedora línea de estudio que precisa de más investigación que permita esclarecer todos los mecanismos que participan en las funciones cardioprotectoras de este tipo de fármacos.

2.2.3.- Terapias antihipertensivas combinadas

De manera general, existe un acuerdo global sobre qué fármacos antihipertensivos son más apropiados para tratar en primera instancia a la mayoría de los pacientes hipertensos (19), siendo las principales opciones tanto los fármacos descritos anteriormente frente a los componentes del SRAA, como otra serie de medicamentos diuréticos o bloqueantes de los canales de calcio (92). No obstante, aunque en términos de disminución de la presión arterial la efectividad de cada terapia es aproximadamente equivalente (93–95), sí que existe una gran variabilidad en la respuesta de los pacientes a los diferentes fármacos, lo que ha ocasionado que, en muchas ocasiones, la estrategia antihipertensiva consista en una combinación de diferentes tratamientos (92). De este modo, el procedimiento clínico para el manejo de la hipertensión se fundamenta, principalmente, en monitorear al paciente durante 4-6 semanas para evaluar la respuesta a un primer tratamiento único. En caso de no responder adecuadamente, se puede incrementar la dosis, evaluando los efectos de nuevo tras 4-6 semanas de tratamiento. Finalmente, si aun así no se consigue disminuir la presión hasta niveles adecuados, se evalúa el efecto del tratamiento con otro único fármaco, o bien con una combinación de varios de ellos (96).

Desafortunadamente, a pesar de todos los esfuerzos económicos y sociales que se han llevado a cabo, tanto para la prevención como para su tratamiento, la prevalencia de la hipertensión y la importancia clínica asociada a ella se estima que continúe aumentando

durante los próximos años (97), lo cual supondrá también un aumento en la prevalencia de las ECVs derivadas de ella. Apoyando esta idea se encuentran los datos recogidos entre los años 2000 y 2016, los cuales mostraron que las enfermedades coronarias derivadas de la hipertensión ascendieron de la cuarta a la tercera posición en cuanto a cantidad de DALYs, pasando de suponer el 4,3% a representar un 4,6% de los DALYs totales. Este hecho cobra aún más importancia en lo que respecta a las ECVs más estrechamente relacionadas con la hipertensión, como la aterosclerosis y los aneurismas, para las que se ha descrito un mayor riesgo de aparición en pacientes hipertensos (98,99).

3.- ANEURISMAS AÓRTICOS

3.1.- Definición, clasificación y prevalencia

Por definición, el término aneurisma describe una dilatación anormal de las paredes de una arteria o una vena, aunque a nivel clínico se considera que existe un aneurisma cuando el diámetro del vaso sanguíneo excede en un 50% su diámetro habitual. Los aneurismas pueden estar presentes en numerosas localizaciones del cuerpo, recibiendo comúnmente el nombre del lugar donde se presentan, como los aneurismas cerebrales, renales, hepáticos o aórticos.

Existen diversas clasificaciones para discernir el tipo de AA, siendo una de las más utilizadas la de Crawford/Safi (100), la cual engloba los aneurismas toracoabdominales en cinco tipos (I – V) (**Figura 6**) diferentes en función de la localización del AA:

- El aneurisma tipo I aparece por encima del espacio intercostal, cerca de la arteria subclavia izquierda, y se extiende incluyendo los orígenes del eje celíaco y las arterias mesentéricas superiores. Aunque las arterias renales también pueden verse afectadas, el aneurisma no se extiende al segmento aórtico infrarrenal.
- En el caso del tipo II, el aneurisma también surge por encima del sexto espacio intercostal y, aunque también puede incluir la aorta ascendente, se extiende distalmente hasta el segmento aórtico infrarrenal y llegando, a menudo, hasta el nivel de la bifurcación aórtica iliaca.
- El aneurisma tipo III surge en la mitad distal de la aorta torácica descendente, por debajo del sexto espacio intercostal, y se extiende hacia la aorta abdominal, pudiendo llegar hasta la bifurcación aórtica ilíaca.
- El aneurisma tipo IV generalmente involucra toda la aorta abdominal desde el nivel del diafragma hasta la bifurcación aórtica ilíaca.
- El aneurisma tipo V surge en la mitad distal de la aorta torácica descendente, por debajo del sexto espacio intercostal, y se extiende hacia la aorta abdominal, pero se limita al segmento visceral.

A nivel epidemiológico, los AAs supusieron más de 170.000 muertes anuales en el año 2019, lo cual supone un aumento de más del 82% respecto a los datos de 1990, año en el que las muertes ocasionadas por AAs se situaban en aproximadamente 95.000 al año (20,101,102). De igual manera, esta patología también ha sufrido un aumento del 67% en la cantidad de DALYs asociados durante ese mismo periodo de tiempo, pasando de aproximadamente 2 millones de DALYs en 1990 a más de 3,3 millones en 2019 (101). En

INTRODUCCIÓN

este sentido, un estudio predictivo de 2010 aseguró que, para ese momento, solo en Estados Unidos habría 1,1 millones de personas que padecían AAs (103,104), lo que suponía aproximadamente un 0,35% de la población. Hoy en día la prevalencia global de los AAs se sitúa aproximadamente entre un 1,6% y un 7,2% (105), correspondiéndose principalmente la mayoría de los casos con pacientes de sexo masculino (106). Además, este dato se correlaciona directamente con la edad, siendo mayor la prevalencia de AA en individuos de edad avanzada, siendo el punto de corte 60 años (105) o 65 años (103,107) dependiendo del autor. Este hecho, unido al aumento de la edad media de la población mundial (108), hace que la estimación de la prevalencia de AA sea de un aumento drástico para los próximos años (107).

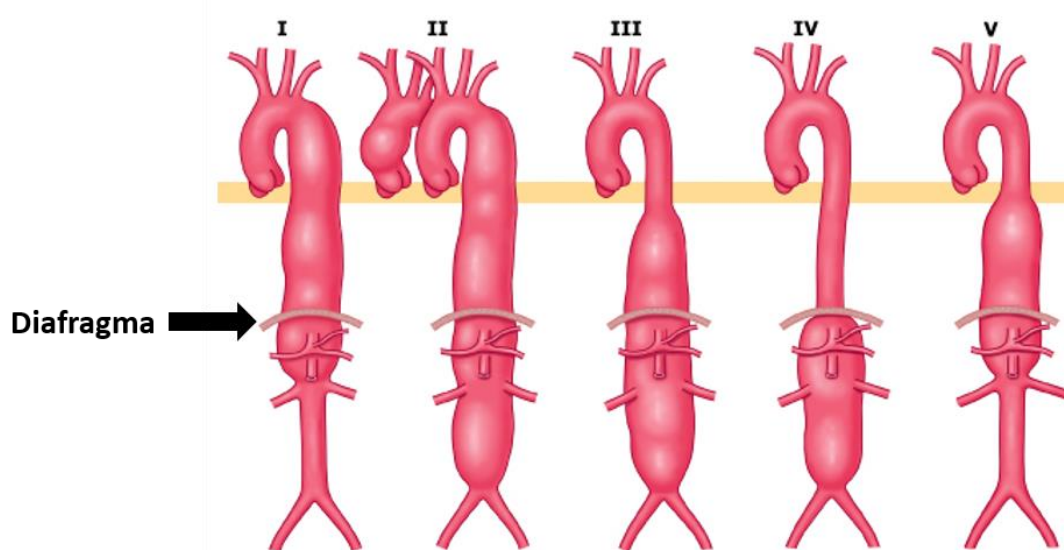


Figura 6.- Modificación de Safi a la clasificación de Crawford de los aneurismas aórticos toracoabdominales basado en la extensión de la afectación aórtica. Modificado de *UpToDate* (109).

Aparentemente, la incidencia de esta patología había disminuido, pasando del 5% en 1991 al 1,3% en 2015 (110), lo que parecían ser unos datos alentadores. Sin embargo, los datos más recientes disponibles en el GBD (Estudio de la Carga mundial de una Enfermedad, del inglés *Global Burden of Disease Study*) contrastan claramente con esta aparente reducción de la incidencia (102). En este último estudio, se reveló que la mortalidad relacionada con AAs ha aumentado significativamente durante los últimos años, tras haber estado disminuyendo durante las últimas dos décadas. En esta misma línea, utilizando un modelo predictivo, se ha estimado que entre 2020 y 2030 el número de muertes relacionadas con AAs continuará aumentando hasta situarse, aproximadamente, en un 42% más que a día de hoy (102). El principal motivo de esta elevada tasa de muerte relacionada con la presencia de AAs se debe a su condición de enfermedad silenciosa. Este hecho dificulta severamente su diagnóstico temprano, suponiendo, por tanto, un serio problema para los sistemas de salud mundiales. Dentro de las complicaciones que los AAs pueden generar, se encuentran la disección aórtica, la compresión o erosión en estructuras adyacentes, la fuga o rotura y el tromboembolismo, siendo todos ellos clínicamente muy graves. Por todo ello, resulta crucial profundizar en los

INTRODUCCIÓN

mecanismos subyacentes que participan en el desarrollo y la progresión de esta patología con el fin de diseñar nuevas técnicas de diagnóstico que permitan una detección precoz de los AAs, así como una evaluación adecuada de su evolución una vez diagnosticadas, en pro de disminuir la elevada tasa de mortalidad asociada (111,112).

En este sentido, el gran impedimento que existe hoy en día en cuanto al manejo de los AAs se fundamenta en la falta de un tratamiento efectivo y eficaz para permita detener su progresión o reducir su tamaño. Habitualmente, el tratamiento base se fundamenta en paliar los factores de riesgo relacionados con el desarrollo y la progresión de los AAs, entre los que se encuentra, fundamentalmente, la hipertensión previamente descrita. Además, una vez que un AA alcanza un tamaño considerado de alto riesgo, el cual está definido actualmente en los 5 cm (113), el único abordaje útil y efectivo consiste en un proceso quirúrgico invasivo. Aunque existen diversas aproximaciones en relación a la reparación quirúrgica de los AAs, el más recomendado a día de hoy según las guías clínicas para el diagnóstico y el manejo de las enfermedades aórticas es la cirugía de reparación endovascular (114). En ella, se realiza una incisión en el abdomen del paciente y se implanta un *stent* unido a un injerto artificial con el que se reemplaza el tejido dañado y/o diseccionado (**Figura 7**) (105,115,116).

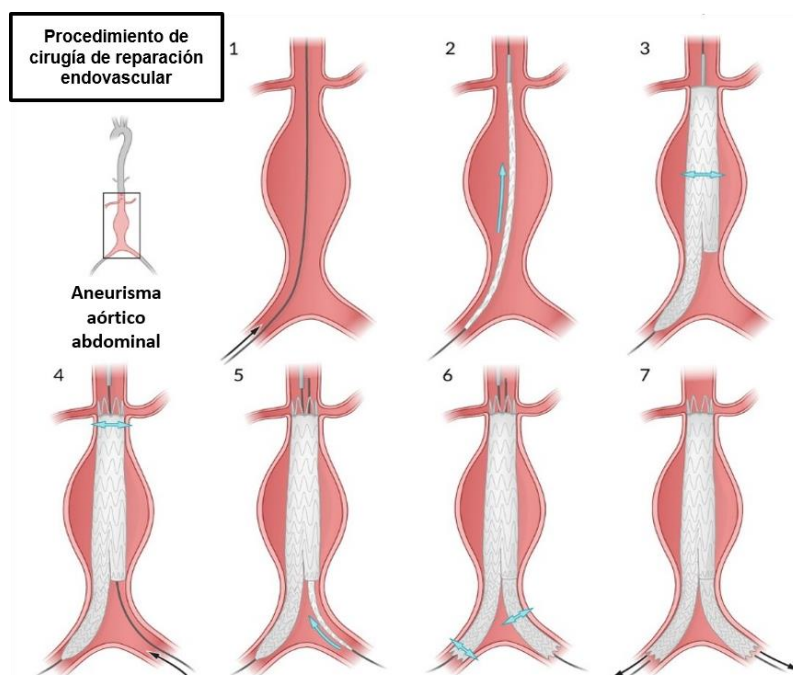


Figura 7.- Procedimiento de cirugía de reparación endovascular. Se realizará una incisión quirúrgica pequeña cerca de la ingle para encontrar la arteria femoral y se hará pasar un tubo delgado y flexible (catéter). Se colocará un *stent* y un injerto artificial junto al catéter, que posteriormente se abrirá y se fijará a las paredes de la aorta. Se retirará el catéter y se cerrará la incisión quirúrgica. Modificada de *Amboss Medical Knowledge* (117).

A nivel molecular, los principales mecanismos que participan en el desarrollo, la expansión y la rotura de los AAs han sido propuestos en diversos modelos animales y, posteriormente, validados en estudios con pacientes, aunque la contribución real de cada uno de ellos en el desarrollo de los AAs en humanos permanece sin clarificar a día de hoy (103,118,119). En este sentido, resultaría esencial poder definir con mayor claridad los mecanismos y factores implicados en la fisiopatología de los AAs para poder desarrollar dianas terapéuticas que ayuden a disminuir los ratios de mortalidad en estos pacientes, lo cual supone un importante reto a resolver en investigaciones venideras.

3.2.- Papel y regulación de la MEC en la homeostasis vascular y en la patología aneurismática

Junto con la mencionada búsqueda de dianas terapéuticas, otro de los principales retos a día de hoy en el campo de la investigación en relación a los AAs se basa en la búsqueda de biomarcadores que permitan una detección temprana. Por ello, a pesar de los numerosos estudios realizados hasta la fecha, siguen siendo necesarias nuevas aproximaciones experimentales y clínicas que permitan profundizar en los mecanismos moleculares que participan en el desarrollo de AAs. Como concepto general, uno de los motivos por el que el sistema vascular se mantiene en un estado de homeostasis se debe al correcto mantenimiento de la estructura de la pared de los vasos sanguíneos. Para ello, los vasos sanguíneos cuentan con diversos mecanismos que controlan el ensamblaje y comunicación entre los distintos tipos celulares que componen las capas vasculares. Uno de los principales componentes de estas capas es la matriz extracelular (MEC), cuya desregulación también ejerce un papel principal en el desarrollo de multitud de diferentes patologías vasculares además de los propios AAs, como la aterosclerosis o la estenosis vascular (120).

En lo que respecta a la estructura aórtica, esta se basa fundamentalmente en la presencia de tres capas o tunicas concéntricas: la íntima, la media y la adventicia (**Figura 8**). La túnica íntima es la que se encuentra en la cara más interna de la aorta en estrecho contacto con la sangre y está compuesta por las células endoteliales y una red de MEC particular formada por laminina, colágeno tipo IV, fibronectina y proteoglicanos (121). La capa media es mucho más gruesa y está formada por capas concéntricas de láminas de elastina, entre las que se intercalan CMLVs que generan una acción conjunta para mantener las capacidades elásticas de la aorta, y un alto contenido de proteínas de MEC (122). Finalmente, la adventicia es la capa más externa de la aorta y se caracteriza por ser relativamente fina, estar compuesta fundamentalmente por fibroblastos y colágenos dispuestos longitudinalmente, y por entremezclarse con el tejido conjuntivo que rodea los vasos (123). Sin embargo, existen situaciones en las que la estructura de la pared de la aorta se ve comprometida, pudiendo dar lugar a una compresión del lumen, como ocurre en patologías que implican un remodelado de la MEC, o a una dilatación del diámetro del vaso, como sucede en los aneurismas (**Figura 8**). Respecto a esta última patología, el análisis de los procesos asociados con el desarrollo y la expansión de los AAs ha demostrado la participación de células pertenecientes a todas las capas de la pared aórtica (124). El hecho de que la MEC sea uno de los componentes mayoritarios de la estructura aórtica hace que su homeostasis desempeñe un papel crucial, tanto en el mantenimiento de las funciones fisiológicas, como en el desarrollo de patologías aórticas. Molecularmente, la MEC es una estructura organizada formada por cientos de elementos, entre los que se incluyen proteoglicanos, glucosaminoglicanos, lamininas, fibronectina, proteínas de adhesión, proteínas estructurales, tales como elastina y distintos tipos de colágeno, y metaloproteinasas (MMPs) (125). Tradicionalmente, la MEC se ha descrito como un soporte estructural para las células circundantes que está involucrada en la diferenciación, adhesión y comunicación celular (126,127). Entre los numerosos factores que componen la MEC, es importante destacar la gran relevancia que tienen las MMPs, las cuales pertenecen a una familia de endopeptidasas formada por 23 miembros que se encargan de degradar y/o remodelar proteínas de la MEC (128,129).

INTRODUCCIÓN

Dependiendo de su especificidad, las MMPs se dividen en diferentes subtipos, siendo la MMP-2 y la MMP-9 unas de las que más se han asociado con el desarrollo de los AAs. Ambas MMPs presentan una actividad gelatinasa y están directamente relacionadas con los procesos de angiogénesis y neurogénesis, así como con la activación de mecanismos de muerte celular debido a su capacidad de romper moléculas presentes en las láminas basales celulares (125). En lo que respecta al desarrollo de AAs, además de estas dos MMPs, también se ha descrito la relevancia que tienen otras MMPs, como la MMP-8, la cual presenta actividad colagenasa y es específica de neutrófilos (130). En la pared vascular, las MMPs participan en el proceso natural de remodelado vascular mediante la degradación de elastina y fibras de colágeno (128), aunque en situaciones patológicas, como los AAs o la aterosclerosis, la desregulación de la actividad de estas proteínas es una de las principales razones del desarrollo y la progresión de la enfermedad (131).

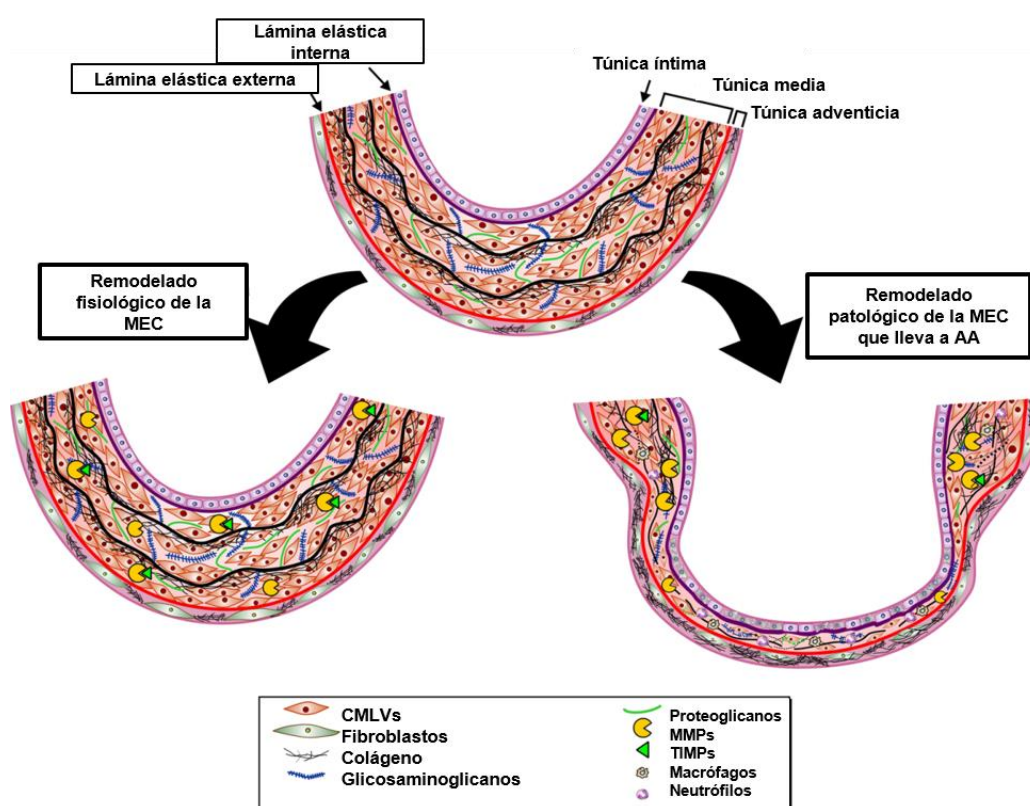


Figura 8.- Sección transversal de la pared aórtica y su remodelación fisiológica vs patológica. La lámina elástica interna separa la túnica media de la túnica íntima. La túnica media está formada por capas intermitentes de fibras elásticas y CMLVs, siendo una región rica en proteoglicanos y glicoproteínas. Durante la remodelación fisiológica, la degradación de las proteínas de la MEC por las MMP (y otras proteasas) se equilibra con las proteínas de la MEC recién sintetizadas, mientras que los inhibidores tisulares de las proteasas (TIMP) controlan la actividad proteolítica de las MMP. El exceso de degradación de la MEC o la alteración de la síntesis de renovación de la MEC, junto con la muerte de las CMLVs, conducen a una remodelación adversa de la MEC, dando lugar a patologías vasculares como los AAs. Modificado de *Jana S et al.* (132).

Entre los diversos procesos que conducen a un desequilibrio en el proceso de síntesis y degradación de la MEC, destacan un incremento en la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés *Reactive Oxygen Species*), mecanismo conocido como estrés oxidativo, y la activación de una respuesta inflamatoria que conduce a la infiltración dentro de la pared

vascular de células del sistema inmune, como neutrófilos y macrófagos (133–135), los cuales son, a su vez, una importante fuente de producción de MMPs (134,136). Por todo ello, uno de los principales objetivos actuales para la búsqueda de biomarcadores y/o dianas terapéuticas frente a los AAs es el estudio de la relación de todos estos mecanismos y factores que participan en este desequilibrio de la MEC con el desarrollo y progresión de la patología.

3.3.- Factores de riesgo en el desarrollo de AA

Como ya se ha mencionado con anterioridad, uno de los principales factores relacionados con la aparición de aneurismas es la edad, ya que se ha descrito que la incidencia y prevalencia de padecer aneurismas, sin mediar otros factores de riesgo, no resulta excesivamente significativa hasta que se alcanza una edad avanzada (103,105,107). Además de la edad, se ha descrito un dimorfismo sexual en el desarrollo de AAs, de tal forma que el sexo masculino es también un factor de riesgo importante. De este modo, con una combinación entre edad y sexo, se estima que, en hombres con una edad comprendida entre 65 y 80 años, la prevalencia de AAs es de aproximadamente el 8%, siendo esta significativamente mayor que el 1,3% observado en mujeres con una edad similar (137). Sin embargo, algunos autores han sugerido que, a día de hoy, existe un sesgo en esta comparativa, el cual se basa en las diferencias en el tamaño corporal, ya que se establece como AA el mismo tamaño para ambos sexos, aun existiendo desviaciones en la comparativa entre ellos. Por ello, sugieren que la prevalencia de AAs en mujeres podría estar infraestimada (138).

Además de los factores mencionados, existen también una serie de factores de riesgo modificables estrechamente relacionados con el desarrollo de AAs, entre los que destacan el consumo de alcohol, de estimulantes y, sobre todo, el tabaco. De este modo, algunos autores han destacado que aproximadamente el 90% de los pacientes con AA estudiados eran fumadores (139). En este sentido, el tabaco no solo está relacionado con desarrollar más aneurismas, sino también con que estos sean de mayor tamaño y más susceptibles a la rotura (104,140,141), de tal forma que las personas fumadoras pueden llegar a tener hasta 5 veces más riesgo de padecer esta patología que las personas no fumadoras (142). La combinación de este factor con otros factores de riesgo modificables ha demostrado ser aún más perjudicial, por lo que aquellos individuos masculinos que son fumadores tienen un riesgo 15 veces mayor de padecer AA que aquellos que no fuman (143). Curiosamente, en caso de cese en el hábito tabáquico, el riesgo de desarrollar AAs disminuye significativamente, pero éste no llega a ser tan bajo como en aquellos individuos que nunca han fumado (142). Otra serie de factores de riesgo nada desdeñables son los relacionados con las condiciones médicas de los pacientes, ya que la presencia de otras patologías como la aterosclerosis (143–147), la obesidad, el daño renal y, como se ha mencionado con anterioridad, la hipertensión arterial, también se correlacionan positivamente con el desarrollo de AAs. Precisamente, la asociación entre la hipertensión arterial y la aparición y rotura de los AAs (148), ha dado lugar a que se estime que pueda convertirse en el principal factor de riesgo relacionado con esta patología vascular durante los próximos años, superando incluso al tabaco (102). Apoyando esta idea, un metaanálisis realizado en 2019 demostró que la comorbilidad de la hipertensión con un AA aumenta 1,66 veces el riesgo de desarrollo de AAs (98).

Finalmente, la genética es también un importante factor de riesgo que, aunque no represente un elevado porcentaje de incidencia, sí que implica un importante gasto socioeconómico debido a la morbilidad asociada, aunque este apartado se desarrollará en profundidad más adelante.

4.- FACTORES GENÉTICOS COMO ORIGEN DE LOS AA

Desde finales de los años 70, tras la publicación de un estudio en el que tres hermanos tuvieron que ser sometidos a una cirugía para corregir la rotura de AAs abdominales asintomáticos, surgió la teoría de la existencia de una correlación entre la genética y el desarrollo de AAs (149). Tras este reporte, se fueron identificando otros grupos familiares de características similares (150–152), reforzando la teoría de una predisposición genética subyacente a la hora de padecer AAs. De esta manera, se estableció que la historia familiar constituye también un factor de riesgo importante en la fisiopatología de los AAs. Dentro del conjunto de aneurismas que pueden tener un origen genético, se ha identificado un grupo sobre el que recae una mayor y especial atención: los aneurismas ocasionados a raíz de enfermedades hereditarias derivadas de desórdenes del tejido conectivo (HCTD, del inglés *Hereditary Connective Tissue Disorders*).

Hasta la fecha, se han descrito más de 200 HCTD diferentes, afectando al tejido conectivo de diferentes órganos del cuerpo, como son el corazón, los vasos sanguíneos, los huesos, los ojos, la piel, las articulaciones y los pulmones (153). Gracias a los nuevos avances tecnológicos, durante las últimas décadas se han identificado muchos de los genes relacionados con esta clase de desórdenes, entre los que se incluyen aquellos que codifican para proteínas estructurales (*FBN1*, *COL1A1*, *COL3A1*, *COL5A1*), enzimas (*ADAMTS2*, *PLOD1*) o componentes de la vía de señalización del TGF- β (*SMAD2/3*, *TGF β R1*, *TGF β R2*, *TGF β R3*) (154), estando muchas de estas proteínas íntimamente relacionadas con la MEC. Sin embargo, las modificaciones genéticas y las consecuentes alteraciones proteicas generadas, no son capaces de explicar todas las alteraciones descritas en pacientes con HCTD, por lo que se postula que existen más genes aún por describir relacionados con esta clase de desórdenes genéticos. Las tres HCTD asociadas con el desarrollo de AAs más características son el síndrome de Marfan (MS, del inglés *Marfan Syndrome*), el síndrome de Loews-Dietz (LDS, del inglés *Loews-Dietz Syndrome*) y el síndrome de Ehlers-Danlos (EDS, del inglés *Ehlers-Danlos Syndrome*). Además de compartir ciertas características fenotípicas, los pacientes que presentan estos síndromes tienen también unos ratios mucho más elevados de expansión aórtica y generación de aneurismas, siendo, por tanto, más susceptibles de requerir una intervención quirúrgica.

El MS está asociado con mutaciones en el gen *FBN1* (155), el cual codifica para la proteína fibrilina-1, una macromolécula estructural que se transporta a la MEC y polimeriza para formar microfibrillas y proporcionar una estabilidad mecánica y una elasticidad adecuada a los tejidos. La *FBN1* es, además, indispensable para incorporar elastina a las fibras elásticas (156), así como fundamental en la regulación de factores de crecimiento y en el desarrollo y la homeostasis celular (157,158). Se han identificado más de 1000 mutaciones genéticas en *FBN1* que dan lugar al MS, muchas de ellas alterando un solo aminoácido en el producto proteico final, pero dando lugar a una menor disponibilidad en la cantidad proteica, a una alteración en su estructura y función, o a una disfunción en su transporte al exterior de la célula. Un aspecto

INTRODUCCIÓN

importante es que las microfibrillas formadas por la FBN1 se unen al TGF- β en estado latente, formando el preproTGF- β , por lo que, sin las microfibrillas suficientes, las acciones de TGF- β se desregulan dando lugar a alteraciones en la homeostasis de la pared aórtica (159). Los aneurismas que presentan los pacientes con MS se encuentran habitualmente localizados en el arco aórtico, pero puede extenderse también a la aorta ascendente y tienen la particularidad de, además de ensancharse muy rápido, estar asociados a una edad mucho más temprana que los aneurismas degenerativos habituales (160–162).

El LDS está causado por una mutación en heterocigosis con pérdida de sentido en cualquiera de los dos receptores clásicos de TGF- β : TGF β R1 y TGF β R2 (163). Este síndrome presenta una condición autosómica dominante que puede asemejarse en términos fenotípicos al MS y que, además, se caracteriza por un riesgo elevado de formación de aneurismas, tanto aórticos como en otras partes del organismo, con una elevada tasa de rotura. Al igual que ocurre en el MS, estos aneurismas aparecen a una edad mucho más temprana de la habitual (160,163,164). En el caso del gen *TGF β R1*, el cual codifica para el receptor tipo 1 del TGF- β , se han localizado 5 mutaciones diferentes asociadas al LDS y que implican una disminución en los niveles de dicho receptor, dando lugar a una desregulación de la vía de TGF- β . Sin embargo, a pesar de esta reducción en los niveles de su receptor tipo I, se ha visto que existe un aumento en las vías de señalización de TGF- β , el cual está relacionado con una disrupción en el desarrollo de tejido conectivo. Como posible explicación a este fenómeno, se ha sugerido la existencia de otros mecanismos compensatorios relacionados con la propia vía de TGF- β que suplan la falta de actividad de este receptor (163). En el caso del gen *TGF β R2*, que codifica para el receptor tipo 2 de TGF- β , las más de 70 mutaciones descritas hasta el momento conllevan una patogénesis y paradoja similar a la descrita para *TGF β R1*, y, curiosamente, se han observado tanto en MS como en LDS.

El EDS, por su parte, es una condición sindrómica que afecta a la síntesis del procolágeno tipo III, generando una hiperelasticidad y fragilidad en la piel, así como una hipermobilidad en las articulaciones. Existen diversos tipos, pero el único que tiene afección vascular es el EDS tipo IV, el cual compromete la integridad vascular y del tejido conectivo generando AAs de tamaño medio que pueden romperse fácilmente a edades tempranas (165).

Por otro lado, además de estos síndromes, también existen otra serie de desórdenes genéticos relacionados con el desarrollo de AAs, como el síndrome de Turner, en el cual existe una ausencia o una formación incompleta del cromosoma X que genera una disgenesia gonadal y que se ha relacionado con alteraciones cardiovasculares congénitas entre las que se encuentran las formación de AAs (166), o mutaciones genéticas que inducen alteraciones en la morfología de la válvula aórtica, dando lugar a una a la formación de una válvula aórtica bicúspide en lugar de tricúspide, lo cual está también estrechamente relacionado con la formación de AAs torácicos con una gran facilidad para sufrir una disección y/o rotura (167,168).

5.- FACTORES MOLECULARES EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL AA

La investigación en relación a esclarecer la fisiopatología aneurismática se ha convertido en uno de los campos con especial relevancia en el ámbito de las ECVs a lo largo de

los últimos años. Sin embargo, la amplia gama de factores moleculares relacionados con el desarrollo, la progresión y la rotura de los AAs, supone un gran escollo para poder llevar a cabo estos estudios. De entre todos estos factores, en este apartado se profundizará sobre uno de los más importantes en la fisiopatología de los AAs, como es el TGF- β , y sobre otro factor cuya expresión está activada tanto por el propio TGF- β como por Ang II, y para el cual existe controversia en cuanto a su función a nivel vascular, el CCN2.

5.1.- El Factor de Crecimiento Transformante β

TGF- β forma parte de una superfamilia de factores de crecimiento que incluye proteínas morfogénicas del hueso (BMPs, del inglés *Bone Morphogenic Proteins*), factores de crecimiento y diferenciación (GDFs, del inglés *Growth Differentiation Factors*), activinas, inhibinas y las tres isoformas del TGF- β (1, 2 y 3) (169). Esta superfamilia está involucrada en multitud de funciones celulares, tales como división, diferenciación, migración, adhesión, organización y muerte celular (170–172). En lo que respecta a TGF- β , se ha descrito que juega un papel esencial en la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo embrionario, la reparación tisular y la respuesta inmune (173,174), siendo tan amplia la diversidad de funciones en las que participa, que la desregulación de alguna de sus rutas relacionadas se ha descrito en patologías de muy diversa naturaleza (175,176). En este sentido, se ha determinado que la desregulación de TGF- β está muy correlacionada con la homeostasis celular y, por tanto, con el desarrollo de determinadas enfermedades como cáncer, enfermedades fibróticas, enfermedades autoinmunes y patologías cardiovasculares (**Figura 9**) (177–179), teniendo la isoforma TGF- β 1 mayor relevancia en el desarrollo de estas últimas (180).

TGF- β se sintetiza como una proteína inactiva unida a un péptido de latencia (LAP) que es capaz de interactuar con diversas proteínas de unión, lo que hace que TGF- β permanezca anclado de forma latente a la MEC (preproTGF- β). Sin embargo, bajo determinadas circunstancias y/o necesidades celulares, se produce un corte proteolítico regulado por diferentes factores como la trombospondina 1 (TSP-1), la plasmina, microambientes ácidos, las MMPs o la integrina- β 6, que separa el péptido latente de TGF- β y permite que este factor quede libre y activado (180–183). Una vez activo, TGF- β se une a sus receptores treonina-serina quinasa, TGF β R2 y TGF β R1, en la membrana celular, desencadenando la activación de diversas respuestas intracelulares. Concretamente, la activación de la ruta comienza con la unión de TGF- β a TGF β R2, lo que da lugar a la formación de un heterocomplejo TGF β R2/TGF β R1, donde TGF β R2 transfosforila y activa TGF β R1, el cual posee un dominio intracelular rico en glicinas y serinas que fosforila a su vez a otros transductores citoplasmáticos que actúan como mensajeros secundarios, transmitiendo y amplificando la señal de TGF- β . A través de la denominada vía canónica, el TGF β R1 activado recluta y fosforila proteínas de la familia de las SMAD mediadas por receptor (rSMAD), SMAD2 y/o SMAD3, las cuales forman un complejo con una SMAD común (Co-SMAD), la SMAD 4, dando lugar a un complejo rSMAD/CoSMAD que se transloca al núcleo para actuar como un regulador transcripcional de sus genes diana (184).

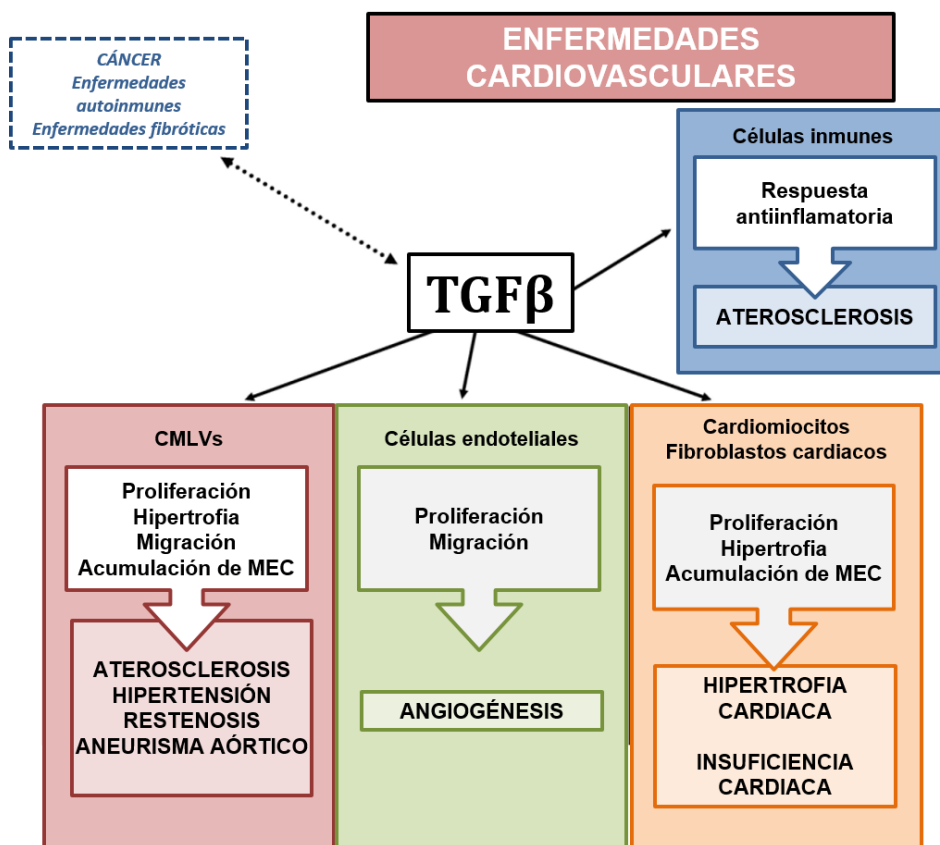


Figura 9.- Enfermedades humanas en las que participa TGF- β , incluyendo cáncer, enfermedades autoinmunes y fibróticas, desglosando las patologías cardiovasculares en las que está involucrado. Modificado de Ruiz-Ortega M et al. (185).

Sin embargo, además de esta vía clásica de actuación, TGF- β también puede desencadenar otras vías de señalización independientes de la ruta de las SMAD, activando moléculas como las GTPasas Rho, MAPK (ERK, p38 y Jnk), Ikk y la PI3K (186,187). Curiosamente, se ha postulado que estas rutas no canónicas de TGF- β pueden no ser dependientes de la actividad quinasa del TGF β R1 (188). Aunque en condiciones fisiológicas TGF- β tiene una función esencial en el mantenimiento de la homeostasis celular, existen numerosas enfermedades cardiovasculares en las que se ha observado una activación exacerbada de su ruta, tales como la hipertensión, la restenosis, la aterosclerosis, la hipertrofia cardiaca, la insuficiencia cardiaca o los AAs (**Figura 10**). Sin embargo, el papel exacto que ejerce la activación de la ruta de TGF- β continúa siendo motivo de controversia debido al amplio espectro de acciones que éste puede regular, tanto positiva como negativamente, como son la proliferación, la diferenciación, la migración o la muerte celular (185). A nivel vascular, se ha descrito que TGF- β ejerce un papel crucial en el fenómeno de rediferenciación celular de las CMLVs (189,190). Este proceso de rediferenciación, conocido como cambio de fenotipo, consiste en modificaciones de las CMLVs que hacen que las células pasen de tener un fenotipo contráctil, comúnmente presente en condiciones fisiológicas, a presentar un fenotipo celular más proliferativo, el cual está relacionado con el desarrollo de patologías como la restenosis y la aterosclerosis (191). Más específicamente, el papel de TGF- β en esta última enfermedad ha supuesto uno de los pilares de la mencionada controversia en relación a la función de este factor a nivel vascular. Durante el proceso aterosclerótico, se ha demostrado que, gracias a su

INTRODUCCIÓN

actividad antiinflamatoria mediada principalmente por sus acciones sobre los macrófagos y otras células inmunes, así como a la función profibrótica que ejerce sobre las CMLVs y a su contribución en el aumento de la síntesis de colágeno en la MEC, TGF- β es capaz de aumentar la estabilidad de la placa de ateroma y, por tanto, de ejercer un papel protector (192). Por el contrario, a pesar de este papel protector en la aterosclerosis, los efectos profibróticos inducidos por TGF- β desempeñan también un papel crucial en el desarrollo de la fibrosis cardíaca y vascular mediante el aumento en la expresión de moléculas relacionadas con la deposición de MEC (colágenos, fibronectina y PAI-1) en las CMLVs, las células endoteliales y los fibroblastos de los vasos sanguíneos (193,194). Asimismo, la activación de TGF- β también reduce los efectos antifibróticos generados por las células vasculares, puesto que disminuye la producción de colagenasas y estimula la producción de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs, de sus siglas en inglés, *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*), lo cual se traduce en un aumento de la actividad de las MMPs (193,194). A pesar de los numerosos estudios que se han llevado a cabo durante las últimas décadas, los mecanismos involucrados en la respuesta fibrótica mediada por TGF- β siguen presentando bastante complejidad debido a que involucran tanto la activación de la vía canónica como de la vía no canónica. Además, este también actúa como un mediador de la fibrosis vascular inducida por otros factores, tales como la Ang II, el estrés mecánico o elevados niveles de glucosa (195–197), lo cual complica aún más el estudio de este factor.

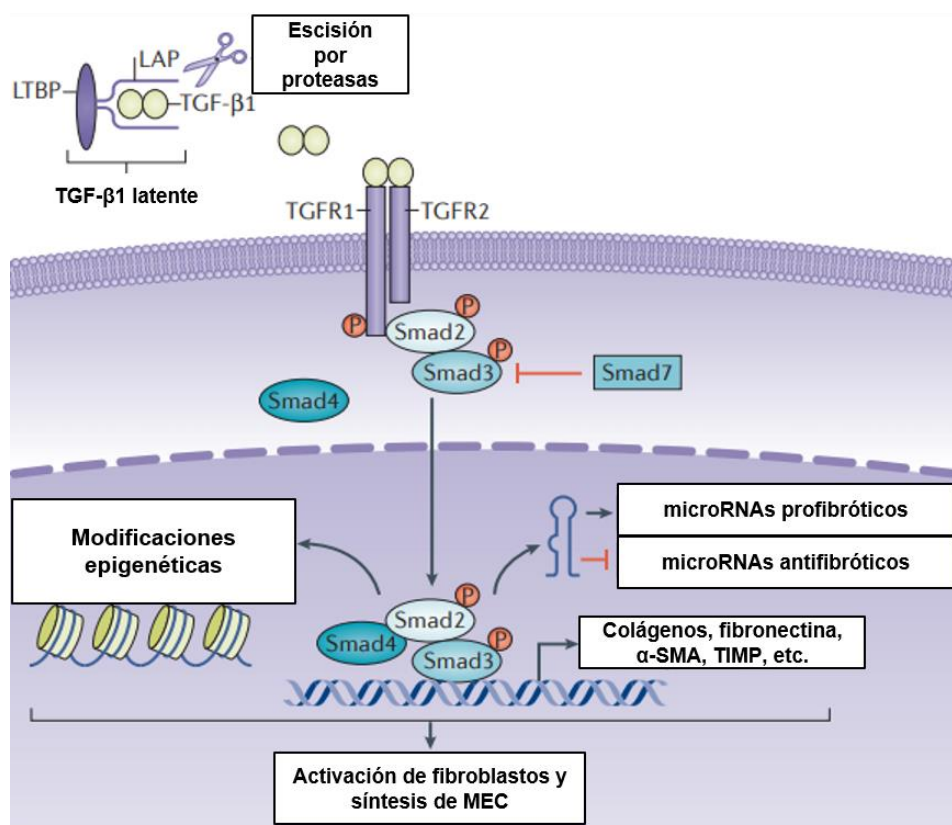


Figura 10.- Vía de señalización canónica de TGF- β en fibrosis tisular. Modificado de *Meng XM et al.* (198).

El papel que juega TGF- β en la fisiopatología de los AAs también ha despertado especial interés durante las últimas décadas, aunque, del mismo modo que sucede con la aterosclerosis, los resultados que se han obtenido al respecto han sido, cuando menos, controvertidos. En primera instancia, debido a que los pacientes con MS presentaban niveles circulantes aumentados de TGF- β 1 y a que, tradicionalmente, este factor estaba considerado principalmente como deletéreo en las patologías cardiovasculares, se estableció que TGF- β podría ser una potencial diana terapéutica, postulando que su bloqueo podría prevenir o detener el desarrollo de AAs (199). Apoyando esta hipótesis, existen varios estudios donde también se describía un incremento de TGF- β 1 en el tejido aórtico aneurismático, así como un aumento en su señalización, evidenciado por una activación de la vía SMAD, lo cual sugería también que el bloqueo de TGF- β 1 tendría efectos beneficiosos en esta patología (200). Sin embargo, contrariamente a lo esperado, los estudios realizados en ratones basados en la inhibición de la ruta de TGF- β mediante el uso de anticuerpos neutralizantes resultaron en una aceleración en la formación y progresión de los AAs (201). Del mismo modo, otros estudios establecieron que la delección de TGF β R1 también promueve la formación rápida y agresiva de AAs, mientras que la delección de TGF β R2 produce aneurismas de tamaño medio y con una menor incidencia (202). Estos estudios, por tanto, sirvieron para concluir que, aunque la participación de la ruta de TGF- β juega un papel importante en el desarrollo de los AAs, actualmente las estrategias dirigidas al bloqueo directo de la ruta de TGF- β no pueden ser una opción terapéutica, haciendo necesario un mayor estudio del papel de esta molécula y de sus factores relacionados en la formación de AAs.

5.2.- El factor 2 de la red de comunicación celular

Uno de los principales factores inducidos tras la activación de la ruta de TGF- β es el CCN2, previamente conocido como CTGF (del inglés *Connective Tissue Growth Factor*), y descrito por primera vez en 1991 en el medio condicionado de células endoteliales de vena de cordón umbilical (203). CCN2 es una proteína matricelular perteneciente a la familia de proteínas CCN, compuesta por otros 5 miembros: CCN1/Cyr61, CCN3/Nov y 3 proteínas matricelulares más (CCN4-6). Todos ellos comparten una estructura tetramodular conservada (181,204,205) y tienen funciones importantes tanto en la estructura y funcionalidad de la MEC como en la regulación de diferentes funciones celulares. En concreto, CCN2 ejerce diversas funciones dependiendo del contexto celular en el que esté involucrado, incluyendo la regulación del crecimiento, la diferenciación y la adhesión celular, del desarrollo embrionario, del remodelado de la MEC y de las respuestas inflamatorias y fibróticas (181,206,207).

Estructuralmente, CCN2 es una proteína monomérica de 34-36 kDa constituida por 349 aminoácidos y que se sintetiza como una preproteína en un estado de autoinhibición, por lo que requiere de un proceso proteolítico y de una homodimerización posterior para ser biológicamente activa (208). Aunque no se conoce con exactitud la conformación tridimensional de CCN2, su estructura comprende cuatro módulos con múltiples sitios de unión para una gran cantidad de ligandos (**Figura 11**), entre los que se incluyen factores de crecimiento, integrinas, receptores y otros componentes de la MEC (209). En este sentido, diferentes estudios de afinidad han servido para determinar la función de los distintos módulos. Así, el módulo I se puede unir directamente al factor de crecimiento similar a insulina (IGF, del inglés *Insulin-Like Growth Factor*) (210) y el módulo II, también conocido como

INTRODUCCIÓN

dominio del factor Von Willebrand tipo C, puede unirse a TGF- β y BMP4 (211), conformando ambos módulos el extremo N-terminal de CCN2. Por otro lado, el extremo C-terminal está formado por el módulo III y el módulo IV. El módulo III es el dominio de unión a trombospondina-1 (TSP1) y está involucrado en la unión de macromoléculas solubles y de matriz (212). En el caso del módulo IV, este recibe el nombre de módulo o fragmento C-terminal (CCN2(IV)) y está implicado en la unión de CCN2 a la superficie celular, poseyendo actividad mitogénica para fibroblastos y siendo el responsable de la interacción de CCN2 con fibronectina (181,205,211,213–215). Uniendo los extremos N- y C-terminal de esta proteína, entre los módulos II y III, se encuentra una región bisagra, la cual es susceptible de ser degradada por proteasas, entre las que se incluyen las MMP-1, -2, -3, -7, -9 y -13, la elastasa y la plasmina, siendo estas dos últimas capaces, además, de separar los módulos de manera individual y dar lugar a cuatro fragmentos correspondientes a los diferentes módulos que conforman la molécula de CCN2 (216). La importancia de los diferentes módulos de CCN2 no solo radica en ser la base de su conformación tridimensional y en otorgar sus funciones a una proteína total compleja, sino que existen diversos estudios que demuestran que, tras la escisión de los diferentes módulos, cada uno de ellos puede ejercer acciones autónomas (206). De este modo, la presencia en fluidos biológicos del CCN2 puede encontrarse de diferentes maneras, siendo capaces todas ellas de ejercer diferentes funciones biológicas: la molécula entera, las dos mitades N- y C-terminal y en fragmentos individuales de entre 10 y 12 kDa correspondientes, fundamentalmente, al módulo CCN2(IV) (181,217,218). En este sentido, el CCN2(IV) ha despertado mayor interés a nivel de investigación, debido a que se ha descrito su participación en procesos inflamatorios y fibróticos (219–221). No obstante, aunque hay estudios que postulan que CCN2(IV) puede ser usado como un potencial biomarcador de progresión en las enfermedades fibróticas, como la enfermedad renal o la fibrosis pulmonar, la relevancia acerca de las acciones directas que tienen estos fragmentos circulantes continúa siendo escasa (222,223).

Dependiendo del tipo celular, existen diferentes factores que pueden regular la expresión de CCN2. Hasta la fecha los agonistas de receptores acoplados a proteínas G tales como el TGF- β , la Ang II, la endotelina 1 (ET1), BMPs, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), elevadas concentraciones de glucosa, situaciones límite como la hipoxia, el estrés mecánico o el estrés oxidativo han sido descritos como desencadenantes de un aumento rápido en la expresión de CCN2 en diferentes tipos celulares, incluyendo CMLVs, células endoteliales, mesangiales, epiteliales, condrocitos o trofoblastos (224–231). Entre las rutas descritas a través de las cuales estos factores regulan la expresión de CCN2, se incluyen la vía de señalización SMAD, la activación y liberación de ROS, la activación de RhoA, PKC, JAK, PI3K o la cascada de las MAPK (74,232–234).

En lo que respecta a las acciones ejercidas por CCN2, a nivel celular este factor se ha descrito tradicionalmente como un mediador de los procesos fibróticos activados por otras moléculas como Ang II, TGF- β o la ET1 (185,213,235). Sin embargo, más recientemente, se ha demostrado que CCN2 también puede regular directamente respuestas celulares de tipo inflamatorio a nivel experimental mediante la activación de la vía de NF- κ B en los riñones y en la aorta de ratones (219,221). Además, CCN2 es capaz de regular la respuesta inflamatoria

directamente induciendo la diferenciación de linfocitos CD4 hacia un fenotipo Th17 (220). También existen trabajos que describen que CCN2 puede ejercer directamente las acciones de factor quimioatrayente e inductor de la migración y adhesión de células inmunes circulantes, sobrerregulando, por tanto, la producción de factores proinflamatorios como citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión celular (207,217,236–238). Aparte de estas acciones como factor proinflamatorio, existen estudios recientes que sugieren que CCN2 podría ser también un inductor de la senescencia celular en un contexto de daño renal agudo (239,240).

Independientemente de los esfuerzos que se han llevado a cabo en pro de encontrar un receptor específico por el cual el CCN2 realiza sus acciones, se han reportado pocas evidencias de su existencia, como son algunos complejos receptor-CCN2 en condrocitos (241). Sin embargo, sí que se ha descrito la capacidad de CCN2 de interactuar con diferentes moléculas, como integrinas, proteoglicanos, BMPs, TGF- β , VEGF, IGF, trombospondina o fibronectina para modular diferentes respuestas celulares (181,210,211,215,224,242–244). En este sentido, durante los últimos años, se ha demostrado en diversos modelos experimentales que, tanto la proteína completa de CCN2, como el CCN2(IV) presentan la capacidad de unirse directamente y activar el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR de sus siglas en inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*), siendo capaz de modular diferentes respuestas celulares proinflamatorias, profibróticas, de angiogénesis y de crecimiento y migración celular, en diferentes tejidos, incluyendo el riñón y la aorta (221,245–248).

En relación al sistema cardiovascular, tradicionalmente se había establecido que CCN2 se encontraba altamente expresado en el desarrollo embrionario del corazón, los arcos braquiales, el endotelio y las CMLVs de los grandes vasos (73,249), mientras que, en edad adulta, la expresión de este gen se reducía drásticamente. Sin embargo, estudios recientes entre los que se encuentra el proyecto *Genotype-Tissue Expression* (GTEx) (250), han demostrado la expresión de CCN2 en multitud de órganos en estado adulto, destacando su presencia en niveles elevados en la aorta, tal y como se puede comprobar en el atlas de expresión proteica que se ha generado (ENSG00000118523-CCN2; (251)). Además, se ha observado que los niveles de esta proteína se encuentran elevados en enfermedades cardiovasculares humanas, tales como la insuficiencia cardiaca, la hipertensión pulmonar, la restenosis y la aterosclerosis (73).

En base a todos estos datos, se han realizado diversos estudios preclínicos que sugieren que el bloqueo de CCN2 podría suponer una excelente opción terapéutica en el tratamiento de enfermedades de base fibrótica, idea basada principalmente en resultados muy prometedores relacionados con el tratamiento de la fibrosis renal y pulmonar (252–254), así como en el remodelado vascular y la insuficiencia cardiaca (255,256). Consecuentemente, y como continuación a estos resultados preclínicos, actualmente existen ensayos clínicos utilizando un anticuerpo neutralizante de CCN2 (pamrevlumab: FG-3019) para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (NCT02606136), el adenocarcinoma de páncreas (NCT04229004) y la fibrosis pulmonar (NCT03955146), los cuales se encuentran en fase 2 y 3 y parecen ser bastante prometedores. Sin embargo, los resultados preclínicos obtenidos basados en estrategias para modular los niveles de CCN2 en patologías cardiovasculares han dado lugar a resultados contradictorios. Por un lado, existen evidencias que muestran el efecto beneficioso del bloqueo de CCN2 en relación al sistema cardiovascular en ratones (255,256).

INTRODUCCIÓN

Sumado a ello, a nivel clínico, los niveles elevados de CCN2 circulantes se han propuesto como un biomarcador de disfunción cardíaca en pacientes con enfermedad crónica cardíaca y fibrosis miocárdica (257). Por el contrario, en diversos modelos experimentales de daño cardíaco, se ha demostrado que la sobreexpresión específica de CCN2 en cardiomiocitos protege frente a los efectos deletéreos generados en el corazón por la hipertensión (258), la isquemia-reperfusión (259) y el ictus (260). En esta misma línea, más recientemente, se ha observado que la administración postisquémica de CCN2 en ratones reduce el tamaño del infarto de miocardio y mejora la recuperación de la función cardíaca (261). Curiosamente, aunque se ha descrito que la expresión génica de CCN2 está elevada en CMLVs provenientes de placas ateroscleróticas de pacientes y de AAs (73,262), actualmente no hay información acerca del impacto que tiene la modulación de los niveles de CCN2 en estas patologías vasculares.

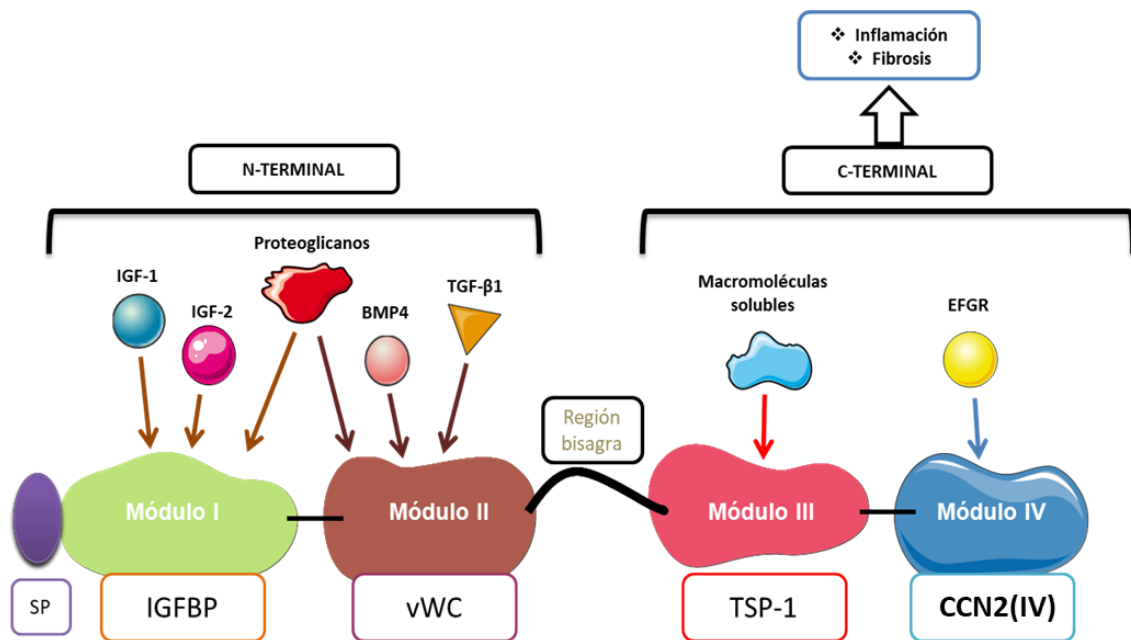


Figura 11.- Estructura modular de CCN2 y sitios de unión a ligandos. Modificado de *Rayego-Mateos S et al.* (206).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Teniendo en cuenta los resultados contradictorios obtenidos en el ámbito cardiovascular respecto al papel que ejerce CCN2 y considerando la estrecha relación existente entre CCN2, Ang II y TGF- β , el principal objetivo de esta tesis será, en primer lugar, evaluar si la delección génica de CCN2 en ratones adultos induce cambios estructurales y funcionales a nivel aórtico, tanto en condiciones fisiológicas como en respuesta a un daño vascular experimental inducido por la administración sistémica de Ang II. En segundo lugar, se evaluarán los efectos directos generados por el tratamiento con CCN2(IV) sobre la activación de la ruta de TGF- β en CMLVs *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Evaluar la estructura y la función aórtica, así como diversos parámetros generales como supervivencia y presión arterial, en ratones deficientes en CCN2, tanto en condiciones fisiológicas como en un contexto de daño vascular inducido por la infusión sistémica de Ang II.
- 2.- Determinar si la administración sistémica del CCN2(IV) recombinante modifica los efectos observados por la delección génica de CCN2 en el modelo de daño vascular.
- 3.- Realizar una transcriptómica de las aortas del modelo experimental de daño vascular para analizar los potenciales mecanismos implicados en los efectos observados.
- 4.- Estudiar si el bloqueo farmacológico de alguno de los potenciales mecanismos encontrados en el análisis transcriptómico presenta efectos beneficiosos en el modelo de daño vascular utilizado.
- 5.- Evaluar el efecto del tratamiento con CCN2(IV) recombinante en la activación y la expresión de los componentes de la vía de TGF- β en CMLVs de aorta de ratón *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Diseño de los modelos experimentales

Todos los estudios realizados en animales se llevaron a cabo de acuerdo a la legislación europea (Directiva 2010/63/EU) y nacional (BOE Núm. 268 Ley 32/2007 y BOE Núm. 34 Real Decreto 53/2013) vigentes para el uso y el cuidado de los animales de laboratorio, así como en concordancia con las guías ARRIVE (de sus siglas en inglés *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*). Los protocolos usados fueron aprobados por el comité ético de investigación animal del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD) y de la Comunidad de Madrid (PROEX 065/18).

