

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**Estudio preclínico de péptidos derivados de la  
proteína SOCS1 para el tratamiento de  
enfermedades cardiovasculares y hepáticas**

**TESIS DOCTORAL**

**SUSANA BERNAL URIBE**

Madrid, 2021

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Doctorado en Farmacología y Fisiología

**Estudio preclínico de péptidos derivados de la  
proteína SOCS1 para el tratamiento de  
enfermedades cardiovasculares y hepáticas**

**SUSANA BERNAL URIBE**

Graduada en Biología

**DIRECTORES:**

Carmen Gómez Guerrero e Ignacio Prieto Arroyo

Laboratorio de Patología Vascular, Renal y Diabetes del Instituto  
de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz

Doña Carmen Gómez Guerrero, Profesora Contratada Doctora  
y Don Ignacio Prieto Arroyo, Investigador Postdoctoral,

CERTIFICAN

Que Doña Susana Bernal Uribe, Graduada en Biología por la Universidad de Alcalá de Henares, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado

**“Estudio preclínico de péptidos derivados de la proteína SOCS1 para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y hepáticas”**

que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid en el Programa de Doctorado de Farmacología y Fisiología.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 18 de octubre de 2021

Los directores de tesis,

Dra. Carmen Gómez Guerrero

Dr. Ignacio Prieto Arroyo

**Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de las siguientes entidades:**

- Ministerio de Economía y Competitividad: proyecto SAF2012-38830 y contrato predoctoral BES-2016-078145.
- Ministerio de Ciencia e Innovación: proyecto RTI2018-098788-B-I00.
- Sociedad Española de Arteriosclerosis: proyecto BIB05/18.
- Instituto de Salud Carlos III: proyecto DTS19/ 00093 y Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM).

**Los resultados de esta tesis forman parte de la siguiente publicación:**

**Bernal S**, Lopez-Sanz L, Jimenez-Castilla L, Prieto I, Melgar A, La Manna S, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Egido J, Gomez-Guerrero C. Protective effect of suppressor of cytokine signalling 1-based therapy in experimental abdominal aortic aneurysm. *Br J Pharmacol.* 2021 Feb;178(3):564-581.

**Otras publicaciones logradas durante el transcurso de esta tesis doctoral:**

- Lopez-Sanz L\*, **Bernal S\***, Jimenez-Castilla, L, Prieto I, La Manna S, Gomez-Lopez S, Blanco-Colio LM, Egido J, Martin-Ventura JL, Gomez-Guerrero C. Fcγ receptor activation mediates vascular inflammation and abdominal aortic aneurysm development. *Clin Transl Med.* 2021; 11:e463.  
\*Ambos autores contribuyeron por igual.
- Lopez-Sanz L, **Bernal S**, Recio C, Lazaro I, Oguiza A, Melgar A, Jimenez-Castilla L, Egido J, Gomez-Guerrero C. SOCS1-targeted therapy ameliorates renal and vascular oxidative stress in diabetes via STAT1 and PI3K inhibition. *Lab Invest.* 2018 Oct;98(10):1276-1290.
- La Manna S, Lopez-Sanz L, **Bernal S**, Fortuna S, Mercurio FA, Leone M, Gomez-Guerrero C, Marasco D. Cyclic mimetics of kinase-inhibitory region of Suppressors of Cytokine Signaling 1: Progress toward novel anti-inflammatory therapeutics. *Eur J Med Chem.* 2021 Oct 5;221:113547.
- La Manna S, Lopez-Sanz L, **Bernal S**, Jimenez-Castilla L, Prieto I, Morelli G, Gomez-Guerrero C, Marasco D. Antioxidant Effects of PS5, a Peptidomimetic of Suppressor of Cytokine Signaling 1, in Experimental Atherosclerosis. *Antioxidants (Basel).* 2020 Aug 14;9(8):754..
- Lazaro I, Lopez-Sanz L, **Bernal S**, Oguiza A, Recio C, Melgar A, Jimenez-Castilla L, Egido J, Madrigal-Matute J, Gomez-Guerrero C. Nrf2 Activation Provides Atheroprotection in Diabetic



Mice Through Concerted Upregulation of Antioxidant, Anti-inflammatory, and Autophagy Mechanisms. *Front Pharmacol.* 2018 Jul 31;9:819.