1.1.- Deleción del gen *Ccn2*

La totalidad de los estudios de este trabajo se realizaron utilizando ratones machos *knockout* (KO) inducibles para el gen *Ccn2* (CCN2^{flox/flox}ROSA26-ERT/Cre). Estos ratones fueron generosamente donados por el Dr. Roel Goldschmeding del *University Medical Center* (UCM) de Utrecht (Holanda) y fueron obtenidos mediante técnicas de ingeniería genética (263,264). Brevemente, estos ratones tienen flanqueado el exón 4 del gen *Ccn2* por sitios LoxP y, además, poseen una recombinasa Cre inducible por tamoxifeno, la cual una vez es activada, corta y elimina el fragmento presente entre las secuencias LoxP que flanquean el exón 4 de CCN2, dando lugar a un transcrito no funcional de la proteína (**Figura 12**).

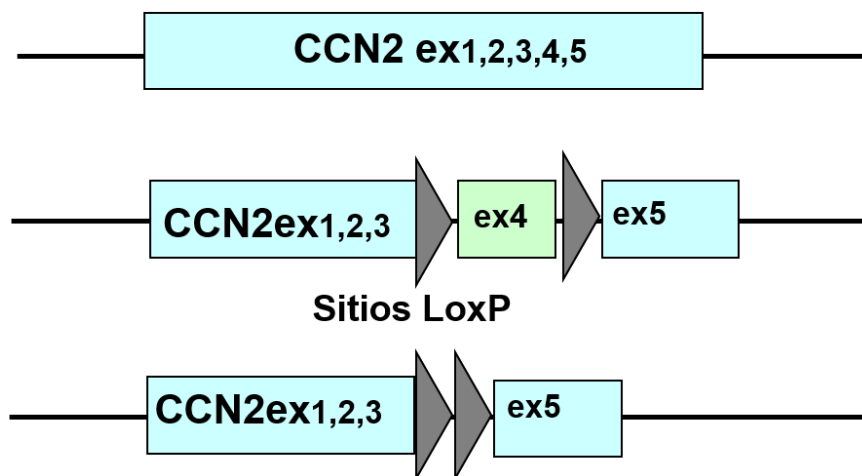


Figura 12.- Esquema explicativo de la generación de los ratones *CCN2*^{flox/flox}ROSA26-ERT/Cre modificados genéticamente, donde “ex” significa exón y los triángulos grises simbolizan los sitios Lox.

Una vez que los ratones *CCN2*^{flox/flox}ROSA26-ERT/Cre, alcanzaron las 13-14 semanas de edad, se dividieron en 2 grupos de trabajo. Por un lado, el denominado grupo *CCN2*-KO, el cual englobaba aquellos ratones que fueron tratados con tamoxifeno (a una concentración de 10 mg/mL disuelto en aceite de maíz; C867, Sigma-Aldrich), administrado por vía intraperitoneal cuatro veces en días alternos, para delectonar el gen *Ccn2*. Por otro lado, el denominado grupo Control, que abarcaba el resto de ratones que recibieron el mismo volumen y el mismo número de inyecciones, pero únicamente con el solvente del tamoxifeno, el aceite de maíz. Tras el tratamiento, se dejó pasar un periodo de dos semanas para lavado

del tamoxifeno, tras el cual la delección del *Ccn2* fue confirmada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; de sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) usando los *primers*: *Ccn2*-floxed Forward: 5'- AATACCAATGCACTTGCCTGGATGG-3' y *Ccn2*-floxed Reverse: 5'-GAAACAGCAATTACTACAACGGGAGTGG-3' (Eurofins). El peso molecular habitual de *Ccn2* es de 878 pares de bases (pb) pero, al estar flanqueado por los sitios LoxP, su peso molecular es de 1003 pb. Una vez activada la recombinasa Cre tras la administración del tamoxifeno, el producto de reacción pasa a tener un peso molecular de 587 pb, lo cual fue confirmado cargando el ADN amplificado en un gel de agarosa (1% y contrastado con SYBR Safe (ThermoFisher) y realizando una electroforesis. Para revelar el gel de agarosa se utilizó el sistema Gel Doc™ EZ System (BioRad) y el software ImageLab™ (BioRad).

1.2.- Descripción de los distintos modelos experimentales

1.2.1.- Modelo de infusión sistémica de Ang II

Dos grupos de ratones, uno CCN2-KO y otro Control, fueron infundidos con el péptido Ang II (A9525, Sigma Aldrich), el cual se administró mediante la implantación de minibombas osmóticas de infusión sistémica (Model 2002, ALZET) durante 15 días, manteniendo una dosis de 1000ng/kg/min, tal y como se ha descrito previamente (221,265). Para facilitar la comprensión de esta cirugía, un vídeo representativo de la cirugía puede visualizarse escaneando el código QR de la **Figura 13**.



Figura 13.- Código QR para visualizar el procedimiento quirúrgico llevado a cabo para implantar las minibombas osmóticas.

En total, se realizaron cuatro grupos experimentales de estudio: el grupo Control (en el cual se administró a los ratones aceite de maíz), el grupo Control + Ang II (donde los ratones fueron pinchados con aceite de maíz e infundidos con Ang II), el grupo CCN2-KO (que incluyó a los ratones tratados únicamente con tamoxifeno) y el grupo CCN2-KO + Ang II (donde se agruparon a los animales pinchados con tamoxifeno e infundidos con Ang II). Tras la realización del primer modelo (**Figura 14A**), se observó una elevada tasa de mortalidad en el grupo de ratones CCN2-KO + Ang II, por lo que se realizaron modelos experimentales adicionales, con el fin de obtener un tamaño muestral lo suficientemente grande para realizar correctamente los análisis estadísticos. Una vez alcanzado el punto final de los 15 días post-cirugía, todos los animales se eutanasiaron en condiciones humanitarias utilizando una exposición prolongada a

CO₂. Una vez comprobado que los animales no respondían al reflejo podal y al reflejo por pellizco en la cola, se realizó una incisión abdominal hasta llegar a la cavidad torácica y se procedió a la extracción de los órganos en las condiciones necesarias para los diferentes análisis. Como salvedad a este protocolo genérico, para el grupo de animales que se usó para realizar los estudios de imagen por resonancia magnética (IRM) y la espectrometría de masas por Monitoreo de Reacciones Múltiples (MRM), se estableció como punto final 5 días después de la cirugía. Además, para poder realizar el análisis de IRM, el modulador de flujo de acero inoxidable de las minibombas fue sustituido por un tubo PEEK (*DURECT corporation*) y por una tapa de ALZET compatible con la técnica.

1.2.2.- Modelo de infusión sistémica de CCN2(IV) recombinante humano y de Ang II

Para comprobar si mantener elevados los niveles de CCN2 circulantes en los ratones podía influir en los efectos inducidos por la delección de CCN2, se realizó un grupo adicional de ratones CCN2-KO en los cuales se implantó una minibomba osmóticas ALZET. En este caso, la minibomba sirvió para infundir de manera sistémica el fragmento C-terminal de CCN2 (CCN2(IV); proteína recombinante de Preprotech) a una dosis de 2,5ng/g de peso/día, desde el día antes de administrar la primera dosis de tamoxifeno (**Figura 14B**). Transcurridos 7 días, esta minibomba se reemplazó por otra de 15 días con la misma dosis de CCN2(IV), hasta completar el periodo de lavado del tamoxifeno. Finalmente, una vez concluido este periodo, se retiró la minibomba de 7 días y se implantaron dos minibombas nuevas de 15 días: una para continuar administrando CCN2(IV) y otra para infundir Ang II, en ambos casos utilizando las dosis previamente descritas.

1.2.3.- Modelo de infusión sistémica de Ang II y tratamiento con SP

Para estudiar el potencial papel que podía tener la aldosterona en los efectos inducidos por la deficiencia de CCN2, un grupo de ratones CCN2-KO + Ang II también recibieron de manera preventiva un tratamiento con el antagonista del MR, SP (266) (S3378-1G, Sigma-Aldrich). Para su administración, la SP se disolvió en aceite de maíz y posteriormente se inyectó por vía intraperitoneal (50mg/kg/día) cada 48 horas, comenzando el tratamiento el día anterior al primer pinchazo de tamoxifeno (**Figura 14C**). Para este nuevo modelo, se diseñaron cuatro grupos experimentales: el grupo Control, el grupo CCN2-KO, el grupo CCN2-KO + Ang II y el grupo CCN2-KO + Ang II + SP (tratados con SP, pinchados con tamoxifeno e infundidos con Ang II).

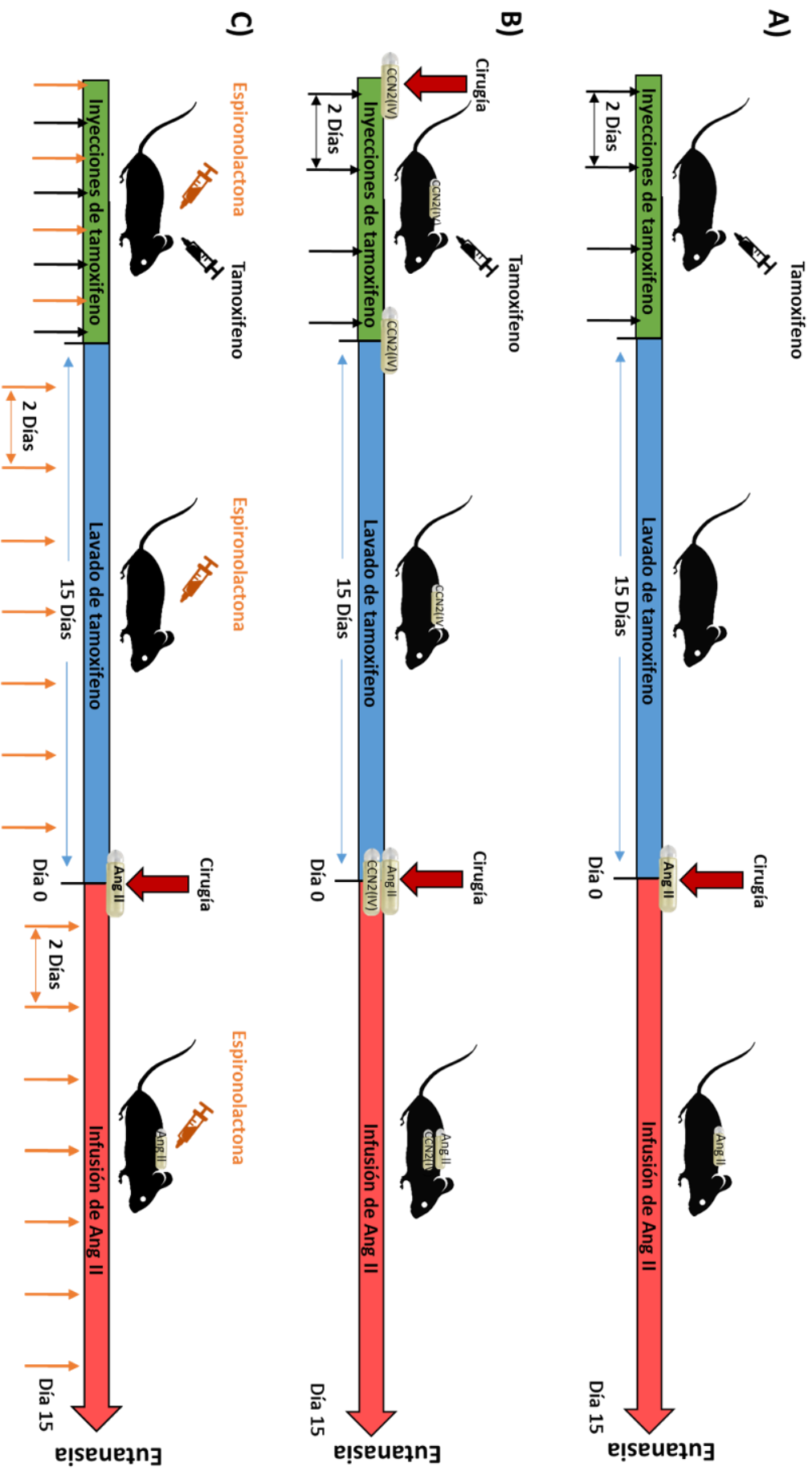


Figura 14.- Esquema de modelos de delección de *Ccr2* e infusión de Ang II (A). Aproximación con la implantación de minibomba osmótica adicional con CCN2(IV) (B) y tratamiento preventivo de espirolactona (C).

2.- Medidas de la presión arterial sistólica

Para realizar las medidas de la presión arterial sistólica de los ratones se utilizó un equipo de medida de presión arterial no invasivo LE5001 (Panlab, Harvard apparatus) unido a un esfigmomanómetro de cola y adaptado para tomar medidas en ratones mediante el uso de un transductor adecuado para ratones normopeso (76-0432; Panlab Harvard Apparatus). Para disminuir las posibles diferencias inter e intramedición y poder obtener las mejores condiciones, las medidas se tomaron en un ambiente tranquilo y termorregulado, manteniendo la sala a 22°C aproximadamente y precalentando los ratones durante 10 minutos a 37°C con una mesa de cirugía calefactada. Posteriormente, los animales se mantuvieron a 35°C y se realizaron entre 10 y 15 mediciones por cada animal y sesión, de tal forma que el resultado fue expresado como la media de la presión arterial sistólica por cada animal y día. La medida inicial se realizó el día previo a la primera inyección de tamoxifeno (denominado día -15) y, posteriormente, se tomaron medidas el día que se realizó la cirugía (nombrado como día 0), el día 7 y el día 15 (punto final).

3.- Evaluación del tamaño y la estructura aórtica por IRM

Los experimentos de IRM fueron llevados a cabo en un Bruker Biospec 47/40 (Bruker) en las instalaciones del centro de Resonancia Magnética Nuclear de la Universidad Complutense de Madrid, operando un Tesla 4.7 y equipado con un sistema de gradiente de 6 cm. Los estudios fueron llevados a cabo por el personal cualificado del centro. Para la transmisión y recepción se utilizó una sonda de radiofrecuencia tipo jaula de pájaro de 3,5 cm. Los estudios de IRM fueron repetidos durante 3 días (día 0, día 2 y día 4 posteriores a la cirugía). Los animales fueron anestesiados con una mezcla de isofluorano y oxígeno (2% en 1,5 L/min para inducir la anestesia y 1% en 1,0 L-min durante la experimentación). Para hacer las medidas, los animales fueron colocados en decúbito prono dentro de la sonda de radiofrecuencia y con el abdomen localizado en el centro de la bobina. La temperatura (36°C) y la respiración fueron monitorizadas durante el experimento, utilizando esta última para conseguir la adquisición de imágenes con un sistema de monitorización para animales pequeños (SA Instruments, Inc.).

Las angiografías por resonancia magnética fueron llevadas a cabo sin inyectar un agente de contraste mediante el uso de una secuencia eco de gradiente 2D con una compensación de flujo de primer orden en todas las direcciones de gradiente lógicas (GEFC). De este modo, la compensación de flujo mejora la señal de los giros en movimiento, por lo que la señal de la sangre que fluye dentro de la luz aparece brillante mientras que no hay señal de los tejidos estáticos. El tiempo de repetición (TR) fue de 45 ms, el tiempo eco (TE) de 8,7 ms y el ángulo de giro (θ) de 80°. El tamaño de la matriz adquirida fue de 256 x 128. Estos datos se llenaron con ceros para obtener un tamaño de matriz reconstruida de 256 x 256. El campo de visión (FOV) fue de 2,56 x 2,56 cm² y se adquirieron 64 cortes axiales (perpendiculares a la aorta) con un grosor de corte de 0,5mm. Estos cortes se superpusieron 0,01 mm, por lo tanto, el volumen FOV fue de 2,56 x 2,56 x 2,57cm³. El número de experimentos promediados fue de 2 y el tiempo total de adquisición para cada experimento fue de 12 minutos y 17 segundos. Para eliminar la señal de flujo venoso, en la posición más caudal del volumen de la imagen, se utilizó un corte de saturación de flujo de 2 mm, paralelo al plano de la imagen, con un hueco

de 0,5 mm respecto al volumen de la misma. Los datos obtenidos por IRM fueron procesados utilizando el software ImageJ 1.51 (NIH). En primer lugar, los cortes cercanos al corazón fueron eliminados debido a los artefactos originados por el movimiento propio del corazón. Después, la señal de la aorta fue segmentada en los diferentes cortes y la matriz fue redimensionada para conseguir una resolución isotrópica de $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$. Finalmente, se utilizó el algoritmo de proyección de máxima intensidad (MIP) para obtener las vistas en 3D del flujo de la aorta.

Para calcular el área de las aortas se utilizó una secuencia eco de gradiente de sangre brillante 2D, con reenfoque a lo largo del eje de codificación de fase. El TR fue de 18 ms, mientras que el TE fue de 3,7 ms y el θ , de 20° . El FOV fue de $2,56 \times 2,56 \text{ cm}^2$ y el grosor del corte de 1,0mm. Se adquirieron un total de 25 cortes axiales sin espacio entre ellos. El tiempo total de adquisición fue de 11 minutos y 31 segundos. Los datos adquiridos se llenaron con ceros para obtener un tamaño de matriz reconstruido de 256×256 . En estos experimentos, como en los anteriores, se utilizó un corte de saturación del flujo venoso. Finalmente, las áreas de las aortas, comprendiendo tanto el área total como el lumen, fueron medidas por dos observadores independientes utilizando el software ParaVision 3.1 (Bruker). Las regiones de interés se dibujaron manualmente y se calculó la media de las dos mediciones. Las áreas aórticas se midieron en cada corte de 1 mm empezando desde la arteria mesentérica superior hasta llegar 1 cm por encima de ella. Las medidas del grupo Control se usaron para calcular un valor medio del área aórtica en cada posición. Las áreas medidas para cada ratón, día y posición se dividieron por estos valores de referencia.

4.- Estudio del tamaño de la aorta por imagen adquirida mediante ultrasonidos

Con el fin de visualizar el diámetro interno en diferentes regiones de la aorta *in vivo*, se utilizó el sistema portátil LOGIQ-e *Ultrasound*, acoplado a una sonda adecuada para el trabajo con ratones: L10-22 (10-22MHz; GE *Healthcare*) para realizar ecografías. De esta manera, se realizaron medidas del diámetro interno máximo de la aorta ascendente (arco aórtico) y descendente, en este último caso se realizó una medida a nivel torácico y otra a nivel abdominal, justo por encima de las arterias renales. Todos los animales se monitorizaron desde el día 0 hasta el último día de estudio en un contexto de anestesia general infundida con isoflurano y manteniendo la temperatura del ratón a 35°C usando una mesa de cirugía calefactable. Para asegurar que no existía un sesgo sistemático intra e interoperario, las medidas fueron realizadas asegurando el cegamiento por dos observadores independientes y en días diferentes. Finalmente, las medidas se compararon para asegurar la equidad de ambas y, posteriormente, se expresaron como una media por cada animal, grupo y día, expresada en milímetros.

5.- Preparación del tejido aórtico para los diferentes estudios posteriores

Al final del procedimiento de cada modelo experimental, los ratones se eutanasiaron por exposición prolongada a CO_2 . En primer lugar, se hizo una evaluación visual para determinar la presencia de anomalías en las aortas de cada ratón (*p. ej.*: AAs). Una vez realizado esto, las aortas se procesaron en segmentos y estos se recogieron de manera diferente dependiendo del estudio a realizar. De este modo, para los ensayos funcionales y

mecánicos, se recogieron segmentos aórticos de 1,5-2mm de grosor de la región torácica descendente, se limpiaron de tejido conectivo y del tejido adiposo perivascular y se introdujeron en una solución Krebs-Henseleit (KHS) (115 mmol/L NaCl, 25 mmol/L NaHCO₃, 4,7 mmol/L KCl, 1,2 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 2,5 mmol/L CaCl₂, 1,2 mmol/L KH₂PO₄, 11,1 mmol/L glucosa, and 0,01 mmol/L Na₂EDTA, pH7,4) en frío (4°C). Además, debido a la baja cantidad de tejido aórtico y a los numerosos estudios que se pretendían llevar a cabo, se realizaron y utilizaron diferentes modelos experimentales para la evaluación histológica, para los estudios de proteínas, para la secuenciación de ARNm (ARNsec) y para su validación por PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR, del inglés *Real Time quantitative PCR*). Para los estudios histo e inmunohistológicos, se recogieron segmentos de aorta de la región suprarrenal, se fijaron en paraformaldehído (PFA) 4% a pH= 7,4, y se embebieron en parafina para ser procesados posteriormente. Los segmentos aórticos para realizar los estudios de microscopía electrónica de transmisión (MET) se incluyeron en un buffer de glutaraldehído-formaldehído 4% en 0,1M de un buffer de cacodilato sódico. Para los estudios de proteínas y expresión génica, los segmentos aórticos se recogieron y almacenaron inmediatamente en nitrógeno líquido hasta que se realizaron los análisis pertinentes.

6.- Estudios mecánicos de la aorta ex vivo

Para determinar la elasticidad de la aorta, se utilizaron los segmentos de 2mm de la aorta descendente en su zona más próxima al cayado, previamente recogidos en KHS y mantenidos a 4°C, los cuales fueron analizados utilizando un miógrafo de alambres (Danish Myo Tech). Se realizó el montaje de los segmentos entre dos alambres de 25 µm conectados a un transductor de fuerza y a un micrómetro, gracias a los cuales se pudo medir la fuerza ejercida por los mismos. Brevemente, se mantuvieron en un baño de órganos adecuado con una solución de Krebs-Henseleit a 37°C y sin calcio, de manera que se evite la autoconstricción del vaso. Una vez montados, se fijó el punto 0 situando los alambres lo más juntos posible evitando que se toquen entre ellos, a continuación, se va hizo avanzar el micrómetro de 200 en 200 µm anotando la fuerza ejercida por las paredes del vaso, hasta alcanzar una fuerza de aproximadamente 200mN.

7.- Ensayos de reactividad vascular de la aorta ex vivo

Para realizar un análisis exhaustivo de la reactividad vascular, se utilizaron otra serie de segmentos aórticos recogidos en KHS y mantenidos a 4°C, los cuales fueron en este caso acoplados a un miógrafo de alambres isométrico (Multichannel wire myograph, DMT), como se ha descrito previamente (221). De manera breve, se hacen pasar dos alambres de acero por el lumen de los segmentos aórticos, los cuales están acoplados a un transductor de tensión que indica la fuerza que cada segmento es capaz de ejercer sobre los alambres. Donde se mantienen los segmentos aórticos en condiciones fisiológicas, utilizando para ello una solución KHS (pH = 7,4), manteniendo una temperatura de 37°C y con aporte continuo de oxígeno y CO₂. Para realizar el estudio, los anillos aórticos se llevaron a un diámetro óptimo para el desarrollo y estudio de una tensión activa. En primer lugar, para asegurar que los segmentos no se habían dañado durante la manipulación para su extracción y el montaje, se evaluó su contractilidad máxima tras una exposición a altas concentraciones de K⁺ (120 mmol/L), para lo que se usó una solución de KHS (K⁺-KHS). Después de ello, en algunos de los segmentos se

llevaron a cabo los estudios de relajación dependiente de endotelio, para lo que se realizó una precontracción usando fenilefrina (Phe) hasta el 50% de la contracción máxima obtenida previamente. Finalmente, usando acetilcolina (Ach) (1 nmol/L-10 μ mol/L), que es un compuesto capaz de activar la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, de sus siglas en inglés *Endothelial nitric oxide synthase*), se elaboró una curva dosis-respuesta. Por otra parte, en el resto de segmentos aórticos, se realizó también una curva dosis-respuesta usando Phe (1 nM-1,1 mmol/L), cuyo fin era analizar la contractilidad de los diferentes segmentos aórticos. Los datos obtenidos se analizaron con el software LabChart® (ADInstruments). Las respuestas vasoconstrictoras se expresaron como un porcentaje en referencia al máximo obtenido con la solución de K⁺-KHS, mientras que las respuestas vasodilatadoras se expresaron como un porcentaje con respecto al obtenido mediante la precontracción previa del 50% inducida con Phe.

8.- Estudios en CMLVs de ratón *in vitro*

8.1.- Obtención y crecimiento de las CMLVs

Para realizar una aproximación *in vitro* de los distintos modelos animales experimentales planteados, se realizaron cultivos primarios de CMLVs provenientes de aortas de ratones macho CCN2flox/floxROSA26-ERT/Cre de entre 3 y 4 meses de edad, las cuales fueron aisladas según se ha descrito previamente (221). Brevemente, las aortas se extrajeron y se depositaron en un tubo de 50 ml con suero salino frío y estéril para realizar el resto del proceso en una campana de cultivo en condiciones de esterilidad. En primer lugar, se retiraron los restos de grasa de las aortas y se cortaron en trozos pequeños de manera transversal. Los trozos obtenidos fueron incubados en 2 mL de medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado con glutamina (1% de L-glutamina a 200mM) y penicilina/estreptomicina (100 U/mL de cada una) y mezclado con 500 U/mL de colagenasa tipo II (Sigma Chemical Co) durante 20 min a 37°C. Posteriormente, se añadieron 2 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con L-glutamina, penicilina/estreptomicina y con suero fetal bovino (SFB) al 20% para detener la actividad enzimática de la colagenasa II. Se recogieron los 4 mL de medio junto con los restos de aorta, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El pellet con los restos de la aorta se resuspendió de nuevo en medio DMEM al 20% de SFB y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 min, descartando de nuevo el sobrenadante. Este último paso se realizó tres veces más y finalmente el *pellet* se resuspendió en DMEM al 20% de SFB y se depositó en un matraz de cultivo de 25 cm² de superficie. Las CMLVs obtenidas se crecieron en medio de cultivo DMEM suplementado con SFB 10%, L-Glutamina 200mmol/L 1%, penicilina 100U/mL y estreptomicina 100 U/mL. Las CMLVs de los pases 2-5 se seleccionaron para ser usadas, comprobando previamente que presentaban una positividad del 99% para la inmunohistoquímica de α -actina de músculo liso ((ACTA), utilizado como marcador de CMLVs). Para generar la delección del gen de *Ccn2* en las CMLVs y obtener por tanto CMLVs-CCN2-KO, las células se trataron con 4-hidroxitamoxifeno (0,02 mg/mL, Sigma-Aldrich), disuelto en metanol, durante las 24 horas previas a cualquier estudio *in vitro*, comprobando la efectividad de la delección posteriormente mediante un análisis de RT-qPCR. Las células utilizadas como CMLVs Control, fueron tratadas con el vehículo de resuspensión del 4-hidroxitamoxifeno (metanol) durante las 24 horas previas a los estudios.

Además de los cultivos primarios, también se llevaron a cabo diferentes experimentos de análisis proteico y génico utilizando una línea celular inmortalizada de CMLVs provenientes de aortas de ratón (MOVAS; CRL 28-97, ATCC). Estas células se crecieron utilizando el mismo medio que las CMLVs del cultivo primario, a excepción de que, en este caso, la concentración de L-glutamina fue de 2% y de que contenía G-418 0,2 mg/mL (Sigma Aldrich) como antibiótico de selección. Una vez alcanzada una confluencia del 80%, ambos tipos celulares se dejaron incubando con su correspondiente medio DMEM al 0,1% de FBS durante toda la noche, en pro de detener el proceso del ciclo de división celular para que todas las células estuvieran en la misma fase cuando se realizaran los diferentes estudios. En todos los estudios, cada experimento fue realizado por triplicado.

8.2.- Estudios de la migración celular *in vitro*

La capacidad de migración de las CMLVs de cultivo primario se midió en una cámara Boyden modificada, utilizando para ello unos *transwells* con un tamaño de poro de 8µm colocados en placas de 24 pocillos (153422, Corning). Los estudios se realizaron tanto en CMLVs controles como en CMLVs-CCN2-KO, sembrando una densidad celular de 5×10^4 por punto, resuspendidas en medio DMEM (0,1% BSA) y depositadas en la parte superior de los *transwells*. El pocillo donde estaba depositado cada *transwell* se rellenó con 1mL de DMEM (0,1% de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*)) y, en determinados pocillos, también se añadió Ang II (10^{-6} mol/L) como estímulo inductor de la migración celular. Transcurridas 4 horas, las membranas de los *transwell* conteniendo las células fueron lavadas e incubadas en PFA 4% para fijar las células. Posteriormente, se recortaron las membranas, se tiñeron con DAPI (1/10.000; Sigma Aldrich) para contrastar los núcleos y se montaron con Prolong™ Gold (Invitrogen) para cuantificar la migración celular. Las células migradas se contabilizaron en fotografías de diez regiones aleatorias de la parte inferior de la membrana del *transwell*. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Nikon Eclipse E400 con una cámara Nikon DSM1200F acoplada.

8.3.- Estudios de cierre de herida *in vitro*

Para realizar los análisis de cierre de herida, las CMLVs de cultivo primario se crecieron en placas de 6 pocillos (3506, Corning). Una vez alcanzaron una confluencia del 80% en cada pocillo, se realizó una hendidura con una punta de pipeta de 20-200 µl en la monocapa de CMLVs de cada pocillo, tanto en las células Control como en las CMLVs-CCN2-KO. Una vez realizada la incisión, se obtuvo una foto de la zona del área dañada, la cual se correspondía con el tamaño de la herida a tiempo 0. Durante las siguientes 3, 6 y 24 h, se tomaron también fotografías de la zona de la herida. Finalmente, utilizando el software Image ProPlus (*Media Cybernetics*) se calculó el % de cierre de herida a los diferentes tiempos. Para obtener las imágenes se utilizó un microscopio de luz invertida LEICA DMI1 (Leica Microsystems).

8.4.- Estudios de estimulación con CCN2(IV)

Una vez las MOVAS alcanzaron una confluencia del 80%, se procedió a realizar una serie estudios en placas de 6 pocillos en las que las células se incubaron con dos diferentes concentraciones de CCN2(IV) (50 y 100ng/mL) y de TGF-β (1ng/mL) a diferentes tiempos (10-20 minutos y 48 horas). Además, diversos pocillos fueron pretratados con los inhibidores SIS3

(Selleck Chemicals), como inhibidor selectivo de la fosforilación de SMAD3 (267), galunisertib (Selleck Chemicals) antagonista de TGF β R1 (268) y erlotinib, un inhibidor del EGFR (Vichem Chemie Research) (269), previo al tratamiento con CCN2(IV). Transcurrido el tiempo de incubación necesario, se realizaron los distintos análisis de *Western Blot* (WB) y RT-qPCR siguiendo los protocolos descritos más adelante en este apartado para los estudios de tejido aórtico, utilizando el mismo buffer de lisis de proteínas y los mismos reactivos de extracción de ARNm, pero con la salvedad de que, en este caso, las células fueron recogidas mecánicamente utilizando un *scraper*.

Finalmente, las MOVAS se crecieron sobre cubreobjetos depositados en placas de 24 pocillos para realizar otra serie de experimentos con CCN2(IV) (50ng/mL y 100ng/mL) a tiempos cortos (5-20 minutos), con el fin de evaluar la activación de la vía SMAD por técnicas de inmunofluorescencia. Transcurrido el tiempo de estimulación, se retiró el medio de cultivo, se realizaron varios lavados de las células con suero salino frío, y se fijaron con PFA 4%. Tras ello, se incubaron durante 15 minutos con una solución de TBS al 0,1% de tritón-X100 (Sigma) para permeabilizar la membrana celular y permitir el paso de los anticuerpos frente a las proteínas a estudiar. Posteriormente, se lavaron las células de nuevo con suero salino y se realizó un bloqueo de las posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos utilizando una solución de TBS al 4% de BSA durante 1 hora. Tras este paso, se incubaron las células durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente: p-SMAD2 (1/200, #3108, Cell Signaling) y SMAD4 (1/200, sc7966, Santa Cruz Biotechnology). Al día siguiente, tras realizar los lavados pertinentes con suero salino, se incubaron las células con el anticuerpo secundario adecuado (AlexaFluor 488[®]; 1/300; Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se contrastaron los núcleos incubando las células con DAPI (1/10.000) durante 10 minutos, se lavaron de nuevo con suero salino y los cubreobjetos con las células adheridas se montaron sobre portaobjetos de cristal utilizando ProlongGold[™] para su posterior análisis por microscopía confocal utilizando un microscopio Leica DM-IRB (Leica Microsystems).

9.- Estudios de histología y estructura en secciones aórticas

9.1.- Tinciones histoquímicas

Para realizar estos análisis, se utilizaron los segmentos aórticos previamente incluidos en parafina. Los bloques se seccionaron en cortes de 4 μ m de grosor, se dispusieron en portaobjetos tratados para la adhesión de tejidos, se desparafinaron, se rehidrataron a través de un gradiente de alcoholes (100-96-70% de alcohol) y se lavaron en agua destilada. Tras este proceso, común a todas las tinciones histoquímicas, se llevaron a cabo diferentes técnicas para visualizar la estructura de la aorta a varios niveles. Por un lado, se realizó la tinción de hematoxilina-eosina siguiendo protocolos previamente establecidos (270), de manera que se pudo evaluar la forma y estructura aórtica a nivel general. También se desarrolló una tinción de Van-Gieson para evaluar el grosor y la disposición de las láminas elásticas utilizando un kit comercial (115974, Merck Millipore). Brevemente, se sumergieron los cortes desparafinados y rehidratados en la solución de Verhoeff durante una hora, se lavaron en agua destilada y se diferenciaron con cloruro férrico al 10% durante 2 minutos. La reacción de diferenciación se detuvo con agua destilada, para posteriormente tratarlos con tiosulfato de sodio al 5% durante

1 minuto y contrastar finalmente con el reactivo Van Gieson (1% fucsina ácida y ácido pícrico saturado) Tras ello, los cortes se lavaron, se deshidrataron y se montaron con medio de montaje DPX (Sigma-Aldrich). La obtención de las imágenes se llevó a cabo utilizando un microscopio Leica DMD108 (Leica *Microsystems*).

9.2.- Evaluación de la estructura aórtica por MET

Los segmentos aórticos fijados en glutaraldehído-formaldehído 4% en 0,1M de un buffer de cacodilato sódico se utilizaron para realizar los estudios por MET con el fin de visualizar la ultraestructura del tejido. El proceso postfijado consistió en incubar los segmentos durante una hora y 40 minutos en una solución al 1% de tetraóxido de osmio a temperatura ambiente, un lavado en agua destilada, una tinción con una solución de acetato de uranilo 0,5% a lo largo de 5 minutos, una secuencia de deshidrataron incubando las muestras en soluciones de alcoholes en concentraciones creciente (30, 50, 70, 95 y 100%) y una incubación final con acetona. Tras este proceso, las muestras se incluyeron en una resina de epóxido Durcupan ACM (Sigma-Aldrich) en proporciones crecientes de ratio Resina/acetona (1:3, 1:1, 3:1 y resina pura) y se polimerizaron en un horno a 60°C durante 48 horas. Los cortes ultrafinos (60nm) se obtuvieron usando el aparato Leica Ultracut S (Leica *Microsystems*) y fueron incluidos en unas rejillas de cobre de 200MESH y contrastados con acetato de uranilo y citrato. Por último, la visualización y adquisición de las imágenes de los cortes se llevó a cabo mediante un microscopio de transmisión electrónica JEOL JEM1010 (100kV) y su software incorporado.

10.- Evaluación de los niveles y la actividad de diversas proteínas a nivel aórtico

10.1-Western blot

Para el análisis de la cantidad relativa de proteínas en el tejido aórtico, se llevaron a cabo técnicas de western blot (WB). Brevemente, las aortas conservadas en nitrógeno líquido fueron lisadas mediante un proceso mecánico utilizando un troquel y un buffer de lisis adecuado que consistió en Tris-HCl (50 mM), NaCl (150 mM), EDTA (2 mM); EGTA (2 mM); Triton X-100 (0,2 %); NP-40 (0.3 %); PMSF (1 mM), coctel de inhibidores de proteasas (1 µl/ml), NaF (25 mM); Na₃VO₄ (100 µM) y DTT (1 mM). A partir de este punto, el proceso para evaluar la concentración de proteínas fue idéntico tanto para el tejido aórtico como para las CMLVs en cultivo. Una vez recogido el lisado aórtico o las CMLVs, los viales se agitaron 3 veces vigorosamente cada 30 minutos utilizando un *vortex* y se dejaron reposar en hielo entre cada periodo de agitación. Finalmente, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante conteniendo el lisado de proteínas total. Posteriormente, la cantidad de proteínas totales se cuantificó mediante el método de ácido bicinónico (BCA; ThermoFisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez cuantificada la concentración, se cargó la misma cantidad (40 µg) de proteína en geles de SDS acrilamida/poliacrilamida 10-12% en condiciones desnaturizantes, usando el *PageRuler*TM como marcador de peso molecular (10-180 kDa, ThermoFisher). Tras esto, utilizando un sistema completo de WB comercial (BioRad), se aplicó un campo eléctrico constante para realizar la separación de las proteínas en función del peso molecular y, una vez alcanzaron la separación adecuada, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad). Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 hora con una solución de leche al 5% en solución salina con Tris (TBS) y acto seguido se incubaron con los diferentes anticuerpos

MATERIALES Y MÉTODOS

primarios correspondiente durante toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, las membranas se lavaron con una solución de TBS-tween 0,1% y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, el revelado de las membranas se realizó utilizando el sustrato ECL (Millipore), la obtención de las imágenes se llevó a cabo mediante el equipo LAS4000 (GE *Healthcare*) y el densitometrado de las bandas se hizo utilizando el software *QuantityOne* (BioRad). Los anticuerpos primarios utilizados en los diferentes experimentos se recogen en la **Tabla 1**.

Tabla 1.- Listado de anticuerpos, concentración a la que se usó en *western blot*, referencia y casa comercial correspondiente.

| Anticuerpo | Concentración | Referencia |
|------------|---------------|---------------------------------|
| MMP-8 | 1/500 | sc-514803 – SC. Biotechnologies |
| TGFBR1 | 1/300 | sc-518086 – SC. Biotechnologies |
| TGFBR2 | 1/300 | sc-17792 – SC. Biotechnologies |
| p-SMAD2 | 1/1000 | #3108 – Cell signaling |
| p-SMAD3 | 1/1000 | ab52903 – Abcam |
| GAPDH | 1/5000 | CB1001 – Merck Millipore |

10.2.- Zimografía

Partiendo del mismo lisado de proteínas obtenido de las aortas, se realizó una medida de la actividad enzimática de las MMPs. Para ello, las muestras de proteína se cargaron y separaron en geles de SDS acrilamida/poliacrilamida al 10% sin condiciones desnaturizantes y conteniendo un 1% de gelatina (Sigma Aldrich), el cual sirve como sustrato a degradar por las MMPs. Utilizando el mismo equipo que para realizar el WB y tras aplicar el campo eléctrico para obtener la separación adecuada, el gel se lavó con tritón-X100 al 2,5% tres veces durante 30 minutos, terminando con un lavado en agua destilada durante 30 minutos para eliminar el exceso de tritón-X100. Tras ello, los geles se incubaron con el buffer de reacción (50 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, 200 mmol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂) durante toda la noche a 37°C con agitación, y luego se tiñeron con azul de Coomassie (Sigma Aldrich) durante 30 minutos. Finalmente, se trataron con un buffer de lavado para eliminar el Coomassie sobrante. Los resultados se analizaron en fresco con el sistema BioRad Gel Doc™ EZ Imager y el densitometrado y la cuantificación de las bandas se llevó a cabo con el software *QuantityOne* (BioRad).

10.3.- Zimografía *in situ*

Los estudios de zimografía *in situ* se realizaron siguiendo un protocolo previamente descrito (271). Brevemente, utilizando las muestras de las aortas incluidas en parafina se realizaron cortes para obtener secciones aórticas de 8µm de grosor, las cuales se desparafinaron y rehidrataron mediante un gradiente de alcoholes (100-96-70% de alcohol).

Cada muestra se incubó con el sustrato *DQ Gelatin* (Invitrogen) durante toda la noche y en una cámara húmeda a 37°C, y los núcleos se contrastaron incubando las muestras con DAPI a una concentración de 1/10000 durante 5 minutos. Finalmente, las muestras se montaron con cubreobjetos usando Prolong™ Gold y se visualizaron y analizaron en un microscopio confocal Leica DM-IRB. Las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas para evaluar la fluorescencia fueron 495 y 515 nm respectivamente. Para verificar la especificidad de la señal con la actividad MMPs, se utilizaron varios cortes de aorta preincubados con EDTA 20mM durante 1 hora y en los cuales se añadió también EDTA a la solución sustrato. Teniendo en cuenta que el EDTA elimina la señal generada por el sustrato *DQ gelatin*, los cortes de aorta tratados con EDTA sirvieron como control negativo de la técnica.

10.4.- Espectrometría de masas por MRM

Para realizar estos estudios, las aortas completas de los ratones utilizados para los estudios de IRM fueron homogenizadas utilizando un sistema de lisis de tejido comercial (Qiagen) con bolas de acero inoxidable y un buffer de lisis adecuado (100 mM Ditiotreitolo (DTT), 5% desoxicolato de sodio, 1% β-octilglucósido, 20 mM Tris base, pH 8.8 y suplementado con las tabletas de cocktail inhibidor de proteasas comercial cOplete™ ULTRA Tablets Mini, EDTA-free EASYpack y PhosSTOP). Las proteínas obtenidas fueron desnaturalizadas (a 99°C durante 20 minutos y a 80°C durante 100 minutos), alquiladas (con 150 mM yodoacetamida durante 30 minutos a temperatura ambiente), precipitadas (a -20°C con acetona durante 1 hora), solubilizadas (con urea 8M durante 30 minutos a temperatura ambiente) y tripsinizadas (tripsina 0,5 µg/µl (Promega)) en bicarbonato de amonio 50 mM a 37°C durante toda la noche. Tras un paso de acidificación, los péptidos tripticos obtenidos fueron purificados utilizando columnas R2/R3 y resuspendidos en una solución de acetonitrilo 2% y ácido fórmico 0.1%. La concentración de péptidos fue determinada por el método del BCA y normalizada para cada muestra, a cada cual se le añadió posteriormente estándares peptídicos marcados con isótopos pesados en un ratio 1:1 de volumen, con el fin de obtener un ratio de entre 0,01-10 en el pico del área entre los péptidos de la muestra y sus correspondientes péptidos pesados. Por cada muestra se corrieron 2,5 µg de péptidos endógenos en un sistema de nanocromatografía líquida (*Easy-nLC II*) utilizando columnas de retención C18 con una longitud de 2 cm y un diámetro interno de 100 µm donde se desalaron los péptidos, y columnas de análisis C18 con una longitud de 2cm y un diámetro interno de 75 µm para la separación de los péptidos (Thermo Scientific). A continuación, los péptidos se eluyeron en tres pasos de 60 minutos en un gradiente de ácido fórmico 0,1% en acetonitrilo con un ratio de flujo de 300 nL/min. Posteriormente, los péptidos fueron ionizados utilizando una fuente de iones *Nanospray Flex* (Thermo Scientific) y analizados en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (*TSQ Vantage*, Thermo Scientific) en el modo de MRM. Los archivos obtenidos por MRM fueron procesados utilizando el software *Pinpoint 1.3* (Thermo Scientific). El ratio de los picos de las áreas entre los péptidos endógenos y los marcados con isótopos (1-3 péptidos por muestra) fueron usados para analizar los datos. Los ratios de los picos de las áreas para las proteínas individuales fueron normalizados utilizando los valores obtenidos para la GAPDH y la ACTB.

11.- Evaluación de la expresión génica

La extracción del ARN mensajero (ARNm) total de las muestras aórticas conservadas en nitrógeno líquido, se llevó a cabo utilizando un troquel para pulverizar el tejido y siguiendo el método de extracción con TRIzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. El ARNm de las CMLVs en cultivo fue extraído siguiendo también el mismo método con la única diferencia de que, en este caso, las células fueron levantadas y recogidas de las placas de cultivo añadiendo TRIzol y utilizando un rascador de plástico. Una vez obtenido el ARNm total se llevaron a cabo diversos estudios

11.1.- ARNsec

Para el ARNsec, se prepararon las librerías de ARN de acuerdo a las instrucciones indicadas en el kit *NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep kit for Illumina (New England Biolabs)*, seguido del protocolo "*NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module*". La calidad del ARN se evaluó de acuerdo al número de integridad del ARN (RIN) obtenido en cada muestra, el cual fue determinado usando un kit ARN 6000 nano LabChip y un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent *Technologies*) (rangos RIN entre 6-7). El ARN total de partida utilizado para realizar el protocolo fue de 900ng. El tiempo de fragmentación usado fue de entre 8 y 15 minutos, de acuerdo a los valores RIN. El resto del protocolo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las librerías obtenidas se validaron y cuantificaron utilizando el kit *DNA7500 LabChip* y el bioanalizador Agilent 2100. Posteriormente, un *pool* equimolecular (realizado juntando las muestras de entre 8 y 10 aortas por grupo) de las librerías se tritieron mediante PCR cuantitativa usando el kit *Kapa-SYBR FAST qPCR* para el sistema *LightCycler 480* (KapaBioSystems) y un estándar de referencia para la cuantificación. Cada *pool* de las librerías fue desnaturalizado antes de ser depositado en una celda de flujo a una densidad de 2,2 pmol/L, donde se formaron *clusters* y se secuenciaron usando el kit "*NextSeqdTM 500 High Output*" y un secuenciador *NextSeq500*, en una única secuencia de lectura utilizando un secuenciador *NextSeq500*. Se produjeron aproximadamente 50 millones de lecturas (rango de 42 a 54) para cada conjunto de muestras, las cuales fueron usadas para realizar los posteriores análisis bioinformáticos. Los archivos obtenidos en formato FASTQ se analizaron utilizando el servicio *XploreRNA* de Exiqon-Qiagen. Los resultados obtenidos se estudiaron mediante la herramienta de anotación funcional de la base de datos *DAVID Database* (272). Los datos en crudo obtenidos en este análisis están disponibles en el archivo SRA del NCBI, con la siguiente numeración: *BioProject* (PRJNA669604) y *BioSamples* (SAMN16442923; SAMN16442924; SAMN16442925 and SAMN16442926).

11.2- Evaluación de la expresión génica por RT-qPCR

Para evaluar los niveles de ARNm de manera individual para genes concretos, se partió de 2 µg del ARNm obtenido de las aortas de los ratones o de las CMLVs en cultivo y se obtuvo el ADN copia (ADNc) correspondiente de cada muestra utilizando una transcriptasa inversa y un kit de alta capacidad de síntesis de ADNc (Applied Biosystems). Posteriormente, los niveles de expresión de los diferentes genes de estudio se analizaron realizando una RT-qPCR mediante el sistema *Real-Time FAST PCR 7500 (Life Technologies)*. Los *primers* murinos de expresión génica marcados con diferentes fluoróforos (FAM o VIC) y prediseñados (Applied

Biosystems) se usaron siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante utilizando el patrón de etapas, ciclos y temperaturas indicado a continuación:

- Etapa 1: Paso 1: 1 ciclo de 2 min a 50°C.
- Etapa 2: Paso 1: 1 ciclo de 10 min a 95°C.
- Etapa 3: 45 ciclos formados por dos pasos:
 - Paso 1: 15 segundos a 95°C.
 - Paso 2: 60 segundos a 60°C.

Las sondas utilizadas para los distintos análisis fueron los siguientes: *Ccn2*: Mm011924185_g1 (FAM); *S100a8*: Mm00496696_g1 (FAM); *S100a9*: Mm00656925_m1 (FAM); *Saa3*: Mm00441203_m1 (FAM); *Spp1*: Mm00436767_m1 (FAM); *Ccl8*: Mm01297183_m1 (FAM); *Tgfbr2*: Mm03024091_m1 (FAM); *Tgfbr1*: Mm00436964_m1 (FAM) y *Tgfb*: Mm01178820_m1 (FAM). El análisis de los distintos genes se realizó en la modalidad multiplex, en la cual se pueden añadir sondas para detectar más de un gen al mismo tiempo en el mismo pocillo, de tal forma que, por un lado, se cuantificó el gen diana de interés marcado con FAM y, por otro, el control endógeno de la muestra marcado con VIC, que en este caso fue el gen de la *Gapdh*: Mm99999915_g1).

12.- Análisis estadístico

Antes de la realización de cualquier análisis estadístico, se realizaron pruebas de normalidad utilizando el test Shapiro-Wilk, de manera que se pudiera definir la distribución de los datos. En los casos en los que los resultados se ajustaron a una distribución normal, se realizó el test de la *t* de *Student* de dos colas, a fin de comparar la media de dos grupos, o el test unilateral de ANOVA para comparar una variable en múltiples grupos (seguido del test post-hoc de Tukey). En el caso de los análisis de estudios bivariantes, se realizó un test bilateral de ANOVA (seguido de un test *post-hoc* de Dunnett). En aquellos casos en los que los datos no se ajustaron a una distribución normal, se realizaron, o bien el test de la *U* de Mann-Whitney para comparar dos grupos, o bien el test de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos (seguido este último de un test *post-hoc* de Dunn). Para los análisis de supervivencia, se utilizó el método de Kaplan Meier, el cual se analizó estadísticamente usando el *log-rank*, mientras que la incidencia de aneurismas se analizó mediante el test exacto de Fisher. Independientemente del tipo de distribución y del test realizado para analizar las diferencias estadísticas, los datos se expresaron como el valor medio \pm el error estándar de la media (SEM de sus siglas en inglés *Standard Error of the Mean*). Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software). Los valores por debajo de un *p value* de 0,05 ($p < 0,05$) se consideraron como estadísticamente significativos.

RESULTADOS

RESULTADOS: Objetivo 1

OBJETIVO 1.- Evaluar la estructura y la función aórtica, así como diversos parámetros generales como supervivencia y presión arterial, en ratones deficientes en CCN2, tanto en condiciones fisiológicas como en un contexto de daño vascular inducido por la infusión sistémica de angiotensina II.

La administración de tamoxifeno deletiona correctamente el gen de CCN2 en los ratones CCN2flox/floxROSA26-ERT/Cre

Para estudiar el efecto de la inhibición de CCN2 se empleó un ratón con una deficiencia inducible para el gen de CCN2 (CCN2flox/floxROSA26-ERT/Cre) regulada por la activación de la recombinasa Cre dependiente de tamoxifeno. Previamente a la intervención quirúrgica, se comprobó que las inyecciones de tamoxifeno habían activado correctamente la recombinasa Cre en los diferentes grupos donde se quería realizar la delección génica de CCN2, siguiendo para ello el protocolo especificado en la sección de *Materiales y Métodos*. Para ello, el ADN extraído de las orejas de los ratones tratados con tamoxifeno o con aceite de maíz (vehículo, grupo Control), y amplificado con los *primers* correspondientes, se cargó en un gel de agarosa al 1% contrastado con SYBRSafe para confirmar la eficacia de la delección (**Figura 15**). El análisis del tamaño de las bandas en el gel confirmó que las cuatro inyecciones de tamoxifeno eran suficientes para inducir la delección total del gen, de tal forma que los ratones del grupo Control presentaban una banda de 1003 pares de bases (pb) mientras que en los ratones tratados con tamoxifeno (CCN2-KO) la banda de amplificación presentaba un tamaño de 587 pb.

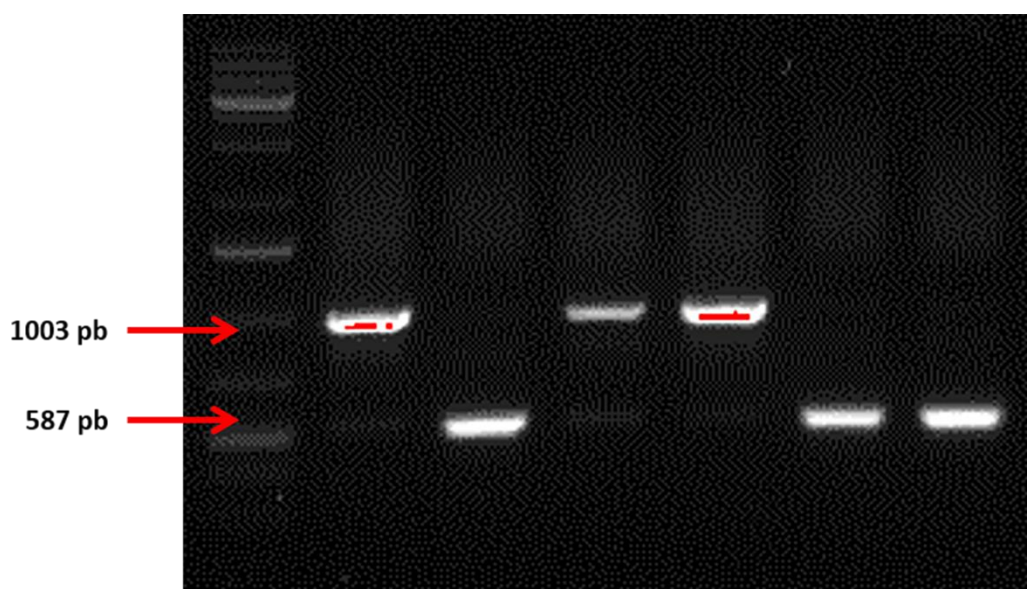


Figura 15.- Imagen representativa del genotipado de los ratones. Gel de agarosa al 1% cargado con ADN amplificado de ratones CCN2flox/floxROSA26-ERT/Cre inyectados con aceite de maíz (Control; pocillos 2, 4 y 5) y tratados con tamoxifeno (CCN2-KO; pocillos 3, 6 y 7). El primer pocillo corresponde al marcador de pesos moleculares. La banda de 1003pb representa el *Ccn2* floxeado y la banda de 587pb representa el *Ccn2* deletionado.

La administración sistémica de Ang II en ratones deficientes en CCN2 reduce la tasa de supervivencia tras 15 días.

La evaluación de la supervivencia en los diferentes grupos tras 15 días de infusión de Ang II se representó en una curva de supervivencia de Kaplan-Meier, donde se pudo observar que la administración de Ang II no produjo ningún cambio en la supervivencia de los ratones Control. Por su parte, la delección de CCN2 supuso un ligero descenso en este parámetro, mostrando una tasa de supervivencia del 90%, aunque sin llegar a mostrar diferencias significativas en comparación con el grupo Control. Por el contrario, en el caso de los ratones CCN2-KO + Ang II, la tasa de supervivencia tras 15 días se redujo significativa y drásticamente hasta un 50% (Figura 16), observando eventos de mortalidad a partir del día 2 tras la administración de Ang II.

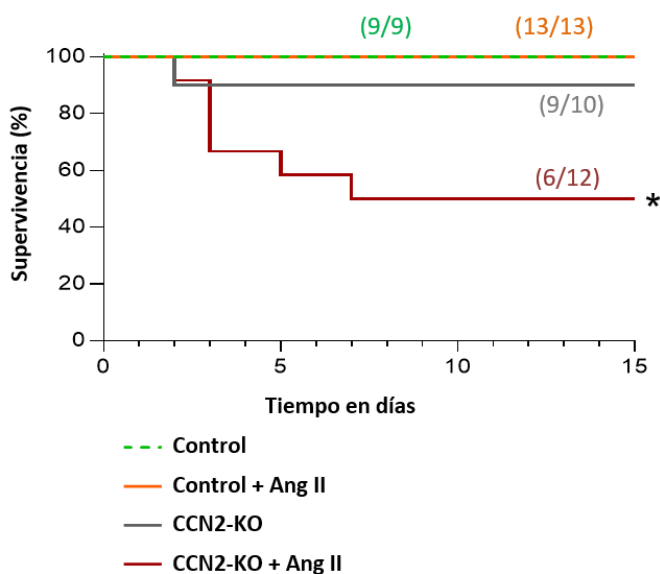


Figura 16.- Curva Kaplan-Meier del modelo de administración sistémica de Ang II. La delección de CCN2 disminuye la supervivencia tras la infusión de Ang II. Se trataron ratones Control y CCN2-KO con Ang II durante 15 días, tiempo tras el cual se evaluó la supervivencia (Curva Kaplan-Meier). N = 9 – 12. * p <0,05 incrementado vs. Control.

La administración sistémica de angiotensina II en ratones deficientes en CCN2 induce una rápida formación de aneurismas aórticos a diferentes niveles.

El análisis *post-mortem* de estos animales desveló que las muertes se debían a la formación y rotura de AAs. Además, transcurridos los 15 días de administración con Ang II, todos los animales que llegaron al punto final del modelo se sometieron a una primera evaluación aórtica visual que sirvió para determinar que un 92% de los ratones CCN2-KO + Ang II (incluyendo ratones vivos y fallecidos) desarrollaron AAs de todo tipo, según la clasificación *Crawford/Safi* (109,273), tanto en la región torácica como en la región y abdominal (aneurismas toracoabdominales) (Figura 17A). Por otro lado, los ratones de los grupos CCN2-KO y Control + Ang II presentaron porcentajes de formación de aneurismas del 30% y el 8%, respectivamente, estando localizados fundamentalmente en este caso en la región abdominal. A pesar de ello, la aparición de AAs en estos dos últimos grupos no mostró una diferencia significativa con respecto al grupo Control, en el cual la presencia de AAs fue nula (Figura 17B).

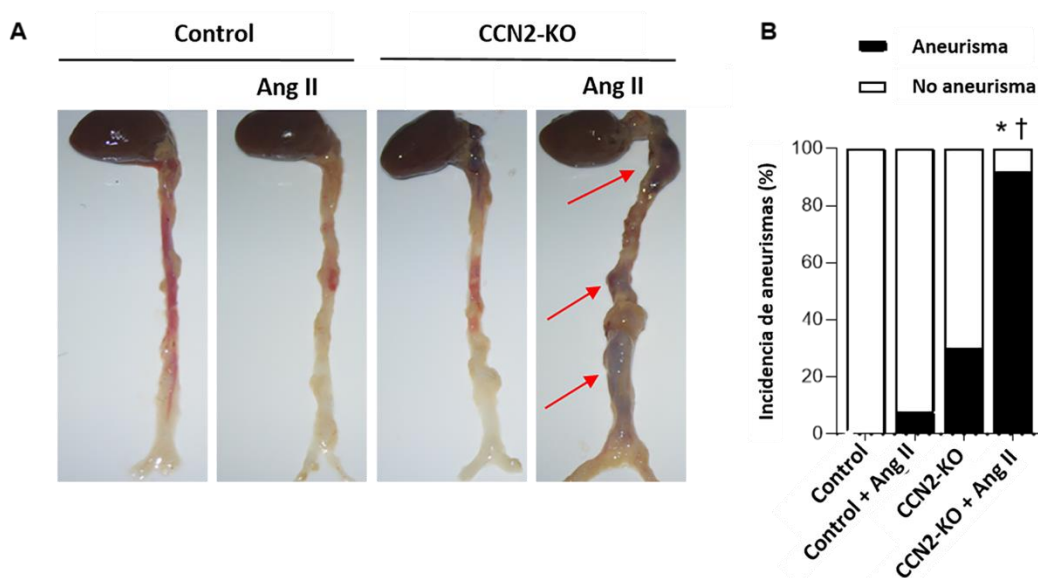


Figura 17.- La delección de CCN2 aumenta el desarrollo de AAs y su consiguiente rotura es la causa del descenso en la supervivencia. (A) Imágenes representativas de las aortas de los ratones que se usaron en el modelo experimental en las que se observa el desarrollo de aneurismas toracoabdominales en el grupo CCN2-KO + Ang II. (B) Porcentaje de aparición de AAs por grupo, mostrando un 92% en el grupo CCN2-KO + Ang II, un 30% en los ratones CCN2-KO y un 8% en ratones Control + Ang II. Los datos se representan como la media \pm SEM. * $p < 0,05$ incrementados vs. control. † $p < 0,05$ disminuido vs. Control. ‡ $p < 0,05$ vs. CCN2-KO.

Una vez confirmada la formación de AAs en el modelo estudiado y para caracterizar más detalladamente su proceso de formación y evolución, se realizaron varios modelos adicionales en los que los animales fueron monitorizados a diferentes tiempos. Por un lado, se realizó un estudio de IRM de los 4 grupos, en el que se tomaron medidas de una sección de 1 cm de la aorta, empezando desde la bifurcación de la arteria mesentérica superior, en días alternos durante 5 días. Conjuntamente, se tomaron las imágenes de la sección longitudinal aórtica, para así obtener una imagen general de la zona de formación de los AAs (**Figura 18**). A día 0, las aortas de los ratones CCN2-KO mostraron un incremento significativo tanto del área total del vaso como del área del lumen en comparación con los ratones Control. Por otro lado, tras 48 horas de administración de Ang II, tanto el área total como el área del lumen aórtico se encontraban aún más aumentadas en los ratones CCN2-KO, mientras que transcurridas 96 horas el incremento del área total del vaso era aún más exacerbado, pero existía una reducción irregular del lumen aórtico (**Figura 18**), lo cual se podía corresponder con la formación de AAs.

Posteriormente, y para confirmar los resultados observados en la IRM mediante otra técnica, en otro modelo adicional se evaluó el diámetro aórtico mediante ecografías por ultrasonidos en diferentes puntos de la aorta y a diferentes tiempos durante los 15 días de administración de Ang II. Acorde con los resultados obtenidos mediante IRM, las medidas obtenidas por ecografía confirmaron, en primer lugar, que la delección de *Ccn2* aumentaba significativamente el diámetro de la aorta abdominal (AbA) en comparación con el grupo Control (**Figura 19**). En segundo lugar, se corroboró también que la infusión sistémica de Ang II, aumentaba el diámetro de la aorta torácica descendente (TDsA) en los ratones CCN2-KO de

RESULTADOS: Objetivo 1

manera significativa y que, además, exacerbaba el incremento del diámetro aórtico ya observado en ausencia de CCN2 en la región abdominal (**Figura 19**). Estos resultados demostraron que la ausencia de CCN2 por sí misma induce un aumento en el diámetro de la pared aórtica y que la administración de Ang II exagera este incremento dando lugar a la formación de aneurismas toracoabdominales.

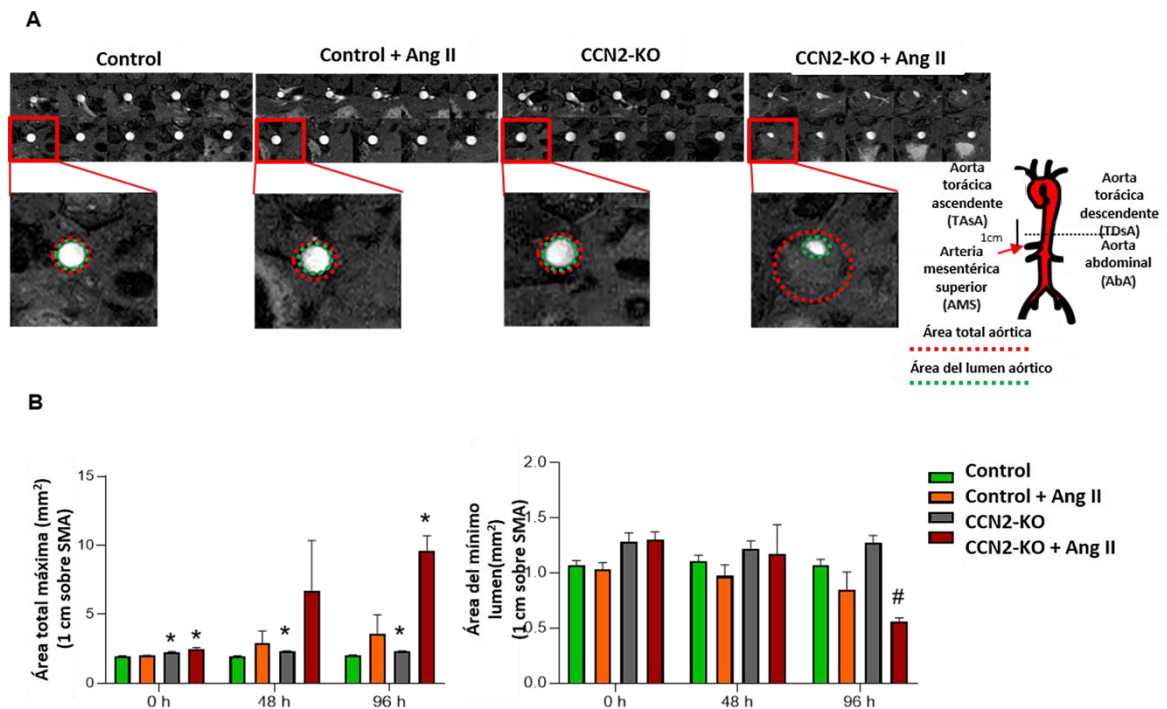


Figura 18.- La deficiencia de CCN2 induce la formación temprana de AAs en ratones en infundidos con Ang II. La IRM permitió analizar el curso temporal en la formación temprana (48h-96h) de AAs en ratones CCN2-KO tratados con Ang II. Los estudios se realizaron en una sección de 1 cm de la aorta comenzando en la arteria mesentérica superior (AMS). A) Imágenes representativas de IMR de los distintos grupos de estudio. B) Cuantificación a tiempo 0h, 48h y 96h del área total máxima y del área de lumen mínimo de las imágenes de aortas tomadas por IRM. N = 5 – 10. Los datos se muestran como media \pm SEM. * p < 0,05 incrementado vs. Control; # p < 0,05 disminuido vs. Control.

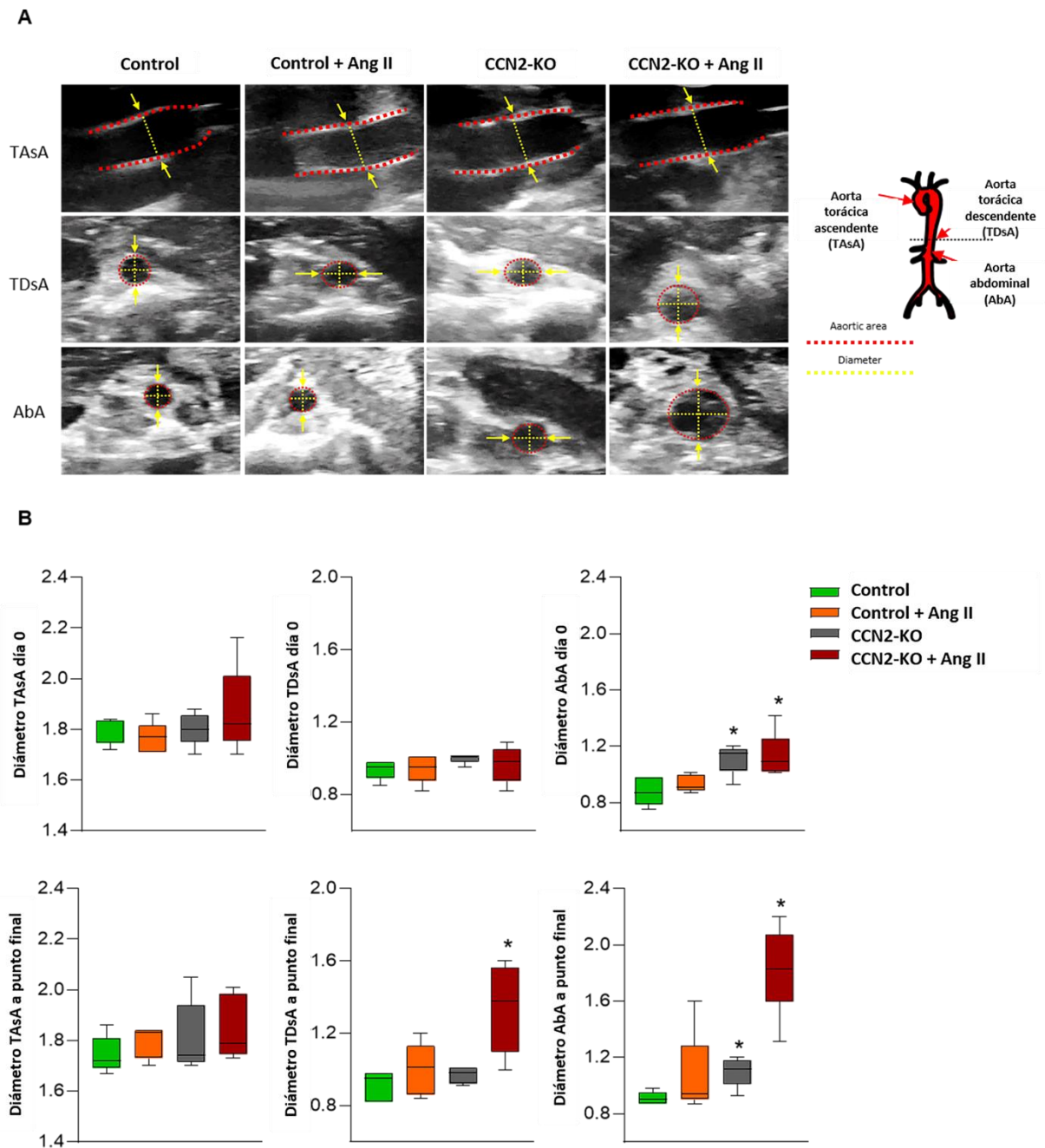


Figura 19.- La deficiencia de CCN2 predispone a la formación de aneurismas toracoabdominales en ratones en respuesta a la administración de Ang II. Las imágenes *in vivo* de ultrasonidos se tomaron a día 0 (día en que se implantó la minibomba de Ang II) y a día 15 (punto final del modelo). Se tomaron imágenes a diferentes niveles: arco aórtico, o aorta torácica ascendente (TAsA), aorta torácica descendente (TAsD) y aorta abdominal (AbA); tal y como se expone en A). Se cuantificaron los diámetros máximos a día 0 (B) y día 15(C). Las líneas de puntos rojas y amarillas delimitan el área del lumen y el diámetro aórtico respectivamente (N = 5 por grupo). Los datos se muestran en un diagrama de cajas, representando el valor mediano y el rango intercuartílico. * p < 0,05 vs. Control.

La ausencia de CCN2 disminuye la presión arterial sistólica, pero no modifica la hipertensión inducida por la administración sistémica de Ang II

Con el fin de evaluar más en profundidad los cambios funcionales producidos por la delección de CCN2 en la aorta, se determinó la presión arterial sistólica en los diferentes grupos de estudio. La administración de Ang II produjo un aumento de la presión arterial sistólica tras 15 días de estudio, el cual fue similar en todos los animales, independientemente de la presencia o la ausencia del gen de CCN2. Por el contrario, los ratones deficientes en CCN2 mostraron un ligero descenso significativo en la presión arterial sistólica en comparación con el grupo Control, hecho que fue observado desde el momento en que se comenzaron las medidas de presión (día 0) (Figura 20).

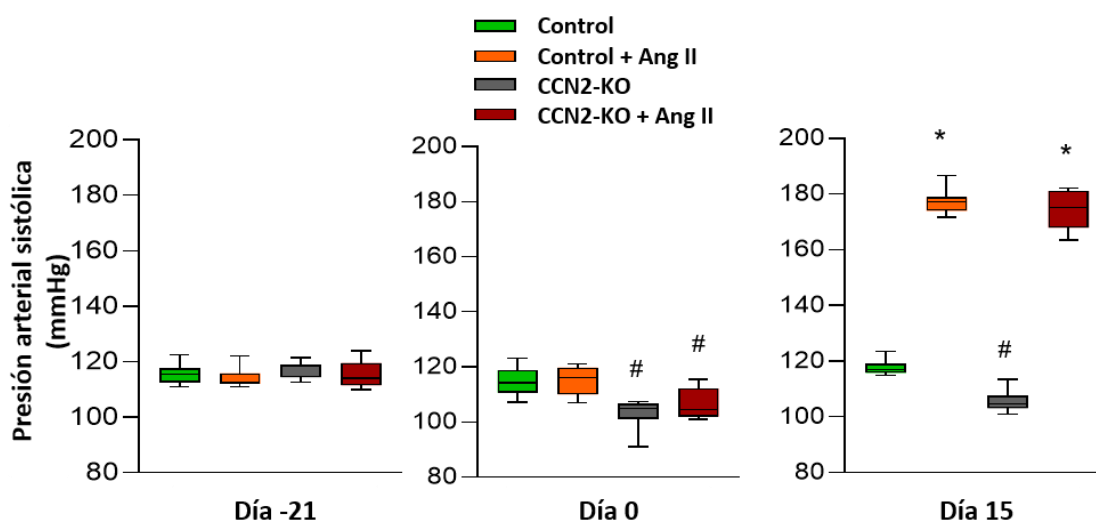


Figura 20.- Diagrama de cajas representando la evolución temporal de las medidas de presión arterial sistólica del modelo experimental desde la primera inyección de tamoxifeno (Día -21) hasta punto final (Día 15). Los datos se muestran en diagramas de cajas, representando el valor mediano y el rango intercuartílico (N = 8 - 13 ratones por grupo). *p <0,05 incrementado vs. Control; # p <0,05 disminuido vs. Control.

La deficiencia adquirida de CCN2 altera la elasticidad y la función vascular

Buscando una posible explicación para la bajada en la presión arterial observada en los ratones CCN2-KO, se decidió evaluar si este hecho podría estar relacionado con cambios en la rigidez de la aorta, para lo que se realizaron estudios de tensión-extensión *ex vivo* en segmentos aórticos de la región torácica de ratones Control y de ratones CCN2-KO. Con este estudio, se comprobó que los segmentos que provenían de ratones CCN2-KO presentaban una mayor elasticidad en comparación con los ratones Control, visto como un incremento en el parámetro 1/pendiente de la curva, así como en el desplazamiento a la izquierda en la distancia que ocupa la curva de tensión-extensión, en la que la distancia recorrida por el micrómetro se representa en el eje X y la fuerza ejercida por el segmento en el eje Y (Figura 21). En base a estos resultados, se puede inferir que los cambios en la rigidez aórtica generados por la ausencia de CCN2 podrían estar influyendo en la bajada de la presión arterial sistólica registrada en los ratones CCN2-KO.

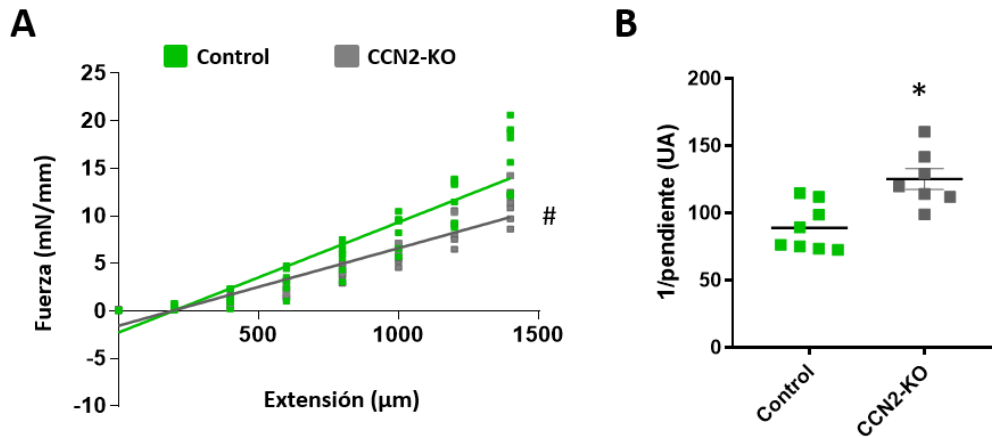


Figura 21.- Representación gráficas de las medidas de elasticidad de los segmentos aórticos. La ausencia de CCN2 altera la elasticidad en aortas de ratón. (A) Elasticidad de segmentos aórticos de ratones Control y CCN2-KO, viendo cómo estos últimos tienen un desplazamiento a la derecha, lo cual implica un aumento en la elasticidad. **(B)** Parámetro 1/pendiente. Los datos se expresan como media \pm SEM (N = 5 - 8 ratones por grupo). * $p < 0,05$ incrementado vs. Control y # $p < 0,05$ disminuido vs. Control.

Posteriormente, se evaluó el impacto de la deficiencia adquirida de CCN2 en la función vascular aórtica mediante estudios de reactividad vascular, utilizando para ello un miógrafo de tensión. En cuanto a la respuesta vasoconstrictora inducida por Phe, los segmentos aórticos de los ratones CCN2-KO mostraron un aumento en la respuesta cuando se compararon con los animales del grupo Control, reflejando unos valores similares a los observados en el grupo Control + Ang II. Por otro lado, los segmentos de los animales CCN2-KO + Ang II presentaron una respuesta vasoconstrictora aun mayor, aunque las diferencias solo fueron significativas con respecto a los valores obtenidos en los animales Control (**Figura 22A**). Por otro lado, en lo que respecta a la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por Ach, la delección de *Ccn2* mostró unos resultados similares a los observados en el grupo Control (**Figura 22B**). Sin embargo, la disfunción endotelial inducida por la Ang II, reflejada por una disminución en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, sí que se observó significativamente agravada en ausencia de CCN2 (**Figura 22B**). Estos resultados sugieren que la delección de *Ccn2* también induce cambios en la función vascular.

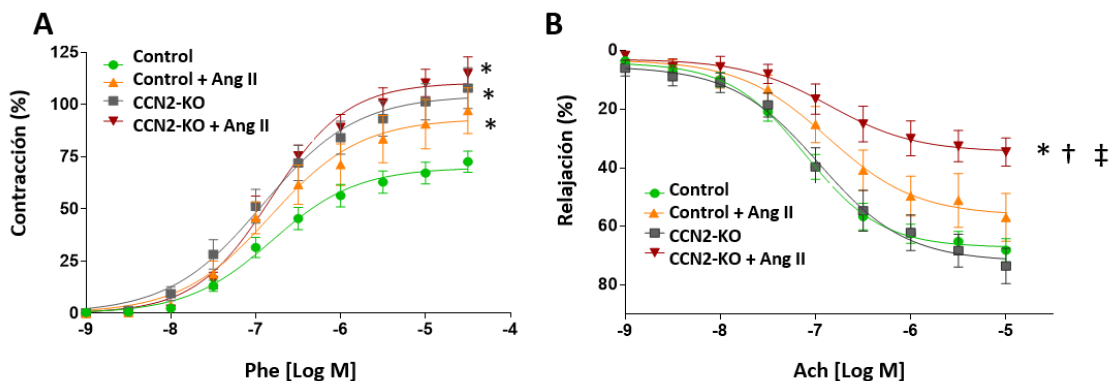


Figura 22.- Gráficas de función vascular del modelo experimental de delección de *Ccn2*. (A) Medidas de contracción en respuesta a concentraciones crecientes de fenilefrina (Phe) **(A)** y de relajación vascular dependiente de endotelio en respuesta a concentraciones crecientes de acetilcolina (Ach) **(B)** de los distintos grupos del modelo experimental. Los datos se expresan como media \pm SEM (N = 5 - 8 ratones por grupo). * $p < 0,05$ vs. Control. † $p < 0,05$ vs. Control + Ang II. ‡ $p < 0,05$ vs. CCN2-KO.

La delección de CCN2 reduce la migración y la proliferación de las CMLVs en cultivo

Con el fin de ahondar en los posibles mecanismos y/o respuestas alteradas por la ausencia de CCN2 en la pared aórtica, se realizaron diversos experimentos *in vitro* utilizando cultivos primarios de CMLVs provenientes de aortas de ratones CCN2^{flox/flox}ROSA26-ERT/Cre. De este modo, se llevó a cabo una batería de experimentos para evaluar si la delección de *Ccn2* tenía efectos en las respuestas de proliferación y migración de las CMLVs. Para ello, las células obtenidas se dividieron en dos subgrupos: células tratadas con 4-hidroxitamoxifeno, forma activa del tamoxifeno y que, por tanto, deleciona el *Ccn2* en las CMLVs (CMLVs-CCN2-KO), y células cultivadas con el vehículo de resuspensión del 4-hidroxitamoxifeno (metanol, CMLVs control). En primer lugar, mediante RT-qPCR, se confirmó que la expresión de *Ccn2* era prácticamente nula en las CMLVs-CCN2-KO (**Figura 23A**). Una vez comprobado esto, se desarrollaron ensayos de cierre de herida y de migración con *transwells*. Los resultados evidenciaron un descenso significativo en la capacidad proliferativa de las CMLVs-CCN2-KO, las cuales mostraron un porcentaje menor de cierre de herida a las 24h en comparación con las CMLVs control (**Figura 23B-C**). De igual manera, los experimentos de migración mostraron un descenso en la migración de las CMLVs-CCN2-KO en respuesta a Ang II en comparación con las células control (**Figura 23D**).

La deficiencia adquirida de CCN2 induce roturas en las capas elásticas de la aorta

Para seguir profundizando en el impacto de la deficiencia de CCN2 en la estructura aórtica en condiciones normales y en condiciones patológicas, se llevaron a cabo distintas evaluaciones histológicas en las aortas de los diferentes grupos.

Por un lado, el análisis visual de la tinción histológica de hematoxilina-eosina no reflejó cambios aparentes en la estructura aortica entre los ratones CCN2-KO y el grupo Control, aunque sirvió para determinar la estructura de los AAs que se generan tras la infusión de Ang II en los ratones deficientes en CCN2 (**Figura 24A**). De manera complementaria, la tinción histológica de Van Gieson reveló ciertas áreas donde había roturas en las fibras elásticas de la pared aórtica en los ratones CCN2-KO, las cuales estaban presentes de una manera mucho más abundante en los AAs del grupo CCN2-KO + Ang II. Además, en las aortas de este último grupo, se pudieron apreciar zonas con las capas de elastina mucho más finas o, incluso, la ausencia de estas en algunas regiones (**Figura 24B, flechas**). Conjuntamente, ambas tinciones sirvieron para demostrar que los AAs que se formaban estaban caracterizados por una pérdida de las fibras elásticas del vaso y cursaban con una extravasación de eritrocitos a las capas más externas de CMLVs, formando una estructura similar a la de un *neolumen*.

Para estudiar de manera más exhaustiva y poder confirmar las anomalías observadas en las fibras elásticas mediante histología, se llevó a cabo un estudio de ultraestructura por MET de la aorta. Mediante esta técnica, se observó cómo las láminas elásticas de las aortas provenientes de los ratones Control eran continuas y consistentes, mientras que las provenientes de los ratones CCN2-KO mostraban una anchura variable, una arquitectura aparentemente más débil y, en algunos casos, zonas donde las láminas estaban rotas (**Figura 24C**). En su conjunto, estos resultados sugieren que las alteraciones de la estructura aórtica generadas por la ausencia de CCN2 podrían ser, en parte, culpables del incremento en la susceptibilidad a la formación de AAs inducidos por la administración de Ang II.

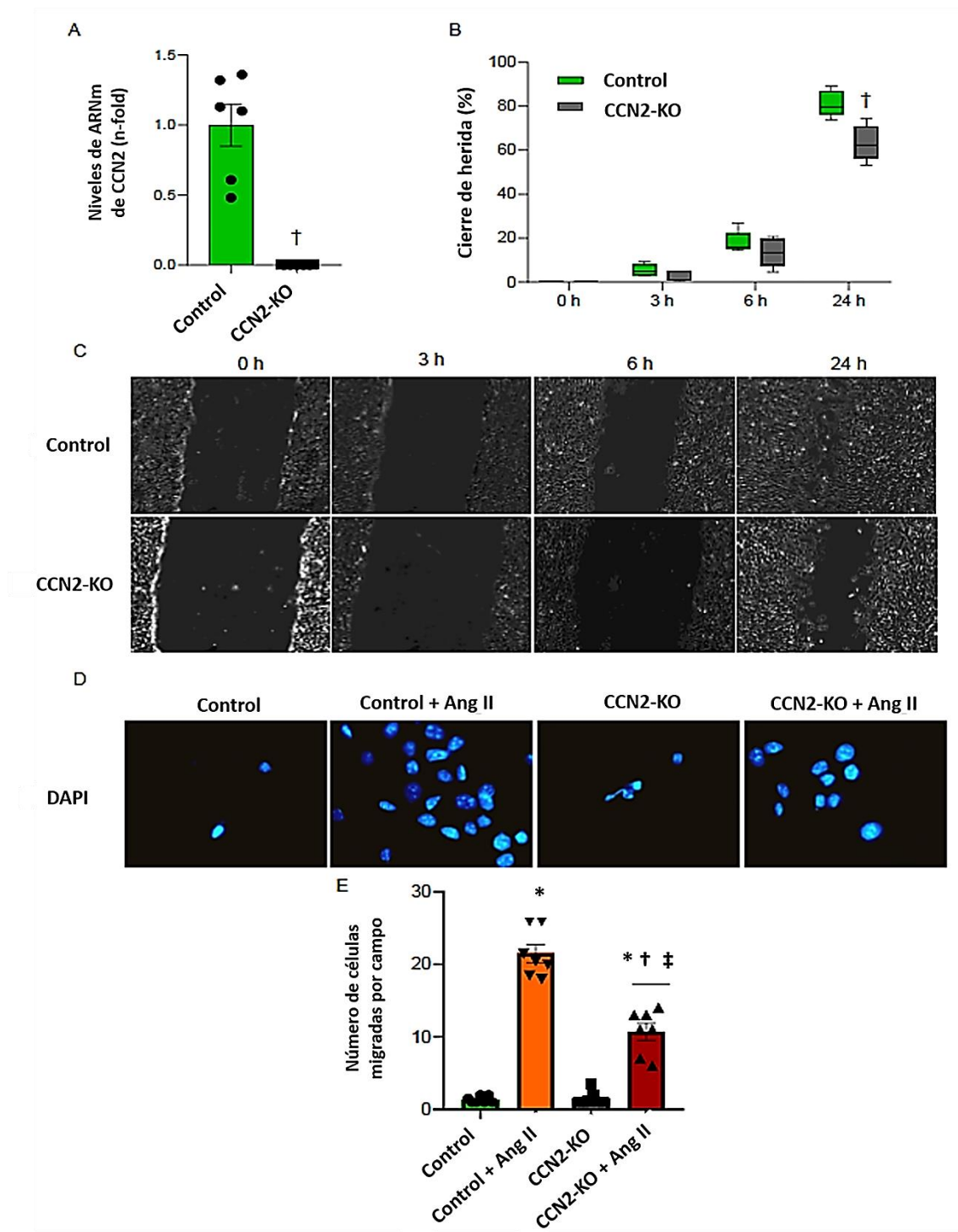


Figura 23.- La delección de *Ccn2* disminuye la función celular en términos de migración y proliferación. (A) Niveles de ARNm de *Ccn2* para confirmar la delección efectiva *in vitro*. (B) Cuantificación del porcentaje en el cierre de herida representado mediante un diagrama de cajas (mediana y rango intercuartílico) y (C) sus respectivas imágenes representativas. (D) Imágenes representativas de la migración celular en *transwells* utilizando como estímulo migratorio Ang II, junto con (E) su cuantificación mediante el número de células migradas por campo, representando media \pm SEM de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ vs. Control. † $p < 0,05$ vs. Control + Ang II. ‡ $p < 0,05$ vs. CCN2-KO.

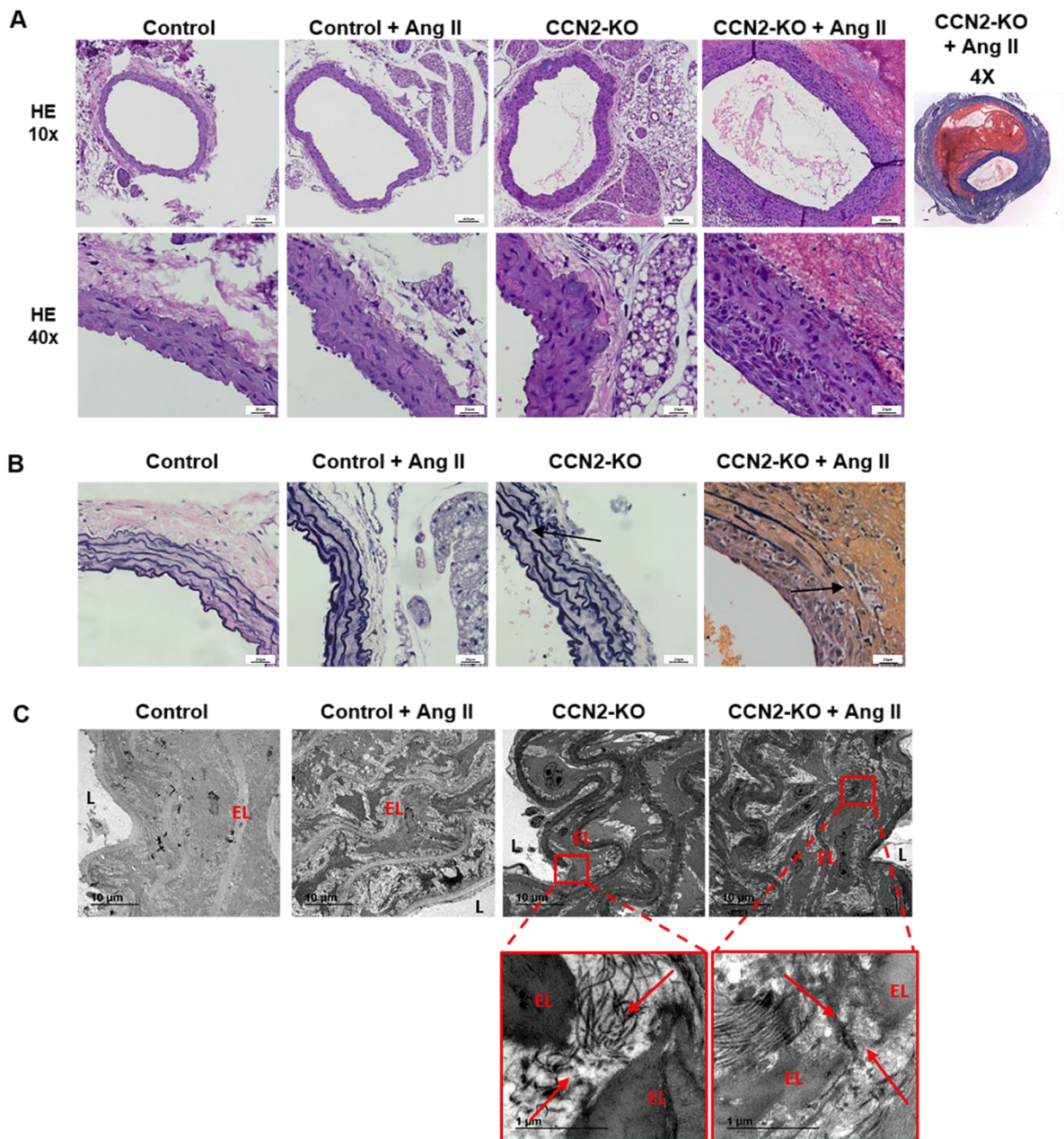


Figura 24.- Imágenes representativas de las técnicas histológicas mostrando que la deficiencia adquirida de CCN2 promueve cambios en la estructura aórtica y la composición y continuidad de las fibras elásticas en respuesta a Ang II. **(A)** Tinción de HE con objetivos de 10X y 40X (NOTA: considerando el tamaño del aneurisma, se incluye una imagen a 4X del grupo CCN2-KO + Ang II). Los aneurismas se caracterizan por la rotura de las láminas elásticas, disección de la pared aórtica y extravasación de eritrocitos a la lámina media. **(B)** Tinción de Van Gieson, observándose zonas de rotura en láminas elásticas en ratones CCN2-KO con y sin Ang II (flechas negras). **(C)** MET al aumento 2000X, marcando las fibras elásticas (EL) y la disrupción de estas en ausencia de CCN2 (incluyendo aumento 15000X). Las barras de escala son 100µm al objetivo 10X y 20µm al objetivo 40X en histología, mientras que en MET sería 10µm a 2000X y 1µm a 15000X.

La ausencia inducida de CCN2 provoca un patrón alterado de la expresión proteica en la aorta

Para evaluar si las alteraciones observadas en los estudios histológicos de las aortas de los ratones CCN2-KO se veían reflejados también en cambios a nivel proteico, se llevó a cabo un estudio para determinar los niveles de expresión de 17 proteínas relacionadas con la matriz extracelular (MEC) y el estado de las CMLVs. Para ello, se realizó una espectrometría de masas por MRM. Una vez obtenidos los valores de estas proteínas, se hicieron diferentes comparaciones entre los grupos Control vs. CCN2-KO y Control vs. Control + Ang II. En este análisis, CCN2 fue detectado en las aortas de los ratones Control (**Tabla 2**), mientras que en las aortas de los ratones CCN2-KO, sus niveles disminuyeron significativamente, demostrando la eficacia de la deleción inducida por tamoxifeno también a nivel proteico. En cuanto a la expresión diferencial del resto de proteínas, la comparación entre el grupo CCN2-KO y el grupo Control reflejó que los niveles de ACTA2 estaban también significativamente disminuidos en ausencia de CCN2, mientras que la expresión de la cadena pesada de miosina 9 (MYH9) aumentaba en, sugiriendo que la regulación de la expresión de estas proteínas está mediada, al menos en parte, por CCN2 (**Tabla 2**).

Tablas 2.- Panel de proteínas relacionadas con la matriz extracelular (MEC) previamente descritas como alteradas en modelos de desarrollo de aneurismas.

| Proteína | CCN2-KO vs. Control | | Control + Ang II vs. Control | |
|----------|---------------------|---------------|------------------------------|---------------|
| | Valor <i>p</i> | <i>N-fold</i> | Valor <i>p</i> | <i>N-fold</i> |
| CCN2 | 0.013 | 0.46 | < 0.001 | 2.36 |
| ACTA2 | 0.019 | 0.79 | 0.351 | 0.92 |
| MYH9 | 0.025 | 1.99 | 0.011 | 1.62 |
| ACTN4 | 0.052 | 1.32 | 0.026 | 1.29 |
| BGN | 0.104 | 1.48 | 0.091 | 1.32 |
| ITA1 | 0.118 | 1.54 | 0.152 | 1.21 |
| VCL | 0.118 | 0.86 | 0.605 | 0.96 |
| COL4A1 | 0.119 | 0.58 | 0.073 | 0.64 |
| DES | 0.140 | 0.83 | 0.167 | 0.88 |
| VIM | 0.142 | 1.40 | 0.104 | 1.24 |
| LAMB2 | 0.193 | 1.26 | 0.802 | 1.03 |
| FBN1 | 0.284 | 0.69 | 0.138 | 0.68 |
| MYH10 | 0.349 | 1.16 | 0.345 | 1.08 |
| PLC | 0.427 | 1.13 | 0.345 | 1.10 |
| FBLN5 | 0.652 | 0.94 | 0.545 | 1.08 |
| COL4A2 | 0.789 | 0.97 | 0.861 | 0.99 |
| ITB1 | 0.843 | 1.03 | 0.916 | 0.99 |

En lo que respecta a la respuesta a la administración de Ang II en animales Control, dentro del panel de proteínas estudiado, CCN2 fue la proteína que mostró una expresión más aumentada (2,36 *fold*), lo cual estaría reforzando la importancia del rol que desempeña CCN2 en la respuesta vascular mediada por Ang II y, por ende, en la respuesta adaptativa y protectora tras la infusión de Ang II.

La deficiencia adquirida de CCN2 aumenta la actividad metaloproteinasa en la aorta

Teniendo en cuenta el papel crucial que tienen las MMPs en la formación y rotura de los aneurismas en numerosos modelos experimentales, el siguiente paso fue evaluar si la delección de *Ccn2* desregulaba los niveles de MMPs y/o su actividad en la pared aórtica. Para ello, se llevó a cabo una zimografía en gel usando lisados de proteína de las aortas completas de los ratones. Los resultados obtenidos de este análisis mostraron que la actividad de dos de las MMPs más importantes en el desarrollo de aneurismas, MMP-2 y MMP-9, era significativamente mayor en los ratones CCN2-KO en comparación con el grupo Control (**Figura 25A**). Sumado a ello, la actividad de ambos tipos de MMPs se encontró también aumentada tanto en el grupo Control + Ang II como en el grupo CCN2-KO + Ang II (**Figura 25A**).

Para complementar los análisis de actividad de las MMPs, mediante WB se analizó la cantidad relativa de MMP-8, tanto en su isoforma latente como en su forma activa. De igual manera que en la zimografía en gel, se observó que, en el grupo CCN2-KO, la concentración relativa de MMP-8 aumentaba significativamente, efecto que se encontró aún más exacerbado en el grupo CCN2-KO + Ang II (**Figura 25B**).

Finalmente, se llevó a cabo también una zimografía *in situ* en secciones de la aorta torácica descendente de los ratones para intentar localizar las zonas concretas de la aorta en las que se estaba produciendo el incremento de la actividad metaloproteinasa. En las secciones aórticas de los ratones Control sólo se detectó una actividad MMP residual, mientras que en las secciones de los grupos Control + Ang II y CCN2-KO se observó un incremento local de la actividad de las MMPs entre las capas elásticas. Este aumento se encontraba más pronunciado aún en las regiones aneurismáticas del grupo CCN2-KO + Ang II (**Figura 25C**).

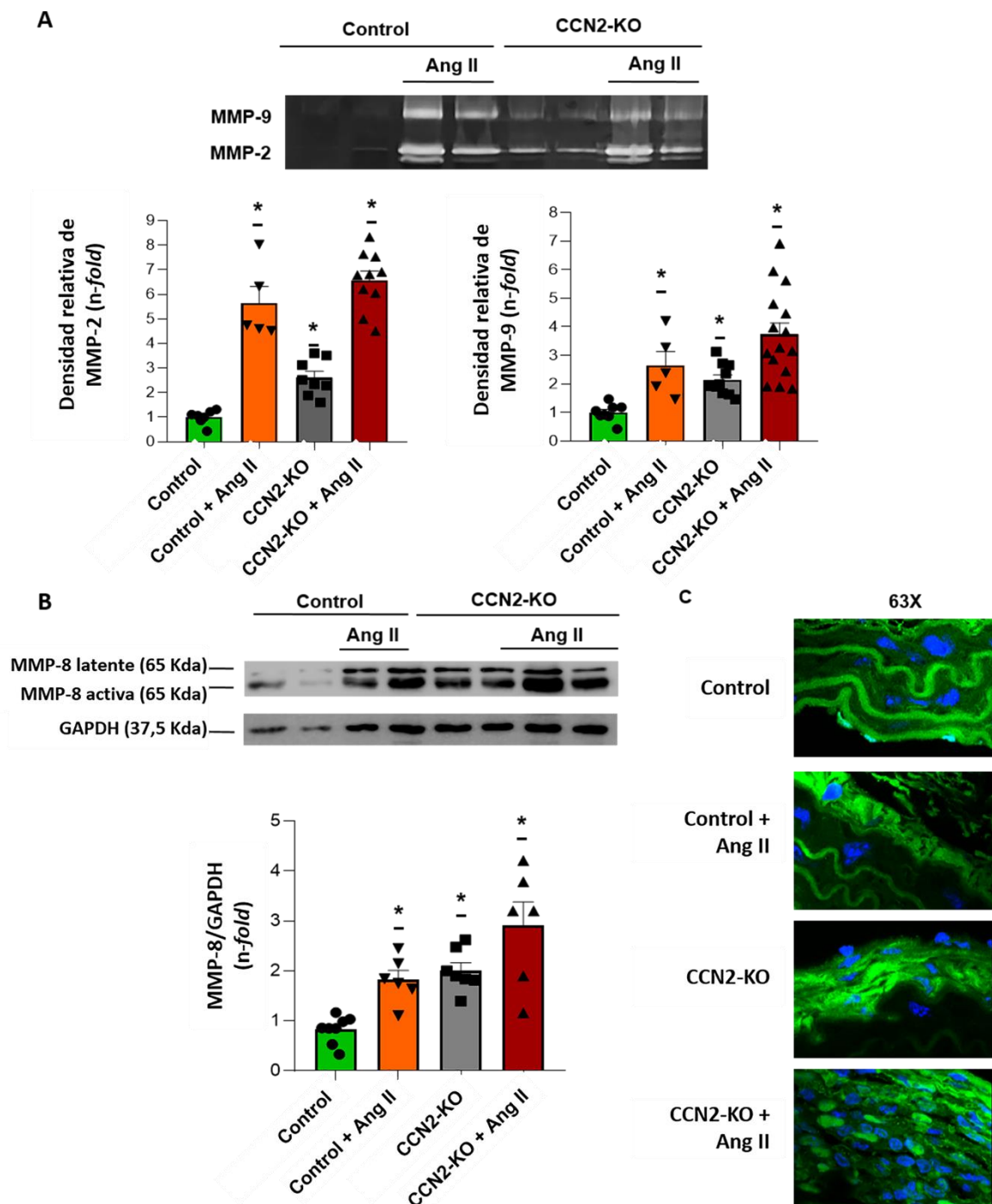


Figura 25.- La delección de *Ccn2* incrementa las metaloproteinasas de matriz (MMPs) vasculares. La actividad o niveles de MMP se evaluaron en lisados de proteínas totales de aorta. (A) Imágenes representativas de zimografía en gel y su cuantificación, y (B) western blot de MMP-8 junto con su cuantificación, en las que se muestra un aumento de las actividades de MMP-2 y -9 y los niveles proteicos de MMP-8 en aortas de ratones CCN2-KO con y sin Ang II. (C) Evaluación de la actividad MMP *in situ* en aortas preservadas en parafina sometidas a una incubación con el sustrato fluoróforo *DQ-Gelatin*. Las aortas CCN2-KO y Control + Ang II muestran una intensidad de fluorescencia similar, observada fundamentalmente entre las láminas elásticas, mientras que se observa un aumento abrupto de la señal de fluorescencia en el grupo CCN2-KO + Ang II. N = 5 - 10 ratones por grupo. Los datos se muestran como media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs Control.

OBJETIVO 2.- Determinar si la administración sistémica del CCN2(IV) recombinante modifica los efectos observados por la delección génica de CCN2 en el modelo de daño vascular.

La administración del fragmento C-terminal de CCN2 recombinante no previene la formación de AAs inducida por la infusión sistémica de Ang II en los ratones CCN2-KO

Para evaluar si la administración previa y mantenida del CCN2(IV) podía prevenir o reducir la formación de AAs inducida por Ang II en los ratones deficientes en CCN2, se realizó un nuevo modelo experimental en el que a un grupo de ratones se les administró este péptido de manera sistémica desde el día previo a la primera inyección con tamoxifeno y hasta el final del estudio. Una vez administradas las 4 dosis de tamoxifeno y transcurridos los 15 días de lavado de tamoxifeno, este grupo de ratones CCN2-KO+CCN2(IV) fue infundido también con Ang II (CCN2-KO+CCN2(IV) + Ang II). Transcurridos 15 días desde la administración de Ang II, se comprobó que la infusión sistémica y continua de CCN2-IV no protegía de la formación de AAs ni del aumento en la mortalidad observada en los ratones CCN2-KO + Ang II (**Figura 26**).

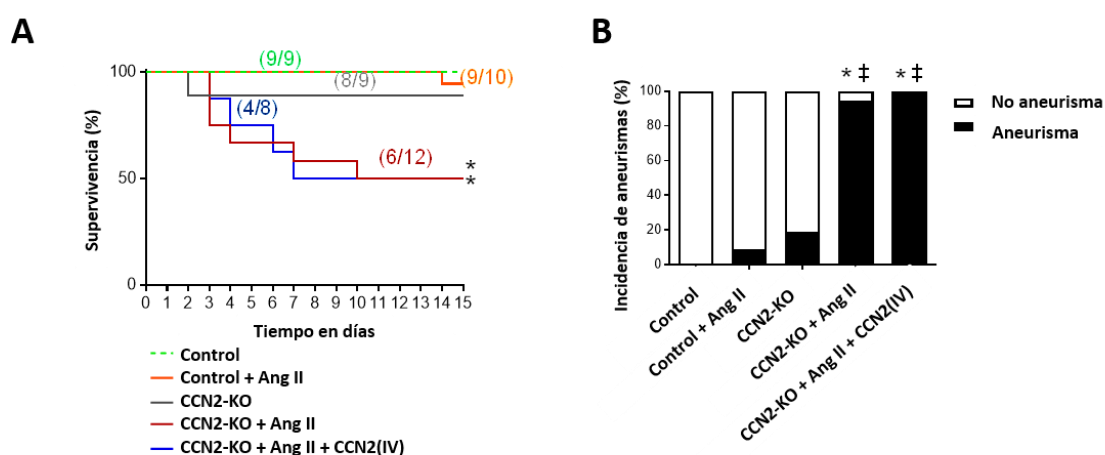


Figura 26.- Evaluación de supervivencia e incidencia de AAs tras la administración exógena de CCN2(IV) en ratones CCN2-KO tratados con Ang II. (A) Curva Kaplan-Meier del modelo de administración sistémica preventiva de CCN2(IV) y **(B)** porcentaje de desarrollo de aneurismas. Los datos se muestran como media \pm SEM. N = 8 – 12. * p < 0,05 vs. Control. ‡ p < 0,05 vs. CCN2-KO.

OBJETIVO 3.- Realizar una transcriptómica de las aortas del modelo experimental de daño vascular para analizar los potenciales mecanismos implicados en los efectos observados.

La deficiencia adquirida de CCN2 modifica el patrón de expresión génica inducido por Ang II en la aorta

Para estudiar el potencial efecto generado por la deficiencia de CCN2 en el patrón de expresión génica de la aorta, tanto en condiciones fisiológicas como en respuesta al daño inducido por Ang II, se llevó a cabo un estudio ARNsec en las aortas de los diferentes grupos. Con los datos obtenidos en la secuenciación, se realizó, en primer lugar, un mapa de calor en dos dimensiones en el que se pudo apreciar una clara separación en el patrón de expresión génica de los ratones del grupo CCN2-KO + Ang II en comparación con los otros tres grupos de estudio (**Figura 27**). Por otro lado, los grupos CCN2-KO y Control + Ang II también mostraron diferencias en el patrón de expresión génica en comparación con el grupo Control (**Tabla 3**).

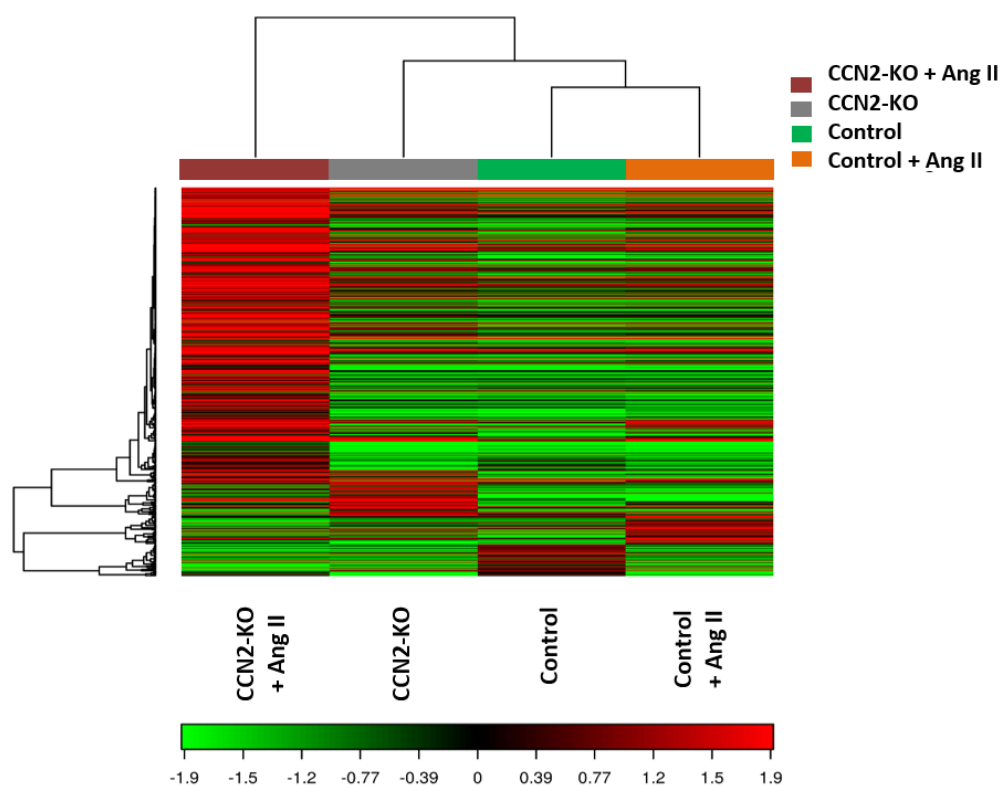


Figura 27.- Diagrama del mapa de calor mostrando en cada columna el *pool* de ARNm de entre 8-10 aortas por cada grupo de ratones.

Posteriormente, se realizó un análisis de ontología génica (GO; del inglés *Gene Ontology*), utilizando los 101 genes que mostraron una desregulación mayor en la comparativa entre el grupo Control + Ang II vs. el grupo Control (**Tabla 3**).

RESULTADOS: Objetivo 3

Tabla 3.- Listado de genes más desregulados por Ang II. La tabla muestra 101 genes desregulados en el análisis comparativo entre los grupos Control y Control + Ang II (Valor Q < 0,5; *N-fold* < 0,6) usados para desarrollar el análisis de los términos de ontología genética posterior.

| Gen | <i>N-fold</i> | Valor Q | Gen | <i>N-fold</i> | Valor Q | Gen | <i>N-fold</i> | Valor Q |
|-----------|---------------|-----------|-----------|---------------|-----------|----------|---------------|-----------|
| Bpifa1 | 6.09278 | 0.402144 | Kcna7 | 1.29903 | 0.439346 | Ralgapa2 | -1.51402 | 0.438702 |
| Ltf | 4.8131 | 0.0784671 | Tnni2 | 1.29811 | 0.0784671 | Sel1l | -1.518 | 0.447171 |
| Ngp | 4.37818 | 0.0784671 | Myoz1 | 1.26288 | 0.0784671 | Cdca7 | -1.60145 | 0.439346 |
| Camp | 3.63239 | 0.447171 | Myh2 | 1.24445 | 0.233975 | Kmt2d | -1.64445 | 0.142984 |
| Igkv4-86 | 3.50615 | 0.389958 | Lox | 1.21287 | 0.447171 | Ly75 | -1.66099 | 0.439346 |
| Chil3 | 3.18853 | 0.0784671 | Tcap | 1.2078 | 0.0784671 | Gck | -1.73365 | 0.296968 |
| S100a8 | 3.13465 | 0.0784671 | Wfdc17 | 1.15392 | 0.487447 | Otud3 | -1.77669 | 0.447171 |
| S100a9 | 2.62486 | 0.0784671 | Klhl31 | 1.1414 | 0.439346 | Satb1 | -1.96113 | 0.296968 |
| Serpine1 | 2.44701 | 0.0784671 | Ckm | 1.12741 | 0.439346 | Lmbrd2 | -2.07852 | 0.439346 |
| Igkv19-93 | 2.39048 | 0.0784671 | Hrc | 1.12686 | 0.0784671 | Rnf213 | -2.08114 | 0.439346 |
| Ampd1 | 2.2244 | 0.402144 | Trim72 | 1.07286 | 0.438702 | Adam12 | -2.09068 | 0.447171 |
| Igkv8-30 | 2.11904 | 0.0784671 | Marco | 1.05972 | 0.268096 | Nmnat2 | -2.13881 | 0.447171 |
| Saa3 | 2.07298 | 0.0784671 | Klhl41 | 1.05308 | 0.438702 | Krt18 | -2.14335 | 0.0784671 |
| Lcn2 | 2.07123 | 0.0784671 | Myh7 | 1.04904 | 0.233975 | Krt8 | -2.19893 | 0.0784671 |
| Tnnt3 | 1.99441 | 0.447171 | Myoz2 | 1.04193 | 0.439346 | Plxna1 | -2.20281 | 0.142984 |
| Lyn | 1.94922 | 0.439346 | Mt2 | 1.03701 | 0.415116 | Kpna6 | -2.20377 | 0.439346 |
| Ighv7-3 | 1.93447 | 0.233975 | Myh4 | 1.03475 | 0.415116 | Themis | -2.23441 | 0.415116 |
| Olfml3 | 1.88264 | 0.438702 | Cox6a2 | 1.01026 | 0.189244 | Man2a1 | -2.26123 | 0.412455 |
| Dnmt1 | 1.83489 | 0.447171 | Pgam2 | 0.945882 | 0.438702 | Pclo | -2.3292 | 0.439346 |
| Ano5 | 1.75665 | 0.439346 | Ctgf | 0.910638 | 0.439346 | Top2a | -2.51633 | 0.0784671 |
| Hba-a2 | 1.75358 | 0.0784671 | Mki67 | -1.02567 | 0.447171 | Trat1 | -2.58295 | 0.142984 |
| Hba-a1 | 1.74791 | 0.0784671 | Elovl6 | -1.14189 | 0.439346 | Cd8a | -2.59805 | 0.438702 |
| Hbb-b1 | 1.63834 | 0.0784671 | Kif5a | -1.14976 | 0.439346 | Uhrf1 | -2.65937 | 0.435656 |
| Hbb-b2 | 1.55452 | 0.0784671 | Abcc1 | -1.25701 | 0.439346 | Rapgef6 | -2.8461 | 0.438702 |
| Tbx15 | 1.48661 | 0.402144 | Insig1 | -1.2714 | 0.439346 | Xpr1 | -2.87525 | 0.412455 |
| Ccl8 | 1.48625 | 0.0784671 | Gm8113 | -1.3053 | 0.447171 | Mcmbp | -2.89271 | 0.439346 |
| Cyr61 | 1.47668 | 0.0784671 | Cyp51 | -1.30831 | 0.189244 | Tnpo1 | -3.22596 | 0.506069 |
| Myl2 | 1.45095 | 0.415116 | Cd8b1 | -1.35408 | 0.189244 | Myb | -3.3702 | 0.0784671 |
| Cd5l | 1.42913 | 0.402144 | Serpina3b | -1.36621 | 0.435656 | Ccl25 | -3.66598 | 0.412455 |
| Eno3 | 1.37453 | 0.439346 | Smc1a | -1.36996 | 0.457825 | Specc1l | -3.91818 | 0.439346 |
| Tmod4 | 1.36411 | 0.439346 | Eya3 | -1.37191 | 0.447171 | Krt5 | -4.4809 | 0.439346 |
| Atf3 | 1.35622 | 0.439346 | Gnl3l | -1.38877 | 0.439346 | Dntt | -7.1519 | 0.296968 |
| Ankrd2 | 1.33863 | 0.439346 | Tmod2 | -1.42908 | 0.412455 | Mgll | -33.3562 | 0.268096 |
| Tnnc2 | 1.32379 | 0.0784671 | Bcl11b | -1.47549 | 0.439346 | | | |

En cuanto al papel que ejercen estos 101 genes en los procesos biológicos (PB), se pudieron identificar los procesos de ensamblamiento de miofibrilina, el sistema inmune, la contracción muscular y la contracción del músculo esquelético como los términos GO estadísticamente más enriquecidos. En el caso de su localización en los componentes celulares (CC), el análisis mostró que los términos más enriquecidos fueron el complejo de hemoglobina, miofibrilina, discos Z, complejo de troponina y el espacio extracelular. Finalmente, en lo que respecta a la función molecular (FM) de estos genes, los términos más enriquecidos fueron la

RESULTADOS: Objetivo 3

actividad de transporte de oxígeno, la unión FATZ (del inglés *Filamin-, α -Actinin-, and Telethonin-binding protein of the Z-disk*), la unión del receptor tipo *Toll* (TLR) 4 y la unión de actina.

Para evaluar las posibles diferencias en el patrón de expresión génica en respuesta a Ang II generado por la delección de *Ccn2*, se realizó una nueva comparativa entre los grupos Control + Ang II y CCN2-KO + Ang II. De este modo, los 101 genes más desregulados en el grupo Control + Ang II (**Tabla 4**) estudiados anteriormente se subdividieron en 4 conjuntos de genes de acuerdo a sus diferentes patrones de expresión en el grupo CCN2-KO + Ang II (Tabla 4):

- Lista 1) genes que aumentaban en el grupo Control + Ang II pero no en el grupo CCN2+ Ang II.
- Lista 2) genes que disminuían en el grupo Control + Ang II pero no el grupo CCN2+ Ang II.
- Lista 3) genes que disminuían en el grupo Control + Ang II y lo hacían aún más en el grupo CCN2+ Ang II.
- Lista 4) genes que aumentaban en el grupo Control + Ang II y lo hacían aún más en el grupo CCN2+ Ang II.

Una vez subdivididos, se realizó un análisis de los términos GO para cada uno de estos subgrupos de genes.

En lo que respecta al análisis de los genes aumentados en el grupo Control+ Ang II pero que no aumentaban en el grupo CCN2-KO + Ang II (Lista 1; 29 genes), los PB más enriquecidos estaban fundamentalmente relacionados con la regulación de la contracción muscular y el ensamblamiento de la miofibrilina (**Tabla 5**). Por otro lado, en el análisis de los términos GO para aquellos genes aumentados por Ang II y que aumentaban más aún en ausencia de CCN2 (Lista 4; 16 genes), los PB más enriquecidos se encontraban relacionados con procesos inflamatorios (**Tabla 6**). Finalmente, el análisis GO de los genes pertenecientes a las listas 2 y 3 no mostró diferencias significativas para ningún término GO.

Tabla 4.- Genes de la Tabla 3 separados de acuerdo a sus diferentes niveles con respecto al grupo CCN2-KO + Ang II.

| Lista 1 | Lista 2 | Lista 3 | Lista 4 |
|--|---|---|--|
| Aumentados en Control + Ang II, pero no en CCN-2 + Ang II | Disminuidos en Control + Ang II, pero no en CCN-2 + Ang II | Disminuidos en Control + Ang II, y más aún en CCN-2 + Ang II | Aumentados en Control + Ang II, y más aún en CCN-2 + Ang II |
| Ngp | Mki67 | Elovl6 | Bpifa1 |
| Camp | Smc1a | Insig1 | Ltf |
| Igkv4-86 | Eya3 | Gm8113 | Chil3 |
| Ampd1 | Cdca7 | Cd8b1 | S100a8 |
| Igkv8-30 | Lmbrd2 | Serpina3b | S100a9 |
| Tnnt3 | Rnf213 | Gnl3l | Serpine1 |
| Ighv7-3 | Adam12 | Tmod2 | Igkv19-93 |
| Dnmt1 | Krt18 | Bcl11b | Saa3 |
| Ano5 | Krt8 | Gck | Lcn2 |
| Tbx15 | Plxna1 | Nmnat2 | Olfml3 |
| Myl2 | Man2a1 | Themis | Ccl8 |
| Eno3 | Top2a | Cd8a | Cd5l |
| Tmod4 | Uhrf1 | | Ankrd2 |
| Atf3 | Ragef6 | | Lox |
| Tnnc2 | Xpr1 | | Wfdc17 |
| Kcna7 | Mcmbp | | Mt2 |
| Tnni2 | Tnpo1 | | |
| Myoz1 | Specc1l | | |
| Myh2 | Krt5 | | |
| Tcap | Dntt | | |
| Klhl31 | Mgll | | |
| Ckm | | | |
| Hrc | | | |
| Myh7 | | | |
| Myoz2 | | | |
| Myh4 | | | |
| Cox6a2 | | | |
| Pgam2 | | | |
| CCN2 | | | |

RESULTADOS: Objetivo 3

Tabla 5.- Análisis de enriquecimiento de términos GO usando los 29 genes aumentados por Ang II en animales Control, pero no en el CCN2-KO. Sólo términos con valor $p < 0,05$ ajustado por el procedimiento de Benjamini se han incluido.

| Categoría | Término | Conteo | % | Valor p | Enriquecimiento (N-fold) | Benjamini |
|------------------|---------------------------------------|---------------|----------|----------------|---------------------------------|------------------|
| GOTERM_BP_DIRECT | Contracción músculo esquelético | 5 | 17,2 | 0,000000042 | 133,7 | 0,0000079 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Contracción músculo cardiaco | 4 | 13,8 | 0,0000039 | 58 | 0,0037 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Contracción muscular | 4 | 13,9 | 0,0000044 | 55,6 | 0,0028 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Ensambliamiento de miofibrilina | 3 | 10,3 | 0,00019 | 139,1 | 0,0091 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Regulación de la contracción muscular | 3 | 10,3 | 0,00046 | 90,7 | 0,017 |
| Categoría | Término | Conteo | % | Valor p | Enriquecimiento (N-fold) | Benjamini |
| GOTERM_CC_DIRECT | Discos Z | 5 | 17,2 | 0,000015 | 31,7 | 0,0008 |
| GOTERM_CC_DIRECT | Miofibrilina | 4 | 13,8 | 0,000015 | 78,6 | 0,00042 |
| GOTERM_CC_DIRECT | Complejo de troponina | 3 | 10,3 | 0,00004 | 294,9 | 0,00073 |
| GOTERM_CC_DIRECT | Complejo de miosina | 3 | 10,3 | 0,0018 | 45,4 | 0,025 |
| Categoría | Término | Conteo | % | Valor p | Enriquecimiento (N-fold) | Benjamini |
| GOTERM_MF_DIRECT | Uniones a actina | 8 | 27,6 | 0,000000046 | 15,3 | 0,0000043 |
| GOTERM_MF_DIRECT | Uniones FATZ | 3 | 10,3 | 0,0000021 | 387,7 | 0,001 |

RESULTADOS: Objetivo 3

Tabla 6.- Análisis de enriquecimiento de términos GO usando los 16 genes aumentados por Ang II en animales Control y aún más en el CCN2-KO. Sólo términos con valor $p < 0,05$ ajustado por el procedimiento de Benjamini se han incluido.

| Categoría | Término | Conteo | % | Valor p | Enriquecimiento (N-fold) | Benjamini |
|------------------|---|--------|------|--------------|--------------------------|-------------|
| GOTERM_BP_DIRECT | Procesos del sistema inmune | 6 | 37,5 | 0,0000046 | 20,2 | 0,00071 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Regulación positiva de la respuesta inflamatoria | 4 | 25 | 0,000011 | 82 | 0,00085 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Respuesta celular a IL-1 | 4 | 25 | 0,000023 | 64,6 | 0,0012 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Respuesta inflamatoria | 5 | 31,2 | 0,00008 | 18,8 | 0,003 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Quimiotaxis de neutrófilos | 3 | 18,8 | 0,0011 | 56,2 | 0,033 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Agregación de neutrófilos | 2 | 12,5 | 0,0014 | 1291,6 | 0,036 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Regulación negativa de la formación de biopelículas en o sobre organismos huésped | 2 | 12,5 | 0,0014 | 1291,6 | 0,036 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Cicatrización | 3 | 18,8 | 0,002 | 41,2 | 0,043 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Respuesta inmune innata | 4 | 25 | 0,0026 | 12,9 | 0,048 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Regulación positiva de la secreción de péptidos | 2 | 12,5 | 0,0029 | 645,8 | 0,047 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Quimiotaxis | 3 | 18,8 | 0,0031 | 32,8 | 0,047 |
| GOTERM_BP_DIRECT | S-nitrosilación de cisteínas | 2 | 12,5 | 0,0036 | 516,6 | 0,048 |
| Categoría | Término | Conteo | % | Valor p | Enriquecimiento (N-fold) | Benjamini |
| GOTERM_CC_DIRECT | Región extracelular | 12 | 75 | 0,0000000078 | 9 | 0,000000026 |
| GOTERM_CC_DIRECT | Espacio extracelular | 9 | 56,2 | 0,0000023 | 7,8 | 0,000039 |
| Categoría | Término | Conteo | % | Valor p | Enriquecimiento (N-fold) | Benjamini |
| GOTERM_MF_DIRECT | Enlaces a TLR-4 | 3 | 18,8 | 0,0000051 | 747,7 | 0,00023 |

La deficiencia adquirida de CCN2 altera el patrón de expresión génica a nivel aórtico

Adicionalmente a los estudios de los patrones de expresión génica producidos en las aortas en respuesta a Ang II, se realizó un análisis GO usando los 67 genes obtenidos en el ARNsec cuya expresión mostró diferencias significativas al comparar el grupo CCN2-KO vs. el grupo Control, independientemente de la infusión de Ang II (**Tabla 7**). Los resultados de la categoría PB mostraron como términos más enriquecidos la síntesis de la hormona esteroidea C21, los procesos biosintéticos, el metabolismo del colesterol, la biosíntesis esteroidea, el metabolismo esteroideo y la biosíntesis de aldosterona. Por su parte los términos CC más enriquecidos fueron la región extracelular, el espacio extracelular, la secreción granular y la cresta mitocondrial. Finalmente, los términos que presentaron un mayor enriquecimiento en la FM fueron la unión al TLR4, la unión a proteínas *Scaffold*, la unión al ion de hierro y la actividad oxidorreductasa (**Tabla 8**).

Tabla 7.- Listado de los genes más desregulados por la delección de CCN2. La tabla muestra 67 genes diferencialmente expresados en el análisis comparativo entre los grupos Control y CCN2-KO (Valor-Q < 0,5; *N-fold* > 0.6) usados para llevar a cabo el análisis de enriquecimiento de procesos de ontología genética (GO).

| Gen | N-fold | Valor Q | Gen | N-fold | Valor Q |
|---------------|---------|-----------|-----------|----------|-----------|
| Cyp11b2 | 6.94059 | 0.198556 | Spp1 | 2.37008 | 0.105462 |
| Srd5a2 | 6.73572 | 0.0564316 | Ighv7-1 | 2.22081 | 0.36074 |
| Akr1b7 | 6.53808 | 0.0564316 | S100a8 | 2.17604 | 0.198556 |
| Pnmt | 6.48425 | 0.481115 | Olfml3 | 2.11032 | 0.471398 |
| Cyp11b1 | 6.2972 | 0.0564316 | S100a9 | 1.93456 | 0.318475 |
| Cyp21a1 | 6.26105 | 0.0564316 | Wwc1 | 1.81276 | 0.461512 |
| Nr5a1 | 6.16508 | 0.227054 | Abhd2 | 1.76731 | 0.0564316 |
| Star | 6.11131 | 0.0564316 | Ccl8 | 1.74912 | 0.0564316 |
| Cyp11a1 | 5.99978 | 0.0564316 | Igfbp2 | 1.7452 | 0.408198 |
| Hao2 | 5.90397 | 0.289494 | Cacna1h | 1.65763 | 0.146209 |
| Akr1cl | 5.83252 | 0.0564316 | Soat1 | 1.63034 | 0.0564316 |
| Mgarp | 5.50678 | 0.0564316 | Paqr8 | 1.61796 | 0.461512 |
| Trank1 | 5.22246 | 0.0564316 | Serpina3n | 1.60857 | 0.0564316 |
| Kcnk9 | 4.68834 | 0.0564316 | Pcsk5 | 1.44333 | 0.408198 |
| Prss35 | 4.52963 | 0.0564316 | Mmd2 | 1.35205 | 0.146209 |
| Klhdc8a | 4.22422 | 0.0564316 | Adh1 | 1.34268 | 0.408198 |
| Peg10 | 3.75615 | 0.0564316 | Glycam1 | 1.33598 | 0.227054 |
| Abcb1b | 3.72803 | 0.0564316 | Serpine1 | 1.25668 | 0.408198 |
| Chga | 3.44752 | 0.0564316 | Sfrp4 | 1.1839 | 0.169295 |
| Chgb | 3.37785 | 0.0564316 | Fdx1 | 1.1478 | 0.36074 |
| Ltf | 3.01707 | 0.461512 | Cd8b1 | -1.35081 | 0.146209 |
| Fdxr | 2.99202 | 0.0564316 | Trat1 | -1.916 | 0.432081 |
| Krt4 | 2.9358 | 0.418158 | Krt8 | -2.1798 | 0.146209 |
| Dlk1 | 2.91966 | 0.481115 | Krt18 | -2.22454 | 0.105462 |
| Saa3 | 2.82102 | 0.0564316 | Uhrf1 | -2.57972 | 0.418158 |
| 1500015O10Rik | 2.80126 | 0.0564316 | Gck | -2.5919 | 0.258807 |
| Bcan | 2.61765 | 0.105462 | Serpina3b | -2.79156 | 0.0564316 |
| Ngp | 2.5943 | 0.492756 | Krt5 | -2.79224 | 0.198556 |
| Wnt4 | 2.5789 | 0.0564316 | Ccl25 | -2.96184 | 0.0564316 |
| Scg2 | 2.48151 | 0.0564316 | Myb | -3.18296 | 0.0564316 |
| Rerg | 2.45552 | 0.408198 | Ctgf | -3.60341 | 0.258807 |
| Hoxb9 | 2.45351 | 0.408198 | Dntt | -5.81913 | 0.0564316 |
| Mc2r | 2.4419 | 0.289494 | Prss16 | -6.31848 | 0.105462 |
| Mup10 | 2.39015 | 0.146209 | | | |

RESULTADOS: Objetivo 3

Tabla 8. - Análisis de enriquecimiento de términos GO usando 67 genes diferencialmente expresados entre los grupos Control y CCN2-KO. Sólo términos con valor $p < 0,05$ ajustado por el procedimiento de Benjamini se han incluido.

| Categoría | Término | Conteo | % | Valor p | Enriquecimiento (N-fold) | Benjamini |
|------------------|--|--------|------|---------------|--------------------------|-------------|
| GOTERM_BP_DIRECT | Biosíntesis de la hormona C21-esteroidea | 4 | 6 | 0,000000014 | 296,4 | 0,000075 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Proceso metabólico del colesterol | 7 | 10,4 | 0,000000048 | 23,3 | 0,00013 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Proceso de biosíntesis esteroidea | 6 | 9 | 0,00000019 | 28,7 | 0,00034 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Proceso metabólico esteroideo | 6 | 9 | 0,00000086 | 21,2 | 0,0012 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Proceso de biosíntesis de aldosterona | 3 | 4,5 | 0,0000032 | 296,4 | 0,0035 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Proceso metabólico de cortisol | 3 | 4,5 | 0,0000032 | 296,4 | 0,0035 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Quimiotaxis de neutrófilos | 5 | 7,5 | 0,0000081 | 21,5 | 0,0072 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Respuestas a hormona esteroidea | 4 | 6 | 0,0000086 | 45,6 | 0,0066 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Proceso de biosíntesis de metabolitos secundarios | 3 | 4,5 | 0,00011 | 177,9 | 0,0072 |
| GOTERM_BP_DIRECT | Proceso de biosíntesis de glucocorticoides | 3 | 4,5 | 0,00015 | 148,2 | 0,0096 |
| Categoría | Término | Conteo | % | Valor p | Enriquecimiento (N-fold) | Benjamini |
| GOTERM_CC_DIRECT | Región extracelular | 24 | 35,8 | 0,00000000017 | 4,2 | 0,000000017 |
| GOTERM_CC_DIRECT | Espacio extracelular | 21 | 31,3 | 0,0000000023 | 4,3 | 0,00000011 |
| GOTERM_CC_DIRECT | Gránulos secretores | 6 | 9 | 0,000003 | 16,5 | 0,00099 |
| GOTERM_CC_DIRECT | Cresta mitocondrial | 3 | 4,5 | 0,00055 | 83,8 | 0,014 |
| GOTERM_CC_DIRECT | Mitocondria | 15 | 22,4 | 0,00091 | 2,7 | 0,018 |
| Categoría | Término | Conteo | % | Valor p | Enriquecimiento (N-fold) | Benjamini |
| GOTERM_MF_DIRECT | Unión a receptor Toll tipo 4 | 3 | 4,5 | 0,00012 | 171,6 | 0,02 |
| GOTERM_MF_DIRECT | Unión a proteínas <i>scaffold</i> | 4 | 6 | 0,0008 | 21,6 | 0,066 |
| GOTERM_MF_DIRECT | Unión a ion férrico | 6 | 9 | 0,0008 | 8,1 | 0,045 |
| GOTERM_MF_DIRECT | Actividad oxidorreductasa, actuando como donador con incorporación o reducción de moléculas de oxígeno, NAD(P)H como un donador e incorporación de un átomo de oxígeno | 3 | 4,5 | 0,00089 | 66 | 0,037 |
| GOTERM_MF_DIRECT | Actividad oxidorreductasa | 9 | 13,4 | 0,001 | 4,3 | 0,035 |

RESULTADOS: Objetivo 3

Una vez realizado este análisis, los niveles de expresión de algunos de los genes de la tabla 7 que fueron considerados de especial interés, se evaluaron mediante RT-qPCR: *S100a8*, *S100a9*, *Spp1*, *Saa3* y *Ccl8*, confirmando también mediante esta técnica que existía una mayor expresión de estos genes en a nivel aórtico en el grupo de ratones CCN2-KO en comparación con los animales del grupo Control (**Figura 28**).

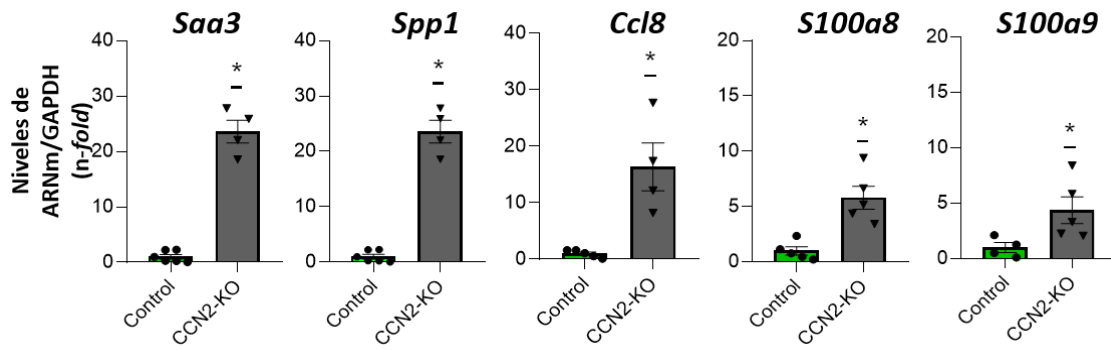


Figura 28.- Validación de los genes seleccionados del ARNsec mediante RT-qPCR. Los datos se muestran como media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Control.

OBJETIVO 4.- Estudiar si el bloqueo farmacológico de alguno de los potenciales mecanismos encontrados en el análisis transcriptómico presenta efectos beneficiosos en el modelo preclínico de daño vascular utilizado.

El bloqueo del MR redujo la formación de AAs inducida por la infusión de Ang II en un contexto de ausencia de CCN2

Debido a que la biosíntesis de aldosterona fue uno de los términos de los PB más enriquecidos en el análisis GO de los genes significativamente más desregulados en la comparativa entre las aortas del grupo CCN2-KO y del grupo Control (**Tabla 8**), y teniendo en cuenta la estrecha relación entre la aldosterona, la Ang II y la formación de AA, se decidió comprobar si el bloqueo del MR podía interferir en los efectos observados en el modelo de estudio. Para llevar a cabo este propósito, un grupo de ratones CCN2-KO + Ang II fue tratado preventivamente con SP (CCN2-KO + Ang II + SP). De este modo, se comprobó cómo la administración preventiva de SP generaba una tendencia estadísticamente no significativa a disminuir la formación de AAs, pasando del 92% en los ratones CCN2-KO + Ang II al 60% en el grupo CCN2-KO + Ang II + SP (**Figura 29A**). En concordancia con estos datos, el tratamiento preventivo con SP también generó una tendencia estadísticamente no significativa a disminuir la mortalidad asociada en el grupo CCN2-KO + Ang II + SP (**Figura 29B**).

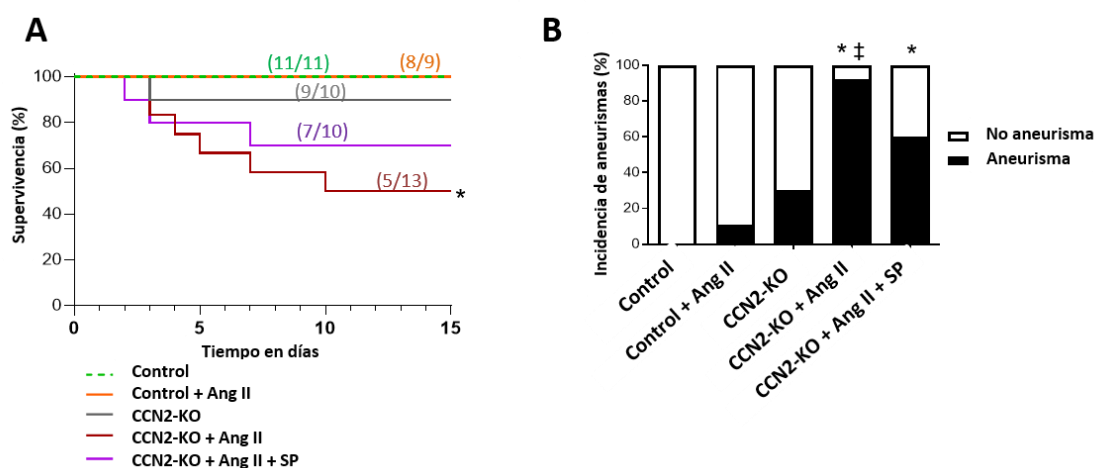


Figura 29.- Evaluación de la supervivencia e incidencia de AAs en el modelo de administración preventiva de SP en ratones CCN2-KO tratados con Ang II. (A) Curva de supervivencia Kaplan-Meier. **(B)** Incidencia de AAs. N = 9 – 13. * p <0.05 vs. Control. ‡ p <0.05 vs. CCN2-KO.

Además, estos efectos se produjeron sin alterar la subida de la presión arterial generada por la administración de Ang II en los ratones deficientes en CCN2, de tal forma que los ratones del grupo CCN2-KO + Ang II + SP mostraron un aumento de la presión arterial similar al observado en el resto de grupos tratados con Ang II (**Figura 30**).

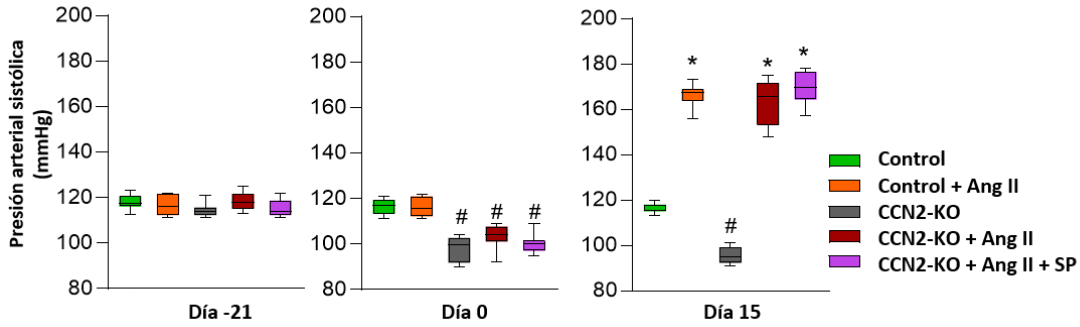


Figura 30.- Diagramas de cajas representando la evolución temporal de las medidas de presión arterial en el modelo de administración sistémica de SP en ratones CCN2-KO + Ang II. N = 8 - 10 por grupo. Los datos se expresan como media \pm SEM. * p <0.05 incrementado vs. Control. # p <0.05 disminuido vs. Control.

En esta misma línea, el análisis por zimografía en gel reflejó que la actividad de MMP-2 y MMP-9 también disminuía en los ratones CCN2-KO + Ang II + SP en comparación con el grupo CCN2-KO + Ang II (Figura 31A). De igual manera, se observó que el tratamiento preventivo con SP mejoraba las respuestas vasodilatadoras y vasoconstrictoras aórticas con respecto a las observadas en el grupo CCN2-KO + Ang II, mostrando unos valores más similares a los encontrados en los ratones Control (Figura 31B).

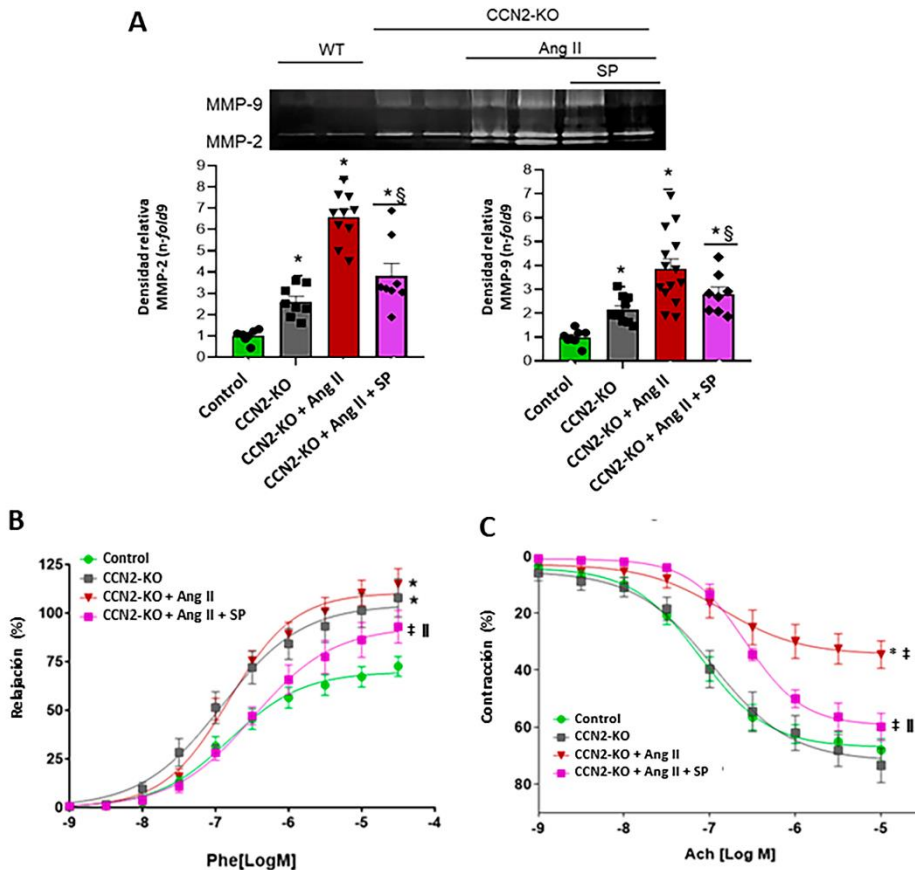


Figura 31.- El bloqueo del MR previene el incremento exacerbado de la actividad metaloproteínasa y los cambios en la función vascular ocasionados por el tratamiento con Ang II en ratones. (A) Imágenes representativas de zimografía en gel y su cuantificación. (B) Medidas de contracción en respuesta a concentraciones crecientes de Phe de los distintos grupos del modelo experimental. (C) Medidas de relajación vascular dependiente de endotelio en respuesta a concentraciones crecientes de Ach de los distintos grupos del modelo experimental. N = 8 - 10. Los datos se expresan como media \pm SEM. * p <0.05 incrementado vs. Control. # p <0,05 disminuido vs. Control. ‡ p <0,05 vs. CCN2-KO. † p <0,05 vs. CCN2-KO + Ang II.

OBJETIVO 5. Evaluar el efecto del tratamiento con CCN2(IV) recombinante en la activación y la expresión de los componentes de la vía de TGF-β en CMLVs de aorta de ratón *in vitro*.

Considerando el papel principal que ejerce la ruta de TGF-β en el desarrollo y la progresión de los AA, y teniendo en cuenta la estrecha relación entre este factor y CCN2, se quiso determinar si CCN2 podría estar modulando directamente la ruta de TGF-β. Para ello, en primer lugar, se analizaron los niveles de los receptores de TGF-β (TGFβR1 y TGFβR2) *in vitro*, tanto en condiciones basales como tras la estimulación con CCN2(IV), utilizando la línea celular MOVAS. A nivel proteico, los resultados de los WB realizados reflejaron que las dos dosis de CCN2(IV) utilizadas (50 y 100 ng/ml) aumentaban significativamente los niveles proteicos de TGFβR2 tras 48 horas de tratamiento en comparación con los niveles observados en las células en condiciones basales, mientras que la estimulación con TGF-β (1 ng/mL) los disminuía drásticamente (**Figura 32A**). Por el contrario, ni la estimulación con CCN2(IV) ni con TGF-β modificaron la expresión proteica de TGFβR1 (**Figura 32C**). En cuanto al análisis de la expresión génica de *Tgfb1* y *Tgfb2*, los datos obtenidos por RT-qPCR fueron similares, de tal manera que el tratamiento con CCN2(IV) (50 y 100 ng/mL) durante 48h, aumentaba la expresión del gen de TGFβRII en las CMLVs en comparación con las células en estado basal, mientras que el tratamiento con TGF-β (1 ng/mL) disminuía la expresión de este receptor significativamente (**Figura 32C**). Del mismo modo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de ARNm de TGFβR1 ni de TGF-β en las CMLVs tratadas con CCN2(IV) o con TGF-β con respecto a las CMLVs en estado basal (**Figura 32D y E**).

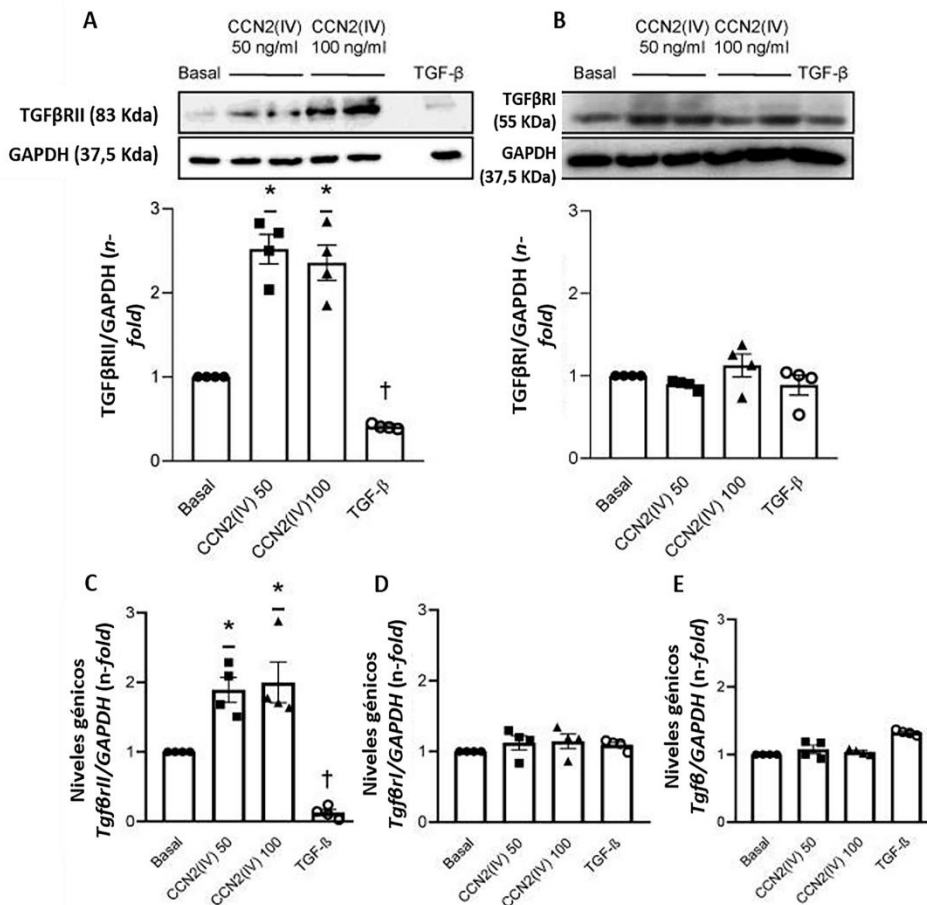


Figura 32.- Los niveles proteicos y génicos de TGFβRII se incrementan tras el estímulo de CCN2(IV) en CMLVs *in vitro*. Las CMLVs incubadas con CCN2(IV) muestran un incremento en los niveles proteicos de TGFβRII a las dosis de 50ng/mL y 100ng/mL tras 48 horas de tratamiento, mientras que el estímulo de TGF-β disminuye los niveles de esta misma proteína en comparación con las CMLVs no tratadas (basal) (**A**). Los niveles proteicos de TGFβRI, sin embargo, no se modifican con ninguno de los dos tratamientos (**B**). Tras 48 horas de tratamiento, CCN2(IV) incrementa el ARNm *Tgfb1* (**C**), pero no modifica los niveles de *Tgfb1* (**D**) o *Tgfb* (**E**), mientras que la estimulación con TGF-β disminuye *Tgfb1* y no modifica *Tgfb1* ni *Tgfb*. Los datos se presentan como media ± SEM de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ aumentado vs. Basal; † $p < 0,05$ disminuido vs. Basal.

CCN2 aumenta la activación de la ruta de las SMAD en CMLVs de aorta de ratón *in vitro*

Para estudiar si CCN2(IV) podía activar directamente la vía canónica de activación inducida por TGF- β , la ruta SMAD; se analizó el estado de fosforilación de las proteínas efectoras SMAD2 y SMAD3 en CMLVs estimuladas con CCN2(IV) *in vitro*. Los resultados mostraron que la estimulación con CCN2(IV) a 50ng/ml inducía la activación de la vía SMAD a tiempos cortos, lo cual se veía reflejado por un incremento en la fosforilación de SMAD3 (p-SMAD3) (Figura 33A) y SMAD2 (p-SMAD2) (Figura 33B), siendo significativo este aumento después de 10, 15 y 20 minutos de estimulación. Además, mediante técnicas de inmunofluorescencia, se observó una translocación de p-SMAD2 y SMAD4 al núcleo de las CMLVs tras 10 y 20 minutos de estimulación con CCN2(IV), confirmando por tanto la activación de la vía SMAD inducida por CCN2(IV) (Figura 33C-D).

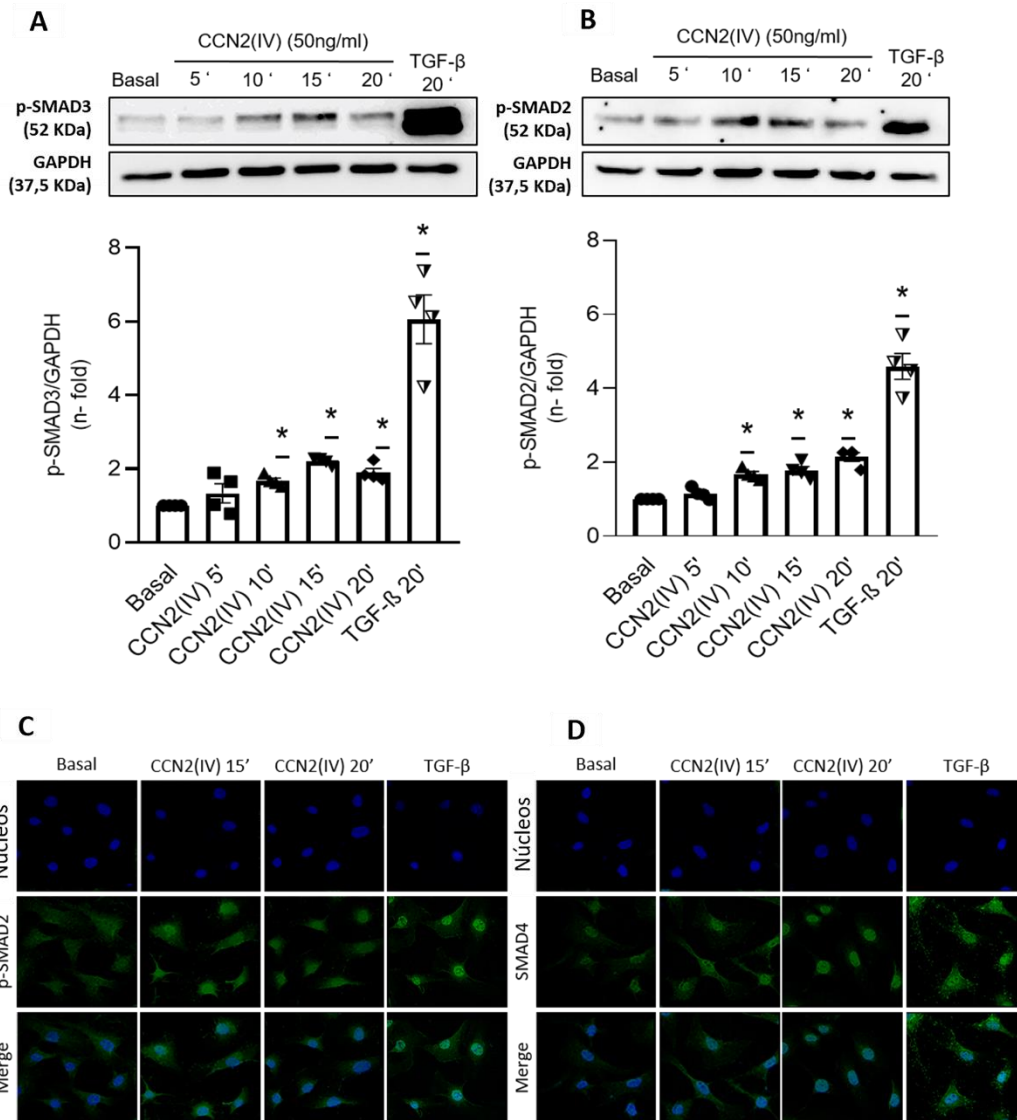


Figura 33.- CCN2(IV) promueve la activación de la vía de las SMAD por la fosforilación de SMAD2 y SMAD3 *in vitro*. CCN2(IV) a la dosis de 50ng/mL induce la activación de SMAD3 (A) y SMAD2 (B) en CMLVs a tiempos cortos (5-20 minutos) medido mediante la cuantificación de p-SMAD3 y p-SMAD2 respectivamente. Estos resultados concuerdan con el incremento de translocación nuclear de p-SMAD2 (C) y SMAD4 (D) tras 10 y 20 minutos de tratamiento con CCN2(IV) en CMLVs. Los datos se representan como media \pm SEM de 4 experimentos independientes. * p < 0,05 incrementado vs. Basal.

El aumento en los niveles de TGFβRII inducido por CCN2(IV) es dependiente de la ruta de las SMAD y está mediado por la activación del EGFR

Para poder determinar si la activación de la ruta de las SMAD era el mecanismo por el cual CCN2(IV) aumentaba los niveles de TGFβR2, las CMLVs en cultivo fueron preincubadas durante 1 h con un inhibidor de la activación de la ruta SMAD, SIS3, antes de ser tratadas con CCN2(IV). De esta manera, se observó que la inhibición de la ruta SMAD prevenía el incremento en la expresión proteica de TGFβR2 inducido tras 48 h de estimulación con CCN2(IV) a 50ng/ml (**Figura 34A**). Por otro lado, se determinó que la preincubación de las CMLVS con galunisertib, un potente inhibidor de TGFβR1, no prevenía el aumento en los niveles de TGFβR2 observados tras 48 h de tratamiento con CCN2(IV) a 50ng/ml (**Figura 34B**).

Finalmente, considerando que CCN2 puede unirse directamente al EGFR e inducir la activación de respuestas celulares, se realizaron experimentos en los que las CMLVs fueron preincubadas durante 1 h con erlotinib, un inhibidor de la actividad tirosina quinasa del EGFR, antes de ser tratadas con CCN2(IV). El análisis de los resultados determinó que la inhibición de la activación de EGFR prevenía el aumento de TGFβR2 observado tras la estimulación durante 48h con CCN2(IV) a 50ng/ml (**Figura 34C**). Estos resultados, por tanto, sugieren que el aumento en los niveles de TGFβR2 inducido por CCN2(IV) estaría mediado por una activación de la ruta SMAD dependiente de EGFR.

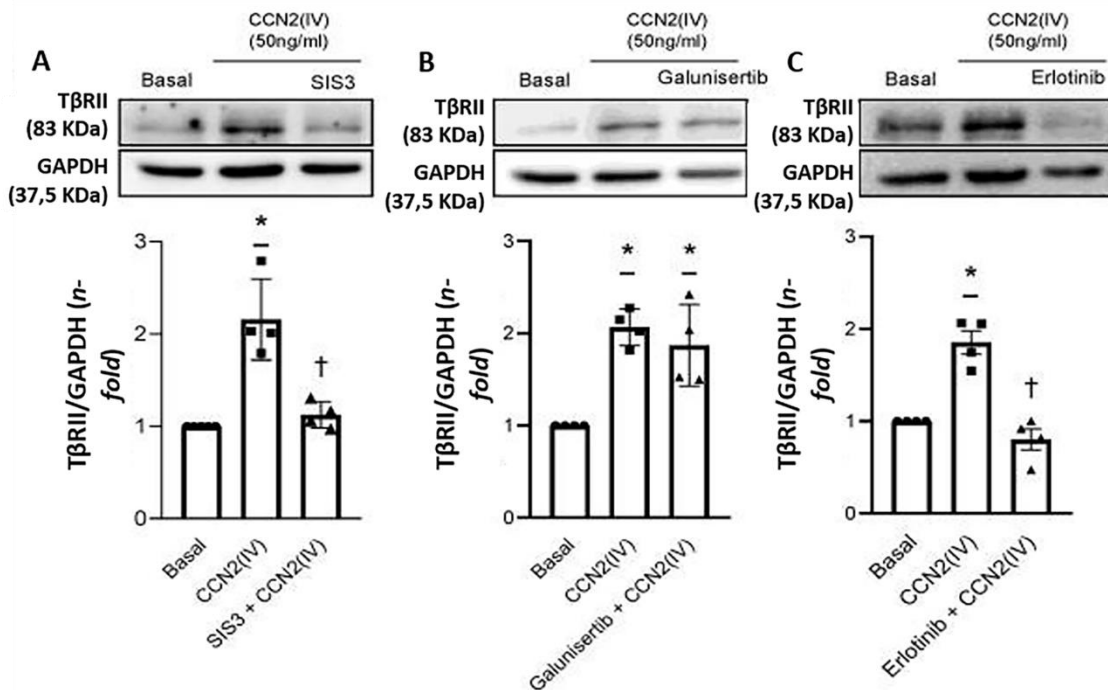


Figura 34.- CCN2(IV) promueve la expresión de TGFβRII vía EGFR/SMAD de manera independiente a TGF-β en CMLVs *in vitro*. El incremento de la expresión de TGFβRII inducida por CCN2(IV) tras 48 horas se redujo significativamente en CMLVs preincubadas durante 1 hora con SIS3, un inhibidor farmacológico de la vía de las SMAD (A). Sin embargo, 1 hora de preincubación con galunisertib, un inhibidor farmacológico de TGFβR1, no previene la sobreexpresión de TGFβRII inducida por CCN2(IV) en CMLVs (B). Por otro lado, la preincubación durante 1 hora de las CMLVs con erlotinib, un inhibidor farmacológico del EGFR, previno la sobreexpresión de TGFβRII tras 48 horas de estimulación con CCN2(IV) (C). Los datos se presentan como media ± SEM de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$ aumentado vs. Basal; † $p < 0,05$ disminuido vs. Basal.

DISCUSIÓN

El papel que juegan las alteraciones genéticas en el desarrollo y la progresión de múltiples patologías está cobrando cada día más relevancia, siendo especialmente notorio en el contexto de las enfermedades silenciosas, entre las que se encuentran diversas patologías cardiovasculares. De esta manera, conocer qué alteraciones genéticas están implicadas en el desarrollo de este tipo de enfermedades podría resultar trascendental para comprender el funcionamiento de las mismas y, en última instancia, para poder definir dianas terapéuticas que permitan diseñar tratamientos más eficaces y personalizados. De este modo, resultan de especial interés aquellos factores con gran importancia en el desarrollo embrionario pero que, en ausencia de condiciones patológicas, dejan de expresarse en el estado adulto del individuo. En base a los conocimientos que existían hasta hace poco, este sería el caso de la proteína CCN2, la cual se pensaba que una vez ejercido su papel en el desarrollo embrionario, dejaba de expresarse en la mayor parte de los tejidos de los individuos adultos sanos, momento en el que su expresión se describía únicamente ligada al desarrollo de diferentes patologías, entre las que se incluyen algunas ECVs (274–279). En este sentido, se ha observado un aumento en los niveles de CCN2 en diferentes ECVs como el remodelado del ventrículo izquierdo o la aterosclerosis (73,255,256,262), aunque a día de hoy el papel que desempeña este factor en el desarrollo y la progresión del daño vascular no ha sido clarificado en su totalidad. Sin embargo, este rol tradicional atribuido a CCN2 en el que participaba canónicamente como un importante factor de desarrollo embrionario y se reexpresaba solo en ciertos contextos patológicos, sobre todo profibróticos, como la enfermedad renal o la fibrosis pulmonar (280), ha quedado en entredicho gracias a los hallazgos realizados durante los últimos años. De este modo, estudios recientes entre los que se encuentra el proyecto *Genotype-Tissue Expression* (GTEx) (250), han demostrado la expresión de CCN2 en multitud de órganos en estado adulto, destacando su presencia en niveles elevados en la aorta, tal y como se puede comprobar en el atlas de expresión proteica que se ha generado (ENSG00000118523-CCN2; (251)). En la misma línea, los resultados obtenidos en esta tesis confirman la presencia de CCN2 en las aortas de los ratones adultos y remarcan la importancia de esta proteína como un componente esencial de la MEC que participa de manera crucial en el mantenimiento de la homeostasis vascular. De este modo, los resultados expuestos a lo largo de esta tesis han contribuido al cambio en el paradigma sobre la expresión y las funciones de CCN2 a nivel vascular, considerándose a día de hoy que CCN2 tiene una dualidad funcional, de manera que puede actuar como un factor de crecimiento al mismo tiempo que ejerce una importante función estructural y de intercomunicación celular al estar embebido en la MEC (280). Así, los hallazgos de esta tesis, arrojan luz al campo de estudio en cuestión, aportando información clave en relación a esta dualidad a nivel aórtico al describir, por primera vez, que la ausencia a nivel génico de CCN2 predispone al desarrollo rápido y fatal de AAs en ratones, los cuales están inducidos principalmente por el desbalance de la homeostasis, tanto estructural como mecánica, de la aorta, así como por la modificación de la respuesta adaptativa frente a los efectos deletéreos inducidos por Ang II.

Importancia de CCN2 en el mantenimiento de la homeostasis de la pared vascular y en el desarrollo de aneurismas aórticos.

La hipertensión es un factor de riesgo que participa tanto en el desarrollo como en la progresión de multitud de enfermedades cardiovasculares, incluyendo el infarto agudo de miocardio, la aterosclerosis o los AAs (98,281,282). En este sentido, la implicación de la

hipertensión, derivada habitualmente de la activación del SRAA, en el desarrollo de AAs, está ampliamente caracterizada en la literatura, de tal forma que la infusión sistémica de Ang II en ratones es uno de los modelos experimentales más utilizados para el estudio de esta patología (283). Sin embargo, la administración de Ang II suele combinarse con otra serie de factores, como alteraciones genéticas de los ratones y/o tratamientos farmacológicos, debido a la resistencia natural que poseen los ratones C57Bl6/J frente a la formación de aneurismas inducidos por la infusión de Ang II. Así, la administración de Ang II se ha asociado con la formación de AAs abdominales y torácicos en diversos modelos experimentales de ratones deficientes en la lipoproteína ApoE (ApoE^{-/-}), o en ratones tratados conjuntamente con un anticuerpo neutralizante de TGF- β (284). Curiosamente, en esta tesis se ha confirmado que uno de los genes cuya expresión más aumenta a nivel aórtico tras la administración de Ang II es *Ccn2*, incrementando sus valores de forma significativa tras solo un día de infusión (285).

No obstante, a pesar de esta relación entre Ang II y CCN2, y de que CCN2 se encuentra aumentado en muchas patologías cardiovasculares que cursan con hipertensión (72,286), en el presente trabajo se determinó, en primer lugar, que la ausencia de CCN2 inducida en estado adulto no modificaba la hipertensión derivada de la administración de Ang II y, en segunda instancia, que la ausencia de CCN2, por sí misma, generaba una disminución de la tensión arterial sistólica en comparación con los ratones WT. Aunque en un principio este resultado podría parecer inesperado, cambios similares en la presión sanguínea se han descrito en ratones que presentan modificaciones genéticas en otros componentes de la MEC. De este modo, en un modelo experimental de delección parcial o silenciamiento de la metaloproteinasa ADAMTS1, la cual participa activamente en la degradación del colágeno tipo 1 (287), los autores observaron un descenso de la presión arterial, así como una dilatación de la pared aórtica (288). En esta misma línea, en el presente trabajo se observó un incremento, tanto en el área total de la aorta como en el área del lumen, en los ratones CCN2-KO, sugiriendo que la ausencia de CCN2 podría generar unas modificaciones estructurales en la aorta similares a las inducidas por la ausencia de ADAMTS1. Además, los estudios de función vascular realizados en segmentos aórticos *ex vivo* demostraron que la delección de CCN2 causa también un aumento de la respuesta contráctil y empeora la disfunción endotelial inducida por Ang II. Todos estos datos apoyan el papel de CCN2 como elemento esencial de la MEC y, por tanto, como un factor fundamental en el mantenimiento de la homeostasis vascular.

Estos resultados, aparentemente inesperados en base a la bibliografía previa que atribuía un papel deletéreo a CCN2 en edad adulta, se unen a otros trabajos en los que se ha demostrado que la modulación de los niveles de CCN2 puede ejercer efectos opuestos dependiendo de las condiciones patológicas. En lo que respecta a las patologías cardiovasculares, hay estudios que apuntan a CCN2 como un factor protector ya que se ha visto que su sobreexpresión a nivel cardiaco reduce la hipertrofia del miocardio en un modelo de daño cardiaco por sobrecarga de presión, así como que la administración de CCN2 recombinante aumenta la tolerancia de los corazones al daño cardiaco generado por isquemia-reperfusión en ratones (260,261). Por el contrario, existen también resultados donde demuestran que el bloqueo de CCN2 en ratones utilizando un anticuerpo monoclonal protege el corazón del remodelado adverso y de la disfunción del ventrículo izquierdo generados por un modelo de daño cardiaco por sobrecarga de presión (256). En lo que concierne a la formación de AAs, aunque se ha descrito una sobreexpresión de CCN2 en el curso de esta

patología (262), el impacto de su modulación en un modelo de inducción de aneurismas no ha sido reportado hasta la fecha. Los hallazgos de esta tesis, demostraron que la deficiencia adquirida de CCN2 quebrantaba la resistencia natural que los ratones C57Bl6/J *wild-type* (WT) poseen frente a la formación de aneurismas inducidos por Ang II, dando lugar a la formación rápida de aneurismas a lo largo de toda la aorta e incrementando su susceptibilidad a la rotura, lo cual se tradujo en una bajada en la tasa de supervivencia hasta el 50% tras 15 días de administración de Ang II. Este resultado, supone otra clara evidencia del papel fundamental que juega CCN2 en la regulación de la respuesta adaptativa y de su función protectora en el mantenimiento de la integridad de la pared aórtica.

En relación al papel clave que tiene CCN2 en la homeostasis de la MEC en la aorta que se ha descrito en esta tesis, existen numerosos trabajos previos que han atribuido a este factor una función esencial en la regulación de las proteínas de la MEC, especialmente, en el control molecular durante el desarrollo vascular embrionario mediante la regulación de la expresión de la elastina y de diferentes tipos de colágeno (289). Teniendo en cuenta esta función, hasta hace pocos años existía la idea de que, una vez ejercidas sus funciones durante el desarrollo embrionario, CCN2 dejaba de expresarse en estado adulto en individuos sanos, quedando por tanto su expresión reducida únicamente a la aparición y/o progresión de determinadas situaciones patológicas, como es el caso de la aterosclerosis o la disección de la aorta, en las cuales la expresión incrementada de CCN2 se asoció con la deposición de colágeno en las regiones donde se manifiesta la lesión (73,286). Sin embargo, diversos trabajos recientes han demostrado que también existe una expresión de CCN2 en estado adulto sin mediar ninguna patología, siendo esta expresión especialmente elevada en la aorta (ENSG00000118523-CCN2) (250,251). Apoyando este descubrimiento, los resultados obtenidos en esta tesis han demostrado la expresión de CCN2 en las aortas de los ratones control, tanto a nivel génico como a nivel proteico, lo cual, a tenor de los resultados deletéreos obtenidos a nivel aórtico tras su delección, sugiere que este factor juega también un papel importante en la estructura y la función de la aorta en condiciones normales, contribuyendo a desbancar el paradigma del silenciamiento de este gen en edad adulta.

Dentro de los efectos deletéreos observados tras la delección de CCN2, la evaluación histológica de las aortas de los ratones CCN2-KO mostró también diversas alteraciones en la pared aórtica, incluyendo roturas en las láminas elásticas. Estas láminas elásticas son uno de los componentes principales de la MEC y resultan fundamentales para mantener el correcto funcionamiento de las acciones mecánicas de la aorta, por lo que su degradación y pérdida compromete la integridad y el adecuado comportamiento mecánico de la pared vascular (290). El correcto remodelado de la MEC, tanto en condiciones normales como en situaciones patológicas, es uno de los puntos clave en el desarrollo de los AAs (128,291,292). En este sentido, uno de los grupos de enzimas fundamentalmente involucradas en la degradación de la MEC son las MMPs, las cuales forman parte de una gran familia de proteínas con diferentes actividades, incluyendo MMPs que tienen la capacidad de actuar como gelatinasas o como colagenasas entre otras funciones (293). Los resultados de esta tesis mostraron cómo la deficiencia adquirida de CCN2 incrementa la actividad de la MMP-2 y de la MMP-9 a nivel aórtico, lo cual fue observado tanto en extractos proteicos del tejido, como mediante estudios *in situ* realizados en secciones aórticas donde se comprobó que la actividad gelatinasa y colagenasa se localizaba entre las fibras elásticas, coincidiendo principalmente con las zonas

de adelgazamiento o rotura de las fibras. En esta misma línea, además de la importancia de las MMP-2 y MMP-9 (128,294,295), existen otras MMPs cuya modulación también se ha relacionado con la fisiopatología de los aneurismas. Entre ellas, resulta de especial relevancia la MMP-8, mayoritariamente secretada por los neutrófilos, los cuales juegan un papel relevante en la formación y progresión de AAs (296–298), y cuyos niveles de expresión también se han observado aumentados en las aortas de los ratones deficientes en CCN2. El incremento en la actividad de las MMPs se ha asociado principalmente a las acciones de la Ang II y también está relacionado directamente con la degradación de las fibras elásticas (76). En este sentido, los resultados del presente trabajo sugieren que las roturas de las fibras elásticas observadas en las aortas del grupo de ratones deficientes en CCN2 podrían deberse a un incremento en la actividad de estas MMPs. En su conjunto, los descubrimientos obtenidos sugieren que la regulación de las MMPs constituye un mecanismo importante en la desestabilización de la pared aórtica mediada por CCN2 y en la susceptibilidad a la formación de AA observada en los ratones CCN2-KO tras la administración de Ang II.

Sumado a este efecto sobre el remodelado de la MEC, existe otro mecanismo que podría contribuir a explicar los efectos observados a nivel aórtico en los ratones deficientes en CCN2 infundidos con Ang II, el cual comprendería los cambios producidos en las unidades contráctiles de elastina y en el fenotipo de las CMLVs. La modificación de estos dos factores puede afectar a la capacidad de las CMLVs de la aorta de responder al flujo pulsátil en un contexto de hipertensión patológica, contribuyendo por tanto a un aumento en la susceptibilidad a sufrir una disección aórtica (299). A este respecto, los resultados de la presente tesis han demostrado que la deficiencia adquirida de CCN2 modifica la correcta expresión de varias proteínas citoesqueléticas fundamentales a nivel aórtico, entre las que se encuentran ACTA2, una proteína en la que la presencia de mutaciones en heterocigosis en el gen que la codifica, *Acta2*, derivaban en la formación de AA en ratones (299,300). Del mismo modo, otros trabajos realizados en ratones *knockout* para ACTA2 mostraron la existencia de una dilatación progresiva en el arco aórtico, cambios en el fenotipo de las CMLVs y la generación, acompañada de la disección, de AAs en respuesta a Ang II (301,302). Por otro lado, el ARNsec realizado en esta tesis reveló un incremento en los niveles de *Spp1* en las aortas de los ratones CCN2-KO en comparación con los ratones Control. Teniendo en cuenta que este gen codifica para la osteopontina, una proteína clave en la modulación del fenotipo de las CMLVs y que está asociada con el desarrollo y la progresión de los aneurismas (303), este dato cobra una gran relevancia. Estas modificaciones en los niveles de expresión de ciertas proteínas sugieren que la ausencia de CCN2 podría estar generando cambios en el fenotipo de las CMLVs, lo cual podría también contribuir a comprometer la estabilidad de la pared aórtica y participar en los efectos deletéreos observados tras la administración de Ang II. Teniendo en cuenta estudios previos donde demostraron que CCN2 estimula la migración y la proliferación de las CMLVs de aorta de rata *in vitro* (304), en el presente trabajo se realizaron diversos estudios en CMLVs de ratón donde se demostró que la delección de *Ccn2* disminuye el porcentaje de cierre de herida, así como la migración de las CMLVs en cultivo. De todos estos resultados, se puede inferir por tanto que CCN2 tiene un papel fundamental en la respuesta adaptativa que se desencadena en la aorta frente al daño producido por Ang II, abriendo nuevas vías para la realización de estudios futuros que permitan profundizar más en la caracterización de los mecanismos implicados y que puedan esclarecer el complejo, a la par

que crucial, papel que desempeñan las proteínas de la MEC y, más concretamente CCN2, en el desarrollo y la progresión de los AAs.

Teniendo en cuenta los efectos que podría estar mediando el CCN2 circulante en los resultados observados, se quiso evaluar si las consecuencias derivadas de la ausencia de CCN2 podrían prevenirse manteniendo elevados sus niveles circulantes a lo largo de todo el modelo. Sin embargo, la aproximación experimental en la que se implantaron minibombas para la infusión sistémica de CCN2(IV), con la cual se trataba mantener elevados los niveles circulantes de CCN2, no protegió frente a los efectos deletéreos inducidos tras quince días de infusión con Ang II. De este modo, tanto la generación de AAs como su rotura y la mortalidad asociada, se mantuvieron elevadas en aquellos ratones CCN2-KO que fueron tratados con Ang II, independientemente de si se encontraban recibiendo también CCN2(IV) de manera sistémica. Por ende, estos resultados sugieren que la formación de AAs observada estaría relacionada con el rol esencial del CCN2 a nivel estructural en el mantenimiento de las homeostasis vascular, y no tanto con su papel como factor de crecimiento, remarcando más aún la diferencia en cuanto a las distintas funciones que esta proteína puede desencadenar dependiendo de su localización y de su estructura. Sin embargo, no se puede descartar tampoco que la administración de la proteína CCN2 recombinante completa y/o el uso de diferentes dosis puedan en cierto modo modificar los resultados observados en este trabajo.

Curiosamente, los resultados descritos en la presente tesis parecen estar en contraposición con un estudio reciente donde concluyen que la deficiencia en la IL12p40 promueve la formación de AA mediante la activación de la ruta CCN2/MMP2. Para ello, los autores utilizaron en primer lugar el modelo experimental clásico de formación de aneurismas mediante la administración de Ang II en ratones *ApoE*^{-/-}, e incluyeron un grupo de ratones doble *knockout* para la citoquina IL12p40 y la ApoE (*Il12p40*^{-/-};*ApoE*^{-/-}) hipotetizando una reducción en la formación de AAs por la ausencia de IL12p40. Contrariamente a lo que esperaban, la aparición de AAs fue similar en ambos grupos, aunque sí que encontraron diferencias en la expresión de algunos factores, entre ellas un aumento aún mayor en la expresión de CCN2 en las aortas de los ratones *Il12p40*^{-/-}; *ApoE*^{-/-}, lo que les llevo a sugerir que CCN2 podría estar mediando la formación de AAs en este modelo experimental. Para evaluar su nueva hipótesis, los autores realizaron otro modelo experimental de formación de AAs, aunque, en este caso, inducido por la administración aortica local de elastasa, en ratones haploinsuficientes para CCN2 (*Ccn2*^{+/-}), reportando una disminución en la generación de aneurismas. En este punto, es importante destacar varios trabajos previos, alguno elaborado por los mismos autores, que podrían ayudar a explicar las aparentes discrepancias con los resultados obtenidos en esta tesis. En primer lugar, en un estudio realizado unos años antes en ratones infundidos con Ang II, los mismos autores determinaron que la ausencia de IL12p40 promovía el desarrollo de AAs (305). Pese a ello, la idea inicial que planteaban en este nuevo trabajo hipotetizaba que la delección conjunta de IL12p40 y *ApoE* podría mitigar la aparición de AAs tras la infusión de Ang II. Por otro lado, en el mismo año, otro trabajo concluyó que el bloqueo de IL-12p40 con un anticuerpo monoclonal reducía la formación de AAs en un modelo de formación de aneurismas por infusión de elastasa (306). Sin embargo, en ninguno de estos artículos se midieron los niveles de CCN2, ni a nivel circulante ni a nivel local en la aorta. Teniendo todo esto en cuenta, una posible explicación para las discrepancias observadas serían las diferencias ya reportadas entre ambos tipos de modelo de formación de aneurismas

aórticos (Infusión de Ang II vs. elastasa) (283). Aunque, por otro lado, también podrían deberse al tipo de delección de CCN2 utilizado, ya que en el presente trabajo se trabajó con ratones *knockout* inducibles, mientras que en los estudios previos utilizaron ratones con haploinsuficiencia de CCN2 desde el desarrollo embrionario. Teniendo en cuenta todos estos datos, se puede inferir que existen diferencias relevantes entre los efectos derivados de la reducción parcial de los niveles de CCN2 y la ausencia del mismo, lo cual podría extrapolarse a la función dual que ejerce CCN2 como factor de crecimiento y como factor estructural de la MEC.

Además del CCN2, diversos estudios previos han demostrado que otras proteínas de la familia de las CCN también están involucradas en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, aunque, también en este caso, los resultados obtenidos en esta tesis podrían resultar controvertidos en primera instancia. En este sentido, CCN3 se ha descrito como un factor protector en dos modelos experimentales de aneurismas diferentes, uno inducido por elastasa y otro por administración de Ang II (307). Por otro lado, otros autores han descrito que CCN3 es un regulador negativo de las respuestas de CCN2 (308), lo que podría sugerir que ambos factores mediarían respuestas opuestas. Sin embargo, también existen varios trabajos que han demostrado que CCN2 y CCN3 tienen cierta capacidad de interactuar entre ellas, formando heterodímeros CCN2/CCN3 que regulan de manera sinérgica las respuestas celulares de ambos factores (309), lo cual explicaría que la ausencia de cualquiera de estas dos proteínas pueda dar lugar a una predisposición a generar AAs. Por otro lado, en un artículo reciente se ha descrito que la delección de CCN4 en ratones ApoE^{-/-} suplementados con una dieta alta en grasa e infundidos con Ang II disminuye la severidad de los AAs, lo cual indicaría un rol diferente de CCN4 en el desarrollo y la progresión de los AAs en comparación con el observado para CCN3 y CCN2 (310). En su conjunto, y teniendo en cuenta tanto los resultados previamente descritos como los que se han obtenido en esta tesis, se puede establecer que las distintas proteínas de la familia de las CCN juegan un papel crucial en el mantenimiento de la arquitectura de la pared vascular, tanto en un estado fisiológico como en un contexto patológico. No obstante, siguen siendo necesarios estudios adicionales que ayuden a comprender mejor los mecanismos involucrados.

Se ha descrito que el sistema inmune tiene un papel importante tanto en el origen como en la progresión del daño en las ECVs (311). Los estudios de ARNseq y los posteriores análisis bioinformáticos realizados en esta tesis mostraron que la ausencia de CCN2 en la aorta de ratones adultos alteraba significativamente la expresión de genes implicados en procesos biológicos relacionados con respuestas inflamatorias, incluidas funciones de neutrófilos, como son la agregación y la quimiotaxis. Entre los genes más incrementados en las aortas de los ratones CCN2-KO destacan *Saa3*, *S100a8*, *S100a9* y *Ccl8*, los cuales participan en diversos procesos inflamatorios en patologías vasculares (312–317). La Ang II, además de ser un péptido vasoactivo, también es una citoquina que regula múltiples respuestas proinflamatorias (76,195). Consecuentemente, el incremento de los cuatro genes anteriormente mencionados se encontraba aún más exacerbado en las aortas de aquellos ratones CCN2-KO que fueron infundidos con Ang II, remarcando por tanto el papel potencial de podrían ejercer los mismos en la formación de AAs observada en el presente estudio. Apoyando esta hipótesis, se han detectado niveles aumentados de SAA, así como la formación de complejos S100A8 y S100A9, en diversas enfermedades cardiovasculares, incluyendo la disección aórtica, los aneurismas y

la aterosclerosis (318–320). Además, se ha demostrado también que la deficiencia de *Saa* protege frente a la formación de AAs inducidos por Ang II en ratones ApoE^{-/-} (321). En este punto, es importante destacar que el estudio de ARNsec se realizó utilizando un *pool* de las muestras aórticas de cada grupo, lo cual hace que el poder estadístico para determinar la significancia de las diferencias en los patrones de expresión esté limitado en cierto modo. Sin embargo, tal y como han descrito algunos autores, los resultados obtenidos en este tipo de estudios pueden utilizarse para generar hipótesis de trabajo que deben ser posteriormente validadas (322). Por ello, los cambios observados en los cinco genes mencionados anteriormente fueron confirmados mediante RT-qPCR utilizando el ARNm de las muestras aórticas individuales de cada grupo, lo cual sirvió para validar estos hallazgos.

El bloqueo del MR como diana terapéutica en los aneurismas aórticos

Siguiendo con la generación de hipótesis basada en los resultados del ARNsec de la presente tesis, el análisis ontológico de los genes reveló que uno de los procesos biológicos más enriquecidos en ausencia de CCN2 fue la biosíntesis de aldosterona, lo cual hizo que se hipotetizara que esta hormona podría estar participando en la generación de los AAs observados. Apoyando esta idea, existen algunos casos clínicos donde se han reportado disecciones aórticas en pacientes con hiperaldosteronismo primario (323), así como varios estudios donde se ha encontrado una asociación entre el bloqueo del MR y una desaceleración en la progresión de los AAs en humanos (324,325). A nivel experimental, también se ha demostrado que una dieta alta en sal combinada con el tratamiento con un agonista del MR produce la formación y rotura de AAs en ratones (326). Siguiendo esta misma línea, los resultados experimentales de esta tesis demostraron que la administración preventiva de un antagonista del MR, la SP, redujo ligeramente tanto la formación de AAs como su mortalidad asociada tras la administración de Ang II en ratones CCN2-KO, sin modificar la presión arterial. Apoyando estos resultados, existen estudios previos donde describieron que otro antagonista del MR, la eplerenona, reduce significativamente el desarrollo de AAs en ratones infundidos por una combinación de Ang II y β -aminopropionitrilo, un compuesto capaz de causar deformaciones en los huesos y en los vasos al afectar al tejido conectivo (327), sin afectar tampoco en este caso a la presión arterial (325). Además, los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que la SP también reduce la desregulación en la función vascular observada en los ratones CCN2-KO infundidos con Ang II, en concordancia con los resultados obtenidos en un estudio previo realizado en arterias de ratones diabéticos tratados con este mismo antagonista del MR (328). Teniendo en cuenta estos resultados, es importante destacar la curiosa relación existente entre la aldosterona, el TGF- β y el CCN2. Por un lado, se ha demostrado que la aldosterona es capaz de incrementar la síntesis de TGF- β (185,329) e inducir la expresión de CCN2 en cardiomiocitos de ratón *in vivo* y en nefropatía diabética experimental en ratas (330,331). Por el contrario, TGF- β es un potente supresor de varios de los genes que codifican enzimas que conllevan a la síntesis de aldosterona, tales como *Cyp11a1*, *Cyp11b1*, *Cyp11b2*, *Cyp21a1*, *NR5A1*, *FDX1*, *FDXR*, *StAR* or *Hsd3b1* (82). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que varios de estos genes relacionados con la síntesis de aldosterona se encontraban sobrepresados en la aorta de ratones deficientes en CCN2, lo cual sugeriría que este factor tiene un rol similar al observado

DISCUSIÓN

para TGF- β en cuanto a la regulación negativa de la vía de aldosterona. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta tesis, además de proponen un posible mecanismo molecular por el cual la ausencia de CCN2 puede estar actuando en la predisposición al desarrollo de AAs (Figura 35), también apoyan el papel de la vía de la aldosterona en la generación de aneurismas y sugieren la realización de estudios futuros que permitan profundizar en el potencial uso de antagonistas del MR como una estrategia terapéutica en un contexto de AAs.

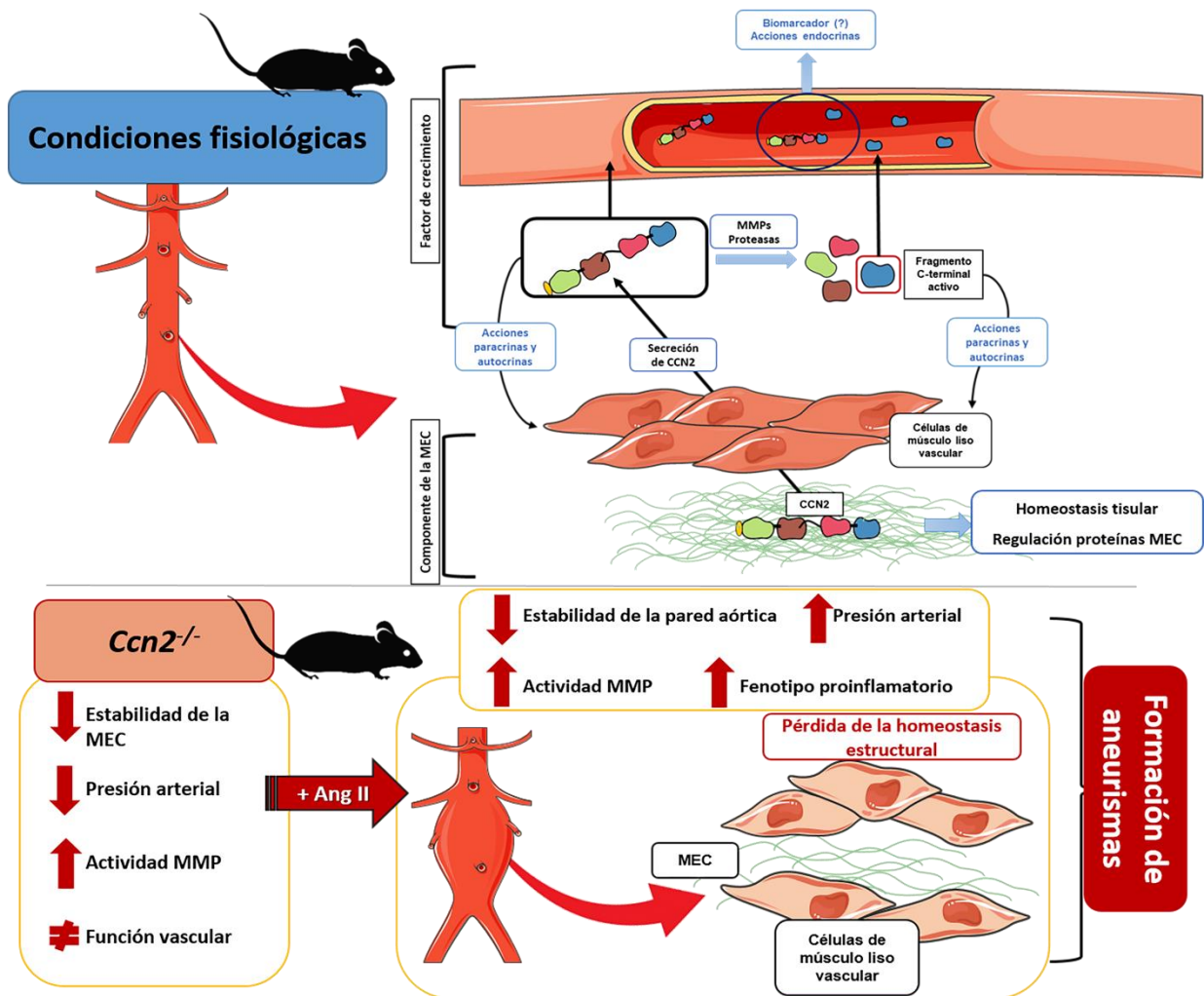


Figura 35.- Esquema gráfico de las consecuencias vasculares que genera la delección de *Ccn2* en condiciones fisiológicas y en un modelo de daño vascular inducido por infusión de Ang II.

Analogía entre los efectos de la modulación de CCN2 y TGF- β en procesos patológicos vasculares

Aunque los resultados siempre han resultado controvertidos en relación a las acciones y funciones directas que ejerce CCN2 en las patologías cardiovasculares, existen diversos estudios donde se ha reportado un aumento en la expresión de CCN2 tanto en AAs humanos no síndromicos (262) como en aneurismas síndromicos, lo cual ha conllevado que algunos autores hayan postulado CCN2 como una potencial diana terapéutica en el tratamiento de los aneurismas. Dentro de los síndromes que cursan con la generación de AAs tienen una especial

relevancia aquellos englobados en los HCTDs, como MS, LS y ELDS (332). Estas patologías se caracterizan principalmente por alteraciones en el tejido conectivo, las cuales desencadenan un ensamblamiento inadecuado de la MEC, contribuyendo a la desregulación de la homeostasis de varios órganos, entre los que se incluyen los vasos sanguíneos, el corazón, los huesos, los ojos, la piel y los pulmones (332). El MS está causado por mutaciones en el gen que codifica para la FBN1, la cual participa en el mantenimiento del gran complejo latente de TGF- β en su estado inactivo. Por su parte, el LDS está asociado con mutaciones en heterocigosis en los genes que codifican para los receptores TGF β R1 y TGF β R 2, así como modificaciones genéticas en otros componentes de la misma vía de señalización (333). Este tipo de alteraciones genera una desregulación de la vía de TGF- β desencadenando un aumento en la señalización de la misma, lo cual fue propuesto como una posible causa del desarrollo de los AAs que se generan en estas patologías (163). A pesar de ello, y de manera paradójica, las aproximaciones experimentales que utilizaron como diana terapéutica el TGF- β en modelos de AAs murinos no solo no demostraron tener un efecto protector (334–336) si no que reflejaron que el bloqueo de este factor aumentaba la formación de AAs, así como su rotura y la consecuente mortalidad (334,337,338). Estos resultados inhibiendo TGF- β serían por tanto análogos a los resultados observados en el presente trabajo con la delección de CCN2 en el desarrollo de AAs, sugiriendo que alteraciones en la síntesis de CCN2 podrían tener una relevancia similar a las alteraciones observadas para la vía de TGF- β . Precisamente, a día de hoy, los estudios sobre las alteraciones génicas de CCN2 a nivel vascular son escasos, existiendo apenas un trabajo donde se reveló que los AAs observados en una cohorte de pacientes estaban asociados con una disminución en los transcritos codificados por un segmento de 16 Mpb entre las bandas citogenéticas q22.1 y q23.3 del cromosoma 6, región en la que precisamente se encuentra el gen de CCN2 (339). Los resultados obtenidos en la presente tesis, por tanto, parecen asemejarse a los resultados deletéreos que se han observado con las modificaciones en la ruta de TGF- β , aunque los mecanismos completos involucrados en el desarrollo de los AAs por la ausencia de CCN2 necesitan aún nuevos estudios adicionales que permitan esclarecer completamente este punto.

En lo que respecta al papel de CCN2 en otras patologías, este factor está siendo utilizado como diana terapéutica en varios ensayos clínicos relacionados con enfermedades en las que se han detectado niveles aumentados de CCN2, como la distrofia muscular de Duchenne (NCT02606136), el adenocarcinoma de páncreas (NCT04229004) y la fibrosis pulmonar (NCT03955146), todos ellos altamente relacionados con procesos fibróticos. Aunque los efectos concretos y potencialmente beneficiosos de esta inhibición aún están por describir totalmente, existen algunos datos que podrían sugerir que el bloqueo de CCN2 comparte una similitud con el papel de TGF- β en estas patologías fibróticas. De esta manera, en lo relacionado con la distrofia muscular de Duchenne, está ampliamente descrito que existe un aumento en los niveles, tanto génicos como proteicos, de TGF- β y de otros componentes subyacentes a su vía canónica, lo cual tiene un rol esencial en el desarrollo de la fibrosis muscular asociada a la progresión de la enfermedad (340–343). De manera similar, los niveles de TGF- β y de los distintos componentes de su vía canónica también se encuentran aumentados en el desarrollo y la progresión del cáncer de páncreas (344) y de la fibrosis pulmonar (345). Diversas estrategias dirigidas a inhibir la ruta de TGF- β en este tipo de enfermedades, han resultado ser beneficiosas en la mayoría de los casos (346–348), lo que

podría sugerir que los actuales ensayos clínicos que utilizan un anticuerpo monoclonal frente a CCN2 en enfermedades que cursan con fibrosis podrían tener resultados similares. En este punto, es importante recordar que en la presente tesis el bloqueo de CCN2 se realizó a nivel génico, no utilizando un anticuerpo neutralizante como en los ensayos clínicos mencionados, y que la administración del CCN2(IV) recombinante no modificó los efectos observados a nivel aórtico con la delección de CCN2. Este último punto podría, por un lado, explicar que no se hayan reportado efectos adversos a nivel vascular en los ensayos clínicos utilizando un anticuerpo neutralizante de CCN2, mientras que, por otro lado, contribuiría también a confirmar las diferentes funciones que ejerce CCN2 como elemento estructural y como factor de crecimiento.

Más allá del papel de TGF- β como inductor de la expresión de CCN2, y apoyando la relación existente entre ambos factores, se encuentra el hecho de que la presencia en conjunto de CCN2 y TGF- β se ha descrito como necesaria para inducir y mantener el proceso fibrótico que se genera en diversas patologías (182,349,350). En este sentido, los resultados descritos en esta tesis demuestran que CCN2 induce un aumento en los niveles de TGF β 2 en CMLVs, posibilitando por tanto una retroalimentación positiva en la activación de la vía de TGF- β , mientras que, por el contrario, el tratamiento con TGF- β reduce los niveles de TGF β 2 y, por tanto, potenciaría una desactivación de la vía. Este hecho proporciona una posible explicación a la necesidad de la coexistencia de ambos factores para mantener una respuesta fibrótica sostenida. Profundizando en la regulación de la vía de TGF- β se puede observar que existe un amplio rango de componentes y factores que interaccionan para activar la ruta y regular la expresión de una extensa lista de genes que tienen un papel fundamental en la respuesta profibrótica inducida por este factor), entre los que se encuentra el propio CCN2 (206,209,351). Por todo ello, la regulación de los niveles de los distintos componentes de la vía de TGF- β resulta crucial para desencadenar la activación de la vía, siendo los niveles de los dos receptores que forman el complejo heteromérico TGF β 1/TGF β 2 uno de los principales puntos de regulación (352). Una vez formado tras la activación por TGF- β , este complejo se internaliza rápidamente mediante dos vías diferentes: la vía dependiente de clatrina, que ayuda a la activación de la vía canónica de las SMAD, y un proceso dependiente de caveolina y balsas lipídicas, que implica la degradación del complejo y la inactivación de la vía (353). A nivel vascular, la importancia de los receptores de TGF- β se ha descrito en diversas patologías, teniendo especial relevancia en el cambio de fenotipo de las CMLVs, en las cuales se ha observado un descenso en el ratio TGF β 2/TGF β 1 en las lesiones ateroscleróticas y restenóticas, situaciones patológicas en las que precisamente las CMLVs tienden a presentar un fenotipo fibrótico (354–356). Curiosamente, un fármaco utilizado comúnmente en la práctica clínica para el tratamiento de la aterosclerosis, como son las estatinas, ha demostrado tener un efecto directo sobre los niveles de los receptores de TGF- β tanto *in vitro* como *in vivo*, de tal forma que inducen un incremento en los niveles de TGF β 2 a la par que aumentan los niveles de CCN2 ((357)). Los resultados de esta tesis, por tanto, parecen indicar que una larga estimulación con TGF- β implicaría la activación de las vías de internalización del complejo TGF β 2/TGF β 1 contribuyendo a su degradación, por lo que sería el aumento en los niveles de CCN2 inducido por el propio TGF- β el que permitirían mantener la activación sostenida de la respuesta de TGF- β mediante la inducción de la expresión de TGF β 2.

DISCUSIÓN

En lo que respecta a los mecanismos celulares directamente regulados por CCN2 a nivel vascular, previamente se ha descrito que este factor puede inducir una respuesta prooxidativa y proinflamatoria en CMLVs y en aortas de ratón mediante la activación del EGFR (221). En esta tesis, se ha descrito que CCN2 puede, además, contribuir a la activación rápida de la vía de las SMAD en CMLVs de ratón, y que sería la activación de esta vía a través del EGFR la que desencadenaría el aumento en la expresión de TGF β R2 observado tras 48 horas de estimulación con CCN2 (**Figura 36**).

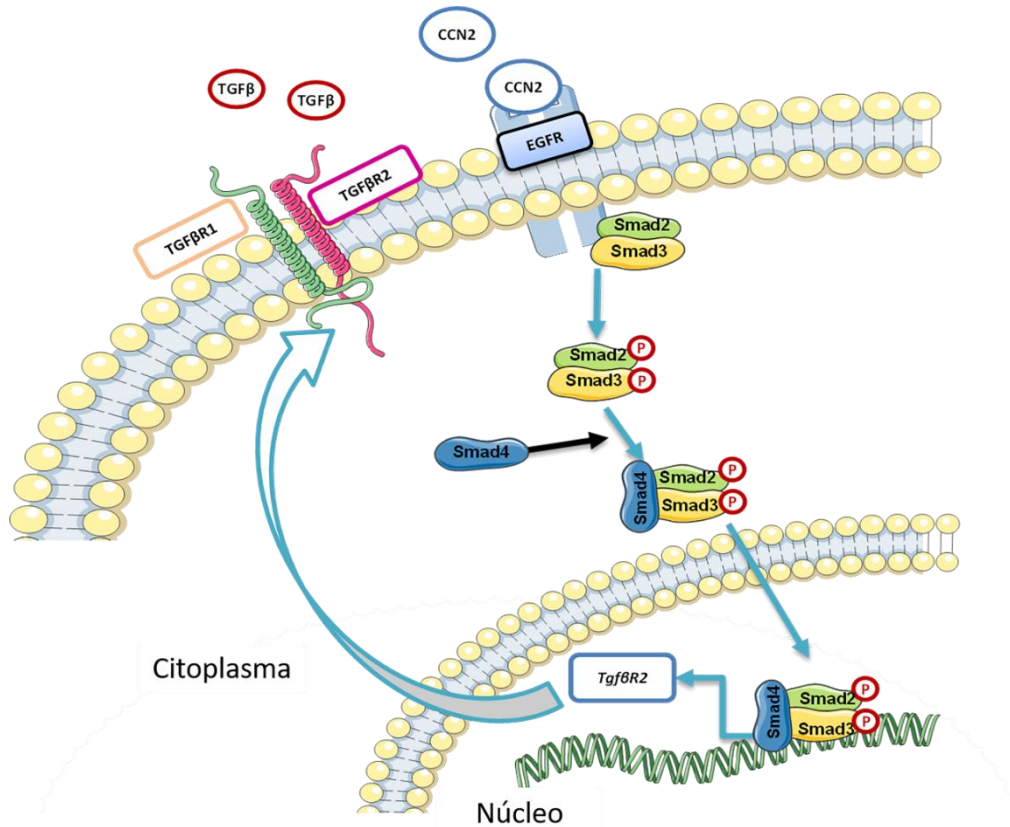


Figura 36.- Esquema gráfico del mecanismo propuesto por el que CCN2 puede estar activando la expresión de TGF β RII.

Con toda la información recabada gracias a los resultados obtenidos a lo largo del desarrollo de esta tesis, junto con la información descrita en estudios previos, queda claro el papel fundamental que desempeña CCN2 en el mantenimiento de la homeostasis vascular, abriendo por tanto un nuevo campo de estudio en torno a CCN2 y las patologías vasculares que debería ser tenido en cuenta para futuras investigaciones, como puede ser la posible existencia de mutaciones y/o polimorfismos en este gen que conlleven un aumento en la predisposición a la generación de aneurismas en humanos.

CONCLUSIONES

- 1.- La deficiencia adquirida de *Ccn2* en ratones predispone a la formación rápida de aneurismas aórticos (AAs) tras la infusión de angiotensina (Ang) II.
- 2.- La administración de Ang II en ratones deficientes en CCN2 reduce la tasa de supervivencia un 50% tras 15 días debido a la rotura de los AAs generados
- 3.- La deficiencia adquirida de *Ccn2* en ratones provoca cambios en la estructura y la función de la aorta, incluyendo la pérdida de fibras elásticas, modificaciones en la rigidez y cambios en las respuestas vasoconstrictoras y vasodilatadoras.
- 4.- La ausencia de CCN2 incrementa la actividad de las metaloproteinasas de matriz (MMP)-2 y -9 y los niveles de MMP-8, y exacerba la expresión de diversos factores proinflamatorios inducida por Ang II a nivel aórtico
- 5.- La ausencia de CCN2 disminuye la respuesta de proliferación y de la migración de las células de músculo liso vascular (CMLVs) de aorta de ratón *in vitro*.
- 6.- La administración exógena preventiva del fragmento C-terminal de CCN2 (CCN2(IV)) en ratones deficientes en CCN2, como aproximación para mantener los niveles de CCN2 circulante, no protege frente a la formación y la rotura de los AAs y la subsecuente muerte asociada generada tras la infusión sistémica de Ang II.
- 7.- El tratamiento preventivo con el bloqueante del receptor de mineralocorticoides espironolactona reduce la formación de AAs y la mortalidad asociada a la rotura de los mismos tras la infusión sistémica de Ang II en ratones deficientes en CCN2.
- 8.- La estimulación de CMLVs de aorta de ratón *in vitro* con CCN2(IV) incrementa la expresión, tanto génica como proteica, del receptor tipo II de TGF- β (TGF β RII) de manera dependiente a la activación del EGFR y de la vía SMAD, mientras que el tratamiento con TGF- β disminuye los niveles de TGF β RII.

Como conclusión general, los resultados de esta tesis demuestran que CCN2 tiene una función esencial en el mantenimiento de la homeostasis de la pared aórtica y que su ausencia genera alteraciones que predisponen a la formación y la rotura de aneurismas. Además, los datos obtenidos amplían el conocimiento de las rutas moleculares moduladas por CCN2, remarcando sus diferentes acciones dependiendo del contexto biológico. Finalmente, este estudio cambia la visión tradicional de CCN2 como elemento deletéreo en la fisiopatología de los AAs, abriendo por tanto nuevas vías de investigación en este campo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. [cited 2022 Dec 1]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
2. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol*. 2020 Dec 22;76(25):2982–3021.
3. Mensah GA, Roth GA, Fuster V. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors: 2020 and Beyond. Vol. 74, *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier; 2019. p. 2529–32.
4. Ritchie H, Spooner F, Roser M. Causes of death - Our World in Data [Internet]. [cited 2022 Dec 1]. Available from: <https://ourworldindata.org/causes-of-death#what-do-people-die-from>
5. IHME. VizHub - GBD Compare [Internet]. [cited 2022 Dec 1]. Available from: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-compare/>
6. Tsao CW, Aday AW, Almarazooq ZI, Alonso A, Beaton AZ, Bittencourt MS, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report from the American Heart Association. *Circulation*. 2022 Feb 22;145(8):E153–639.
7. Wikipedia. Disability-adjusted life year - Wikipedia [Internet]. [cited 2022 Dec 1]. Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Disability-adjusted_life_year
8. Mills KT, Stefanescu A, He J. The global epidemiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol*. 2020 Apr 1;16(4):223–37.
9. Kirkland EB, Heincelman M, Bishu KG, Schumann SO, Schreiner A, Axon RN, et al. Trends in Healthcare Expenditures Among US Adults With Hypertension: National Estimates, 2003-2014. *J Am Heart Assoc*. 2018 Jun 1;7(11).
10. Wang G, Yan L, Ayala C, George MG, Fang J. Hypertension-associated expenditures for medication among US adults. *Am J Hypertens*. 2013 Nov 1;26(11):1295–302.
11. Metsker O, Kopanitsa G, Irtyuga O, Uspenskiy V. Dynamic Aortic Aneurism Risk Factors. *Stud Health Technol Inform*. 2021 Oct 27;285:130–5.
12. Teo KK, Rafiq T. Cardiovascular Risk Factors and Prevention: A Perspective From Developing Countries. *Can J Cardiol*. 2021 May 1;37(5):733–43.
13. Enfermedad de las arterias coronarias: MedlinePlus en español [Internet]. [cited 2022 Dec 1]. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/coronaryarteryrdisease.html>
14. Neil HAW, Hawkins MM, Durrington PN, Betteridge DJ, Capps NE, Humphries SE. Non-coronary heart disease mortality and risk of fatal cancer in patients with treated heterozygous familial hypercholesterolaemia: a prospective registry study. *Atherosclerosis*. 2005;179(2):293–7.
15. Hypertension [Internet]. [cited 2022 Dec 1]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
16. Williams B, Mancia G, Spiering W, Rosei EA, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the

BIBLIOGRAFÍA

- European Society of Hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2018;36(10):1956–2041.
17. Unger T, Borghi C, Charchar F, Khan NA, Poulter NR, Prabhakaran D, et al. 2020 International Society of Hypertension global hypertension practice guidelines. *J Hypertens*. 2020 Jun 1;38(6):982–1004.
 18. Hypertension in adults: diagnosis and management | Guidance | NICE [Internet]. [cited 2022 Dec 1]. Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng136>
 19. Guideline for the pharmacological treatment of hypertension in adults.
 20. Stanaway JD, Afshin A, Gakidou E, Lim SS, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* (London, England). 2018 Nov 10;392(10159):1923–94.
 21. Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: A meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet*. 2002 Dec 14;360(9349):1903–13.
 22. Gu D, Kelly TN, Wu X, Chen JC, Duan X, Huang JF, et al. Blood pressure and risk of cardiovascular disease in Chinese men and women. *Am J Hypertens*. 2008 Mar;21(3):265–72.
 23. Thomas H, Diamond J, Vieco A, Chaudhuri S, Shinnar E, Cromer S, et al. Global Atlas of Cardiovascular Disease 2000-2016: The Path to Prevention and Control. *Glob Heart*. 2018 Sep 1;13(3):143–63.
 24. Miura K, Daviglius ML, Dyer AR, Liu K, Garside DB, Stamler J, et al. Relationship of blood pressure to 25-year mortality due to coronary heart disease, cardiovascular diseases, and all causes in young adult men: the Chicago Heart Association Detection Project in Industry. *Arch Intern Med*. 2001;161(12):1501–8.
 25. Piper MA, Evans C V., Burda BU, Margolis KL, O'Connor E, Whitlock EP. Diagnostic and predictive accuracy of blood pressure screening methods with consideration of rescreening intervals: a systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2015 Feb 3;162(3):192–204.
 26. Forouzanfar MH, Liu P, Roth GA, Ng M, Biryukov S, Marczak L, et al. Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. *JAMA*. 2017 Jan 10;317(2):165–82.
 27. Mills KT, Bundy JD, Kelly TN, Reed JE, Kearney PM, Reynolds K, et al. Global Disparities of Hypertension Prevalence and Control: A Systematic Analysis of Population-Based Studies From 90 Countries. *Circulation*. 2016 Aug 9;134(6):441–50.
 28. Turnbull F, Neal B, Algert C, Chalmers J, Woodward M, MacMahon S, et al. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: Results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet*. 2003 Nov 8;362(9395):1527–35.
 29. Ettehad D, Emdin CA, Kiran A, Anderson SG, Callender T, Emberson J, et al. Blood

BIBLIOGRAFÍA

- pressure lowering for prevention of cardiovascular disease and death: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* (London, England). 2016 Mar 5;387(10022):957–67.
30. WC C, GW E, RP B, DC G, RH G, JA C, et al. Effects of intensive blood-pressure control in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2010 Apr 29;362(17):1575–85.
 31. Whelton PK, Appel LJ, Espeland MA, Applegate WB, Ettinger WH, Kostis JB, et al. Sodium reduction and weight loss in the treatment of hypertension in older persons: a randomized controlled trial of nonpharmacologic interventions in the elderly (TONE). TONE Collaborative Research Group. *JAMA*. 1998 Mar 18;279(11):839–46.
 32. Cook NR, Cutler JA, Obarzanek E, Buring JE, Rexrode KM, Kumanyika SK, et al. Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP). *BMJ*. 2007 Apr 28;334(7599):885–8.
 33. Borzecki AM, Oliveria SA, Berlowitz DR. Barriers to hypertension control. *Am Heart J*. 2005 May;149(5):785–94.
 34. Mills KT, Obst KM, Shen W, Molina S, Zhang HJ, He H, et al. Comparative Effectiveness of Implementation Strategies for Blood Pressure Control in Hypertensive Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2018 Jan 16;168(2):110–20.
 35. Di Cesare M, Bentham J, Stevens GA, Zhou B, Danaei G, Lu Y, et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* (London, England). 2016 Apr 2;387(10026):1377–96.
 36. Guthold R, Stevens GA, Riley LM, Bull FC. Worldwide trends in insufficient physical activity from 2001 to 2016: a pooled analysis of 358 population-based surveys with 1.9 million participants. *Lancet Glob Heal*. 2018 Oct 1;6(10):e1077–86.
 37. Iwahori T, Miura K, Ueshima H, Tanaka-Mizuno S, Chan Q, Arima H, et al. Urinary sodium-to-potassium ratio and intake of sodium and potassium among men and women from multiethnic general populations: the INTERSALT Study. *Hypertens Res*. 2019 Oct 1;42(10):1590–8.
 38. HELWIG J, RHOADS JE, ROBERTS B. The metabolic response to trauma. *Annu Rev Med*. 1956;7:141–56.
 39. Yun AJ, Doux JD, Lee PY. Contrast nephropathy may be partly mediated by autonomic dysfunction: renal failure considered as a modern maladaptation of the prehistoric trauma response. *Med Hypotheses*. 2006;66(4):776–83.
 40. Fountain JH, Lappin SL. Physiology, Renin Angiotensin System. *StatPearls*. 2022 Jun 18;
 41. Benigni A, Cassis P, Remuzzi G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Mol Med*. 2010 Jul;2(7):247–57.
 42. Cantero-Navarro E, Fernández-Fernández B, Ramos AM, Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez RR, Sánchez-Niño MD, et al. Renin-angiotensin system and inflammation update. *Mol Cell Endocrinol*. 2021 Jun 1;529.
 43. Tigerstedt R, Bergman PQ. Niere und Kreislauf1. *Skand Arch Physiol*. 1898 Jan 1;8(1):223–71.

BIBLIOGRAFÍA

44. BRAUN-MENENDEZ E, PALADINI AC. Pressor Polypeptides Formed in Vivo and in Vitro as Mediators of Renal Hypertension. *Circulation*. 1958;17(4, Part 2):668–71.
45. SKEGGS LT, MARSH WH, KAHN JR, SHUMWAY NP. The existence of two forms of hypertensin. *J Exp Med*. 1954;99(3):275–82.
46. SKEGGS LT, KAHN JR, LENTZ K, SHUMWAY NP. The preparation, purification, and amino acid sequence of a polypeptide renin substrate. *J Exp Med*. 1957;106(3):439–53.
47. Fleming I. Signaling by the angiotensin-converting enzyme. *Circ Res*. 2006 Apr;98(7):887–96.
48. MA C, R S, GY O, C Y, I K, SE S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature*. 2002 Jun 20;417(6891):822–8.
49. Ferrario CM, Chappell MC. Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Nov;61(21):2720–7.
50. Danilczyk U, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme II in the heart and the kidney. *Circ Res*. 2006 Mar;98(4):463–71.
51. Balakumar P, Jagadeesh G. A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. *Cell Signal*. 2014;26(10):2147–60.
52. Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol*. 1992;54:227–41.
53. Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassègue B, Alexander RW. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 1997;29(1 Pt 2):366–73.
54. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Jan;292(1).
55. Wu R, Laplante MA, De Champlain J. Cyclooxygenase-2 inhibitors attenuate angiotensin II-induced oxidative stress, hypertension, and cardiac hypertrophy in rats. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2005 Jun;45(6):1139–44.
56. Welch WJ. Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2008 Jul 1;52(1):51–6.
57. Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996 Apr 15;97(8):1916–23.
58. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, König S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ Res*. 2000 Jun 23;86(12):1266–72.
59. Ruiz-Ortega M, Lorenzo Ó, Rupérez M, Blanco J, Egido J. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-kappaB and AP-1 in the kidney: role of AT(1) and AT(2) receptors. *Am J Pathol*. 2001;158(5):1743–56.
60. Levy M. How well do we manage and support patients and families with dominantly

- inherited renal disease? *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(1):1–4.
61. Esteban V, Ruperez M, Vita JR, López ES, Mezzano S, Plaza JJ, et al. Effect of simultaneous blockade of AT1 and AT2 receptors on the NFκB pathway and renal inflammatory response. *Kidney Int*. 2003 Oct 1;64(86):S33–8.
 62. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Jun 1;35(6):881–900.
 63. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Egido J. ACE inhibitors and AT(1) receptor antagonists-beyond the haemodynamic effect. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(5):561–5.
 64. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Rupérez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001;10(3):321–9.
 65. Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, et al. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006 Mar;15(2):159–66.
 66. Van Kats JP, Danser AHJ, Van Meegen JR, Sassen LMA, Verdouw PD, Schalekamp MADH. Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. *Circulation*. 1998 Jul 7;98(1):73–81.
 67. Dai Q, Xu M, Yao M, Sun B. Angiotensin AT1 receptor antagonists exert anti-inflammatory effects in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2007 Dec;152(7):1042–8.
 68. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol*. 2009 Oct;9(10):692–703.
 69. Álvarez Á, Cerdá-Nicolás M, Abu Nabah YN, Mata M, Issekutz AC, Panés J, et al. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood*. 2004 Jul 15;104(2):402–8.
 70. Piqueras L, Kubes P, Alvarez A, O'Connor E, Issekutz AC, Esplugues J V., et al. Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation*. 2000 Oct 24;102(17):2118–23.
 71. Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(3):645–51.
 72. Rupérez M, Lorenzo Ó, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation*. 2003 Sep 23;108(12):1499–505.
 73. Ponticos M. Connective tissue growth factor (CCN2) in blood vessels. *Vascul Pharmacol*. 2013 Mar;58(3):189–93.
 74. 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 Oct;23(10):1782–7.

BIBLIOGRAFÍA

75. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.* 1994;93(6):2431–7.
76. Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, et al. Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2018 Jun 6;98(3):1627–738.
77. Grundy HM, Simpson SA, Tait JF. Isolation of a Highly Active Mineralocorticoid from Beef Adrenal Extract. *Nat* 1952 1694306. 1952;169(4306):795–6.
78. González-Núñez D, Poch E. [Aldosterone: basic physiopathology and new mechanisms of action in the distal nephron]. Vol. 26, *Nefrología : publicacion oficial de la Sociedad Espanola Nefrologia.* Spain; 2006. p. 291–303.
79. Danziger J, Zeidel ML. Osmotic homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015 Jan 1;10(5):852–62.
80. Gorini S, Kim SK, Infante M, Mammi C, La Vignera S, Fabbri A, et al. Role of Aldosterone and Mineralocorticoid Receptor in Cardiovascular Aging. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019 Aug 23;10.
81. Funder JW, Mihailidou AS, Danser J, Ito S, Satoh F, Nishiyama A. Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors—Physiology and Pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2017, Vol 18, Page 1032. 2017 May 11;18(5):1032.
82. Matsuki K, Hathaway CK, Chang AS, Smithies O, Kakoki M. Transforming growth factor beta1 and aldosterone. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015 Mar 13;24(2):139–44.
83. Chun TY, Pratt JH. Aldosterone increases plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2005 Jul 15;239(1–2):55–61.
84. Brown NJ. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2013 Aug;9(8):459–69.
85. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation.* 1998 Apr 14;97(14):1411–20.
86. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, Byun JJ, Colvin MM, et al. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation.* 2022 May 3;145(18):E895–1032.
87. MacGregor MS, Taal MW. Renal Association Clinical Practice Guideline on detection, monitoring and management of patients with CKD. *Nephron Clin Pract.* 2011 May;118 Suppl 1(SUPPL. 1).
88. Angiotensin II Receptor Antagonists. *LiverTox Clin Res Inf Drug-Induced Liver Inj.* 2017 Jan 13;
89. Struthers A, Krum H, Williams GH. A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone. *Clin Cardiol.* 2008 Apr;31(4):153–8.
90. Matsumoto Y, Mori Y, Kageyama S, Arihara K, Sugiyama T, Ohmura H, et al. Spironolactone reduces cardiovascular and cerebrovascular morbidity and mortality in

- hemodialysis patients. *J Am Coll Cardiol.* 2014 Feb 18;63(6):528–36.
91. Lin C, Zhang Q, Zhang H, Lin A. Long-Term Effects of Low-Dose Spironolactone on Chronic Dialysis Patients: A Randomized Placebo-Controlled Study. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2016 Feb 1;18(2):121–8.
 92. Jamerson K, Weber MA, Bakris GL, Dahlöf B, Pitt B, Shi V, et al. Benazepril plus amlodipine or hydrochlorothiazide for hypertension in high-risk patients. *N Engl J Med.* 2008 Dec 4;359(23):2417–28.
 93. F T, B N, T N, C A, H A, F B, et al. Effects of different regimens to lower blood pressure on major cardiovascular events in older and younger adults: meta-analysis of randomised trials. *BMJ.* 2008 May 17;336(7653):1121–3.
 94. Law MR, Morris JK, Wald NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ.* 2009 May 23;338(7705):1245.
 95. Staessen JA, Wang JG, Thijs L. Cardiovascular prevention and blood pressure reduction: a quantitative overview updated until 1 March 2003. *J Hypertens.* 2003 Jun 1;21(6):1055–76.
 96. Yusuf S, Amir A, Jackie B, Joseph P, Lonn E, McCready T, et al. Combination pharmacotherapy to prevent cardiovascular disease: present status and challenges. *Eur Heart J.* 2014 Feb 7;35(6):353–64.
 97. Zhou B, Bentham J, Di Cesare M, Bixby H, Danaei G, Cowan MJ, et al. Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. *Lancet (London, England).* 2017 Jan 7;389(10064):37–55.
 98. Kobeissi E, Hibino M, Pan H, Aune D. Blood pressure, hypertension and the risk of abdominal aortic aneurysms: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Epidemiol.* 2019;34(6).
 99. Nakanishi R, Baskaran L, Gransar H, Budoff MJ, Achenbach S, Al-Mallah M, et al. Relationship of Hypertension to Coronary Atherosclerosis and Cardiac Events in Patients With Coronary Computed Tomographic Angiography. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2017 Aug 1;70(2):293–9.
 100. Crawford ES, Crawford JL, Safi HJ, Coselli JS, Hess KR, Brooks B, et al. Thoracoabdominal aortic aneurysms: preoperative and intraoperative factors determining immediate and long-term results of operations in 605 patients. *J Vasc Surg.* 1986 Mar;3(3):389–404.
 101. Wang Z, You Y, Yin Z, Bao Q, Lei S, Yu J, et al. Burden of Aortic Aneurysm and Its Attributable Risk Factors from 1990 to 2019: An Analysis of the Global Burden of Disease Study 2019. *Front Cardiovasc Med.* 2022 May 31;9:1272.
 102. Huang X, Wang Z, Shen Z, Lei F, Liu YM, Chen Z, et al. Projection of global burden and risk factors for aortic aneurysm—timely warning for greater emphasis on managing blood pressure. *Ann Med.* 2022;54(1):553–64.
 103. Quintana RA, Taylor WR. Cellular Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation. *Circ Res.* 2019;124(4):607–18.

BIBLIOGRAFÍA

104. Kent KC, Zwolak RM, Egorova NN, Riles TS, Manganaro A, Moskowitz AJ, et al. Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. *J Vasc Surg*. 2010 Sep;52(3):539–48.
105. Guirguis-Blake JM, Beil TL, Senger CA, Coppola EL. Primary Care Screening for Abdominal Aortic Aneurysm: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force. *JAMA*. 2019 Dec 10;322(22):2219–38.
106. Wei L, Bu X, Wang X, Liu J, Ma A, Wang T. Global Burden of Aortic Aneurysm and Attributable Risk Factors from 1990 to 2017. *Glob Heart*. 2021 May 4;16(1).
107. Howard DPJ, Banerjee A, Fairhead JF, Handa A, Silver LE, Rothwell PM. Population-Based Study of Incidence of Acute Abdominal Aortic Aneurysms With Projected Impact of Screening Strategy. *J Am Heart Assoc*. 2015 Aug 19;4(8):e001926.
108. Center for Health Statistics N. Deaths, percent of total deaths, and death rates for the 15 leading causes of death in 5-year age groups, by race and sex: United States, 2015. 2015.
109. Safi modification of Crawford TAAA classification - UpToDate [Internet]. [cited 2022 Dec 3]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/image?imageKey=SURG%2F66037>
110. Oliver-Williams C, Sweeting MJ, Turton G, Parkin D, Cooper D, Rodd C, et al. Lessons learned about prevalence and growth rates of abdominal aortic aneurysms from a 25-year ultrasound population screening programme. *Br J Surg*. 2018 Jan 1;105(1):68–74.
111. Erbel R, Aboyans V, Boileau C, Bossone E, Di Bartolomeo R, Eggebrecht H, et al. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases. *Kardiol Pol*. 2014;72(12):1169–252.
112. Hiratzka LF, Creager MA, Isselbacher EM, Svensson LG, Nishimura RA, Bonow RO, et al. Surgery for aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valves: A statement of clarification from the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2016 Feb 16;133(7):680–6.
113. Aneurismas de aorta. Tipos, síntomas y tratamiento. Clínica Universidad de Navarra [Internet]. [cited 2022 Dec 3]. Available from: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/aneurisma-aorta>
114. Members WC, Eric M. Isselbacher MMsF, Ourania Preventza MM, James Hamilton Black IMD, John G. Augoustides MF, Adam W. Beck MD, et al. 2022 ACC/AHA Guideline for the Diagnosis and Management of Aortic Disease: A Report of the American Heart Association/American College of Cardiology Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2022 Nov;
115. Reparación endovascular - aneurisma aórtico: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. [cited 2022 Dec 3]. Available from: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/007391.htm>
116. Swerdlow NJ, Wu WW, Schermerhorn ML. Open and Endovascular Management of Aortic Aneurysms. *Circ Res*. 2019;124(4):647–61.
117. Abdominal aortic aneurysm - Knowledge @ AMBOSS [Internet]. [cited 2022 Dec 6]. Available from: https://www.amboss.com/us/knowledge/Abdominal_aortic_aneurysm

BIBLIOGRAFÍA

118. Lu H, Rateri DL, Bruemmer D, Cassis LA, Daugherty A. Novel mechanisms of abdominal aortic aneurysms. *Curr Atheroscler Rep*. 2012 Oct;14(5):402–12.
119. Lysgaard Poulsen J, Stubbe J, Lindholt JS. Animal Models Used to Explore Abdominal Aortic Aneurysms: A Systematic Review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2016 Oct 1;52(4):487–99.
120. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN. Vascular extracellular matrix in atherosclerosis. *Cardiol Rev*. 2013 Nov;21(6):270–88.
121. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev*. 2005 Jul;85(3):979–1000.
122. Robert L, Jacob MP, Fülöp T. Elastin in blood vessels. *Ciba Found Symp*. 1995;192.
123. Michael H. Ross, Wojciech Pawlina. *Histologia: Texto Y Atlas*. 5th ed. 2007.
124. Dobrucki LW, Sinusas AJ. Targeted Imaging of Abdominal Aortic Aneurysm: Biology Over Structure. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2020;13(3).
125. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Rosa CCD La, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 2;21(24):1–53.
126. Teti A. Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol*. 1992 Apr;2(10 Suppl).
127. Bülow RD, Boor P. Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *J Histochem Cytochem*. 2019 Sep 1;67(9):643–61.
128. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2002 Sep 1;110(5):625–32.
129. Kapoor C, Vaidya S, Wadhwan V, Hitesh, Kaur G, Pathak A. Seesaw of matrix metalloproteinases (MMPs). *J Cancer Res Ther*. 2016 Jan 1;12(1):28–35.
130. Pradhan-Palikhe P, Vikatmaa P, Lajunen T, Palikhe A, Lepäntalo M, Tervahartiala T, et al. Elevated MMP-8 and decreased myeloperoxidase concentrations associate significantly with the risk for peripheral atherosclerosis disease and abdominal aortic aneurysm. *Scand J Immunol*. 2010 Aug;72(2):150–7.
131. Dale MA, Suh MK, Zhao S, Meisinger T, Gu L, Swier VJ, et al. Background differences in baseline and stimulated MMP levels influence abdominal aortic aneurysm susceptibility. *Atherosclerosis*. 2015 Dec 1;243(2):621–9.
132. Jana S, Hu M, Shen M, Kassiri Z. Extracellular matrix, regional heterogeneity of the aorta, and aortic aneurysm. *Exp Mol Med* 2019 5112. 2019 Dec 19;51(12):1–15.
133. VanderLaan PA, Reardon CA. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. The unusual suspects: an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2005;46(5):829–38.
134. Raffort J, Lareyre F, Clément M, Hassen-Khodja R, Chinetti G, Mallat Z. Monocytes and macrophages in abdominal aortic aneurysm. *Nat Rev Cardiol*. 2017 Aug 1;14(8):457–71.

BIBLIOGRAFÍA

135. Korai M, Purcell J, Kamio Y, Mitsui K, Furukawa H, Yokosuka K, et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development of Intracranial Aneurysm Rupture. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2021;77(6):2084–93.
136. Werb Z, Banda MJ, Jones PA. Degradation of connective tissue matrices by macrophages. I. Proteolysis of elastin, glycoproteins, and collagen by proteinases isolated from macrophages. *J Exp Med*. 1980;152(5):1340–57.
137. Scott RAP, Bridgewater SG, Ashton HA. Randomized clinical trial of screening for abdominal aortic aneurysm in women. *Br J Surg*. 2002;89(3):283–5.
138. Rogers IS, Massaro JM, Truong QA, Mahabadi AA, Kriegel MF, Fox CS, et al. Distribution, determinants, and normal reference values of thoracic and abdominal aortic diameters by computed tomography (from the Framingham Heart Study). *Am J Cardiol*. 2013 May 15;111(10):1510–6.
139. Chaikof EL, Dalman RL, Eskandari MK, Jackson BM, Lee WA, Mansour MA, et al. The Society for Vascular Surgery practice guidelines on the care of patients with an abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2018 Jan 1;67(1):2-77.e2.
140. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, et al. The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch Intern Med*. 2000 May 22;160(10):1425–30.
141. Lederle FA, Nelson DB, Joseph AM. Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: A systematic review. *J Vasc Surg*. 2003;38(2):329–34.
142. Aune D, Schlesinger S, Norat T, Riboli E. Tobacco smoking and the risk of abdominal aortic aneurysm: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1).
143. Wong DR, Willett WC, Rimm EB. Smoking, hypertension, alcohol consumption, and risk of abdominal aortic aneurysm in men. *Am J Epidemiol*. 2007 Apr;165(7):838–45.
144. JJ B, J D, GM B, M C, C D, B E, et al. Results of the randomized, placebo-controlled clopidogrel and acetylsalicylic acid in bypass surgery for peripheral arterial disease (CASPAR) trial. *J Vasc Surg*. 2010;52(4):825-833.e2.
145. Ramella M, Bernardi P, Fusaro L, Manfredi M, Casella F, Porta CM, et al. Relevance of inflammation and matrix remodeling in abdominal aortic aneurysm (AAA) and popliteal artery aneurysm (PAA) progression. *Am J Transl Res*. 2018;10(10):3265.
146. Bhak RH, Wininger M, Johnson GR, Lederle FA, Messina LM, Ballard DJ, et al. Factors associated with small abdominal aortic aneurysm expansion rate. *JAMA Surg*. 2015 Jan 1;150(1):44–50.
147. Brown LC, Powell JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann Surg*. 1999 Sep;230(3):289–97.
148. Sakalihasan N, Michel JB, Katsargyris A, Kuivaniemi H, Defraigne JO, Nchimi A, et al. Abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Dis Prim*. 2018 Dec 1;4(1).

BIBLIOGRAFÍA

149. Clifton MA. Familial abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg.* 1977;64(11):765–6.
150. Salo JA, Soisalon-Soininen S, Bondestam S, Mattila PS. Familial occurrence of abdominal aortic aneurysm. *Ann Intern Med.* 1999 Apr 20;130(8):637–42.
151. Blanchard JF, Armenian HK, Friesen PP. Risk factors for abdominal aortic aneurysm: results of a case-control study. *Am J Epidemiol.* 2000 Mar 15;151(6):575–83.
152. Larsson E, Granath F, Swedenborg J, Hultgren R. A population-based case-control study of the familial risk of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg.* 2009 Jan;49(1):47–51.
153. Meester JAN, Verstraeten A, Schepers D, Alaerts M, Laer L Van, Loeys BL. Differences in manifestations of Marfan syndrome, Ehlers-Danlos syndrome, and Loeys-Dietz syndrome. *Ann Cardiothorac Surg.* 2017 Nov 1;6(6):582–94.
154. Verstraeten A, Alaerts M, Van Laer L, Loeys B. Marfan Syndrome and Related Disorders: 25 Years of Gene Discovery. *Hum Mutat.* 2016 Jun 1;37(6):524–31.
155. Robinson PN, Arteaga-Solis E, Baldock C, Collod-Bérout G, Booms P, De Paepe A, et al. The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet.* 2006 Oct;43(10):769–87.
156. Godfrey M, Menashe V, Weleber RG, Koler RD, Bigley RH, Lovrien E, et al. Cosegregation of elastin-associated microfibrillar abnormalities with the Marfan phenotype in families. *Am J Hum Genet.* 1990;46(4):652.
157. Sakai LY, Keene DR, Renard M, De Backer J. FBN1: The disease-causing gene for Marfan syndrome and other genetic disorders. *Gene.* 2016 Oct 10;591(1):279–91.
158. Bonetti MI. Microfibrils: a cornerstone of extracellular matrix and a key to understand Marfan syndrome. *Ital J Anat Embryol.* 2009 Oct;114(4):201–24.
159. Harradine KA, Akhurst RJ. Mutations of TGFbeta signaling molecules in human disease. *Ann Med.* 2006 Oct 1;38(6):403–14.
160. Hiratzka LF, Bakris GL, Beckman JA, Bersin RM, Carr VF, Casey DE, et al. 2010 ACCF/AHA/AATS/ACR/ASA/SCA/SCAI/SIR/STS/SVM guidelines for the diagnosis and management of patients with Thoracic Aortic Disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, American Association for Thoracic Surgery, American College of Radiology, American Stroke Association, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Interventional Radiology, Soc. Circulation. 2010;121(13).
161. Judge DP, Dietz HC. Therapy of Marfan syndrome. *Annu Rev Med.* 2008;59:43–59.
162. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet.* 2003 Mar 1;33(3):407–11.
163. Gallo EM, Loch DC, Habashi JP, Calderon JF, Chen Y, Bedja D, et al. Angiotensin II-dependent TGF-β signaling contributes to Loeys-Dietz syndrome vascular pathogenesis. *J Clin Invest.* 2014 Jan 2;124(1):448–60.
164. Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, et al. Aneurysm

BIBLIOGRAFÍA

- syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med.* 2006 Aug 24;355(8):788–98.
165. Germain DP, Herrera-Guzman Y. Vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Ann Genet.* 2004;47(1):1–9.
166. Gotzsche CO, Krag-Olsen B, Nielsen J, Sorensen KE, Kristensen BO. Prevalence of cardiovascular malformations and association with karyotypes in Turner's syndrome. *Arch Dis Child.* 1994;71(5):433–6.
167. Biner S, Rafique AM, Ray I, Cuk O, Siegel RJ, Tolstrup K. Aortopathy is prevalent in relatives of bicuspid aortic valve patients. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(24):2288–95.
168. Verma S, Siu SC. Aortic dilatation in patients with bicuspid aortic valve. *N Engl J Med.* 2014 May 15;370(20):1920–9.
169. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:753–91.
170. Javelaud D, Mauviel A. Mammalian transforming growth factor- β s: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(7):1161–5.
171. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2005 Dec 1;19(23):2783–810.
172. Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett.* 2002 Jun 3;82(1–2):85–91.
173. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:597–641.
174. Kingsley DM. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 1994;8(2):133–46.
175. Massagué J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):295–309.
176. Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000 May 4;342(18):1350–8.
177. Zhao B, Chen Y-G. Regulation of TGF- β Signal Transduction. *Scientifica (Cairo).* 2014;2014:1–9.
178. Caja L, Dituri F, Mancarella S, Caballero-Diaz D, Moustakas A, Giannelli G, et al. TGF- β and the Tissue Microenvironment: Relevance in Fibrosis and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 May 1;19(5).
179. Syed V. TGF- β Signaling in Cancer. *J Cell Biochem.* 2016 Jun 1;117(6):1279–87.
180. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 2003 Jan 15;116(Pt 2):217–24.
181. Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci.* 2006 Dec 1;119(Pt 23):4803–10.
182. Strutz F. Signaling in fibrosis: targeting the TGF beta, endothelin-1 and CCN2 axis in scleroderma. *Front Biosci (Elite Ed).* 2009 Jan 6;1(1):125–31.

BIBLIOGRAFÍA

183. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest.* 1992;90(2):456–61.
184. Conway SJ, Kaartinen V. TGF β superfamily signaling in the neural crest lineage. *Cell Adh Migr.* 2011;5(3).
185. Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res.* 2007 May 1;74(2):196–206.
186. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009 Jan;19(1):128–39.
187. Zhang YE. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Feb 1;9(2).
188. Yamashita M, Fatyol K, Jin C, Wang X, Liu Z, Zhang YE. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell.* 2008 Sep 26;31(6):918–24.
189. Zhu SB, Zhu J, Zhou ZZ, Xi EP, Wang RP, Zhang Y. TGF- β 1 induces human aortic vascular smooth muscle cell phenotype switch through PI3K/AKT/ID2 signaling. *Am J Transl Res.* 2015;7(12):2764–74.
190. Suwanabol PA, Seedial SM, Shi X, Zhang F, Yamanouchi D, Roenneburg D, et al. Transforming growth factor- β increases vascular smooth muscle cell proliferation through the Smad3 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinases pathways. *J Vasc Surg.* 2012;56(2).
191. Zhang F, Guo X, Xia Y, Mao L. An update on the phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci.* 2021 Jan 1;79(1).
192. Toma I, McCaffrey TA. Transforming growth factor- β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res.* 2012 Jan;347(1):155–75.
193. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004 May;18(7):816–27.
194. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol.* 2002;118(2):211–5.
195. Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep.* 2003;5(1):73–9.
196. Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Johnson R, Lan HY. Role of TGF-beta signaling in extracellular matrix production under high glucose conditions. *Kidney Int.* 2003 Jun 1;63(6):2010–9.
197. Li JH, Huang XR, Zhu HJ, Oldfield M, Cooper M, Truong LD, et al. Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. *FASEB J.* 2004;18(1):176–8.
198. Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2016 126. 2016 Apr 25;12(6):325–38.

BIBLIOGRAFÍA

199. Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, et al. Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*. 2006 Apr 7;312(5770):117–21.
200. Meester JAN, Vandeweyer G, Pintelon I, Lammens M, Van Hoorick L, De Belder S, et al. Loss-of-function mutations in the X-linked biglycan gene cause a severe syndromic form of thoracic aortic aneurysms and dissections. *Genet Med*. 2017 Apr 1;19(4):386–95.
201. Ruddy JM, Jones JA, Ikonomidis JS. Pathophysiology of Thoracic Aortic Aneurysm (TAA): Is It Not One Uniform Aorta? Role of Embryologic Origin. *Prog Cardiovasc Dis*. 2013 Jul 1;56(1):68–73.
202. Yang P, Schmit BM, Fu C, Desart K, Oh SP, Berceli SA, et al. Smooth muscle cell-specific *Tgfbr1* deficiency promotes aortic aneurysm formation by stimulating multiple signaling events. *Sci Rep*. 2016 Oct 14;6.
203. 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(6):1285–94.
204. Perbal B, Tweedie S, Bruford E. The official unified nomenclature adopted by the HGNC calls for the use of the acronyms, CCN1-6, and discontinuation in the use of CYR61, CTGF, NOV and WISP 1-3 respectively. *J Cell Commun Signal*. 2018 Dec 1;12(4):625–9.
205. Perbal B. The CCN family of genes: a brief history. *Mol Pathol*. 2001;54(2):103–4.
206. Rayego-Mateos S, Campillo S, Rodrigues-Diez RR, Tejera-Muñoz A, Marquez-Exposito L, Goldschmeding R, et al. Interplay between extracellular matrix components and cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *Clin Sci (Lond)*. 2021 Aug 1;135(16):1999–2029.
207. Perbal B. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet (London, England)*. 2004 Jan 3;363(9402):62–4.
208. Kaasbøll OJ, Gadicherla AK, Wang JH, Monsen VT, Hagelin EMV, Dong MQ, et al. Connective tissue growth factor (CCN2) is a matricellular preproprotein controlled by proteolytic activation. *J Biol Chem*. 2018 Nov 16;293(46):17953–70.
209. Chen Z, Zhang N, Chu HY, Yu Y, Zhang ZK, Zhang G, et al. Connective Tissue Growth Factor: From Molecular Understandings to Drug Discovery. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Oct 29;8.
210. Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT, 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 U S A*. 1997 Nov 25;94(24):12981–6.
211. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol*. 2002;4(8):599–604.
212. Adams JC, Tucker RP. The Thrombospondin Type 1 Repeat (TSR) Superfamily: Diverse Proteins With Related Roles in Neuronal Development. 2000;280–99.
213. Sánchez-López E, Díez RR, Vita JR, Mateos SR, Díez RRR, García ER, et al. [Connective

BIBLIOGRAFÍA

- tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage]. *Nefrologia*. 2009;29(5):382–91.
214. Rachfal AW, Brigstock DR. Structural and Functional Properties of CCN Proteins. *Vitam Horm*. 2005;70:69–103.
 215. Hall-Glenn F, Lyons KM. Roles for CCN2 in normal physiological processes. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Oct;68(19):3209–17.
 216. Hashimoto G, Inoki I, Fujii Y, Aoki T, Ikeda E, Okada Y. Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27;277(39):36288–95.
 217. de Winter P, Leoni P, Abraham D. Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. *Growth Factors*. 2008 Apr;26(2):80–91.
 218. Brigstock DR, Steffen CL, Kim GY, Vegunta RK, Diehl JR, Harding PA. Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor. *J Biol Chem*. 1997 Aug 8;272(32):20275–82.
 219. Sánchez-López E, Rayego S, Rodrigues-Díez RR, Rodríguez JS, Rodrigues-Díez RR, Rodríguez-Vita J, et al. CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF- κ B. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Jul;20(7):1513–26.
 220. Rodrigues-Díez R, Rodrigues-Díez RR, Rayego-Mateos S, Suarez-Alvarez B, Lavoz C, Stark Aroeira L, et al. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor is a novel immune modulator of the Th17 response. *Lab Invest*. 2013 Jul;93(7):812–24.
 221. Rodrigues-Díez RR, Garcia-Redondo AB, Orejudo M, Rodrigues-Díez R, Briones AM, Bosch-Panadero E, et al. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor, through EGFR/Nox1 signaling, activates the NF- κ B pathway and proinflammatory factors in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Jan 1;22(1):29–47.
 222. Gerritsen KG, Abrahams AC, Peters HP, Nguyen TQ, Koeners MP, Den Hoedt CH, et al. Effect of GFR on plasma N-terminal connective tissue growth factor (CTGF) concentrations. *Am J Kidney Dis*. 2012 May;59(5):619–27.
 223. Riser BL, Cortes P, DeNichilo M, Deshmukh P V., Chahal PS, Mohammed AK, et al. Urinary CCN2 (CTGF) as a possible predictor of diabetic nephropathy: preliminary report. *Kidney Int*. 2003 Aug 1;64(2):451–8.
 224. Babic AM, Chen C-C, Lau LF. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin α v β 3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biol*. 1999 Apr;19(4):2958–66.
 225. Chen G, Grotendorst G, Eichholtz T, Khalil N. GM-CSF increases airway smooth muscle cell connective tissue expression by inducing TGF- β receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Mar 1;284(3).
 226. 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 α 5 β 1. *FEBS Lett*. 2006 Feb 20;580(5):1376–82.

BIBLIOGRAFÍA

227. Liu X, Luo F, Li J, Wu W, Li L, Chen H. Homocysteine induces connective tissue growth factor expression in vascular smooth muscle cells. *J Thromb Haemost.* 2008 Jan;6(1):184–92.
228. 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 Feb 26;274(9):5830–4.
229. Park SK, Kim J a., Seomun Y, Choi J, Kim DH, Han IO, et al. Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;284(4):966–71.
230. Rimon 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 Jun;149(6):2952–8.
231. 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.
232. 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 Oct;62(4):1149–59.
233. 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.
234. Wahab NA, Weston BS, Mason RM. Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Exp Cell Res.* 2005 Jul 15;307(2):305–14.
235. Rodriguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Rupérez M, Esteban V, Sanchez-López E, Plaza JJ, et al. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2005 Jul 22;97(2):125–34.
236. Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, Laurent M, Martinerie C. The CCN family: a new class of inflammation modulators? *Biochimie.* 2011 Mar;93(3):377–88.
237. Chen CC, Lau LF. Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Apr;41(4):771–83.
238. Cicha I, Yilmaz A, Klein M, Raithel D, Brigstock DR, Daniel WG, et al. Connective tissue growth factor is overexpressed in complicated atherosclerotic plaques and induces mononuclear cell chemotaxis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 May;25(5):1008–13.
239. Marquez-Exposito L, Tejedor-Santamaria L, Santos-Sanchez L, Valentijn FA, Cantero-Navarro E, Rayego-Mateos S, et al. Acute Kidney Injury is Aggravated in Aged Mice by the Exacerbation of Proinflammatory Processes. *Front Pharmacol.* 2021 Jun 22;12.
240. Marquez-Exposito L, Tejedor-Santamaria L, Valentijn FA, Tejera-Muñoz A, Rayego-Mateos S, Marchant V, et al. Oxidative Stress and Cellular Senescence Are Involved in the Aging Kidney. *Antioxidants* 2022, Vol 11, Page 301. 2022 Jan 31;11(2):301.

BIBLIOGRAFÍA

241. 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 Jun 29;247(3):905–9.
242. Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, Enomoto H, Nakamura H, Makino K ichi, et al. Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J*. 2002;16(2):219–21.
243. Moussad EEDA, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab*. 2000;71(1–2):276–92.
244. Huang J, Huang H, Wu M, Li J, Xie H, Zhou H, et al. Connective tissue growth factor induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells through ERK signaling. *Int J Mol Med*. 2013 Aug;32(2):423–9.
245. Rayego-Mateos S, Morgado-Pascual JL, Rodrigues-Diez RR, Rodrigues-Diez R, Falke LL, Mezzano S, et al. Connective tissue growth factor induces renal fibrosis via epidermal growth factor receptor activation. *J Pathol*. 2018 Feb 1;244(2):227–41.
246. Rayego-Mateos S, Rodrigues-Díez R, Morgado-Pascual JL, Rodrigues Díez RR, Mas S, Lavoz C, et al. Connective tissue growth factor is a new ligand of epidermal growth factor receptor. *J Mol Cell Biol*. 2013 Oct;5(5):323–35.
247. Chang CC, Yang MH, Lin BR, Chen ST, Pan SH, Hsiao M, et al. CCN2 inhibits lung cancer metastasis through promoting DAPK-dependent anoikis and inducing EGFR degradation. *Cell Death Differ*. 2013;20(3):443–55.
248. Chang CC, Yang MH, Lin BR, Chen ST, Pan SH, Hsiao M, et al. Correction to: CCN2 inhibits lung cancer metastasis through promoting DAPK-dependent anoikis and inducing EGFR degradation. *Cell Death Differ*. 2019 Jan 1;26(1):196.
249. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development*. 2003 Jun;130(12):2779–91.
250. Aguet F, Brown AA, Castel SE, Davis JR, He Y, Jo B, et al. Genetic effects on gene expression across human tissues. *Nature*. 2017 Oct 11;550(7675):204–13.
251. Gene: CCN2 (ENSG00000118523) - Summary - Homo_sapiens - Ensembl genome browser 108 [Internet]. [cited 2022 Dec 22]. Available from: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000118523;r=6:131948176-131951372;t=ENST00000367976
252. Hao C, Xie Y, Peng M, Ma L, Zhou Y, Zhang Y, et al. Inhibition of connective tissue growth factor suppresses hepatic stellate cell activation in vitro and prevents liver fibrosis in vivo. *Clin Exp Med*. 2014 May 1;14(2):141–50.
253. Ponticos M, Holmes AM, Shi-wen X, Leoni P, Khan K, Rajkumar VS, et al. Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen. *Arthritis Rheum*. 2009 Jul;60(7):2142–55.
254. Falke LL, Goldschmeding R, Nguyen TQ. A perspective on anti-CCN2 therapy for chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29 Suppl 1(SUPPL. 1).
255. Wang R, Xu YJ, Liu XS, Zeng DX, Xiang M. Knockdown of connective tissue growth factor

BIBLIOGRAFÍA

- by plasmid-based short hairpin RNA prevented pulmonary vascular remodeling in cigarette smoke-exposed rats. *Arch Biochem Biophys*. 2011 Apr 1;508(1):93–100.
256. Szabó Z, Magga J, Alakoski T, Ulvila J, Piuholta J, Vainio L, et al. Connective tissue growth factor inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in pressure overload-induced heart failure. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2014 Jun;63(6):1235–40.
257. 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 Apr;10(4):373–9.
258. Panek AN, Posch MG, Alenina N, Ghadge SK, Erdmann B, Popova E, et al. Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertrophy and protection against pressure overload. *PLoS One*. 2009 Aug 25;4(8).
259. Shakil Ahmed M, Gravning J, Martinov VN, von Lueder TG, Edvardsen T, Czibik G, et al. Mechanisms of novel cardioprotective functions of CCN2/CTGF in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Apr;300(4).
260. Gravning J, Ahmed MS, Von Lueder TG, Edvardsen T, Attramadal H. CCN2/CTGF attenuates myocardial hypertrophy and cardiac dysfunction upon chronic pressure-overload. *Int J Cardiol*. 2013 Oct 3;168(3):2049–56.
261. Moe IT, Ahmed MS, Stang E, Hagelin EMV, Attramadal H. CTGF/CCN2 Postconditioning Increases Tolerance of Murine Hearts towards Ischemia-Reperfusion Injury. *PLoS One*. 2016 Feb 1;11(2).
262. Branchetti E, Poggio P, Sainger R, Shang E, Grau JB, Jackson BM, et al. Oxidative stress modulates vascular smooth muscle cell phenotype via CTGF in thoracic aortic aneurysm. *Cardiovasc Res*. 2013 Nov 1;100(2):316–24.
263. Liu S, Shi-Wen X, Abraham DJ, Leask A. CCN2 is required for bleomycin-induced skin fibrosis in mice. *Arthritis Rheum*. 2011 Jan;63(1):239–46.
264. Fontes MSC, Kessler EL, van Stuijvenberg L, Brans MA, Falke LL, Kok B, et al. CTGF knockout does not affect cardiac hypertrophy and fibrosis formation upon chronic pressure overload. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Nov 1;88:82–90.
265. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000;105(11):1605–12.
266. Ochs HR, Greenblatt DJ, Bodem G, Smith TW. Spironolactone. *Am Heart J*. 1978;96(3):389–400.
267. Jinnin M, Ihn H, Tamaki K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression. *Mol Pharmacol*. 2006;69(2):597–607.
268. Herbertz S, Sawyer JS, Stauber AJ, Gueorguieva I, Driscoll KE, Estrem ST, et al. Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Aug 10;9:4479–99.
269. Sridhar SS, Seymour L, Shepherd FA. Inhibitors of epidermal-growth-factor receptors: a review of clinical research with a focus on non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*.

BIBLIOGRAFÍA

- 2003 Jul 1;4(7):397–406.
270. Lillie RD (Ralph D, Fullmer HM. Histopathologic technic and practical histochemistry. 3rd ed. McGraw-Hill; 1976. 942 p.
271. George SJ, Johnson JL. In situ zymography. *Methods Mol Biol.* 2010;622:271–7.
272. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009;4(1):44–57.
273. Safi HJ, Winnerkvist A, Miller CC, Iliopoulos DC, Reardon MJ, Espada R, et al. Effect of extended cross-clamp time during thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Ann Thorac Surg.* 1998;66(4):1204–8.
274. Mahendiran T, Klingenberg R, Nanchen D, Gencer B, Meier D, Räber L, et al. CCN family member 1 (CCN1) is an early marker of infarct size and left ventricular dysfunction in STEMI patients. *Atherosclerosis.* 2021 Oct 1;335:77–83.
275. Klenotic PA, Zhang C, Lin Z. Emerging roles of CCN proteins in vascular development and pathology. *J Cell Commun Signal.* 2016 Sep 1;10(3):251–7.
276. Dorn LE, Petrosino JM, Wright P, Accornero F. CTGF/CCN2 is an autocrine regulator of cardiac fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2018 Aug 1;121:205–11.
277. Liu H, Dong W, Lin Z, Lu J, Wan H, Zhou Z, et al. CCN4 regulates vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *Mol Cells.* 2013 Aug;36(2):112–8.
278. Jeong D, Yang DK, Kho C, Oh JG, Lee A, Chen J, et al. Matricellular Protein CCN5 Reverses Established Cardiac Fibrosis. *J Am Coll Cardiol.* 2016 Apr 1;67(13):1556–68.
279. Chaqour B. Caught between a “Rho” and a hard place: are CCN1/CYR61 and CCN2/CTGF the arbiters of microvascular stiffness? *J Cell Commun Signal.* 2020 Mar 1;14(1):21–9.
280. Zaykov V, Chaqour B. The CCN2/CTGF interactome: an approach to understanding the versatility of CCN2/CTGF molecular activities. *J Cell Commun Signal.* 2021 Dec 1;15(4):567–80.
281. Picariello C, Lazzeri C, Attanà P, Chiostrì M, Gensini GF, Valente S. The impact of hypertension on patients with acute coronary syndromes. *Int J Hypertens.* 2011;2011.
282. Fan J, Watanabe T. Atherosclerosis: Known and unknown. *Pathol Int.* 2022 Mar 1;72(3):151–60.
283. Daugherty A, Cassis LA. Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Mar;24(3):429–34.
284. Trachet B, Fraga-Silva RA, Piersigilli A, Tedgui A, Sordet-Dessimoz J, Astolfo A, et al. Dissecting abdominal aortic aneurysm in Ang II-infused mice: suprarenal branch ruptures and apparent luminal dilatation. *Cardiovasc Res.* 2015 Feb 1;105(2):213–22.
285. He C, Jiang B, Wang M, Ren P, Murtada S II, Caulk AW, et al. mTOR inhibition prevents angiotensin II-induced aortic rupture and pseudoaneurysm but promotes dissection in ApoE-deficient mice. *JCI insight.* 2022 Feb 8;7(3).
286. Meng Y, Tian C, Liu L, Wang L, Chang Q. Elevated expression of connective tissue growth factor, osteopontin and increased collagen content in human ascending

- thoracic aortic aneurysms. *Vascular*. 2014;22(1):20–7.
287. Rehn AP, Birch MA, Karlström E, Wendel M, Lind T. ADAMTS-1 increases the three-dimensional growth of osteoblasts through type I collagen processing. *Bone*. 2007 Aug;41(2):231–8.
288. Oller J, Méndez-Barbero N, Ruiz EJ, Villahoz S, Renard M, Canelas LI, et al. Nitric oxide mediates aortic disease in mice deficient in the metalloprotease Adamts1 and in a mouse model of Marfan syndrome. *Nat Med*. 2017 Feb 1;23(2):200–12.
289. Chaqour B. Molecular control of vascular development by the matricellular proteins CCN1 (Cyr61) and CCN2 (CTGF). *Trends Dev Biol*. 2013;7:59–72.
290. Yanagisawa H, Wagenseil J. Elastic fibers and biomechanics of the aorta: Insights from mouse studies. *Matrix Biol*. 2020 Jan 1;85–86:160–72.
291. Ju X, Ijaz T, Sun H, Lejeune W, Vargas G, Shilagard T, et al. IL-6 regulates extracellular matrix remodeling associated with aortic dilation in a fibrillin-1 hypomorphic mgR/mgR mouse model of severe Marfan syndrome. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(1).
292. Thirunavukkarasu S, Khan NS, Song CY, Ghafoor HU, Brand DD, Gonzalez FJ, et al. Cytochrome P450 1B1 Contributes to the Development of Angiotensin II-Induced Aortic Aneurysm in Male Apoe(-/-) Mice. *Am J Pathol*. 2016 Aug 1;186(8):2204–19.
293. Abdel-Hamid NM, Abass SA. Matrix metalloproteinase contribution in management of cancer proliferation, metastasis and drug targeting. *Mol Biol Rep*. 2021 Sep 1;48(9):6525–38.
294. McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, Johnson DA, Parker MA, Pearce WH. Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation*. 1997 Oct 7;96(7):2228–32.
295. Rabkin SW. Differential expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP proteins in thoracic aortic aneurysm - comparison with and without bicuspid aortic valve: a meta-analysis. *Vasa*. 2014;43(6):433–42.
296. Klopff J, Brostjan C, Neumayer C, Eilenberg W. Neutrophils as Regulators and Biomarkers of Cardiovascular Inflammation in the Context of Abdominal Aortic Aneurysms. *Biomedicines*. 2021 Sep 1;9(9).
297. Van Lint P, Libert C. Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006 Aug;17(4):217–23.
298. Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, Sinha I, Ford JW, Deogracias MP, et al. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation*. 2005 Jul 12;112(2):232–40.
299. Milewicz DM, Prakash SK, Ramirez F. Therapeutics Targeting Drivers of Thoracic Aortic Aneurysms and Acute Aortic Dissections: Insights from Predisposing Genes and Mouse Models. *Annu Rev Med*. 2017 Jan 14;68:51–67.
300. Guo DC, Pannu H, Tran-Fadulu V, Papke CL, Yu RK, Avidan N, et al. Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat Genet*. 2007 Dec;39(12):1488–93.

BIBLIOGRAFÍA

301. Cheng J, Zhou X, Jiang X, Sun T. Deletion of ACTA2 in mice promotes angiotensin II induced pathogenesis of thoracic aortic aneurysms and dissections. *J Thorac Dis.* 2018;10(8):4733–40.
302. Chen J, Peters A, Papke CL, Villamizar C, Ringuette LJ, Cao J, et al. Loss of Smooth Muscle α -Actin Leads to NF- κ B-Dependent Increased Sensitivity to Angiotensin II in Smooth Muscle Cells and Aortic Enlargement. *Circ Res.* 2017 Jun 9;120(12):1903–15.
303. Wang SK, Green LA, Gutwein AR, Gupta AK, Babbey CM, Motaganahalli RL, et al. Osteopontin may be a driver of abdominal aortic aneurysm formation. *J Vasc Surg.* 2018 Dec 1;68(6S):22S-29S.
304. Fan WH, Pech M, Karnovsky MJ. Connective tissue growth factor (CTGF) stimulates vascular smooth muscle cell growth and migration in vitro. *Eur J Cell Biol.* 2000;79(12):915–23.
305. Sharma N, Dev R, Belenchia AM, Aroor AR, Whaley-Connell A, Pulakat L, et al. Deficiency of IL12p40 (Interleukin 12 p40) Promotes Ang II (Angiotensin II)-Induced Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 Feb 1;39(2):212–23.
306. Yan H, Hu Y, Akk A, Ye K, Bacon J, Pham CTN. Interleukin-12 and -23 blockade mitigates elastase-induced abdominal aortic aneurysm. *Sci Rep.* 2019 Dec 1;9(1).
307. Zhang C, Van Der Voort D, Shi H, Zhang R, Qing Y, Hiraoka S, et al. Matricellular protein CCN3 mitigates abdominal aortic aneurysm. *J Clin Invest.* 2016 Apr 1;126(4):1282–99.
308. Riser BL, Najmabadi F, Perbal B, Peterson DR, Rambow JA, Riser ML, et al. CCN3 (NOV) is a negative regulator of CCN2 (CTGF) and a novel endogenous inhibitor of the fibrotic pathway in an in vitro model of renal disease. *Am J Pathol.* 2009;174(5):1725–34.
309. Hoshijima M, Hattori T, Aoyama E, Nishida T, Yamashiro T, Takigawa M. Roles of heterotypic CCN2/CTGF-CCN3/NOV and homotypic CCN2-CCN2 interactions in expression of the differentiated phenotype of chondrocytes. *FEBS J.* 2012 Oct;279(19):3584–97.
310. Williams H, Wadey KS, Frankow A, Blythe HC, Forbes T, Johnson JL, et al. Aneurysm severity is suppressed by deletion of CCN4. *J Cell Commun Signal.* 2021 Sep 1;15(3):421–32.
311. Reali E, Ferrando-Martinez S, Catalfamo M. Editorial: The Interplay Between Immune Activation and Cardiovascular Disease During Infection, Autoimmunity and Aging: The Role of T Cells. *Front Immunol.* 2021 Jun 24;12.
312. Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd AR, Michiel DF, Bausserman LL, et al. Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 1994 Jul 1;180(1):203–9.
313. Wang S, Song R, Wang Z, Jing Z, Wang S, Ma J. S100A8/A9 in Inflammation. *Front Immunol.* 2018 Jun 11;9(JUN).
314. Golledge J, Muller J, Shephard N, Clancy P, Smallwood L, Moran C, et al. Association between osteopontin and human abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Mar;27(3):655–60.
315. McCormick MM, Rahimi F, Bobryshev Y V., Gaus K, Zreiqat H, Cai H, et al. S100A8 and

BIBLIOGRAFÍA

- S100A9 in human arterial wall. Implications for atherogenesis. *J Biol Chem.* 2005 Dec 16;280(50):41521–9.
316. Rush C, Nyara M, Moxon J V., Trollope A, Cullen B, Golledge J. Whole genome expression analysis within the angiotensin II-apolipoprotein E deficient mouse model of abdominal aortic aneurysm. *BMC Genomics.* 2009 Jul 6;10.
317. Ye RD, Sun L. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. *J Leukoc Biol.* 2015 Dec;98(6):923–9.
318. He Y, Ma C, Xing J, Wang S, Ji C, Han Y, et al. Serum amyloid a protein as a potential biomarker in predicting acute onset and association with in-hospital death in acute aortic dissection. *BMC Cardiovasc Disord.* 2019 Dec 3;19(1).
319. De Korte AM, Aquarius R, Vogl T, Roth J, Bartels RHMA, Boogaarts HD, et al. Elevation of inflammatory S100A8/S100A9 complexes in intracranial aneurysms. *J Neurointerv Surg.* 2020 Nov 1;12(11):1117–21.
320. Averill MM, Kerkhoff C, Bornfeldt KE. S100A8 and S100A9 in cardiovascular biology and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Feb;32(2):223–9.
321. Webb NR, De Beer MC, Wroblewski JM, Ji A, Bailey W, Shridas P, et al. Deficiency of Endogenous Acute-Phase Serum Amyloid A Protects apoE^{-/-} Mice From Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015 May 27;35(5):1156–65.
322. Rajkumar AP, Qvist P, Lazarus R, Lescai F, Ju J, Nyegaard M, et al. Experimental validation of methods for differential gene expression analysis and sample pooling in RNA-seq. *BMC Genomics.* 2015 Jul 25;16(1).
323. Ahmed SH, Husain NM, Khawaja SN, Massey C V., Pettyjohn FS. Is primary hyperaldosteronism a risk factor for aortic dissection? *Cardiology.* 2007 Jun;108(1):48–50.
324. Thompson A, Cooper JA, Fabricius M, Humphries SE, Ashton HA, Hafez H. An analysis of drug modulation of abdominal aortic aneurysm growth through 25 years of surveillance. *J Vasc Surg.* 2010;52(1).
325. Kurobe H, Hirata Y, Matsuoka Y, Sugawara N, Higashida M, Nakayama T, et al. Protective effects of selective mineralocorticoid receptor antagonist against aortic aneurysm progression in a novel murine model. *J Surg Res.* 2013 Nov;185(1):455–62.
326. Liu S, Xie Z, Daugherty A, Cassis LA, Pearson KJ, Gong MC, et al. Mineralocorticoid receptor agonists induce mouse aortic aneurysm formation and rupture in the presence of high salt. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Jul;33(7):1568–79.
327. Papadantonakis N, Matsuura S, Ravid K. Megakaryocyte pathology and bone marrow fibrosis: the lysyl oxidase connection. *Blood.* 2012 Aug 30;120(9):1774–81.
328. Silva MAB, Bruder-Nascimento T, Cau SBA, Lopes RAM, Mestriner FLAC, Fais RS, et al. Spironolactone treatment attenuates vascular dysfunction in type 2 diabetic mice by decreasing oxidative stress and restoring NO/GC signaling. *Front Physiol.* 2015;6(OCT).
329. Juknevičius I, Segal Y, Kren S, Lee R, Hostetter TH. Effect of aldosterone on renal transforming growth factor-beta. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286(6).

BIBLIOGRAFÍA

330. Han KH, Kang YS, Han SY, Jee YH, Lee MH, Han JY, et al. Spironolactone ameliorates renal injury and connective tissue growth factor expression in type II diabetic rats. *Kidney Int.* 2006 Jul 12;70(1):111–20.
331. Messaoudi S, Gravez B, Tarjus A, Pelloux V, Ouvrard-Pascaud A, Delcayre C, et al. Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2013 Feb;61(2):361–7.
332. Zoppi N, Chiarelli N, Ritelli M, Colombi M. Multifaced Roles of the $\alpha\beta 3$ Integrin in Ehlers-Danlos and Arterial Tortuosity Syndromes' Dermal Fibroblasts. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 1;19(4).
333. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, et al. A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet.* 2005;37(3):275–81.
334. Mallat Z, Ait-Oufella H, Tedgui A. The Pathogenic Transforming Growth Factor- β Overdrive Hypothesis in Aortic Aneurysms and Dissections: A Mirage? *Circ Res.* 2017 May 26;120(11):1718–20.
335. Chen X, Rateri DL, Howatt DA, Balakrishnan A, Moorleggen JJ, Cassis LA, et al. TGF- β Neutralization Enhances AngII-Induced Aortic Rupture and Aneurysm in Both Thoracic and Abdominal Regions. *PLoS One.* 2016 Apr 1;11(4).
336. Lareyre F, Clment M, Raffort J, Pohlod S, Patel M, Esposito B, et al. TGF β (Transforming Growth Factor- β) Blockade Induces a Human-Like Disease in a Nondissecting Mouse Model of Abdominal Aortic Aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(11):2171–81.
337. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, Bonnin P, Ramkhelawon B, Taleb S, et al. TGF-beta activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest.* 2010 Feb 1;120(2):422–32.
338. Li W, Li Q, Jiao Y, Qin L, Ali R, Zhou J, et al. Tgfbr2 disruption in postnatal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. *J Clin Invest.* 2014 Feb 3;124(2):755–67.
339. Biros E, Moran CS, Walker PJ, Cardinal J, Golledge J. A deletion in chromosome 6q is associated with human abdominal aortic aneurysm. *Clin Sci (Lond).* 2014;127(7):475–84.
340. Yamazaki M, Minota S, Sakurai H, Miyazono K, Yamada A, Kanazawa I, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am J Pathol.* 1994 Feb;144(2):221–6.
341. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2007 May 1;74(2):184–95.
342. Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, Brugnoli R, Barresi R, Mora M, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest.* 1995;96(2):1137–44.
343. Mázala DAG, Novak JS, Hogarth MW, Nearing M, Adusumalli P, Tully CB, et al. TGF- β -driven muscle degeneration and failed regeneration underlie disease onset in a DMD mouse model. *JCI insight.* 2020 Mar 26;5(6).

BIBLIOGRAFÍA

344. Shen W, Tao G qing, Zhang Y, Cai B, Sun J, Tian Z qiang. TGF- β in pancreatic cancer initiation and progression: two sides of the same coin. *Cell Biosci.* 2017 Aug 7;7(1).
345. Rubio K, Castillo-Negrete R, Barreto G. Non-coding RNAs and nuclear architecture during epithelial-mesenchymal transition in lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis. *Cell Signal.* 2020 Jun 1;70.
346. Gaspar NJ, Li L, Kapoun AM, Medicherla S, Reddy M, Li G, et al. Inhibition of transforming growth factor beta signaling reduces pancreatic adenocarcinoma growth and invasiveness. *Mol Pharmacol.* 2007 Jul;72(1):152–61.
347. Flanigan KM, Ceco E, Lamar KM, Kaminoh Y, Dunn DM, Mendell JR, et al. LTBP4 genotype predicts age of ambulatory loss in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2013 Apr;73(4):481–8.
348. Arribillaga L, Dotor J, Basagoiti M, Riezu-Boj JI, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ, et al. Therapeutic effect of a peptide inhibitor of TGF- β on pulmonary fibrosis. *Cytokine.* 2011 Mar;53(3):327–33.
349. Bonniaud P, Martin G, Margetts PJ, Ask K, Robertson J, Gauldie J, et al. Connective tissue growth factor is crucial to inducing a profibrotic environment in “fibrosis-resistant” BALB/c mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004 Nov;31(5):510–6.
350. Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Haberberger T, Kelly M, Robertson J, et al. Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Oct 1;168(7):770–8.
351. Zhang Y, Alexander PB, Wang XF. TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Apr 1;9(4).
352. Rojas A, Padidam M, Cress D, Grady WM. TGF-beta receptor levels regulate the specificity of signaling pathway activation and biological effects of TGF-beta. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jul;1793(7):1165–73.
353. Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol.* 2003 May 1;5(5):410–21.
354. McCaffrey TA, Consigli S, Du B, Falcone DJ, Sanborn TA, Spokojny AM, et al. Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1. *J Clin Invest.* 1995;96(6):2667–75.
355. McCaffrey TA, Du B, Fu C, Bray PJ, Sanborn TA, Deutsch E, et al. The expression of TGF- β receptors in human atherosclerosis: Evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(9):1627–42.
356. McCaffrey TA, Du B, Consigli S, Szabo P, Bray PJ, Hartner L, et al. Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest.* 1997 Nov 1;100(9):2182–8.
357. Rodríguez-Vita J, Sánchez-Galín E, Santamaría B, Sánchez-López E, Rodríguez-Díez R, Blanco-Colio LM, et al. Essential role of TGF-beta/Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation. *PLoS One.* 2008 Dec 17;3(12).

ANEXO

Los resultados de esta tesis forman parte de las dos siguientes publicaciones:

- Rodrigues-Díez RR, **Tejera-Muñoz A**, Esteban V, Steffensen LB, Rodrigues-Díez R, Orejudo M, Rayego-Mateos S, Falke LL, Cannata-Ortiz P, Ortiz A, Egido J, Mallat Z, Briones AM, Bajo MA, Goldschmeding R, Ruiz-Ortega M. CCN2 (Cellular Communication Network Factor 2) Deletion Alters Vascular Integrity and Function Predisposing to Aneurysm Formation. *Hypertension*. 2022 Mar;79(3):e42-e55. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.18201. Epub 2021 Dec 30. PMID: 35138869.
- **Tejera-Muñoz A**, Marquez-Exposito L, Tejedor-Santamaría L, Rayego-Mateos S, Orejudo M, Suarez-Álvarez B, López-Larrea C, Ruíz-Ortega M, Rodrigues-Díez RR. CCN2 Increases TGF- β Receptor Type II Expression in Vascular Smooth Muscle Cells: Essential Role of CCN2 in the TGF- β Pathway Regulation. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 29;23(1):375. doi: 10.3390/ijms23010375. PMID: 35008801; PMCID: PMC8745763.

Otros trabajos publicados durante la tesis:

- **Tejera-Muñoz A**, Rodríguez I, Del Río-García A, Mohamedi Y, Martín M, Chiminazzo V, Suárez-Álvarez B, López-Larrea C, Ruiz-Ortega M, Rodrigues-Díez RR. The CCN2 Polymorphism rs12526196 Is a Risk Factor for Ascending Thoracic Aortic Aneurysm. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 06 23(23):15406. <https://doi.org/10.3390/ijms232315406>. PubMed PMID: 36499730; PubMed Central PMCID: PMC9740045.
- Opazo-Ríos L, **Tejera-Muñoz A**, Soto Catalan M, Marchant V, Lavoz C, Mas Fontao S, Moreno JA, Fierro Fernandez M, Ramos R, Suarez-Alvarez B, López-Larrea C, Ruiz-Ortega M, Egido J, Rodrigues-Díez RR. Kidney microRNA Expression Pattern in Type 2 Diabetic Nephropathy in BTBR Ob/Ob Mice. *Front Pharmacol*. 2022;13:778776. doi: 10.3389/fphar.2022.778776. eCollection 2022. PubMed PMID: 35370692; PubMed Central PMCID: PMC8966705.
- Rayego-Mateos S, Morgado-Pascual JL, Lavoz C, Rodrigues-Díez RR, Márquez-Expósito L, **Tejera-Muñoz A**, Tejedor-Santamaría L, Rubio-Soto I, Marchant V, Ruiz-Ortega M. CCN2 Binds to Tubular Epithelial Cells in the Kidney. *Biomolecules*. 2022 Feb 3;12(2). doi: 10.3390/biom12020252. PubMed PMID: 35204752; PubMed Central PMCID: PMC8869303.
- Marquez-Exposito L, Tejedor-Santamaria L, Valentijn FA, **Tejera-Muñoz A**, Rayego-Mateos S, Marchant V, Rodrigues-Diez RR, Rubio-Soto I, Knoppert SN, Ortiz A, Ramos AM, Goldschmeding R, Ruiz-Ortega M. Oxidative Stress and Cellular Senescence Are Involved in the Aging Kidney. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jan 31;11(2). doi: 10.3390/antiox11020301. PubMed PMID: 35204184; PubMed Central PMCID: PMC8868560.
- Tejedor-Santamaria L, Morgado-Pascual JL, Marquez-Exposito L, Suarez-Alvarez B, Rodrigues-Diez RR, **Tejera-Muñoz A**, Marchant V, Mezzano S, Lopez-Larrea C, Sola A, Fernandez-Juarez GM, Ortiz A, Rayego-Mateos S, Ruiz-Ortega M. Epigenetic Modulation of Gremlin-1/NOTCH Pathway in Experimental Crescentic Immune-Mediated Glomerulonephritis. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2022 Jan 20;15(2). doi: 10.3390/ph15020121. PubMed PMID: 35215234; PubMed Central PMCID: PMC8876310.

- Granado M, González-Hedström D, Amor S, Fajardo-Vidal A, Villalva M, de la Fuente-Fernández M, **Tejera-Muñoz A**, Jaime L, Santoyo S, García-Villalón AL. Marjoram extract prevents ischemia reperfusion-induced myocardial damage and exerts anti-contractile effects in aorta segments of male wistar rats. *J Ethnopharmacol.* 2022 Jan 10;282:114660. doi: 10.1016/j.jep.2021.114660. Epub 2021 Sep 20. PubMed PMID: 34547419.
- Rayego-Mateos S, Campillo S, Rodrigues-Diez RR, **Tejera-Muñoz A**, Marquez-Exposito L, Goldschmeding R, Rodríguez-Puyol D, Calleros L, Ruiz-Ortega M. Interplay between extracellular matrix components and cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *Clin Sci (Lond).* 2021 Aug 27;135(16):1999-2029. doi: 10.1042/CS20201016. Review. PubMed PMID: 34427291.
- Rodrigues-Diez RR, **Tejera-Muñoz A**, Orejudo M, Marquez-Exposito L, Santos-Sanchez L, Rayego-Mateos S, Cantero-Navarro E, Tejedor-Santamaria L, Marchant V, Ortiz A, Egido J, Mezzano S, Selgas R, Navarro-González JF, Valdivielso JM, Lavoz C, Ruiz-Ortega M. Interleukin-17A: Potential mediator and therapeutic target in hypertension. *Nefrologia (Engl Ed).* 2021 May-Jun;41(3):244-257. doi: 10.1016/j.nefro.2021.06.003. Epub 2021 Jul 14. Review. PubMed PMID: 36166242.
- Cantero-Navarro E, Rayego-Mateos S, Orejudo M, Tejedor-Santamaria L, **Tejera-Muñoz A**, Sanz AB, Marquez-Exposito L, Marchant V, Santos-Sanchez L, Egido J, Ortiz A, Bellon T, Rodrigues-Diez RR, Ruiz-Ortega M. Role of Macrophages and Related Cytokines in Kidney Disease. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:688060. doi: 10.3389/fmed.2021.688060. eCollection 2021. Review. PubMed PMID: 34307414; PubMed Central PMCID: PMC8295566.
- Marquez-Exposito L, Tejedor-Santamaria L, Santos-Sanchez L, Valentijn FA, Cantero-Navarro E, Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez RR, **Tejera-Muñoz A**, Marchant V, Sanz AB, Ortiz A, Goldschmeding R, Ruiz-Ortega M. Acute Kidney Injury is Aggravated in Aged Mice by the Exacerbation of Proinflammatory Processes. *Front Pharmacol.* 2021;12:662020. doi: 10.3389/fphar.2021.662020. eCollection 2021. PubMed PMID: 34239439; PubMed Central PMCID: PMC8258347.
- Rodrigues-Diez RR, **Tejera-Muñoz A**, Marquez-Exposito L, Rayego-Mateos S, Santos Sanchez L, Marchant V, Tejedor Santamaria L, Ramos AM, Ortiz A, Egido J, Ruiz-Ortega M. Statins: Could an old friend help in the fight against COVID-19?. *Br J Pharmacol.* 2020 Nov;177(21):4873-4886. doi: 10.1111/bph.15166. Epub 2020 Jul 15. Review. PubMed PMID: 32562276; PubMed Central PMCID: PMC7323198.
- Marchant V, **Tejera-Muñoz A**, Marquez-Expósito L, Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez RR, Tejedor L, Santos-Sanchez L, Egido J, Ortiz A, Valdivielso JM, Fraser DJ, López-Cabrera M, Selgas R, Ruiz-Ortega M. IL-17A as a Potential Therapeutic Target for Patients on Peritoneal Dialysis. *Biomolecules.* 2020 Sep 24;10(10). doi: 10.3390/biom10101361. Review. PubMed PMID: 32987705; PubMed Central PMCID: PMC7598617.
- González-Hedström D, Amor S, de la Fuente-Fernández M, **Tejera-Muñoz A**, Priego T, Martín AI, López-Calderón A, Inarejos-García AM, García-Villalón ÁL, Granado M. A Mixture of Algae and Extra Virgin Olive Oils Attenuates the Cardiometabolic Alterations Associated with Aging in

Male Wistar Rats. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jun 3;9(6). doi: 10.3390/antiox9060483. PubMed PMID: 32503213; PubMed Central PMCID: PMC7346162.

- de la Fuente-Fernández M, González-Hedström D, Amor S, **Tejera-Muñoz A**, Fernández N, Monge L, Almodóvar P, Andrés-Delgado L, Santamaría L, Prodanov M, Inarejos-García AM, García-Villalón AL, Granado M. Supplementation with a Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Fruit Extract Attenuates the Cardiometabolic Alterations Associated with Metabolic Syndrome in Mice. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Apr 21;9(4). doi: 10.3390/antiox9040339. PubMed PMID: 32326269; PubMed Central PMCID: PMC7222348.

- Orejudo M, García-Redondo AB, Rodrigues-Diez RR, Rodrigues-Diez R, Santos-Sanchez L, **Tejera-Muñoz A**, Egido J, Selgas R, Salaiques M, Briones AM, Ruiz-Ortega M. Interleukin-17A induces vascular remodeling of small arteries and blood pressure elevation. *Clin Sci (Lond)*. 2020 Mar 13;134(5):513-527. doi: 10.1042/CS20190682. PubMed PMID: 32104886.

- González-Hedström D, Guerra-Menéndez L, **Tejera-Muñoz A**, Amor S, de la Fuente-Fernández M, Martín-Carro B, Arriazu R, García-Villalón ALL, Granado M. Overfeeding During Lactation in Rats is Associated with Cardiovascular Insulin Resistance in the Short-Term. *Nutrients*. 2020 Feb 20;12(2). doi: 10.3390/nu12020549. PubMed PMID: 32093229; PubMed Central PMCID: PMC7071409.

- Lavoz C, Rayego-Mateos S, Orejudo M, Opazo-Ríos L, Marchant V, Marquez-Exposito L, **Tejera-Muñoz A**, Navarro-González JF, Droguett A, Ortiz A, Egido J, Mezzano S, Rodrigues-Diez RR, Ruiz-Ortega M. Could IL-17A Be a Novel Therapeutic Target in Diabetic Nephropathy?. *J Clin Med*. 2020 Jan 19;9(1). doi: 10.3390/jcm9010272. Review. PubMed PMID: 31963845; PubMed Central PMCID: PMC7019373.

- Marquez-Exposito L, Cantero-Navarro E, R Rodrigues-Diez R, Orejudo M, **Tejera-Muñoz A**, Tejedor L, Rayego-Mateos S, Rández-Carbayo J, Santos-Sanchez L, Mezzano S, Lavoz C, Ruiz-Ortega M. Molecular Regulation of Notch Signaling by Gremlin. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1227:81-94. doi: 10.1007/978-3-030-36422-9_6. Review. PubMed PMID: 32072500.

- Granado M, Amor S, Martín-Carro B, Guerra-Menéndez L, **Tejera-Muñoz A**, González-Hedström D, Rubio C, Carrascosa JM, García-Villalón ÁL. Caloric restriction attenuates aging-induced cardiac insulin resistance in male Wistar rats through activation of PI3K/Akt pathway. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2019 Jan;29(1):97-105. doi: 10.1016/j.numecd.2018.09.005. Epub 2018 Sep 26. PubMed PMID: 30497927.

ORIGINAL ARTICLE

CCN2 (Cellular Communication Network Factor 2) Deletion Alters Vascular Integrity and Function Predisposing to Aneurysm Formation

Raúl R. Rodrigues-Díez¹, Antonio Tejera-Muñoz¹, Vanesa Esteban¹, Lasse B. Steffensen¹, Raquel Rodrigues-Díez¹, Macarena Orejudo, Sandra Rayego-Mateos, Lucas L. Falke, Pablo Cannata-Ortiz, Alberto Ortiz¹, Jesus Egido, Ziad Mallat¹, Ana M. Briones¹, M. Auxiliadora Bajo¹, Roel Goldschmeding, Marta Ruiz-Ortega¹

BACKGROUND: CCN2 (cellular communication network factor 2) is a matricellular protein involved in cell communication and microenvironmental signaling responses. CCN2 is known to be overexpressed in several cardiovascular diseases, but its role is not completely understood.

METHODS: Here, CCN2 involvement in aortic wall homeostasis and response to vascular injury was investigated in inducible *Ccn2*-deficient mice, with induction of vascular damage by infusion of Ang II (angiotensin II; 15 days), which is known to upregulate CCN2 expression in the aorta.

RESULTS: Ang II infusion in CCN2-silenced mice lead to 60% mortality within 10 days due to rapid development and rupture of aortic aneurysms, as evidenced by magnetic resonance imaging, echography, and histological examination. *Ccn2* deletion decreased systolic blood pressure and caused aortic structural and functional changes, including elastin layer disruption, smooth muscle cell alterations, augmented distensibility, and increased metalloproteinase activity, which were aggravated by Ang II administration. Gene ontology analysis of RNA sequencing data identified aldosterone biosynthesis as one of the most enriched terms in CCN2-deficient aortas. Consistently, treatment with the mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone before and during Ang II infusion reduced aneurysm formation and mortality, underscoring the importance of the aldosterone pathway in Ang II-induced aorta pathology.

CONCLUSIONS: CCN2 is critically involved in the functional and structural homeostasis of the aorta and in maintenance of its integrity under Ang II-induced stress, at least, in part, by disruption of the aldosterone pathway. Thus, this study opens new avenues to future studies in disorders associated to vascular pathologies. (**Hypertension. 2022;79:e42–e55. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.18201.**) • **Supplemental Material**

Key Words: aldosterone ■ aneurysm ■ aorta ■ extracellular matrix ■ hypertension

CCN2 (cellular communication network factor 2), previously known as CTGF (connective tissue growth factor), belongs to the CCN family,^{1,2} including also by CCN1/Cyr61 (cysteine-rich protein), CCN3/Nov (nephroblastoma overexpressed protein), and 3 other matricellular proteins (CCN4-6), sharing a conserved tri- to tetramodular structure. These CCN proteins

are important ECM (extracellular matrix) components involved in the regulation of different cellular functions.^{1,3}

CCN2 exerts multiple context-dependent biological functions, including regulation of cell growth, differentiation, development, adhesion, inflammation, and ECM remodeling.^{3,4} Regarding the cardiovascular system, CCN2 is highly expressed during development in

Correspondence to: Marta Ruiz-Ortega, Department of Medicine, Molecular and Cellular Biology in Renal and Vascular Pathology, UAM, IIS-FJD, Avda. Reyes Católicos, 2, 28040, Madrid, Spain, Email mruizo@fjd.es or Raquel Rodrigues-Díez, Department of Pharmacology, UAM, C/del Arzobispo Morcillo, 4, 28029, Madrid, Spain, Email rrodrigues@fjd.es

*R.R. Rodrigues-Díez and A. Tejera-Muñoz contributed equally.

Supplemental Material is available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.18201>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page e54.

© 2022 American Heart Association, Inc.

Hypertension is available at www.ahajournals.org/journal/hyp

NOVELTY AND RELEVANCE

What Is New?

Ccn2 (cellular communication network factor 2) deletion in mice induces aortic structural modifications, including elastin layer disruption, smooth muscle cell alterations, increased metalloproteinase activity, and vascular function changes.

The vascular wall homeostasis disruption induced by *Ccn2* deletion leads to rapid aortic aneurysm generation and rupture after Ang II (angiotensin II) infusion in mice, suggesting that the relative resistance of C57Bl/6 mice to Ang II–induced aortic aneurysm is lost in the context of CCN2 deficiency.

Treatment of *Ccn2*-deleted mice with the mineralocorticoid receptor antagonist spironolactone before and during Ang II infusion reduced the incidence and lethal dissection and rupture of aneurysm without modifying blood pressure.

What Is Relevant?

The role of CCN2 in maintaining aortic wall homeostasis and preventing aortic aneurysm generation in a context of hypertension driven by Ang II is relevant for prevention of vascular complications of hypertension.

This preclinical study opens a new line of research to evaluate whether *CCN2* gene alterations could predispose to thoracic aortic disease in humans.

Spironolactone exerted beneficial effects in our experimental model of aneurysm generation in *Ccn2* deleted mice after Ang II infusion, encouraging future research targeting aldosterone for aneurysm-related pathologies.

Clinical/Pathophysiological Implications?

CCN2 contributes to aortic wall homeostasis and adaptive remodeling that prevents aneurysm generation, which might have important implications for further clinical exploration in patients at risk.

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

| | |
|----------------|---|
| ACTA2 | alpha smooth muscle actin 2 |
| Ang II | angiotensin II |
| CCN2 | cellular communication network factor 2 |
| CCN2-KO | CCN2 knockout |
| CTGF | connective tissue growth factor |
| ECM | extracellular matrix |
| MMP | matrix metalloproteinase |
| Nov | nephroblastoma overexpressed protein |
| RNA-seq | RNA sequencing |
| TGF | transforming growth factor |
| VSMC | vascular smooth muscle cell |

heart, branchial arches, and in endothelium and vascular smooth muscle cells (VSMCs) of major blood vessels,^{5,6} and it is overexpressed in experimental and human cardiovascular diseases, like heart failure, pulmonary hypertension, restenosis, and atherosclerosis.⁵ CCN2 plays a relevant role in fibrogenesis, for which it is a well-established biomarker of fibrosis, and it has been considered the key downstream profibrotic mediator of TGF (transforming growth factor)- β and Ang II (angiotensin II).^{3,7} Based on those studies, CCN2 was proposed as a growth factor and cytokine, but this concept has been recently extended to include also a role as matricellular ECM protein implicated in cell communication and coordination of responses to microenvironmental signaling.^{2,4}

Preclinical studies suggest that the CCN2 blockade could be a potential therapeutic option for fibrotic

diseases, based on the promising results in experimental liver, lung, and renal fibrosis,^{8–10} as well as in pulmonary vascular remodeling and heart failure,^{11,12} and anti-CCN2 therapy is in phase 2 or 3 clinical trials for Duchenne muscular dystrophy (NCT02606136), pancreatic adenocarcinoma (NCT04229004) and idiopathic pulmonary fibrosis (NCT03955146). However, CCN2 overexpression in cardiomyocytes protected mice from Ang II–induced pressure overload cardiomyopathy and ischemia-reperfusion injury.^{13,14} Accordingly, CCN2 overexpression attenuated myocardial hypertrophy, cardiac dysfunction, and left ventricular remodeling in experimental pressure overload and stroke.¹⁵ More recently, post-ischemic administration of recombinant CCN2 reduced infarct size and improved cardiac function recovery following ischemia-reperfusion injury.¹⁶ CCN2 knockout (CCN2-KO) mice die shortly after birth by respiratory failure.⁶ In inducible CCN2-KO mice, however, *Ccn2* deletion ameliorated renal fibrosis,¹⁷ although it did not improve cardiac fibrosis and hypertrophy.¹⁸ High circulating CCN2 levels have been proposed as a potential risk biomarker for cardiac dysfunction in patients with chronic heart failure and myocardial fibrosis.¹⁹ Moreover, CCN2 mRNA expression was increased in human VSMCs from aneurysms and atherosclerotic plaques.^{5,20} Nevertheless, scarce information is available about the impact of CCN2 modulation in these vascular diseases.

Our aim was to characterize the role of CCN2 in the regulation of vascular responses under normal and pathological conditions, using the inducible CCN2-deficient mouse strain (CCN2^{flox/flox}/Rosa26-ERT/Cre; henceforth named CCN2-KO), and the well-known model of vascular damage induced by systemic Ang II

administration²¹ in which aortic CCN2 expression is known to be upregulated.^{22,23}

METHODS

The authors declare that all supporting data are available within the article (and its [Supplemental Material](#)). *Expanded method-ology is available in the [Supplemental Material](#).

Study Approval

Animal studies were performed at Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz in accordance with the current European (Directive 2010/63/EU) and National (Real Decreto 53/2013) legislation for the Use and Care of Laboratory Animals and according to the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines. The protocol was approved by the Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz Animal Research Ethical Committee and by the Comunidad de Madrid Committee (PROEX 065/18).

Statistics

Data are expressed as mean±SEM. Normality distribution was tested with the Shapiro-Wilk test. Two-tailed Student *t* test was used to compare 2 groups, 1-way ANOVA (followed by the Tukey post hoc test) to compare one variable in multiple groups and 2-way ANOVA (followed by the Dunnett post hoc test) to compare 2 variables. For not-normally distributed data, nonparametric Mann-Whitney *U* test (to compare 2 groups) or Kruskal-Wallis test (to compare >2 groups, followed by the Dunn post hoc test) was used. The Kaplan-Meier method was used for survival curves, which were statistically analyzed by the log-rank test. Aneurysm incidence was analyzed by the Fisher exact test. Statistical analyses were performed on GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). *P*<0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Ang II Induces Severe Aortic Aneurysm Formation and Dissection in CCN2-KO Mice

Ang II infusion in CCN2-KO mice dramatically decreased survival at 15 days (Figure 1A). Postmortem examination revealed aortic rupture as the cause of death. Visual aortic evaluation showed that 92% of Ang II-infused CCN2-KO mice developed thoracic and abdominal aorta aneurysms (thoracoabdominal aneurysms) of all types in the Crawford/Safi classification (Figure 1B and 1C). This phenotype could not be rescued by infusion of exogenous recombinant C-terminal fragment of CCN2 (CCN2-IV; Figure S1A and S1B).

Ang II administration increased systolic blood pressure in both CCN2-KO and control mice. In CCN2-KO mice, a slight and persistent decrease in systolic blood pressure was observed upon *Ccn2* deletion (Figure 1D). In ex vivo tension-extension studies, isolated thoracic aortic segments of CCN2-KO mice presented an increased

vessel distensibility, as shown by a rightward shift in the tension-extension distance curve and increased 1/slope (Figure 1E and 1F), suggesting disruption of aortic homeostasis in the absence of CCN2.

Acquired CCN2 Deficiency Alters Aortic Structure and Increases Susceptibility to Ang II-Induced Aneurysm Formation

In vivo magnetic resonance imaging showed a large increase in aortic diameter in CCN2-KO mice as early as 48 hours after in response to Ang II administration (Figure 2A; Figure S2) indicative of aneurysm formation, and patchy reductions in aortic lumen associated with increased total aortic area suggestive of aortic wall dissection. In these mice, maximum total aortic area and minimum aortic lumen had significantly changed after 24 and 96 hours, respectively (Figure 2B through 2D). CCN2-KO mice had slightly but significantly increased maximal total and minimal luminal aortic areas compared with controls (Figure 2B through 2D), indicating aortic dilatation in CCN2-deficient mice already before Ang II administration, which was confirmed by an increased abdominal aorta diameter visualized by ultrasound (Figure 3A and 3B). Additionally, Ang II infusion in CCN2-KO mice dramatically increased the diameter of the thoracic descending aorta diameter and enhanced the abdominal aorta diameter increase observed in CCN2-KO mice (Figure 3A and 3C), consistent with thoracoabdominal aneurysm formation.

Acquired CCN2 Deficiency Alters Vascular Function

In CCN2-deficient mice, the ex vivo aortic vasoconstrictor response to phenylephrine was significantly increased compared with control mice. Moreover, the Ang II-induced increase of the vasoconstrictor response was further enhanced by CCN2 deficiency (Figure S3A). Endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine was not affected by *Ccn2* deletion alone, being similar in CCN2-KO and control aortic rings (Figure S3B). However, the decreased vasorelaxation response that characterizes the endothelial dysfunction induced by Ang II was aggravated in the absence of CCN2 (Figure S3B).

Ccn2 Deletion Reduces VSMC Migration and Proliferation

Scrape wounded monolayers of CCN2-KO aortic VSMCs showed a significant decreased spontaneous wound closure compared with control cells (Figure S4A through S4C), and also Ang II-induced migration was impaired in CCN2-deficient VSMCs (Figure S4D and S4E).

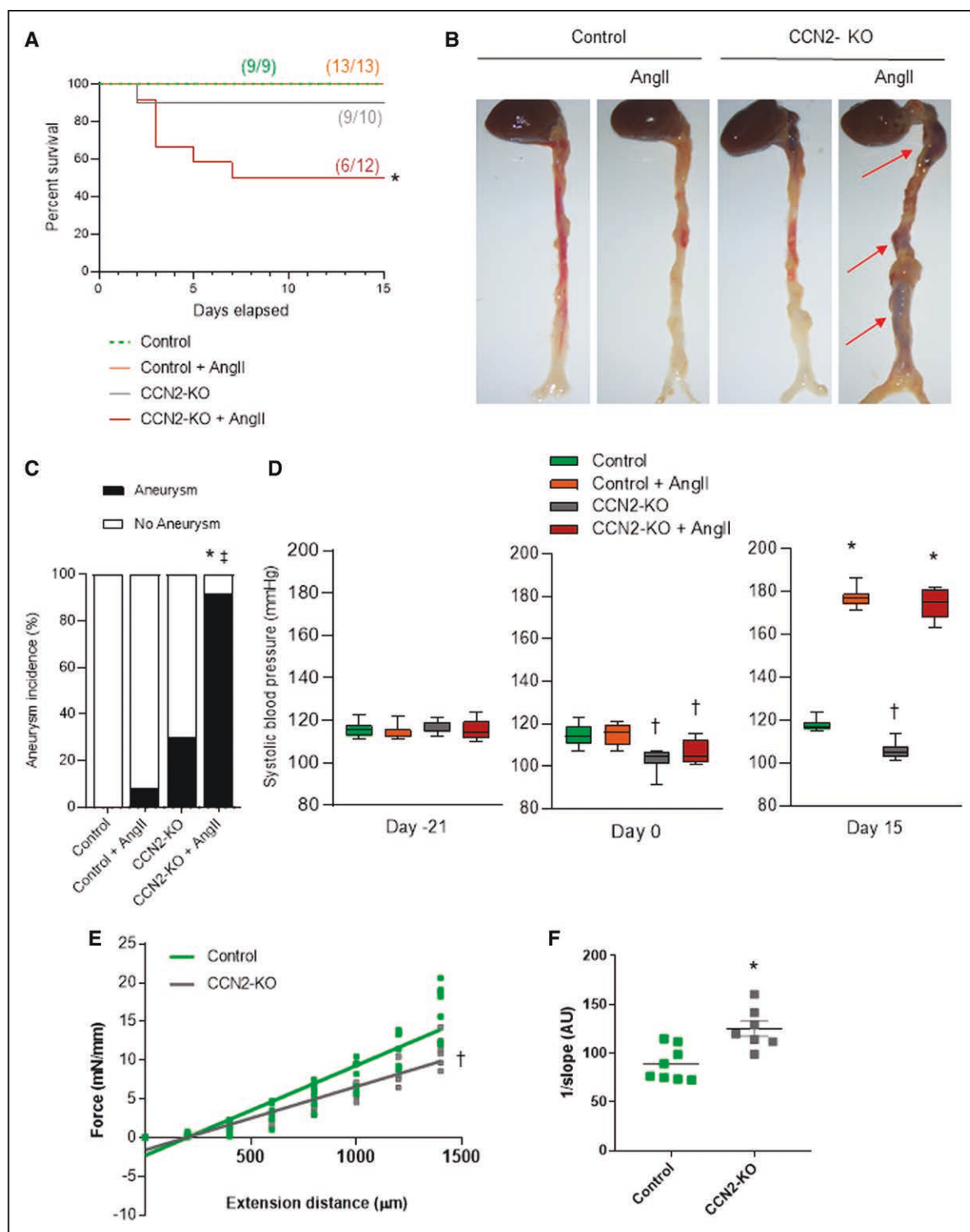
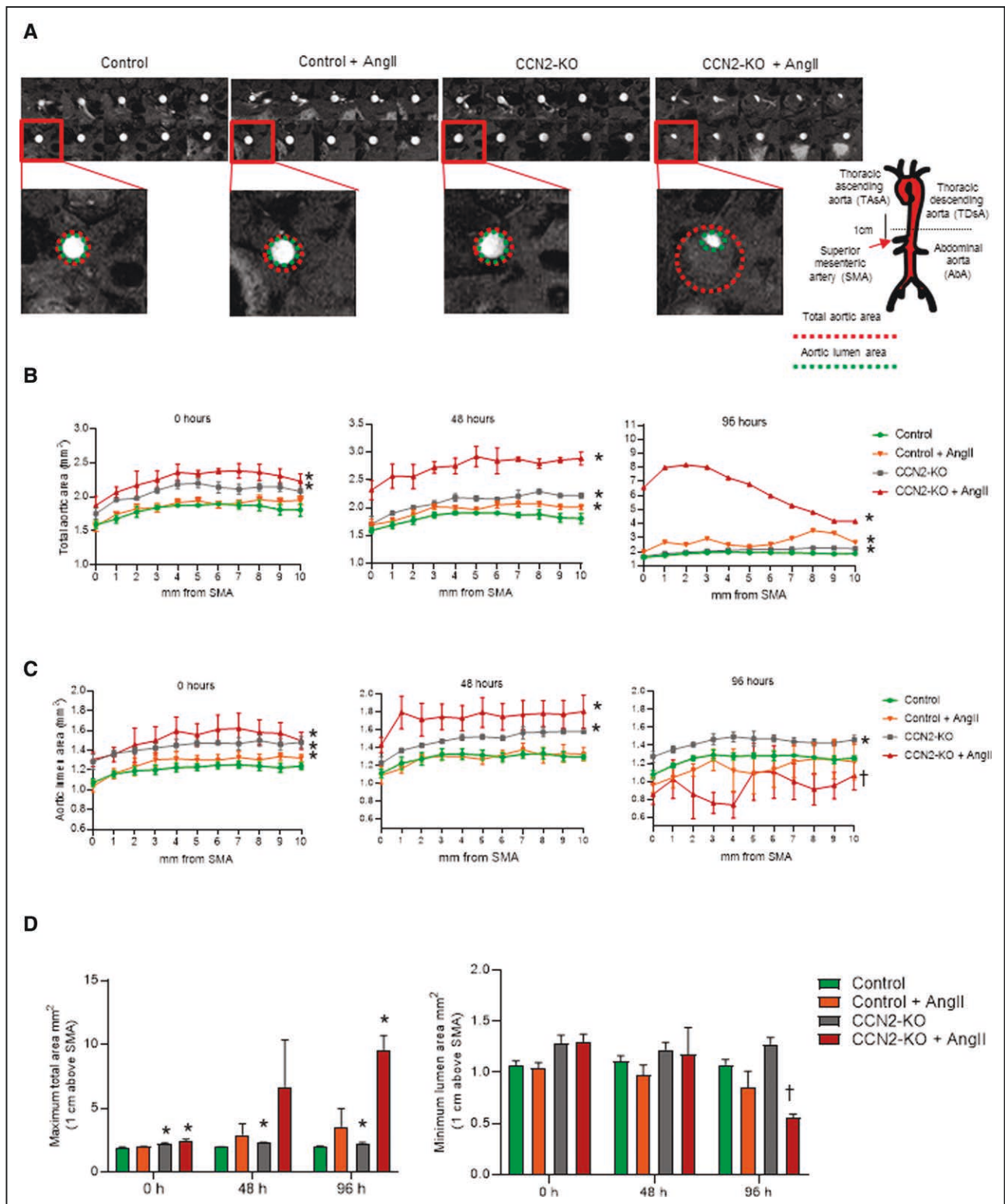


Figure 1. CCN2 (cellular communication network factor 2) deficiency decreases mice survival following Ang II (angiotensin II) administration as a result of aortic aneurysm development and rupture.

Control and CCN2 knockout (CCN2-KO) mice were infused with Ang II for 15 d. Survival, aneurysm generation, and systolic blood pressure (SBP) were analyzed. **A**, Kaplan-Meier survival curve: dramatic increase in mortality in Ang II-infused CCN2-KO mice. **B**, Clean whole aorta: thoracoabdominal aneurysm (TAAA) generation in Ang II-infused CCN2-KO mice for 15 d. **C**, Aneurysm appearance. Larger TAAA formation was found in 92% of Ang II-infused CCN2-KO mice and smaller abdominal aneurysm (AbA) in 30% and 8% of CCN2-KO and control+Ang II mice, respectively. **D**, Time course of SBP since the first tamoxifen injection (day -21): Ang II increased SBP in all groups, and CCN2 deficiency decreased SBP. Data shown as box and whisker plots, with 75th and 25th percentiles; bars represent maximal and minimal values. $n=8$ to 13 mice per group. **E**, Tension-extension distance relationship and **(F)** $1/\text{slope}$ of this relationship in aorta from control and CCN2-KO mice. $n=7$ mice per group. Data shown as mean \pm SEM. * $P<0.05$ increased vs control. † $P<0.05$ decreased vs control. ‡ $P<0.05$ vs CCN2-KO.



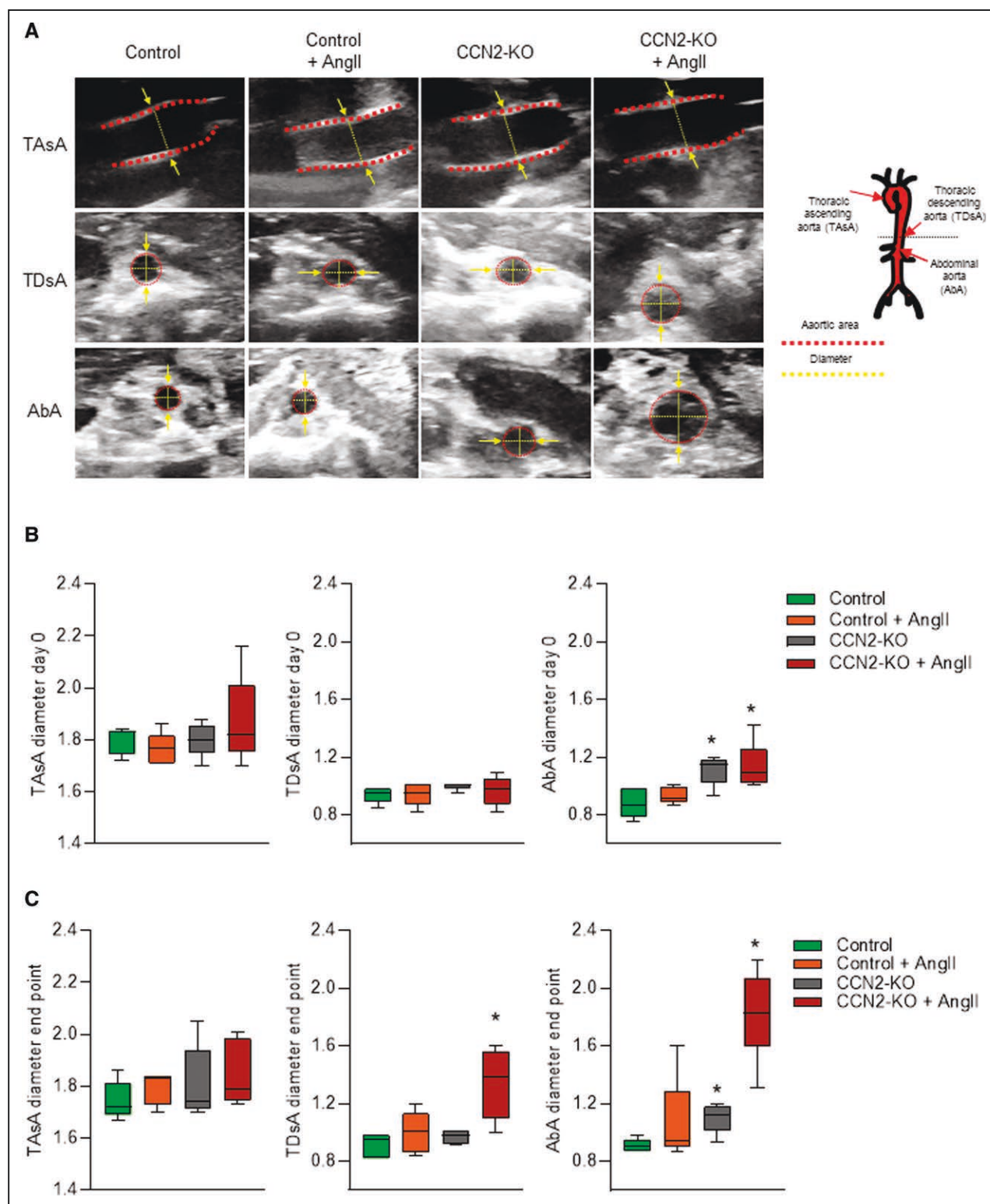


Figure 3. CCN2 (cellular communication network factor 2) deficiency predisposes to TAAA formation in response to Ang II (angiotensin II) administration in mice.

Ultrasound live was done at 0 and 15 d of Ang II administration. **A**, Ultrasound images. **B** and **C** Maximal diameters of TAAs, thoracic descending aorta (TDsA) and AbA at day 0 and endpoint, respectively. Red and yellow dashed lines indicate the lumen boundary and diameter, respectively. $n=5$ mice per group. Data shown as box and whisker plots, with 75th and 25th percentiles; bars represent maximal and minimal values. $*P<0.05$ increased vs control.

Acquired CCN2 Deficiency–Induced Aortic Elastic Layer Disruption and Protein Changes Are Increased by Ang II Infusion

In Ang II–infused CCN2-KO mice, aneurysmal lesions were characterized by elastic lamina rupture and aortic wall dissection with extravasation of red blood cells outside the muscle layer forming a neo-lumen. Aneurysms also presented inflammatory cell infiltration in the border of the dissected aortic wall, along with reduced muscular layer cellularity (Figure 4A). Van Gieson staining revealed areas with disrupted elastic layers in the aortic wall of CCN2-KO mice, both in untreated and Ang II–treated mice, as well as elastic layer thinning or absence in aortic aneurysm sections (Figure 4B, arrows). Electron microscopy showed structural abnormalities in the elastic lamina of CCN2-KO mouse aortas, such as variable width, discontinuities, and abnormal collagen distribution (Figure 4C). CCN2 protein was readily identified in the aortic vessel wall of control mice by multiple reaction monitoring mass spectrometry analysis (Table S1). Aortic CCN2 protein and gene levels were significantly reduced in CCN2-KO mice (Table S1; Figure S5), demonstrating the efficacy of gene targeting. ACTA2 (alpha smooth muscle actin 2) expression was significantly decreased (by $\approx 20\%$) while myosin heavy chain 9 was significantly increased in CCN2-KO mice (Table S1). Interestingly, CCN2 was the most Ang II–upregulated protein in the aortic wall of control mice (2.36-fold increase), suggesting that CCN2 plays an important role in Ang II–induced vascular responses, which might well include protective adaptive structural remodeling.

Acquired CCN2 Deficiency Increases Aortic Metalloproteinase Activity

Ccn2 deletion significantly increased MMP (matrix metalloproteinase) 2 and 9 (MMP-9) activities (Figure 5A) and relative MMP-8 concentrations of both latent and active protein (Figure 5B) compared with control mice. In addition, Ang II augmented MMP-2/9 activities and MMP-8 levels in the presence as well as in absence of CCN2 (Figure 5A and 5B). Furthermore, *in situ* zymography identified baseline MMP activity in thoracic descending aorta sections of control mice. Ang II administration and *Ccn2* deletion both increased local MMP activity, and the most activity was observed in the aneurysms of Ang II–treated CCN2-KO mice (Figure 5C).

Acquired CCN2 Deficiency Modifies the Ang II–Induced Aortic Gene Expression Pattern

A heat map based on 2-way hierarchical clustering of differentially expressed genes identified by RNA

sequencing (RNA-seq) showed clear segregation of CCN2-KO+Ang II mice from the other 3 groups of mice. Additionally, CCN2-KO and control+Ang II mice also had markedly different gene expression patterns compared with vehicle-treated control mice (Figure S6A). Because RNA-seq analysis was performed on pooled samples per group, the power to determine statistical significance of differential gene expression was limited.²⁴ Results were, therefore, used for hypothesis generation. Thus, the most deregulated genes in response to Ang II in control mice (Table S2) were entered into a GO enrichment analysis²⁵ (Table S3), which identified myofibril assembly, immune system process, muscle contraction, and skeletal muscle contraction as the most enriched terms at the biological process level in response to Ang II. Hemoglobin complex, myofibril, Z disc, troponin complex, and extracellular space were among the most enriched terms in the cellular component category, while oxygen transporter activity, FATZ binding, Toll-like receptor 4 binding, and actin binding stood out in the molecular function category.

To further unravel the potential contribution of *Ccn2* deletion in the aortic response to Ang II, deregulated genes in response to Ang II in control mice were subdivided in 4 sets of genes according to their differential expression pattern in the absence of CCN2 (Table S4). Next, GO enrichment analysis was performed for each set of genes. Results for genes upregulated by Ang II in control but not in CCN2-KO were mainly related to muscle and myofibrils (Table S5), while those for gene sets 2 and 3 did not show statistically significant results for any GO category. Genes downregulated by Ang II and more decreased in the absence of CCN2 (gene set 4) were mainly related to inflammatory responses (Table S6).

Acquired CCN2 Deficiency Induces Changes in the Aortic Gene Expression Pattern

A new GO enrichment analysis was done using the most deregulated genes obtained from the RNA-seq studies comparing the control versus CCN2-KO groups (67 genes, Q value, <0.5 ; fold change, >0.6 ; Table S7). Biological process category results identified C21-steroid hormone, biosynthetic process, cholesterol metabolic process, steroid biosynthetic process, steroid metabolic process, or aldosterone biosynthetic process, as some of the most deregulated terms in the absence of CCN2. In the cellular component level, extracellular region, extracellular space, secretory granule, or mitochondrial crista were present, and in the molecular function category, Toll-like receptor 4 binding, scaffold protein binding, iron ion binding, and oxidoreductase activity (Table S8).

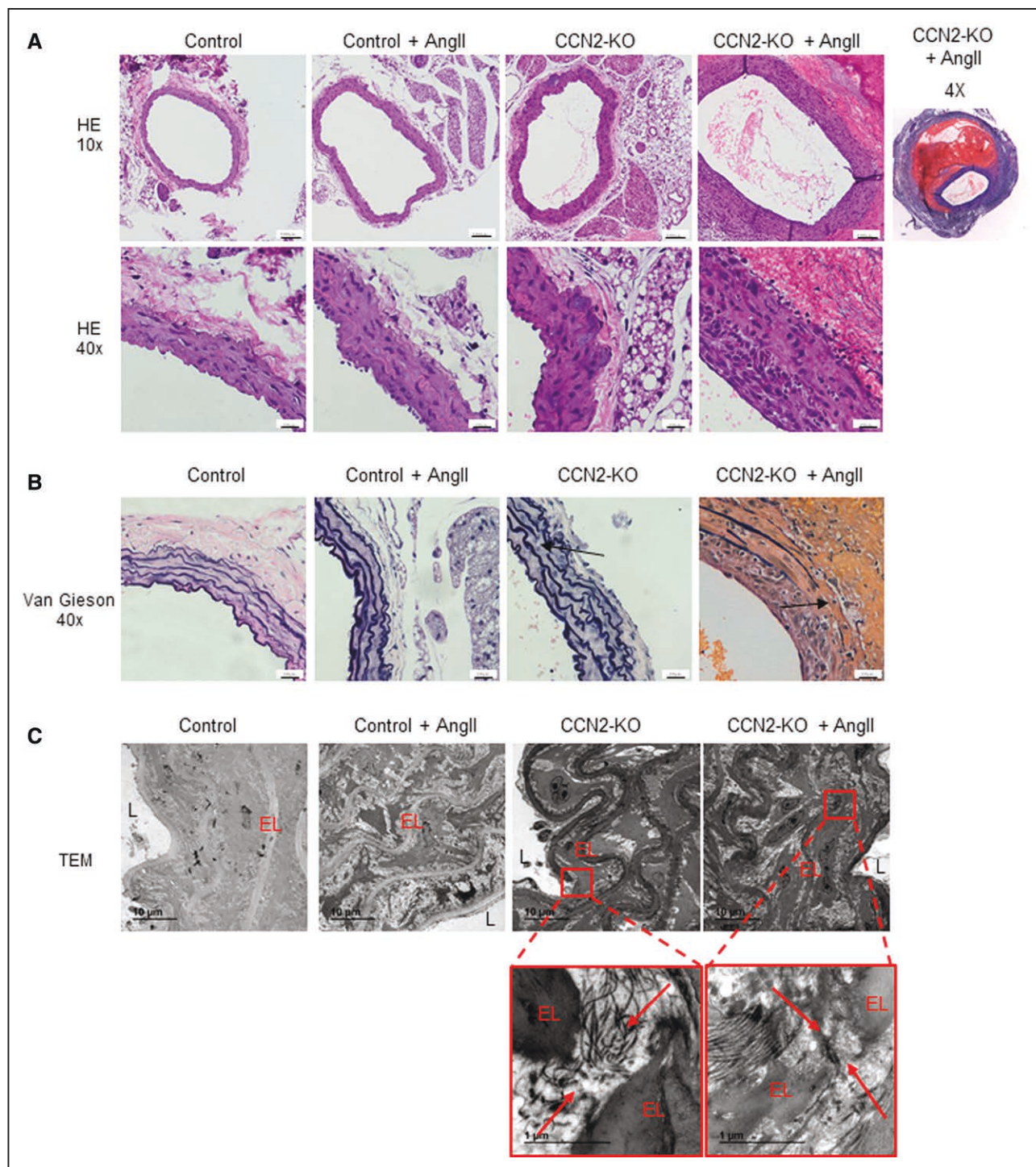


Figure 4. CCN2 (cellular communication network factor 2) deficiency promotes aortic structural and composition changes that are exacerbated in response to Ang II (angiotensin II) administration.

A, Hematoxylin/eosin (HE) at $\times 10$ and their magnification at $\times 40$. *Considering aneurysm size, a lower magnification ($\times 4$) image was included in the CCN2 knockout (CCN2-KO)+Ang II group. Aneurysms were characterized by elastic lamina rupture, aortic wall dissection, and extravasation of red blood cells outside the muscle layer. An inflammatory cell infiltration in the border of the dissected aortic wall and reduced cellularity of the muscular layer were also observed. **B**, Van Gieson staining: internal elastic lamina disrupted zones in CCN2-KO mice with or without Ang II infusion (black arrows). **C**, Transmission electron microscopy (TEM; $\times 2000$): aortic elastic layer (EL) disruption in the absence of CCN2, boxed in red and magnified at $\times 15000$ below. Scale bars: $100\ \mu\text{m}$ at $\times 10$ objective and $20\ \mu\text{m}$ at $\times 40$ in histology; $10\ \mu\text{m}$ at $\times 2000$ and $1\ \mu\text{m}$ at $\times 15000$ in TEM.

Quantitative real time polymerase chain reaction of key differentially expressed genes identified by RNA-seq analysis in the CCN2-KO group, that is, *S100a8*,

S100a9, *Spp1*, *Saa3*, and *Ccl8* (Table S7), confirmed higher aortic mRNA expression levels in CCN2-KO than in control mice (Figure S6B).

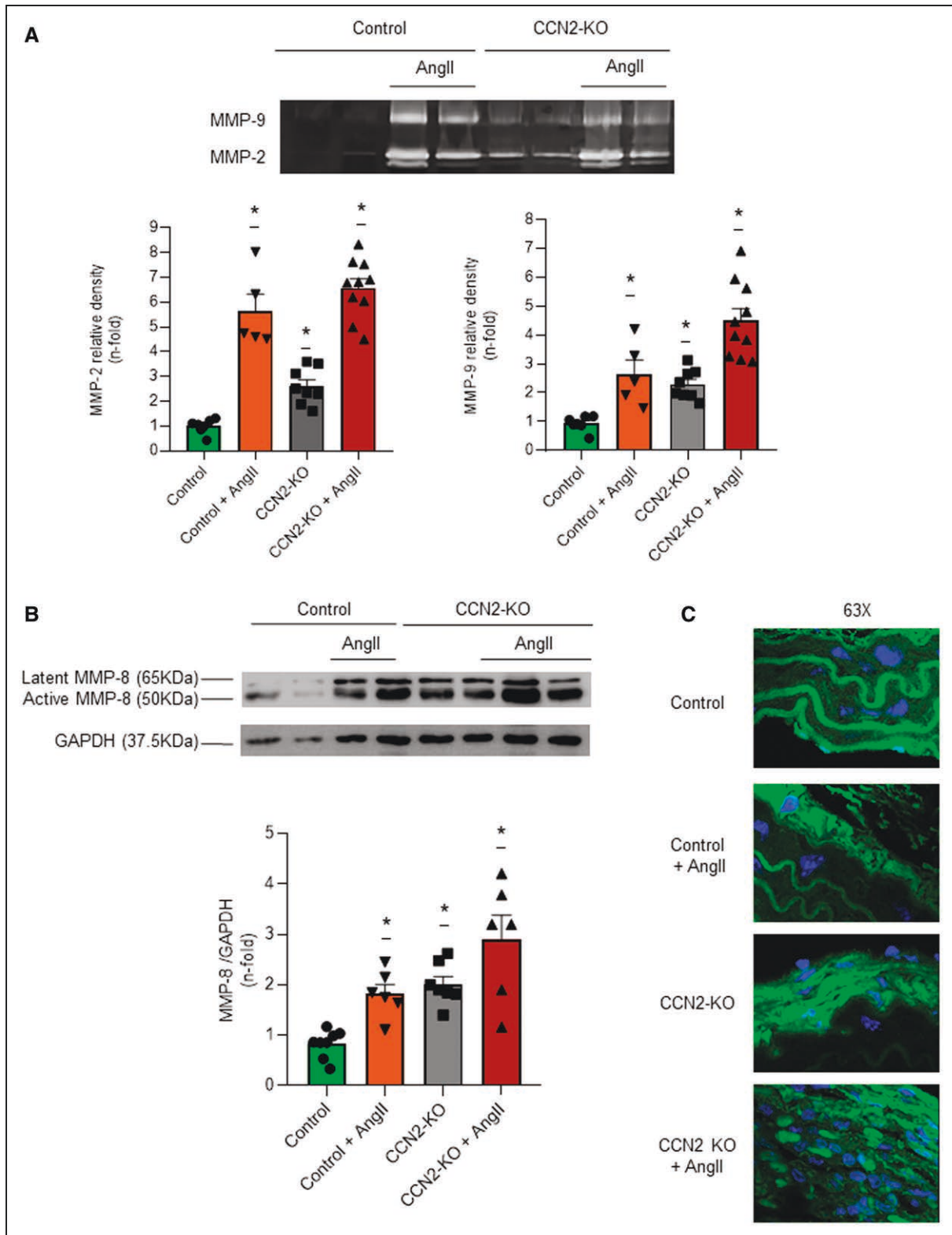


Figure 5. Ccn2 (cellular communication network factor 2) deletion increases vascular MMPs (matrix metalloproteinases).

MMP activities or levels were evaluated in total aortic protein lysates. **A**, Representative MMP-2 and MMP-9 gel zymography and **(B)** MMP-8 Western blot (**top**) and corresponding quantification (**bottom**) showing elevated MMP activities and MMP8 levels in CCN2 knockout (CCN2-KO) group and increased following Ang II (angiotensin II) infusion. **C**, In situ MMP activity was evaluated in paraffin-preserved aortas by the DQ-Gelatin fluorogenic substrate assay. Aortas of CCN2-KO and Ang II-infused control mice displayed similar fluorescence intensity (green signal, observed between elastic layers), whereas there was a broadly distributed green signal in Ang II-infused CCN2-KO mice. $n=5$ to 10 mice per group. Data shown as mean \pm SEM. * $P<0.05$ increased vs control.

Mineralocorticoid Receptor Blockade Reduced Aneurysm Formation Induced by Ang II Administration in CCN2-KO

As aldosterone biosynthetic process was one of the most enriched biological process terms in the GO analysis of deregulated genes when comparing untreated CCN2-KO with control mice (Table S8), we investigated the effect of blocking mineralocorticoid receptor by spironolactone. Spironolactone administration did not prevent systolic blood pressure increase (Figure 6A) but tended to reduce mortality (Figure 6B), as well as aneurysm generation (92% versus 60%) in Ang II-infused CCN2-KO mice (Figure 6C). Importantly, spironolactone treatment significantly decreased both MMP-2 and MMP-9 activity (Figure 6D) and markedly improved both phenylephrine-vasoconstrictor and acetylcholine-vasorelaxant responses (Figure S7A and S7B).

DISCUSSION

The most important findings of this study are that near-total silencing of CCN2 expression disrupted the baseline aortic mechanical and structural homeostasis, as well as the adaptive response to Ang II-induced deleterious effects, culminating in life-threatening thoracoabdominal aneurysm formation and dissection. Our data point to a major physiological role of CCN2 as a key ECM component of the aortic wall that is essential for prevention of structural damage, especially in the context of hypertension and inflammation, which is well beyond its traditionally described role as growth factor.

Hypertension resulting from activation of the renin-angiotensin system has previously been associated with both abdominal and thoracic aortic aneurysms in certain strains of mice.²⁶ To this, we add that the resistance of young C57Bl/6 mice to Ang II-induced aortic aneurysm formation is lost upon silencing of CCN2 expression. In Ang II-infused wild-type mice, CCN2 is rapidly upregulated in the aorta, and this precedes collagen accumulation.²³ Our data confirm and extend this notion, showing that CCN2 is one of the most upregulated factors in the aorta. CCN2 inhibition is known to diminish Ang II-induced ECM overproduction in cultured VSMCs²³ and ameliorated experimental fibrosis.^{8–10} However, data on the impact of CCN2 on cardiovascular pathology indicate that effects may vary with specific disease conditions.^{15,16} As for the aortic wall, our observations regarding exacerbated aortic aneurysm formation and fatal dissection caused by Ang II in CCN2-deficient mice support a role of CCN2 in adaptive and protective responses essential to maintenance of aortic wall integrity.

Intriguingly, our results may seem to contrast with the recent description of reduced elastase-induced aneurysm formation in CCN2 haploinsufficient (*Ccn2*^{+/-}) compared with wild-type mice and with the involvement

of CCN2/MMP2 pathway activation in Ang II-induced AAAs in double knockout (*IL12p40*^{-/-}; *ApoE*^{-/-}) mice.²⁷ The latter authors previously described that also deletion of only *IL12p40* promotes AAA induction by Ang II infusion. Unfortunately, CCN2 levels were not evaluated in that study, nor in a previous study showing that *IL12p40* blockade mitigates elastase-induced AAA.^{28,29} Therefore, it remains to be established how far apparent discrepancies between our results and previous studies might relate to differences between the models studied (elastase versus Ang II³⁰) or differences between near complete silencing of CCN2 in adult mice and genetic CCN2 haploinsufficiency also during in utero development.

Other CCN family proteins are also involved in cardiovascular disease. Although CCN3 can negatively regulate CCN2 responses,³¹ it was protective in experimental aneurysms induced by elastase or Ang II administration.³² This might relate to the fact that CCN2/CCN3 heterodimers can also elicit cellular responses related to both CCN2 and CCN3 activity.³³ On the contrary, *Ccn4* deletion could mitigate aneurysm severity in *ApoE*^{-/-} mice exposed to high-fat diet and Ang II infusion.³⁴ Thus, CCN proteins may play multiple and differential roles in maintaining the adult vascular wall architecture in health and disease.

Increased CCN2 expression has been associated with collagen deposition in human atherosclerotic lesions and in thoracic aortic dissection.^{5,35} Interestingly, CCN2-KO mice had elastic layer disruption, which might relate to weakening of the meshwork of collagen fibers that should normally prevent rupture of elastin fibers by over-extension of the vessel wall. Degradation or loss of elastin fibers significantly alters the mechanical properties of the aorta.³⁶ Enzymes involved in degradation of elastin and collagenous ECM components, such as MMPs and collagenases, are critically involved in aneurysm formation and rupture.³⁷ We found that acquired CCN2 deficiency increased MMP-2 and MMP-9 activity, as well as MMP-8 expression. The elevated MMP activity was located at sites of disruption and loss of elastin fibers. This strongly suggests that MMP dysregulation is also an important mechanism by which CCN2 loss, already prior Ang II infusion, led to aortic wall destabilization and susceptibility to aneurysm formation.

Another mechanism potentially involved in the detrimental effects induced by CCN2 deficiency might relate to changes in elastin-contractile unit proteins and altered VSMC properties. Both changes could negatively affect the ability of aortic VSMCs to respond to pulsatile blood flow in pathological conditions and increase aortic dissection susceptibility.³⁸ Acquired CCN2 deficiency interfered with the aortic expression of several cytoskeletal proteins, including ACTA2—a contractile element of VSMCs relevant to aneurysm formation. Heterozygous *Acta2* mutations cause familial thoracic aortic aneurysms.³⁸ ACTA2 knockout mice exhibited progressive aortic root dilation,

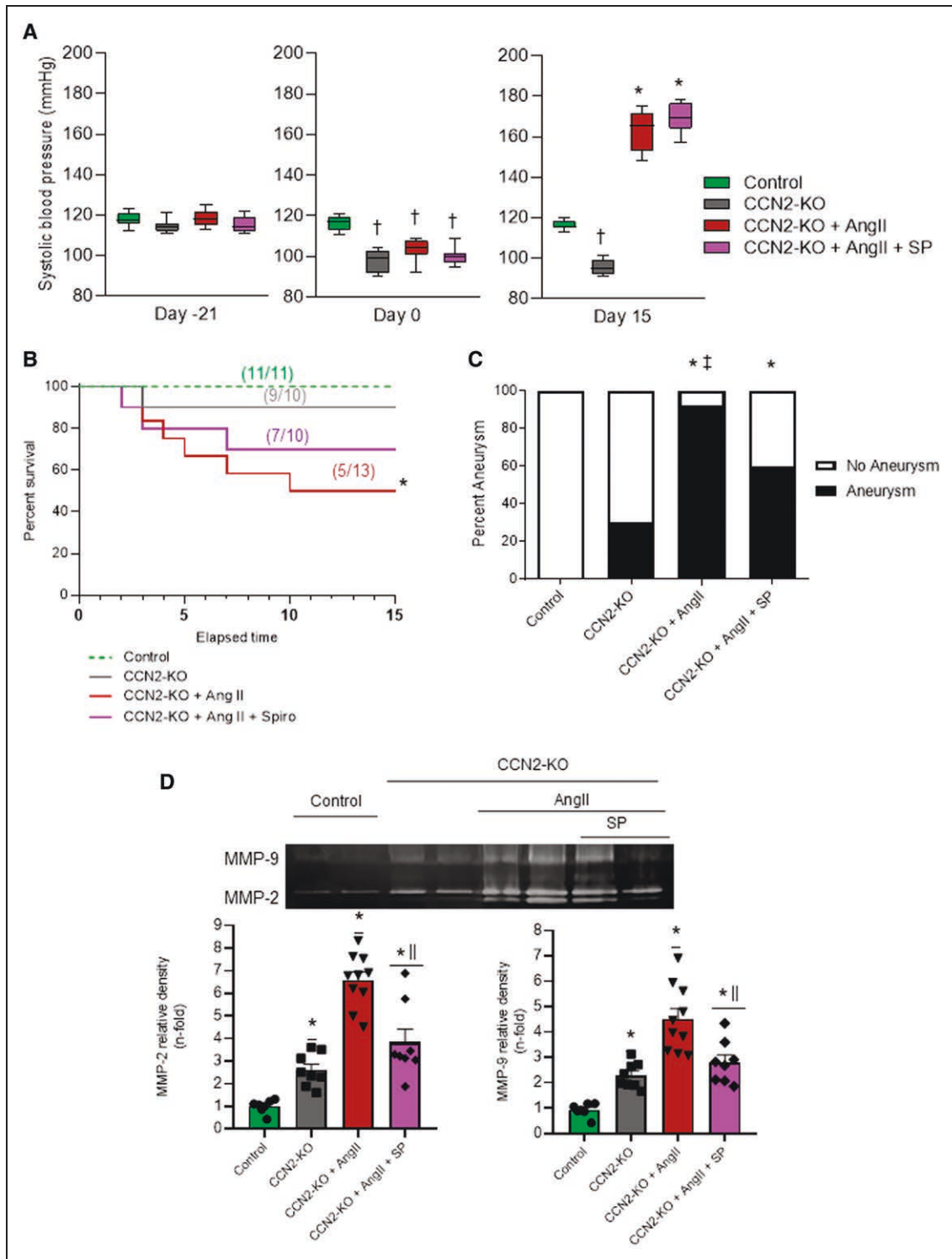


Figure 6. Mineralocorticoid receptor blockade by spironolactone (SP) improves survival, aneurysm appearance rates observed in Ang II (angiotensin II)-infused CCN2 knockout (CCN2-KO) mice.

SP (50 mg/kg per day, intraperitoneal in alternate days) treatment in CCN2-KO+Ang II group was started at the time of *Ccn2* deletion until the end of follow-up. **A**, Kaplan-Meier survival curve showed less mortality in SP-treated compared with untreated Ang II-infused CCN2-KO mice. **B**, SP treatment decreased the percentage of aneurysm appearance in the CCN2-KO+Ang II group. **C**, SP did not prevent Ang II-induced blood pressure level elevation. Data shown as box and whisker plots, with 75th and 25th percentiles; bars represent maximal and minimal values. $n=8$ to 10 mice per group. **D**, Representative MMP (matrix metalloproteinase) 2 and 9 gel zymography (**top**) and quantification (**bottom**) showing a significant MMP2 and MMP9 activity reduction in CCN2-KO+Ang II group treated with SP. $n=7$ to 10 mice per group. * $P<0.05$ increased vs control. † $P<0.05$ decreased vs control. ‡ $P<0.05$ vs CCN2-KO. || $P<0.05$ vs CCN2-KO+Ang II.

VSMC phenotype alterations, and aneurysm formation and dissection in response to Ang II.^{39,40} Of note, our RNA-seq data revealed increased *Spp1* levels in the aorta of Ang II-infused *Ccn2*-deleted mice. *Spp1* encodes osteopontin—a key regulator of VSMC phenotype associated with (progression of) aneurysmatic aorta dilatation.⁴¹ In agreement with previous observations that recombinant CCN2 stimulated migration and proliferation of rat VSMCs,⁴² *Ccn2* deletion decreased wound healing and cell migration in cultured murine VSMCs. Our RNA-seq study showed that Ang II increased the aortic expression of *Saa3*, *S100a8*, *S100a9*, and *Ccl8*, which are all involved in vascular damage and inflammation,^{43–46} and that CCN2 deficiency resulted in even higher expression of these genes, supporting a potential role in aneurysm formation. Elevated SAA and S100A8/S100A9 complexes were observed in human cardiovascular diseases including acute aortic dissection, aneurysms, or atherosclerosis.^{46,47} Moreover, *Saa* deficiency protected *ApoE*^{−/−} mice from Ang II-induced abdominal aortic aneurysm formation.⁴⁸ Interestingly, the systemic administration of a high dose of CCN2-IV failed in preventing aneurysm formation and rupture, suggesting that endogenous, local CCN2 expression is essential for the proper function, maintenance, and adaptive responses of the aortic vascular wall.

Several observational studies reported dysregulated CCN2 expression in both nonsyndromic²⁰ and syndromic human thoracic aortic aneurysms, as observed in several heritable connective tissue disorders such as Marfan, Loeys-Dietz, Ehlers-Danlos, aneurysms-osteoarthritis, and the arterial tortuosity syndrome.⁴⁹ These pathologies are characterized by altered connective tissue, resulting in perturbed ECM assembly, maintenance, and homeostasis in various organ systems.⁴⁹ In some of these syndromes, aneurysms have been linked to TGF β pathway dysregulation. This is of particular interest since CCN2 is a direct transcriptional target and important mediator of TGF β effects. Paradoxically, although increased TGF β signaling was suggested to cause aortic aneurysm development, inhibition of TGF β in experimental aneurysm models was not protective.^{50–52} In fact, TGF β blockade exacerbated aneurysm formation and dissection in several experimental models.^{50,53,54} Also, although it has been suggested to consider Ang II receptor 1 blockade in patients with thoracic aortic aneurysms, based on its ability to inhibit TGF β production and to attenuate aortic dilation in mice, clinical results are thus far controversial, with losartan not providing any benefit in Marfan patients, while irbesartan was associated with a reduced rate of aortic dilatation in children and young adults with this syndrome.^{55,56} How these observations might relate to alteration of CCN2 expression and activity remains to be established.

Interestingly, human abdominal aortic aneurysms are associated with downregulation of transcripts encoded by a 16-Mbp segment between cytogenetic bands q22.1 and q23.2 of chromosome 6. Since CCN2 was found to

be highly downregulated,⁵⁷ this could be directly related to aneurysm generation in these patients. The observed similarities between CCN2 deletion and TGF β pathway disruption with respect to aortic aneurysm development may provide a novel framework for further exploration of the pathogenesis of aortic aneurysm formation and rupture.

Finally, RNA-seq analyses identified aldosterone as a potential contributor to aneurysm formation. Primary aldosteronism patients may develop aortic dissection,⁵⁸ and mineralocorticoid receptor blockers may slow aortic aneurysm progression.⁵⁹ Similarly, in mice fed a high-salt diet, a mineralocorticoid receptor agonist caused aortic aneurysm formation and rupture.⁶⁰ We observed that mineralocorticoid receptor inhibition by spironolactone slightly reduced aneurysm formation and death from aneurysm rupture following Ang II infusion in CCN2-KO mice, without preventing blood pressure elevation. Accordingly, another mineralocorticoid receptor antagonist, eplerenone, significantly reduced aneurysm development induced by Ang II and β -aminopropionitrile in mice, also without preventing blood pressure elevation.⁵⁹ Although spironolactone effects on regulation of other ECM components, such as collagen, have been previously described,⁶¹ the present results strengthen specifically the relation between aldosterone and CCN2 and support the involvement of the aldosterone pathway in aortic aneurysm generation and the potential of mineralocorticoid receptor antagonists for prevention of arterial aneurysm formation and progression.

PERSPECTIVES

Our studies have revealed the crucial role of CCN2 in the maintenance of structural and functional aortic wall homeostasis and as an indispensable factor in adaptive remodeling for preservation of its integrity under (Ang II induced) stress conditions. The near-total absence of CCN2 affected the baseline condition of the aortic wall and predisposed the mice to a pathological response to Ang II, favoring aneurysm formation and rupture, which could not be rescued by exogenous CCN2 infusion. With respect to the lack of safety issues thus far reported for neutralizing anti-CCN2 antibodies currently in phase 2 and 3 clinical trials for various conditions, it should be noted that such treatment cannot be expected to reduce CCN2 availability in the aortic wall to levels near those obtained in our KO mice. Considering the well-established connection between TGF β signaling and CCN2, our data further support a critical role for the TGF β /CCN2 axis in the protection against the development and progression of aortic aneurysms and possibly other cardiovascular disease related to connective tissue disorders.

ARTICLE INFORMATION

Received August 5, 2021; accepted December 4, 2021.

Affiliations

Molecular and Cellular Biology in Renal and Vascular Pathology, IIS-Fundación Jiménez Díaz-Universidad Autónoma Madrid, Spain (R.R.R.-D., A.T.-M., M.O., S.R.-M., M.R.-O.). Red de Investigación Renal, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (R.R.R.-D., M.O., S.R.-M., P.C.-O., A.O., M.A.B., M.R.-O.). Department of Allergy and Immunology, FIIS-Fundación Jiménez Díaz, UAM, Asma, Reacciones Adversas y Alérgicas Network, Madrid, Spain (V.E.). Unit of Cardiovascular and Renal Research, Department of Molecular Medicine, University of Southern Denmark, Odense, Denmark (L.B.S.). Department of Pharmacology, UAM, Instituto de Investigación-Hospital Universitario La Paz, IdiPaz, Ciber Cardiovascular, Madrid, Spain (R.R.-D., A.M.B.). Department of Pathology, University Medical Center Utrecht, the Netherlands (L.L.F.). IIS-Fundación Jiménez Díaz-Universidad Autónoma Madrid, Spain (P.C.-O., A.O., J.E., R.G.). Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Spain (J.E.). Department of Medicine, University of Cambridge, United Kingdom (Z.M.). Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France, Cambridge, United Kingdom (Z.M.). Department of Nephrology, Instituto de Investigación-Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain (M.A.B.).

Acknowledgments

We thank Laura Santos for her help with histology and immunohistochemistry. We also thank Rafael Selgas and FJD animal facilities' employees for support during these years.

Sources of Funding

This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III and Fondos FEDER European Union (PI17/00119, PI20/00140, DTS20/00083, Red de Investigación Renal REDINREN: RD16/0009 to M. Ruiz-Ortega, PI17/01495 and PI20/00487 to J. Egido; PI16/02057, Red De Asma Reacciones Adversas Y Alérgicas ARADyAL: RD16/0006/0013, PFIS grant: F18/00222 to A. Tejera-Muñoz); Comunidad Autónoma de Madrid FEDER—a way to build Europe (B2017/BMD-3751 NOVELREN-CM to M. Ruiz-Ortega; B2017/BMD-3686 CIFRA2-CM; B2017/BMD-3676 AORTA-SANA to A.M. Briones; José Castillejo grant: CAS19/00133 to R.R. Rodríguez-Díez, Juan de la Cierva incorporación grant: IJCI-2017-31399 to R. Rodríguez-Díez, and IJCI2018-035187-I to S. Rayego-Mateos); "Convocatoria Dinamización Europa Investigación 2019" MINECO (EIN2019-103294 to M. Ruiz-Ortega and S. Rayego-Mateos); Spanish Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (SAF2016-80305P); Innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant of the European Union's Horizon 2020 (IMPROVE-PD ID: 812699) to M. Ruiz-Ortega and British Heart Foundation (CH/10/001/27642), Sociedad Española de Nefrología.

Disclosures

None.

Supplemental Material

Figures S1–S9
Tables S1–S8

REFERENCES

1. Perbal B, Tweedie S, Bruford E. The official unified nomenclature adopted by the HGNC calls for the use of the acronyms, CCN1–6, and discontinuation in the use of CYR61, CTGF, NOV and WISP 1–3 respectively. *J Cell Commun Signal*. 2018;12:625–629. doi: 10.1007/s12079-018-0491-1
2. Chaour B. Caught between a "Rho" and a hard place: are CCN1/CYR61 and CCN2/CTGF the arbiters of microvascular stiffness? *J Cell Commun Signal*. 2020;14:21–29. doi: 10.1007/s12079-019-00529-3
3. Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci*. 2006;119(pt 23):4803–4810. doi: 10.1242/jcs.03270
4. Rayego-Mateos S, Campillo S, Rodríguez-Díez RR, Tejera-Muñoz A, Marquez-Exposito L, Goldschmeding R, Rodríguez-Puyol D, Calleros L, Ruiz-Ortega M. Interplay between extracellular matrix components and cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *Clin Sci (Lond)*. 2021;135:1999–2029. doi: 10.1042/CS20201016
5. Ponticos M. Connective tissue growth factor (CCN2) in blood vessels. *Vascu Pharmacol*. 2013;58:189–193. doi: 10.1016/j.vph.2013.01.004
6. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development*. 2003;130:2779–2791. doi: 10.1242/dev.00505
7. Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2007;74:196–206. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.02.008
8. Hao C, Xie Y, Peng M, Ma L, Zhou Y, Zhang Y, et al. Inhibition of connective tissue growth factor suppresses hepatic stellate cell activation in vitro and prevents liver fibrosis in vivo. *Clin Exp Med*. 2014;14:141–150. doi:10.1007/s10238-013-0229-6
9. Ponticos M, Holmes AM, Shi-wen X, Leoni P, Khan K, Rajkumar VS, Hoyle RK, Bou-Gharios G, Black CM, Denton CP, et al. Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen. *Arthritis Rheum*. 2009;60:2142–2155. doi: 10.1002/art.24620
10. Falke LL, Goldschmeding R, Nguyen TQ. A perspective on anti-CCN2 therapy for chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(suppl 1):i30–i37. doi: 10.1093/ndt/gft430
11. Wang R, Xu YJ, Liu XS, Zeng DX, Xiang M. Knockdown of connective tissue growth factor by plasmid-based short hairpin RNA prevented pulmonary vascular remodeling in cigarette smoke-exposed rats. *Arch Biochem Biophys*. 2011;508:93–100. doi:10.1016/j.abb.2011.01.019
12. Szabó Z, Magga J, Alakoski T, Ulvila J, Piihola J, Vainio L, Kivirikko KI, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Lipson KE, et al. Connective tissue growth factor inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in pressure overload-induced heart failure. *Hypertension*. 2014;63:1235–1240. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03279
13. Panek AN, Posch MG, Alenina N, Ghadge SK, Erdmann B, Popova E, Perrot A, Geier C, Dietz R, Morano RD, et al. Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertrophy and protection against pressure overload. *PLoS One*. 2009;4:e6743. doi: 10.1371/journal.pone.0006743
14. Ahmed MS, Gravning J, Martinov VN, von Lueder TG, Edvardsen T, Czibik G, Moe IT, Vinge LE, Øie E, Valen G, et al. Mechanisms of novel cardioprotective functions of CCN2/CTGF in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300:H1291–H1302. doi: 10.1152/ajpheart.00604.2010
15. Gravning J, Ahmed MS, von Lueder TG, Edvardsen T, Attramadal H. CCN2/CTGF attenuates myocardial hypertrophy and cardiac dysfunction upon chronic pressure-overload. *Int J Cardiol*. 2013;168:2049–2056. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.01.165
16. Moe IT, Ahmed MS, Stang E, Hagelin EMV, Attramadal H. CTGF/CCN2 postconditioning increases tolerance of murine hearts towards ischemia-reperfusion injury 1ole jørgen kaasbøll. *PLoS One*. 2016;11:e0149000. doi:10.1371/journal.pone.0149000
17. Rayego-Mateos S, Morgado-Pascual JL, Rodríguez-Díez RR, Rodríguez-Díez R, Falke LL, Mezzano S, Ortiz A, Egido J, Goldschmeding R, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor induces renal fibrosis via epidermal growth factor receptor activation. *J Pathol*. 2018;244:227–241. doi: 10.1002/path.5007
18. Fontes MS, Kessler EL, van Stuijvenberg L, Brans MA, Falke LL, Kok B, Leask A, van Rijen HV, Vos MA, Goldschmeding R, et al. CTGF knockout does not affect cardiac hypertrophy and fibrosis formation upon chronic pressure overload. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;88:82–90. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.09.015
19. Koitabashi N, Arai M, Niwano K, Watanabe A, Endoh M, Suguta M, Yokoyama T, Tada H, Toyama T, Adachi H, 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;10:373–379. doi: 10.1016/j.ejheart.2008.02.011
20. Branchetti E, Poggio P, Sainger R, Shang E, Grau JB, Jackson BM, Lai EK, Parmacek MS, Gorman RC, Gorman JH, et al. Oxidative stress modulates vascular smooth muscle cell phenotype via CTGF in thoracic aortic aneurysm. *Cardiovasc Res*. 2013;100:316–324. doi: 10.1093/cvr/cvt205
21. Daugherty A, Manning MW, Cassis LA. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest*. 2000;105:1605–1612. doi: 10.1172/JCI7818
22. Rodríguez-Díez RR, García-Redondo AB, Orejudo M, Rodríguez-Díez R, Briones AM, Bosch-Panadero E, Kery G, Pato J, Ortiz A, Salaices M, et al. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor, through EGFR/Nox1 signaling, activates the NF-κB pathway and proinflammatory factors in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22:29–47. doi: 10.1089/ars.2013.5500
23. Rupérez M, Lorenzo Ó, Blanco-Colio LM, Esteban V, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation*. 2003;108:1499–1505. doi:10.1161/01.CIR.0000089129.51288.BA

24. Rajkumar AP, Qvist P, Lazarus R, Lescai F, Ju J, Nyegaard M, Mors O, Børglum AD, Li Q, Christensen JH. Experimental validation of methods for differential gene expression analysis and sample pooling in RNA-seq. *BMC Genomics*. 2015;16:548. doi: 10.1186/s12864-015-1767-y
25. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4:44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211
26. Trachet B, Fraga-Silva RA, Jacquet PA, Stergiopoulos N, Segers P. Incidence, severity, mortality, and confounding factors for dissecting AAA detection in angiotensin II-infused mice: a meta-analysis. *Cardiovasc Res*. 2015;108:159–170. doi: 10.1093/cvr/cv215
27. Sharma N, Hans CP. Interleukin 12p40 deficiency promotes abdominal aortic aneurysm by activating CCN2/MMP2 pathways. *J Am Heart Assoc*. 2021;10:e017633. doi: 10.1161/JAHA.120.017633
28. Yan H, Hu Y, Akk AK, Ye K, Bacon J, Pham C. Interleukin-12 and -23 blockade mitigates elastase-induced abdominal aortic aneurysm. *Sci Rep*. 2019;9:10447. doi:10.1038/S41598-019-46909-Y
29. Sharma N, Dev R, Belenchia AM, Aroor AR, Whaley-Connell A, Pulakat L, Hans CP. Deficiency of IL12p40 (interleukin 12 p40) promotes Ang II (angiotensin II)-induced abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39:212–223. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311969
30. Daugherty A, Cassis LA. Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:429–434. doi: 10.1161/01.ATV.0000118013.72016.ea
31. Riser BL, Najmabadi F, Perbal B, Peterson DR, Rambow JA, Riser ML, Sukowski E, Yeger H, Riser SC. CCN3 (NOV) is a negative regulator of CCN2 (CTGF) and a novel endogenous inhibitor of the fibrotic pathway in an in vitro model of renal disease. *Am J Pathol*. 2009;174:1725–1734. doi: 10.2353/ajpath.2009.080241
32. Zhang C, van der Voort D, Shi H, Zhang R, Qing Y, Hiraoka S, Takemoto M, Yokote K, Moxon JV, Norman P, et al. Matricellular protein CCN3 mitigates abdominal aortic aneurysm. *J Clin Invest*. 126:1282–1289. doi: 10.1172/JCI82337
33. Hoshijima M, Hattori T, Aoyama E, Nishida T, Yamashiro T, Takigawa M. Roles of heterotypic CCN2/CTGF-CCN3/NOV and homotypic CCN2-CCN2 interactions in expression of the differentiated phenotype of chondrocytes. *FEBS J*. 2012;279:3584–3597. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08717.x
34. Williams H, Wadey KS, Frankow A, Blythe HC, Forbes T, Johnson JL, George SJ. Aneurysm severity is suppressed by deletion of CCN4. *J Cell Commun Signal*. 2021;15:421–432. doi: 10.1007/s12079-021-00623-5
35. Meng Y, Tian C, Liu L, Wang L, Chang Q. Elevated expression of connective tissue growth factor, osteopontin and increased collagen content in human ascending thoracic aortic aneurysms. *Vascular*. 2014;22:20–27. doi:10.1177/1708538112472282
36. Yanagisawa H, Wagenseil J. Elastic fibers and biomechanics of the aorta: insights from mouse studies. *Matrix Biol*. 2020;85–86:160–172. doi: 10.1016/j.matbio.2019.03.001
37. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest*. 2002;110:625–632. doi: 10.1172/JCI15334
38. Milewicz DM, Prakash SK, Ramirez F. Therapeutics targeting drivers of thoracic aortic aneurysms and acute aortic dissections: insights from predisposing genes and mouse models. *Annu Rev Med*. 2017;68:51–67. doi: 10.1146/annurev-med-100415-022956
39. Cheng J, Zhou X, Jiang X, Sun T. Deletion of ACTA2 in mice promotes angiotensin II induced pathogenesis of thoracic aortic aneurysms and dissections. *J Thorac Dis*. 2018;10:4733–4740. doi:10.21037/jtd.2018.07.75
40. Chen J, Peters A, Papke CL, Villamizar C, Ringuette LJ, Cao J, et al. Loss of smooth muscle α -actin leads to NF- κ B-dependent increased sensitivity to angiotensin II in smooth muscle cells and aortic enlargement. *Circ Res*. 2017;120:1903–1915. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310563
41. Wang SK, Lemmon GW, Gupta AK, Dalsing MC, Sawchuk AP, Motaganahalli RL, Murphy MP, Fajardo A. Fenestrated endovascular aneurysm repair-induced acute kidney injury does not result in chronic renal dysfunction. *J Vasc Surg*. 2019;69:1679–1684. doi: 10.1016/j.jvs.2018.09.044
42. Fan WH, Pech M, Karnovsky MJ. Connective tissue growth factor (CTGF) stimulates vascular smooth muscle cell growth and migration in vitro. *Eur J Cell Biol*. 2000;79:915–923. doi: 10.1078/0171-9335-00122
43. Golledge J, Muller J, Shephard N, Clancy P, Smallwood L, Moran C, et al. Association between osteopontin and human abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:655–660. doi:10.1161/01.ATV.0000255560.49503.4e
44. McCormick MM, Rahimi F, Bobryshev YV, Gaus K, Zreiqat H, Cai H, Lord RS, Geczy CL. S100A8 and S100A9 in human arterial wall. Implications for atherogenesis. *J Biol Chem*. 2005;280:41521–41529. doi: 10.1074/jbc.M509442200
45. Rush C, Nyara M, Moxon JV, Trollope A, Cullen B, Golledge J. Whole genome expression analysis within the angiotensin II-apolipoprotein E deficient mouse model of abdominal aortic aneurysm. *BMC Genomics*. 2009;10:298. doi: 10.1186/1471-2164-10-298
46. He Y, Ma C, Xing J, Wang S, Ji C, Han Y, et al. Serum amyloid A protein as a potential biomarker in predicting acute onset and association with in-hospital death in acute aortic dissection. *BMC Cardiovasc Disord*. 2019;19:282. doi:10.1186/s12872-019-1267-0
47. Averill MM, Kerkhoff C, Bornfeldt KE. S100A8 and S100A9 in cardiovascular biology and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:223–229. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.236927
48. Webb NR, De Beer MC, Wroblewski JM, Ji A, Bailey W, Shridas P, Charnigo RJ, Noffsinger VP, Witta J, Howatt DA, et al. Deficiency of endogenous acute-phase serum amyloid A protects apoE^{-/-} mice from angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:1156–1165. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304776
49. Zoppi N, Chiarelli N, Ritelli M, Colombi M. Multifaceted roles of the α v β 3 integrin in Ehlers-Danlos and arterial tortuosity syndromes' dermal fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 2018;19:E982. doi: 10.3390/ijms19040982
50. Mallat Z, Ait-Oufella H, Tedgui A. The pathogenic transforming growth factor- β overdrive hypothesis in aortic aneurysms and dissections: a mirage? *Circ Res*. 2017;120:1718–1720. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.310371
51. Chen X, Rateri DL, Howatt DA, Balakrishnan A, Moorleghen JJ, Cassis LA, Daugherty A. TGF- β neutralization enhances AngII-induced aortic rupture and aneurysm in both thoracic and abdominal regions. *PLoS One*. 2016;11:e0153811. doi: 10.1371/journal.pone.0153811
52. Lareyre F, Clément M, Raffort J, Pohlod S, Patel M, Esposito B, Master L, Finigan A, Vandestienne M, Stergiopoulos N, et al. TGF β (transforming growth factor- β) blockade induces a human-like disease in a nondissecting mouse model of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:2171–2181. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309999
53. Wang Y, Ait-Oufella H, Herbin O, Bonnin P, Ramkhalawon B, Taleb S, Huang J, Offenstadt G, Combadière C, Réna L, et al. TGF- β activity protects against inflammatory aortic aneurysm progression and complications in angiotensin II-infused mice. *J Clin Invest*. 2010;120:422–432. doi: 10.1172/JCI38136
54. Li W, Li Q, Jiao Y, Qin L, Ali R, Zhou J, et al. Tgfb2 disruption in post-natal smooth muscle impairs aortic wall homeostasis. *J Clin Invest*. 2014;124:755–767. doi:10.1172/JCI69942
55. Mullen M, Jin XY, Child A, Stuart AG, Dodd M, Aragon-Martin JA, Gaze D, Kiotsekokoglou A, Yuan L, Hu J, et al; AIMS Investigators. Irbesartan in Marfan syndrome (AIMS): a double-blind, placebo-controlled randomised trial. *Lancet*. 2019;394:2263–2270. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32518-8
56. Hofmann Bowman MA, Eagle KA, Milewicz DM. Update on clinical trials of losartan with and without β -blockers to block aneurysm growth in patients with marfan syndrome: a review. *JAMA Cardiol*. 2019;4:702–707. doi: 10.1001/jamacardio.2019.1176
57. Biros E, Moran CS, Walker PJ, Cardinal J, Golledge J. A deletion in chromosome 6q is associated with human abdominal aortic aneurysm. *Clin Sci (Lond)*. 2014;127:475–484. doi: 10.1042/CS20130784
58. Ahmed SH, Husain NM, Khawaja SN, Massey CV, Pettyjohn FS. Is primary hyperaldosteronism a risk factor for aortic dissection? *Cardiology*. 2007;108:48–50. doi: 10.1159/000095787
59. Kurobe H, Hirata Y, Matsuoka Y, Sugasawa N, Higashida M, Nakayama T, Maxfield MW, Yoshida Y, Shimabukuro M, Kitagawa T, et al. Protective effects of selective mineralocorticoid receptor antagonist against aortic aneurysm progression in a novel murine model. *J Surg Res*. 2013;185:455–462. doi: 10.1016/j.jss.2013.05.002
60. Liu S, Xie Z, Daugherty A, Cassis LA, Pearson KJ, Gong MC, et al. Mineralocorticoid receptor agonists induce mouse aortic aneurysm formation and rupture in the presence of high salt. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1568–1579. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300820
61. Lacolley P, Safar ME, Lucet B, Ledudal K, Labat C, Benetos A. Prevention of aortic and cardiac fibrosis by spirinolactone in old normotensive rats. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:662–667. doi: 10.1016/s0735-1097(00)01129-3



Article

CCN2 Increases TGF- β Receptor Type II Expression in Vascular Smooth Muscle Cells: Essential Role of CCN2 in the TGF- β Pathway Regulation

Antonio Tejera-Muñoz ^{1,2} , Laura Marquez-Exposito ^{1,2} , Lucía Tejedor-Santamaría ^{1,2} ,
Sandra Rayego-Mateos ^{1,2} , Macarena Orejudo ¹ , Beatriz Suarez-Álvarez ^{2,3}, Carlos López-Larrea ^{2,3,4},
Marta Ruíz-Ortega ^{1,2,*} and Raúl R. Rodrigues-Díez ^{2,3,*}

- ¹ Molecular and Cellular Biology in Renal and Vascular Pathology, IIS-Fundación Jiménez Díaz-Universidad Autónoma Madrid, 28040 Madrid, Spain; antoniotemu@gmail.com (A.T.-M.); laura.marqueze@quironsalud.es (L.M.-E.); luciatejedors@hotmail.com (L.T.-S.); srayego@fjd.es (S.R.-M.); macaorejudo@gmail.com (M.O.)
- ² Red de Investigación Renal (REDINREN), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain; bea230@hotmail.com (B.S.-Á.); inmuno@hca.es (C.L.-L.)
- ³ Translational Immunology Laboratory, Health Research Institute of Asturias (ISPA), 33011 Oviedo, Spain
- ⁴ Department of Immunology, Hospital Universitario Central De Asturias, 33011 Oviedo, Spain
- * Correspondence: mruizo@fjd.es (M.R.-O.); rrodriguez@fjd.es (R.R.R.-D.)
- † These authors contributed equally to this work as senior author.



Citation: Tejera-Muñoz, A.; Marquez-Exposito, L.; Tejedor-Santamaría, L.; Rayego-Mateos, S.; Orejudo, M.; Suarez-Álvarez, B.; López-Larrea, C.; Ruíz-Ortega, M.; Rodrigues-Díez, R.R. CCN2 Increases TGF- β Receptor Type II Expression in Vascular Smooth Muscle Cells: Essential Role of CCN2 in the TGF- β Pathway Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 375. <https://doi.org/10.3390/ijms23010375>

Academic Editor: Stefanie Krick

Received: 25 November 2021

Accepted: 27 December 2021

Published: 29 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The cellular communication network factor 2 (CCN2/CTGF) has been traditionally described as a mediator of the fibrotic responses induced by other factors including the transforming growth factor β (TGF- β). However, several studies have defined a direct role of CCN2 acting as a growth factor inducing oxidative and proinflammatory responses. The presence of CCN2 and TGF- β together in the cellular context has been described as a requisite to induce a persistent fibrotic response, but the precise mechanisms implicated in this relation are not described yet. Considering the main role of TGF- β receptors (T β R) in the TGF- β pathway activation, our aim was to investigate the effects of CCN2 in the regulation of T β RI and T β RII levels in vascular smooth muscle cells (VSMCs). While no differences were observed in T β RI levels, an increase in T β RII expression at both gene and protein level were found 48 h after stimulation with the C-terminal fragment of CCN2 (CCN2(IV)). Cell pretreatment with a T β RI inhibitor did not modify T β RII increment induced by CCN2(VI), demonstrating a TGF- β -independent response. Secondly, CCN2(IV) rapidly activated the SMAD pathway in VSMCs, this being crucial in the upregulation of T β RII since the preincubation with an SMAD3 inhibitor prevented it. Similarly, pretreatment with the epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor erlotinib abolished T β RII upregulation, indicating the participation of this receptor in the observed responses. Our findings suggest a direct role of CCN2 maintaining the TGF- β pathway activation by increasing T β RII expression in an EGFR-SMAD dependent manner activation.

Keywords: CCN2; TGF- β ; SMAD; TGF- β receptors; EGFR; CTGF

1. Introduction

The transforming growth factor beta (TGF- β) belongs to the TGF- β growth factor superfamily implicated in cell division, differentiation, migration, adhesion, organization and death [1–3]. The relevant role of TGF- β in cellular homeostasis has been widely demonstrated and the deregulation of their related pathways has been associated with several human pathologies including cancer, autoimmune disorders and cardiovascular diseases [4,5]. The classical TGF- β pathway activation starts with TGF- β binding to its serine-threonine kinase receptor type II (T β RII) which leads to receptor type I (T β RI) activation. The active T β RI, enlists and phosphorylates the receptor-regulated SMADs proteins (R-SMADs:

SMAD 2 and SMAD 3) inducing the formation of a new heterocomplex with the common-mediator SMAD (SMAD 4). Finally, this R-SMAD/SMAD4 complex is translocated into the nucleus regulating the expression of their related genes through the interaction with other transcription factors [4,6,7]. Aside from this classical activation, other different pathways activated by TGF- β have also been described, including ERK, p38 mitogen activated protein kinase (MAPK), JNK and PI3K/AKT cascades [8,9].

Regarding cardiovascular system, TGF- β pathway plays an essential role in the vascular wall formation during the embryonic development [5,10]. In mature vessels, TGF- β has been directly related with the development of vascular fibrosis [11,12]. However, it has been also described as a vascular anti-inflammatory mediator [13,14]. Interestingly, although the anti-inflammatory effects were largely demonstrated in vascular smooth muscle cells (VSMCs), a pro-inflammatory role has been recently attributed to the endothelial-derived TGF- β in atherosclerosis lesions [15]. These results demonstrate the complexity of the TGF- β pathway regulation, and encourage new studies to further unravel the processes involved.

Among the large number of genes regulated by TGF- β , one of the most increased factors already described is the Cellular Communication Network Factor 2 (CCN2), previously known as connective tissue growth factor (CTGF) [16]. CCN2 is a matricellular protein encompassed in the CCN protein family, composed also by CCN1/Cyr61 (cysteine rich protein), CCN3/Nov (nephroblastoma overexpressed protein) and other three secreted proteins (CCN4-6) [17]. CCN2 is implicated in several biological processes such as cell proliferation, survival, angiogenesis and migration [18–20]. As other CCN members, CCN2 are composed by four distinct modules: 1: insulin-like growth factor binding protein; 2: von Willebrand factor type C repeat; 3: thrombospondin type 1 repeat; and 4: C-terminal cystine-knot [21]. CCN2 is secreted as a preprotein that requires proteolytic processing to release the C-terminal domains and to be fully biologically active [22]. Increased levels of CCN2 have been described in several pathologies, including cardiovascular diseases like heart failure, pulmonary hypertension, vascular remodeling and atherosclerosis [20,23–25]. Traditionally, CCN2 has been described as a downstream mediator of the profibrotic responses induced by other factors such as the above mentioned TGF- β , endothelin or angiotensin II (Ang II) in VSMCs [11,26,27]. Nevertheless, during last years, our group, and many others, described the ability of the CCN2-C-terminal module (CCN2-IV) to directly induce and activate pro-oxidative and pro-inflammatory responses [28–31]. Increased circulating CCN2 levels have been suggested as a risk biomarker for cardiac dysfunction in patients with myocardial fibrosis and chronic heart failure [32]. However, at experimental level, there is different evidence depending on the pathology. In this sense, while CCN2 blockade have shown beneficial effects in experimental aortic restenosis, pulmonary vascular remodeling [24,33] or in several models of liver, lung and kidney fibrosis in mice [34–36], CCN2 overexpression demonstrated cardio-protective effects in Ang-II infused mice after experimental myocardial injury induced by ischemia reperfusion [37–41].

The essential participation of CCN2 in the TGF- β profibrotic responses has been described in some studies. Thereby, in dermal and lung fibroblast CCN2 is necessary to the maintenance of a persistent fibrotic tissue formation induced by TGF- β [42,43]. Accordingly, although CCN2 by itself is not considered a direct fibrotic factor, their presence is crucial to generate a fibrotic environment in experimental lung fibrosis in mice [36,44–46]. These results suggest the existence of other mechanisms directly induced by CCN2 that may contribute to the maintenance of the fibrotic response elicited by TGF- β .

Despite this close relation between TGF- β and CCN2, the potential downstream regulation of the TGF- β pathway by CCN2 remains unclear. Considering the main role of the TGF- β receptors in the TGF- β pathway activation and its maintenance [47–49], our aim was to evaluate whether CCN2 modulate TGF- β receptors levels in VSMCs and to describe the potential mechanisms implicated.

was to evaluate whether CCN2 modulate TGF- β receptors levels in VSMCs and to describe the potential mechanisms implicated.

2: Results

2.1. CCN2(IV) Increases T β RII Levels in Cultured VSMCs after 48 Hours

In order to evaluate whether CCN2 could modulate TGF- β receptors levels, culture VSMCs were treated with the recombinant CCN2(IV) at different doses (50 or 100 ng/mL). CCN2(IV) significantly increased T β RII protein levels in VSMCs at both doses compared with basal condition cells after 48 h (Figure 1A). Conversely, the treatment with TGF- β (1 ng/mL) induced a significant decrease in the T β RII levels (Figure 1A). On the other hand, neither CCN2(IV) nor TGF- β modified T β RI protein levels (Figure 1B). Similarly, CCN2(IV) increased T β RII mRNA levels after 48 h at 50 and 100 ng/mL doses, whereas TGF- β significantly decreased them (Figure 1C). Finally, CCN2(IV) treatment did not modify T β RI and TGF- β mRNA levels at any studied dose after 48 h (Figure 1D,E).

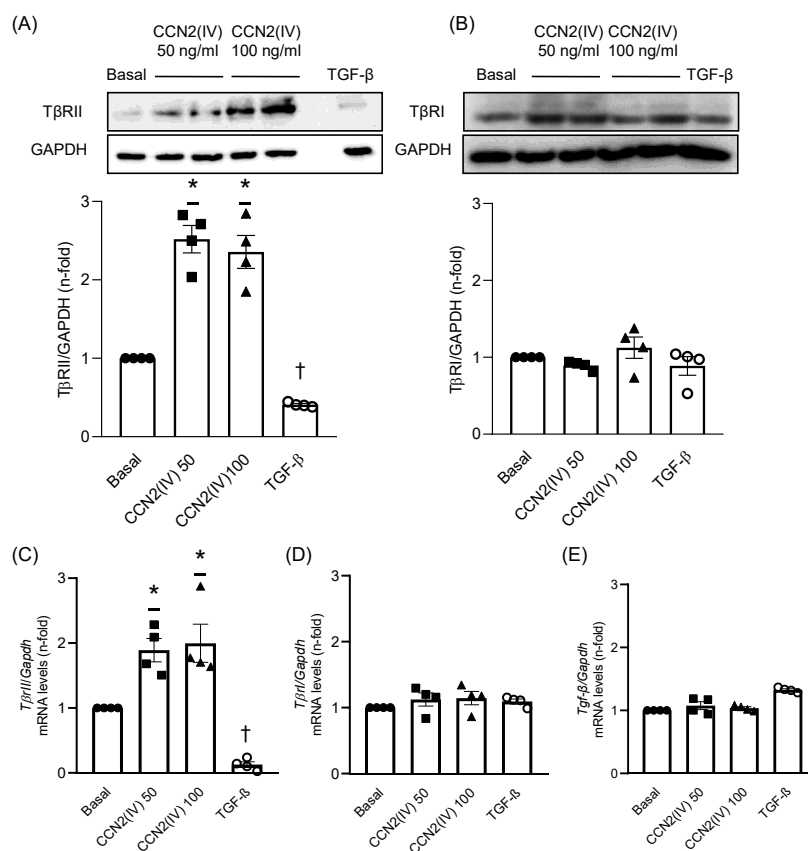


Figure 1. T β RII protein and mRNA levels are increased by CCN2(IV) stimulus in VSMCs in vitro. CCN2(IV)-incubated vascular smooth muscle cells (VSMCs) showed increased protein levels of T β RII and T β RII at doses of 50 ng/mL and 100 ng/mL after 48 h of treatment, whereas TGF- β (1 ng/mL) treatment decreased T β RII protein levels compared to non-treated VSMCs (A). Protein levels of T β RI were not modified neither by CCN2(IV) nor TGF- β (B). After 48 h of treatment, CCN2(IV) increased *T β RII* (C), but not *T β RI* (D) and *TGF- β* (E) mRNA levels, whilst TGF- β stimulation decreased *T β RII* and did not modify *T β RI* and *TGF- β* mRNA levels. Data are presented as mean \pm SEM of 4 independent experiments. * $p < 0.05$ increased vs. Basal; † $p < 0.05$ decreased vs. Basal.

2.2. CCN2(IV) Activates the SMAD Pathway in Cultured and Aortic VSMCs at Short Times

To test whether CCN2 directly activate the SMAD pathway, culture VSMCs were incubated with CCN2(IV) at different times. After 10, 15 and 20 min, CCN2(IV) induced a significant SMAD pathway activation observed by increased levels of phosphorylated SMAD3 (Figure 2A, p-SMAD3) and SMAD2 (Figure 2B, p-SMAD2). The SMAD pathway activation was confirmed by translocation of p-SMAD2 (Figure 2C) and SMAD 4 (Figure 2D) into the VSMCs nuclei after 10 and 20 min. As observed in vitro, the in vivo

intraperitoneal CCN2(IV) administration in mice increased p-SMAD3 (Figure 3A) and p-SMAD2 (Figure 3B) levels in the aortic VSMCs after 24 h. In this set of experiments, TGF- β (1 ng/mL) was used as positive control.

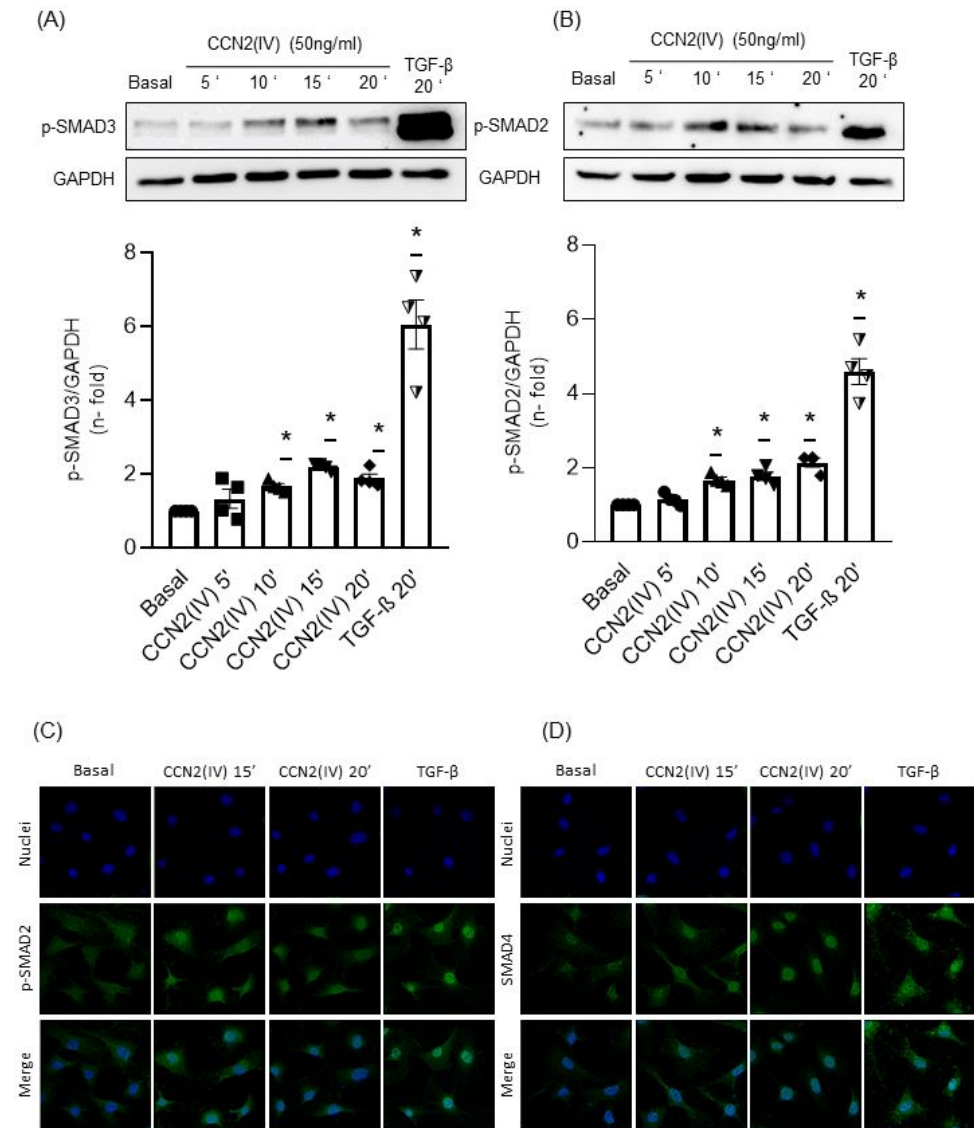


Figure 2. CCN2(IV) promotes SMAD pathway activation by phosphorylation of SMAD2 and SMAD3 in vitro. CCN2(IV) (50 ng/mL) induced SMAD3 (A) and SMAD2 (B) phosphorylation in VSMCs at early time-points (5 to 20 min) represented as p-SMAD3 and p-SMAD2 respectively. These results agreed with an increase in the nuclear translocation of p-SMAD2 (C) and SMAD4 (D) after 10 and 20 min of treatment with CCN2(IV) in VSMCs. Data are presented as mean \pm SEM of 4 independent experiments. * $p < 0.05$ increased vs. Basal.

2.3. CCN2(IV) Increases T β RII Expression in VSMCs by TGF- β –Independent SMAD Activation

The potential role of SMAD pathway activation induced by CCN2(IV) in the regulation of T β RII expression was evaluated by using the SMAD3 inhibitor SIS3. The protein levels evaluation demonstrated that preincubation of VSMCs with SIS3 for 1 h inhibited T β RII upregulation induced by CCN2(IV) after 48 h of treatment (Figure 4A), demonstrating a direct role of SMAD activation in this process. On the other hand, preincubation of VSMCs for 1 h with galunisertib, a potent T β RI inhibitor, did not modulate T β RII levels in CCN2(IV) treated cells (Figure 4B), indicating a TGF- β independent response.

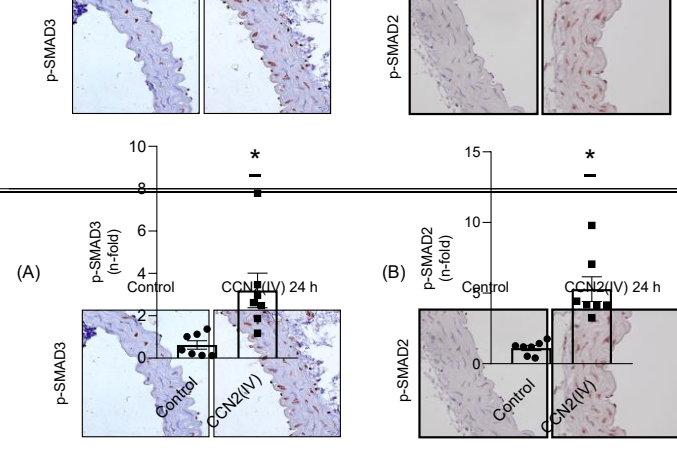


Figure 3. p-SMAD3 and p-SMAD2 are higher expressed in aortic VSMCs from mice injected with CCN2(IV). Intraperitoneal administration of CCN2(IV) (2.5 ng/g) increased aortic levels of p-SMAD3 (A) and p-SMAD2 (B) compared to control group after 24 h of treatment. Microphotographs show aorta immunohistochemistry (40× magnification) of both groups. Data are presented as mean ± SEM of 7 mice per group. * $p < 0.05$ increased vs. Basal.

2.3. CCN2(IV) Increases TβRII Expression in VSMCs by TGF-β-Independent SMAD Activation

The potential role of SMAD pathway activation induced by CCN2(IV) in the regulation of TβRII expression was evaluated by using the SMAD3 inhibitor SIS3. The protein levels of TβRII in aortic VSMCs from mice injected with CCN2(IV) after 48 h of treatment were significantly increased compared to control group after 48 h of treatment. Microphotographs show aorta immunohistochemistry (40× magnification) of both groups. Data are presented as mean ± SEM of 7 mice per group. * $p < 0.05$ increased vs. Basal.

2.3. CCN2(IV) Increases TβRII Expression in VSMCs by TGF-β-Independent SMAD Activation

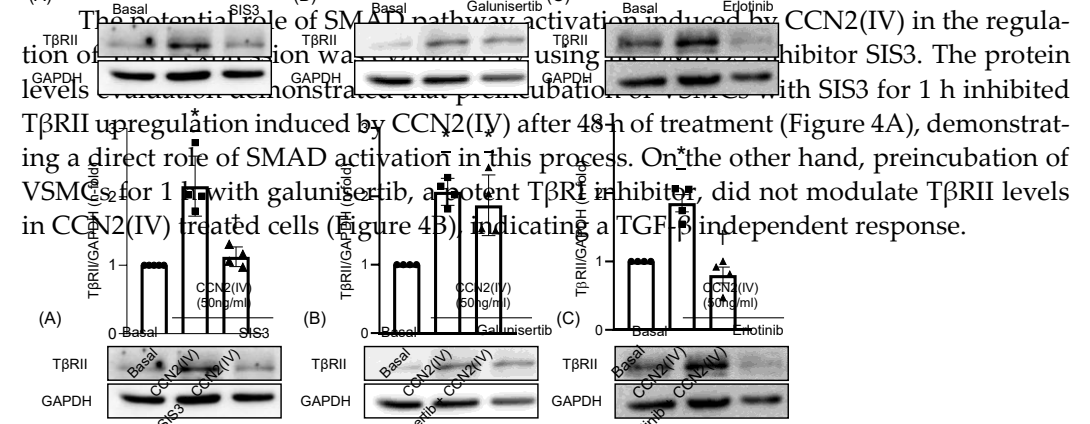


Figure 4. CCN2(IV) triggers TβRII expression via EGFR/SMAD activation and independently of TGFβ pathway in VSMCs in vitro. The increased expression of TβRII induced by CCN2(IV) after 48 h was significantly reduced in VSMCs preincubated 1 h with SIS3, a pharmacological inhibitor of the SMAD3 activation (A). However, 1 h of preincubation with galunisertib, a pharmacological inhibitor of TβRII, did not prevent TβRII overexpression induced by CCN2(IV) in VSMCs (B). On the other hand, preincubation of VSMCs with erlotinib, a pharmacological inhibitor of EGFR, 1 h before CCN2(IV) addition, significantly prevented TβRII overexpression after 48 h (C). Data are presented as mean ± SEM of 4 independent experiments. * $p < 0.05$ increased vs. Basal; † $p < 0.05$ decreased vs. Basal.

2.4. TβRII Expression Induced by CCN2(IV) in VSMCs Is Mediated by the EGF Receptor
Figure 4. CCN2(IV) triggers TβRII expression via EGFR/SMAD activation and independently of TGFβ pathway in VSMCs in vitro. The increased expression of TβRII induced by CCN2(IV) after 48 h was significantly reduced in VSMCs preincubated 1 h with SIS3, a pharmacological inhibitor of the SMAD3 activation (A). However, 1 h of preincubation with galunisertib, a pharmacological inhibitor of TβRII, did not prevent TβRII overexpression induced by CCN2(IV) in VSMCs (B). On the other hand, preincubation of VSMCs with erlotinib, a pharmacological inhibitor of EGFR, 1 h before CCN2(IV) addition, significantly prevented TβRII overexpression after 48 h (C). Data are presented as mean ± SEM of 4 independent experiments. * $p < 0.05$ increased vs. Basal; † $p < 0.05$ decreased vs. Basal.

3. Discussion

The present study points out a direct role of CCN2 increasing T β RII levels and, therefore, suggests its participation exerting positive feedback in the TGF- β pathway activation. On the contrary, TGF- β induces a reduction in T β RII levels, indicating the complexity of this pathway regulation. Our results provide a potential explanation of the previously described relevance of CCN2 maintaining the TGF- β profibrotic response and open new ways to future studies in this field.

The regulation of the TGF- β pathway comprises a wide range of components and factors, which lead into the activation of a large list of genes [51]. Among the latter, CCN2 plays an essential role in the profibrotic response induced by TGF- β [52,53]. TGF- β pathway components levels have been described to be essential in the regulation of the TGF- β activation [48]. Upon their activation, the heteromeric T β RI/T β RII complexes are rapidly internalized into the cytoplasm by, at least, two different processes: the classical clathrin-dependent pathway, which helps SMAD activation, and a lipid raft-caveolin dependent process which mediates the receptor degradation [54]. Consequently, the specificity of signaling pathway activation and the biological effects of TGF- β are modulated by TGF- β receptor levels [47]. At vascular level, the relevance of TGF- β receptors has been described in several pathologies. Thus, the cell-phenotype conversion from an antiproliferative to a profibrotic response after TGF- β stimulation observed in VSMCs derived from human atherosclerotic and restenotic lesions, was attributed to the decreased ratio of T β RII/T β RI [55–57]. Interestingly, one of the most used drugs for atherosclerosis treatment, statins, have demonstrated to increase T β RII expression, as well as CCN2 production in cultured VSMCs [58]. Consequently, atorvastatin treatment increased T β RII expression in the atheroma plaque in an experimental model of atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout mice, which was associated to beneficial effects, including amelioration of disease progression and stabilization of the atheroma plaque by increased CCN2 expression and collagen content [58]. These data suggest an interrelation between CCN2 and T β RII regulation both in vitro and in vivo in VSMCs. Here we demonstrate that CCN2 increased T β RII expression in cultured VSMCs at both protein and gene level after 48 h, while T β RI levels remained unaltered. Contrarily, TGF- β decreased T β RII levels after 48 h of stimulation, which could correspond to the above-mentioned TGF- β receptor degradation. These findings suggest a direct role of CCN2 maintaining positive feedback in the TGF- β response.

CCN2 exerts a dual role in the vasculature not only acting as a growth factor, but also maintaining vascular homeostasis [22,59,60]. This feature could explain the different results obtained modulating CCN2 levels in experimental cardiovascular pathologies showing the benefits of both blocking [24,61,62] or overexpressing CCN2 [37,38,40,41,63], depending on the disease. Regarding gene expression regulation, CCN2 knockout mice die shortly after birth by respiratory failure due to its essential role in coordinating chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development [64]. In adult mice, tamoxifen-dependent CCN2 deletion ameliorated renal fibrosis [65], but it did not improve cardiac fibrosis and hypertrophy [66]. Recently, our group has demonstrated the relevance of CCN2 on maintaining vascular wall homeostasis in a model of Ang II-induced vascular damage. In this sense, acquired CCN2 deletion in adult mice predispose to rapid aortic aneurysms development and rupture after Ang II administration [67]. These results are similar to those observed in experimental mice models combining TGF- β neutralization with Ang II infusion, which enhanced AngII-induced aortic rupture and aneurysm in both thoracic and abdominal regions [68,69]. Although further studies are necessary to further evaluate this hypothesis, the present results open new potential mechanisms in which CCN2, by increasing T β RII expression in VSMCs, could exert positive feedback in the TGF- β pathway activation, contributing to the TGF- β -beneficial effects described in some vasculopathy situations [70]. Regarding CCN2-growth factor actions, our previous studies described the ability of CCN2 to induce pro-oxidative and pro-inflammatory responses in cultured VSMCs and mice aorta [28]. In the present study we demonstrated that CCN2 also activates

evaluate this hypothesis, the present results open new potential mechanisms in which CCN2, by increasing TβRII expression in VSMCs, could exert positive feedback in the TGF-β pathway activation, contributing to the TGF-β-beneficial effects described in some vasculopathy situations [70]. Regarding CCN2-growth factor actions, our previous studies described the ability of CCN2 to induce pro-oxidative and pro-inflammatory responses in cultured VSMCs and mice aorta [28]. In the present study we demonstrated that CCN2 also activates SMAD pathway in cultured VSMCs at early time-points leading to TβRII production after 48 h. We have previously described that CCN2 directly binds to and activates EGFR in VSMCs to induce pro-oxidative and pro-inflammatory responses in VSMCs. In this new study, we further strengthen the EGFR participation in CCN2 response demonstrating that this receptor is essential to induce TβRII overexpression mediated by CCN2 (IV) in VSMCs. Altogether, our data suggest a potential mechanism implicated in TβRII overexpression induced by CCN2 (IV) that include EGFR and SMAD pathway activation (Figure 5).

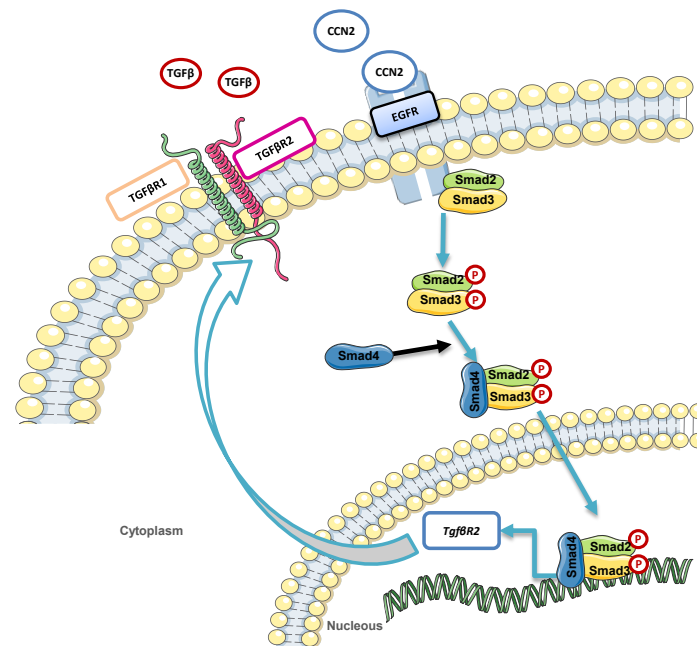


Figure 5. Graphical scheme of proposed mechanism by which CCN2 may be triggering the expression of TβRII, compared to canonical TGF-β pathway activation.

4. Materials and Methods

4.1. Experimental Mice Model

Experimental animal studies were performed in adult male C57BL/6J mice (9–12 weeks old, 20 g, Harlan Interfauna Ibérica, S.A., Barcelona, Spain) and maintained in the facilities of the “Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz” (IIS-FJD) fed with standard diet and water ad libitum, under special pathogen-free conditions and normal light-dark cycles. All the procedures with animals were performed according to the European Community (RD 53/2013) and IIS-FJD Animal Research Ethical Committee guidelines (PROEX 062/18). CCN2(IV) administration was performed as previously described [28]. Briefly, mice were intraperitoneally injected with CCN2(IV) (2 μg/g of body weight, dissolved in saline) and were euthanatized after 24 h under anesthesia (Isoflurane; Abbott Laboratories, Madrid, Spain). Aortas were collected, dissected free of fat and connective tissue, fixed in paraformaldehyde and embedded in paraffin. A control saline-injected group was also studied (n = 7 mice per group). The purity of CCN2(IV) (endotoxin levels < 0.01) was evaluated by MALDI-TOF (data not shown).

4.2. Histological Analysis

Aortic sections embedded in paraffin were placed in coated slides (4 μm thick), deparaffinized, rehydrated (alcohol gradient from xylene, alcohol 100-95-70%) and washed in distilled water. For immunostaining, antigens were restored by using PTLINK system (DAKO Diagnostics, Barcelona, Spain), blocking endogenous peroxidase afterwards. Commercial casein solution (DAKO Diagnostics) was used to release non-specific protein bindings (1 h at room temperature) and tissue sections were incubated overnight at 4 °C with primary p-SMAD2 ([1/200]; #3108, Cell signaling, Danvers, MA, USA) or p-

SMAD3 ([1/200]; ab52903, Abcam, Cambridge, UK) antibody diluted in antibody solution (DAKO Diagnostics). Sections were incubated with the specific HRP secondary antibodies (GENA934, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) for 1 h followed by Avidin-Biotin Complex incubation (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) during 30 min. To develop signal, samples were incubated with substrate solution and 3,3-diaminobenzidine as a chromogen (Abcam, Cambridge, UK) and counterstained with Carazzi's haematoxylin (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). For each antibody, specificity was checked by omission of primary antibodies (data not shown). Quantification was made by using the Image-Pro Plus software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) determining the positive relative staining area per total area in 5 to 10 randomly chosen fields ($\times 40$ magnification) taken with LeicaDMD108 microscope (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany).

4.3. Cell Cultures

Vascular smooth muscle cells (VSMCs) came from mice aorta cell line MOVAS (ATCC CRL-2797; Barcelona, Spain). VSMCs were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% L-glutamine 200 mM, 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin and 0.2 mg/mL G-418 (all reagents were obtained from Sigma Chemical, MO, USA). Every experiment was performed at 80% of confluence, as well as in growth-arrested cells conditioned by serum starvation during the 24 h prior to stimuli. Cells were treated with recombinant C-terminal CCN2 (CCN2(IV)) (Peprotech, London, UK) as stimulus at concentrations of 50 and 100 ng/mL evaluated at different time-points. According to previous studies of our group [58,71], SMAD pathway activation was evaluated at early time-points (5 to 20 min) whereas TGF- β receptors levels were assessed after 48 h of CCN2(IV) treatment. The following pharmacological inhibitors were used to study different pathways: SIS3 (Selleck Chemicals, Berlin, Germany), as a SMAD3 phosphorylation inhibitor [72], galunisertib (Selleck Chemicals) a T β RI antagonist [73], and erlotinib, an EGFR inhibitor (Vichem Chemie Research, Budapest, Hungary).

4.4. Immunofluorescence

Immunofluorescence studies were assessed in VSMCs seeded in 24-well Multidish over glass coverslips (Cultek, Madrid, Spain). Once experiments were done, cells were fixed in 4% PFA, treated with 0.1% Triton-X100 and blocked with 4% BSA in TBS. Afterwards, cells were incubated with p-SMAD2 ([1/200]; #3108, Cell signaling, MA, USA) and p-SMAD4 antibodies ([1/200]; sc7966; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) overnight, followed by 1 h of incubation with AlexaFluor[®]488 conjugated secondary antibody (1/300; Invitrogen, Life Technologies, Philadelphia, PA, USA). DAPI was used as nuclear counterstaining (Sigma Chemical). Negative control was also performed in absence of primary antibody (data not shown) in order to verify specificity of the immunostaining. Finally, samples were mounted in ProlongGold[™] (Invitrogen, Life Technologies) and visualized in a Leica DM-IRB confocal microscope.

4.5. qPCR Analysis

Total mRNA was obtained by using TRIzol method as previously described (Invitrogen) and retro-transcribed into cDNA by using the Reverse Transcription kit (Applied biosystems, Life Technologies, Inchinnan, UK). Multiplex real time-PCR was performed using fluorogenic primers designed by the Assay-on-Demand mouse gene expression products (Applied Biosystems): *Tgfb* (Mm01178820_m1), *Tgfb1* (Mm00436964_m1) and *Tgfb2* (Mm03024091_m1) (FAM). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) (Mm99999915_g1, VIC) was used as endogen control to normalized data. The mRNA copy number were calculated for each sample by the instrument software (ABIPrism 7500 Fast sequence detection PCR system software (Applied Biosystems)) using Ct value ("arithmetic fit point analysis for the lightcycler"), and results were expressed in n-fold calculated vs. control.

4.6. Western Blot

Total proteins were isolated from the whole frozen aorta using lysis buffer as previously described [28]. Afterwards, proteins were quantified using bicinchoninic acid assay (BCA) method (Thermo Fisher Scientific). A total 50 µg of proteins were loaded and separated on 10% polyacrylamide-SDS gels under reducing conditions. At the end of electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK). Membranes were blocked in TBS containing 0.1% Tween20 (TBST) and 5% dry non-fat milk (1 h at room temperature) and incubated with the different primary antibodies overnight at 4 °C. Next day, membranes were washed 10 min three times with TBST and incubated 1 h with the appropriate HRP (horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibody (anti-rabbit, GENA934, anti-mouse, GENA931, Sigma Chemical [1/2000]) at room temperature. ECL kit (Amersham Bioscience) was used to develop. Results were analyzed by LAS 4000 (GE Healthcare Systems, Chicago, IL, USA) and the quantification of the bands density was done by using the Quantity One software (Bio-Rad, CA, USA). The following primary antibodies were employed p-SMAD2 (#3108, Cell signaling (1/1000)), p-SMAD3 (ab52903; abcam; (1/1000)), TβRII ((sc17792; Santa Cruz Biotechnologies; 1/300)) and TβRI (sc518086; Santa Cruz Biotechnologies; [1/300]).

4.7. Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Normality distribution was tested by using Shapiro-Wilk test. If the samples followed a Gaussian distribution or not, means were compared by t-student or Mann-Whitney statistical test respectively. Every statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

5. Conclusions

The present study contributes to extend the complex mechanism implicated in the TGF-β pathway regulation suggesting that CCN2 expression induced by TGF-β positively regulates TβRII synthesis, which could compensate TβRII degradation induced by TGF-β and, therefore, explain the essential role of CCN2 maintaining the TGF-β-mediated profibrotic responses.

Author Contributions: Conceptualization, A.T.-M., C.L.-L., M.R.-O. and R.R.R.-D.; Data curation, A.T.-M., L.M.-E., L.T.-S. and M.O.; Formal analysis, A.T.-M., B.S.-Á., C.L.-L., M.R.-O. and R.R.R.-D.; Funding acquisition, B.S.-Á., C.L.-L., M.R.-O. and R.R.R.-D.; Investigation, A.T.-M., S.R.-M., M.R.-O. and R.R.R.-D.; Methodology, A.T.-M., L.M.-E., L.T.-S., S.R.-M., B.S.-Á., M.R.-O. and R.R.R.-D.; Project administration, M.R.-O. and R.R.R.-D.; Resources, B.S.-Á., C.L.-L., M.R.-O. and R.R.R.-D.; M.R.-O. and R.R.R.-D.; Validation, M.R.-O. and R.R.R.-D.; Visualization, M.R.-O. and R.R.R.-D.; Writing—original draft, A.T.-M., M.R.-O. and R.R.R.-D.; Writing—review & editing, A.T.-M., B.S.-Á., C.L.-L., M.R.-O. and R.R.R.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) and Fondos FEDER European Union (PI17/00119, PI20/00140, PI19/00184, PI20/00639; and DTS20/00083). Sara Borrell' program from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (grant number CD20/00042 to R.R.R.-D.). Red de Investigación Renal REDINREN: RD16/0009/0003 to M.R.-O. and RD16/0009/0020 to C.L.-L. Sociedad Española de Nefrología. "NOVELREN-CM: Enfermedad renal crónica: nuevas Estrategias para la prevención, Diagnóstico y tratamiento" (B2017/BMD-3751 to M.R.-O.). "Convocatoria Dinamización Europa Investigación 2019" MINECO (EIN2019-103294 to M.R.-O. and S.R.-M.); Juan de la Cierva incorporacion grant: IJC2018-035187-I to S.R.-M., Innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant of the European Union's Horizon 2020 (IMProve-PD ID: 812699) to M.R.-O.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the IIS-FJD Animal Research Ethical Committee guidelines (PROEX 065/18).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. The results presented in this paper have not been published previously in whole or part.

References

1. Javelaud, D.; Mauviel, A. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 1161–1165. [[CrossRef](#)]
2. Massagué, J.; Seoane, J.; Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 2783–2810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Moustakas, A.; Pardali, K.; Gaal, A.; Heldin, C.H. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol. Lett.* **2002**, *82*, 85–91. [[CrossRef](#)]
4. Batlle, E.; Massagué, J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* **2019**, *50*, 924–940. [[CrossRef](#)]
5. Goumans, M.J.; ten Dijke, P. TGF- β Signaling in Control of Cardiovascular Function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a022210. [[CrossRef](#)]
6. Tzavlaki, K.; Moustakas, A. TGF- β Signaling. *Biomolecules* **2020**, *10*, 487. [[CrossRef](#)]
7. Leask, A. Targeting the TGF β , endothelin-1 and CCN2 axis to combat fibrosis in scleroderma. *Cell. Signal.* **2008**, *20*, 1409–1414. [[CrossRef](#)]
8. Moustakas, A.; Heldin, C.H. Non-Smad TGF-beta signals. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 3573–3584. [[CrossRef](#)]
9. Zhang, Y.E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* **2009**, *19*, 128–139. [[CrossRef](#)]
10. Goumans, M.J.; Liu, Z.; Ten Dijke, P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* **2009**, *19*, 116–127. [[CrossRef](#)]
11. Ruiz-Ortega, M.; Rodriguez-Vita, J.; Sanchez-Lopez, E.; Carvajal, G.; Egido, J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *74*, 196–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Cichon, M.A.; Radisky, D.C. Extracellular matrix as a contextual determinant of transforming growth factor- β signaling in epithelial-mesenchymal transition and in cancer. *Cell Adh. Migr.* **2014**, *8*, 588–594. [[CrossRef](#)]
13. Li, M.O.; Wan, Y.Y.; Sanjabi, S.; Robertson, A.K.L.; Flavell, R.A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **2006**, *24*, 99–146. [[CrossRef](#)]
14. Toma, I.; McCaffrey, T.A. Transforming growth factor- β and atherosclerosis: Interwoven atherogenic and atheroprotective aspects. *Cell Tissue Res.* **2012**, *347*, 155. [[CrossRef](#)]
15. Chen, P.Y.; Qin, L.; Li, G.; Wang, Z.; Dahlman, J.E.; Malagon-Lopez, J.; Gujja, S.; Cilfone, N.A.; Kauffman, K.J.; Sun, L.; et al. Endothelial TGF- β signalling drives vascular inflammation and atherosclerosis. *Nat. Metab.* **2019**, *1*, 912–926. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Perbal, B.; Tweedie, S.; Bruford, E. The official unified nomenclature adopted by the HGNC calls for the use of the acronyms, CCN1–6, and discontinuation in the use of CYR61, CTGF, NOV and WISP 1–3 respectively. *J. Cell Commun. Signal.* **2018**, *12*, 625–629. [[CrossRef](#)]
17. Perbal, A.; Perbal, B. The CCN family of proteins: A 25th anniversary picture. *J. Cell Commun. Signal.* **2016**, *10*, 177–190. [[CrossRef](#)]
18. De Winter, P.; Leoni, P.; Abraham, D. Connective tissue growth factor: Structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. *Growth Factors* **2008**, *26*, 80–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Perbal, B. CCN proteins: Multifunctional signalling regulators. *Lancet* **2004**, *363*, 62–64. [[CrossRef](#)]
20. Ponticos, M. Connective tissue growth factor (CCN2) in blood vessels. *Vascul. Pharmacol.* **2013**, *58*, 189–193. [[CrossRef](#)]
21. Leask, A.; Abraham, D.J. All in the CCN family: Essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 4803–4810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kaasbøll, O.J.; Gadicherla, A.K.; Wang, J.H.; Monsen, V.T.; Hagelin, E.M.V.; Dong, M.Q.; Attramadal, H. Connective tissue growth factor (CCN2) is a matricellular preproprotein controlled by proteolytic activation. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 17953–17970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Cicha, I.; Yilmaz, A.; Klein, M.; Raithel, D.; Brigstock, D.R.; Daniel, W.G.; Goppelt-Strube, M.; Garlisch, C.D. Connective tissue growth factor is overexpressed in complicated atherosclerotic plaques and induces mononuclear cell chemotaxis in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2005**, *25*, 1008–1013. [[CrossRef](#)]
24. Kundi, R.; Hollenbeck, S.T.; Yamanouchi, D.; Herman, B.C.; Edlin, R.; Ryer, E.J.; Wang, C.; Tsai, S.; Liu, B.; Kent, K.C. Arterial gene transfer of the TGF-beta signalling protein Smad3 induces adaptive remodelling following angioplasty: A role for CTGF. *Cardiovasc. Res.* **2009**, *84*, 326–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Oemar, B.S.; Werner, A.; Garnier, J.M.; Do, D.D.; Godoy, N.; Nauck, M.; März, W.; Rupp, J.; Pech, M.; Lüscher, T.F. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation* **1997**, *95*, 831–839. [[CrossRef](#)]
26. Rodriguez-Vita, J.; Ruiz-Ortega, M.; Rupérez, M.; Esteban, V.; Sanchez-López, E.; Plaza, J.J.; Egido, J. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor- β , increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **2005**, *97*, 125–134. [[CrossRef](#)]

27. Rupérez, M.; Lorenzo, Ó.; Blanco-Colio, L.M.; Esteban, V.; Egidio, J.; Ruiz-Ortega, M. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation* **2003**, *108*, 1499–1505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Rodrigues-Diez, R.R.; Garcia-Redondo, A.B.; Orejudo, M.; Rodrigues-Diez, R.; Briones, A.M.; Bosch-Panadero, E.; Kery, G.; Pato, J.; Ortiz, A.; Salaces, M.; et al. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor, through EGFR/Nox1 signaling, activates the NF- κ B pathway and proinflammatory factors in vascular smooth muscle cells. *Antioxid. Redox Signal.* **2015**, *22*, 29–47. [[CrossRef](#)]
29. Sánchez-López, E.; Rayego, S.; Rodrigues-Diez, R.; Rodriguez, J.S.; Rodrigues-Diez, R.; Rodríguez-Vita, J.; Carvajal, G.; Aroeira, L.S.; Selgas, R.; Mezzano, S.A.; et al. CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF- κ B. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 1513–1526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Charrier, A.; Chen, R.; Kemper, S.; Brigstock, D.R. Regulation of pancreatic inflammation by connective tissue growth factor (CTGF/CCN2). *Immunology* **2014**, *141*, 564–576. [[CrossRef](#)]
31. Rodrigues-Diez, R.; Rodrigues-Diez, R.R.; Rayego-Mateos, S.; Suarez-Alvarez, B.; Lavoz, C.; Stark Aroeira, L.; Sánchez-López, E.; Orejudo, M.; Alique, M.; Lopez-Larrea, C.; et al. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor is a novel immune modulator of the Th17 response. *Lab. Investig.* **2013**, *93*, 812–824. [[CrossRef](#)]
32. Koitabashi, N.; Arai, M.; Niwano, K.; Watanabe, A.; Endoh, M.; Suguta, M.; Yokoyama, T.; Tada, H.; Toyama, T.; Adachi, H.; 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*, 373–379. [[CrossRef](#)]
33. Wang, X.; McLennan, S.V.; Allen, T.J.; Twigg, S.M. Regulation of pro-inflammatory and pro-fibrotic factors by CCN2/CTGF in H9c2 cardiomyocytes. *J. Cell Commun. Signal.* **2010**, *4*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hao, C.; Xie, Y.; Peng, M.; Ma, L.; Zhou, Y.; Zhang, Y.; Kang, W.; Wang, J.; Bai, X.; Wang, P.; et al. Inhibition of connective tissue growth factor suppresses hepatic stellate cell activation in vitro and prevents liver fibrosis in vivo. *Clin. Exp. Med.* **2014**, *14*, 141–150. [[CrossRef](#)]
35. Phanish, M.K.; Winn, S.K.; Dockrell, M.E.C. Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)-A marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. *Nephron-Exp. Nephrol.* **2010**, *114*, e83–e92. [[CrossRef](#)]
36. Ponticos, M.; Holmes, A.M.; Shi-wen, X.; Leoni, P.; Khan, K.; Rajkumar, V.S.; Hoyles, R.K.; Bou-Gharios, G.; Black, C.M.; Denton, C.P.; et al. Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 2142–2155. [[CrossRef](#)]
37. Shakil Ahmed, M.; Gravning, J.; Martinov, V.N.; von Lueder, T.G.; Edvardsen, T.; Czibik, G.; Moe, I.T.; Vinge, L.E.; Øie, E.; Valen, G.; et al. Mechanisms of novel cardioprotective functions of CCN2/CTGF in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.-Heart. Circ. Physiol.* **2011**, *300*, H1291–H1302. [[CrossRef](#)]
38. Gravning, J.; Ahmed, M.S.; Von Lueder, T.G.; Edvardsen, T.; Attramadal, H. CCN2/CTGF attenuates myocardial hypertrophy and cardiac dysfunction upon chronic pressure-overload. *Int. J. Cardiol.* **2013**, *168*, 2049–2056. [[CrossRef](#)]
39. Moe, I.T.; Ahmed, M.S.; Stang, E.; Hagelin, E.M.V.; Attramadal, H. CTGF/CCN2 postconditioning increases tolerance of murine hearts towards ischemia-reperfusion injury 1ole jørgen kaasbøll. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0149000. [[CrossRef](#)]
40. Panek, A.N.; Posch, M.G.; Alenina, N.; Ghadge, S.K.; Erdmann, B.; Popova, E.; Perrot, A.; Geier, C.; Morano, R.D.I.; Bader, M.; et al. Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertrophy and protection against pressure overload. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6743. [[CrossRef](#)]
41. Moe, I.T.; Pham, T.A.; Hagelin, E.M.V.; Ahmed, M.S.; Attramadal, H. CCN2 exerts direct cytoprotective actions in adult cardiac myocytes by activation of the PI3-kinase/Akt/GSK-3 β signaling pathway. *J. Cell Commun. Signal.* **2013**, *7*, 31–47. [[CrossRef](#)]
42. Mori, T.; Kawara, S.; Shinozaki, M.; Hayashi, N.; Kakinuma, T.; Igarashi, A.; Takigawa, M.; Nakanishi, T.; Takehara, K. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J. Cell. Physiol.* **1999**, *181*, 153–159. [[CrossRef](#)]
43. Lasky, J.; Ortiz, L.A.; Tonthat, B.; Hoyle, G.W.; Corti, M.; Athas, G.; Lungarella, G.; Brody, A.; Friedman, M. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am. J. Physiol.* **1998**, *275*, L365–L371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Strutz, F. Signaling in fibrosis: Targeting the TGF beta, endothelin-1 and CCN2 axis in scleroderma. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* **2009**, *1*, 125–131. [[CrossRef](#)]
45. Bonniaud, P.; Martin, G.; Margetts, P.J.; Ask, K.; Robertson, J.; Gauldie, J.; Kolb, M. Connective tissue growth factor is crucial to inducing a profibrotic environment in “fibrosis-resistant” BALB/c mouse lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2004**, *31*, 510–516. [[CrossRef](#)]
46. Bonniaud, P.; Margetts, P.J.; Kolb, M.; Haberberger, T.; Kelly, M.; Robertson, J.; Gauldie, J. Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2003**, *168*, 770–778. [[CrossRef](#)]
47. Rojas, A.; Padidam, M.; Cress, D.; Grady, W.M. TGF-beta receptor levels regulate the specificity of signaling pathway activation and biological effects of TGF-beta. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 1165–1173. [[CrossRef](#)]
48. Lönn, P.; Morén, A.; Raja, E.; Dahl, M.; Moustakas, A. Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads. *Cell Res.* **2009**, *19*, 21–35. [[CrossRef](#)]
49. Kang, J.S.; Liu, C.; Derynck, R. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 385–394. [[CrossRef](#)]

50. Rayego-Mateos, S.; Rodrigues-Díez, R.; Morgado-Pascual, J.L.; Rodrigues Díez, R.R.; Mas, S.; Lavoz, C.; Alique, M.; Pato, J.; Keri, G.; Ortiz, A.; et al. Connective tissue growth factor is a new ligand of epidermal growth factor receptor. *J. Mol. Cell Biol.* **2013**, *5*, 323–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Zhang, Y.; Alexander, P.B.; Wang, X.F. TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*, a022145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Rayego-Mateos, S.; Campillo, S.; Rodrigues-Díez, R.R.; Tejera-Muñoz, A.; Marquez-Exposito, L.; Goldschmeding, R.; Rodríguez-Puyol, D.; Calleros, L.; Ruiz-Ortega, M. Interplay between extracellular matrix components and cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *Clin. Sci. (Lond.)* **2021**, *135*, 1999–2029. [[CrossRef](#)]
53. Chen, Z.; Zhang, N.; Chu, H.Y.; Yu, Y.; Zhang, Z.K.; Zhang, G.; Zhang, B.T. Connective Tissue Growth Factor: From Molecular Understandings to Drug Discovery. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 1239. [[CrossRef](#)]
54. Di Guglielmo, G.M.; Le Roy, C.; Goodfellow, A.F.; Wrana, J.L. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 410–421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. McCaffrey, T.A.; Consigli, S.; Du, B.; Falcone, D.J.; Sanborn, T.A.; Spokojny, A.M.; Bush, H.L. Decreased type II/type I TGF-beta receptor ratio in cells derived from human atherosclerotic lesions. Conversion from an antiproliferative to profibrotic response to TGF-beta1. *J. Clin. Investig.* **1995**, *96*, 2667–2675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. McCaffrey, T.A.; Du, B.; Fu, C.; Bray, P.J.; Sanborn, T.A.; Deutsch, E.; Tarazona, N.; Shakhovitch, A.; Newman, G.; Patterson, C.; et al. The expression of TGF-beta receptors in human atherosclerosis: Evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1999**, *31*, 1627–1642. [[CrossRef](#)]
57. McCaffrey, T.A.; Du, B.; Consigli, S.; Szabo, P.; Bray, P.J.; Hartner, L.; Weksler, B.B.; Sanborn, T.A.; Bergman, G.; Bush, H.L. Genomic instability in the type II TGF-beta1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J. Clin. Investig.* **1997**, *100*, 2182–2188. [[CrossRef](#)]
58. Rodríguez-Vita, J.; Sánchez-Galín, E.; Santamaría, B.; Sánchez-López, E.; Rodrigues-Díez, R.; Blanco-Colio, L.M.; Egido, J.; Ortiz, A.; Ruiz-Ortega, M. Essential role of TGF-beta/Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Chaqour, B. Caught between a “Rho” and a hard place: Are CCN1/CYR61 and CCN2/CTGF the arbiters of microvascular stiffness? *J. Cell Commun. Signal.* **2020**, *14*, 21–29. [[CrossRef](#)]
60. Kubota, S.; Takigawa, M. Cellular and molecular actions of CCN2/CTGF and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond.)* **2015**, *128*, 181–196. [[CrossRef](#)]
61. Wang, R.; Xu, Y.J.; Liu, X.S.; Zeng, D.X.; Xiang, M. Knockdown of connective tissue growth factor by plasmid-based short hairpin RNA prevented pulmonary vascular remodeling in cigarette smoke-exposed rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **2011**, *508*, 93–100. [[CrossRef](#)]
62. Szabó, Z.; Magga, J.; Alakoski, T.; Ulvila, J.; Piuholta, J.; Vainio, L.; Kivirikko, K.I.; Vuolteenaho, O.; Ruskoaho, H.; Lipson, K.E.; et al. Connective tissue growth factor inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in pressure overload-induced heart failure. *Hypertension* **2014**, *63*, 1235–1240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gravning, J.; Ørn, S.; Kaasbøll, O.J.; Martinov, V.N.; Manhenke, C.; Dickstein, K.; Edvardsen, T.; Attramadal, H.; Ahmed, M.S. Myocardial connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e52120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ivkovic, S.; Yoon, B.S.; Popoff, S.N.; Safadi, F.F.; Libuda, D.E.; Stephenson, R.C.; Daluiski, A.; Lyons, K.M. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* **2003**, *130*, 2779–2791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Rayego-Mateos, S.; Morgado-Pascual, J.L.; Rodrigues-Díez, R.R.; Rodrigues-Díez, R.; Falke, L.L.; Mezzano, S.; Ortiz, A.; Egido, J.; Goldschmeding, R.; Ruiz-Ortega, M. Connective tissue growth factor induces renal fibrosis via epidermal growth factor receptor activation. *J. Pathol.* **2018**, *244*, 227–241. [[CrossRef](#)]
66. Fontes, M.S.C.; Kessler, E.L.; van Stuijvenberg, L.; Brans, M.A.; Falke, L.L.; Kok, B.; Leask, A.; van Rijen, H.V.M.; Vos, M.A.; Goldschmeding, R.; et al. CTGF knockout does not affect cardiac hypertrophy and fibrosis formation upon chronic pressure overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *88*, 82–90. [[CrossRef](#)]
67. Rodrigues-Díez, R.R.; Tejera-Muñoz, A.; Esteban, V. CCN2 (Cellular Communication Network Factor 2) Deletion Alters Vascular Integrity and Function Predisposing to Aneurysm Formation. *Hypertension*, 2022; in press. [[CrossRef](#)]
68. Chen, X.; Rateri, D.L.; Howatt, D.A.; Balakrishnan, A.; Moorleggen, J.J.; Cassis, L.A.; Daugherty, A. TGF- β neutralization enhances angii-induced aortic rupture and aneurysm in both thoracic and abdominal regions. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0153811. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Mallat, Z.; Ait-Oufella, H.; Tedgui, A. The Pathogenic Transforming Growth Factor- β Overdrive Hypothesis in Aortic Aneurysms and Dissections: A Mirage? *Circ. Res.* **2017**, *120*, 1718–1720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Lareyre, F.; Clément, M.; Raffort, J.; Pohlod, S.; Patel, M.; Esposito, B.; Master, L.; Finigan, A.; Vandestienne, M.; Stergiopoulos, N.; et al. TGF β (transforming growth factor- β) blockade induces a human-like disease in a nondissecting mouse model of abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2017**, *37*, 2171–2181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Rodríguez-Vita, J.; Sanchez-Lopez, E.; Esteban, V.; Ruperez, M.; Egido, J.; Ruiz-Ortega, M. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation* **2005**, *111*, 2509–2517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

72. Jinnin, M.; Ihn, H.; Tamaki, K. Characterization of SIS3, a novel specific inhibitor of Smad3, and its effect on transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix expression. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *69*, 597–607. [[CrossRef](#)]
73. Herbertz, S.; Sawyer, J.S.; Stauber, A.J.; Gueorguieva, I.; Driscoll, K.E.; Estrem, S.T.; Cleverly, A.L.; Desai, D.; Guba, S.C.; Benhadji, K.A.; et al. Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 4479–4499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]