- Opazo-Ríos L, Plaza A, Sánchez Matus Y, **Bernal S**, Lopez-Sanz L, Jimenez-Castilla L, Carpio D, Droguett A, Mezzano S, Egido J, Gomez-Guerrero C. Targeting NF- $\kappa$ B by the Cell-Permeable NEMO-Binding Domain Peptide Improves Albuminuria and Renal Lesions in an Experimental Model of Type 2 Diabetic Nephropathy. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 13;21(12):4225.
- Lazaro I, Oguiza A, Recio C, Lopez-Sanz L, **Bernal S**, Egido J, Gomez-Guerrero C. Interplay between HSP90 and Nrf2 pathways in diabetes-associated atherosclerosis. *Clin Investig Arterioscler.* 2017 Mar-Apr;29(2):51-59.
- Recio C, Lazaro I, Oguiza A, Lopez-Sanz L, **Bernal S**, Blanco J, Egido J, Gomez-Guerrero C. Suppressor of Cytokine Signaling-1 Peptidomimetic Limits Progression of Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Feb;28(2):575-585.

*“Ver lo que está delante de nuestros ojos  
requiere un esfuerzo constante”*

**George Orwell**

*“Recuerda mirar hacia las estrellas y no abajo hacia tus pies.  
Trata de darle sentido a lo que ves  
y pregúntate qué haces en el universo. Sé curioso”*

**Stephen Hawking**

♡ *A mi padre*

*A mi madre*

*A Javi*

# Agradecimientos

En primer lugar, quisiera comenzar agradeciendo a mis directores de tesis, la Dra. Carmen Gómez Guerrero y el Dr. Ignacio Prieto Arroyo, el esfuerzo, la paciencia y el tiempo que han dedicado conmigo en esta tesis.

Carmen, gracias por depositar tu confianza en mí desde el primer día, cuando yo estaba tan perdida que no sabía ni siquiera muy bien qué era eso del doctorado. Gracias por dejarme ser parte de “Grupo Carmen” y brindarme así esta oportunidad de ser doctora. Gracias a ti y a estos años de formación he crecido y he aprendido muchísimo como profesional, pero también como persona.

Tengo infinitas cosas que agradecer, pero empezaré por dos pilares fundamentales que me sostienen, dos de las personas más importantes que forman parte de mi vida y que he tenido la enorme suerte de conocer durante este largo y accidentado camino llamado “tesis”, pero que volvería a recorrer de nuevo aunque fuera solo por encontrarlas otra vez:

A **Ana**. Eres una de las personas más bonitas que tengo en mi vida. Puedo decir que estoy muy, MUY orgullosa de ti, siempre, como profesional, como persona, como amiga. Esta tesis es un poquito tuya también y aquí no solo está el trabajo que has hecho a mi lado, sino también el apoyo que me has brindado, día tras día. Espero que nuestra bonita amistad dure para siempre.

A **Luna**. Desde aquella entrevista en la que una Luna pollito quería conocer más sobre el laboratorio, pasando por todo lo que hemos vivido juntas y hasta hoy: GRACIAS. Gracias, porque siempre me tiendes tu mano cuando he necesitado ayuda, e incluso antes de necesitarla, ya me la habías ofrecido. Y gracias, porque siempre has estado a mi lado, sé que seguirás estándolo, y por supuesto yo también estaré para ti.

Gracias a las dos por vuestra generosidad y apoyo incondicional. Gracias por escucharme, por vuestra atención, por vuestra comprensión y por nuestra amistad. Os requetequiero.

A **Laura**. Aún recuerdo mi primer día en el laboratorio, cuando entré nerviosísima y conseguiste calmarme con naturalidad, una sonrisa y tu frase “tranquila, aprenderemos juntas”. Y así fue. Gracias por todo, porque juntas hemos crecido y aprendido muchísimo durante estos años y hemos compartido un montón de momentos y experiencias que jamás olvidaremos.

A **Lucas**, porque no hay otro como tú. Siempre humilde, con respuestas y soluciones para todo y para todos, creo que tus conocimientos y tus ganas no tienen límites. Pero también gracias por los momentos geniales que nos has regalado a todos (y que no se podrían contar aquí!).

A **Gema**. Porque, aún desde el subsuelo más oscuro y profundo, conseguiste ser una más del grupo en muy poco tiempo. He disfrutado mucho el tiempo a tu lado, gracias por tu sencillez y tu alegría, por hacer por seguir viéndonos y por mantener el contacto pese a la distancia.

A **Patri S**. Aunque no hayamos pasado mucho tiempo juntas, ha sido suficiente para ver lo genial que eres. Gracias por tu ayuda en el laboratorio, por tu colaboración en esta tesis, pero sobre todo gracias por tu apoyo en momentos más complicados.

No me olvido de otras personas que formaron parte del grupo hace algún tiempo: lol, tan organizada y meticulosa, con su impecable cuaderno de laboratorio, gracias por formarme al principio

de los tiempos; Sara, por prestarnos PS5 y ayudarnos con el *maravilloso* mundo de los péptidos, y Patri Q., porque en esta tesis hay parte del cariño, tiempo y trabajo que invertiste en nuestro grupo.

Al dúo Luis-José Luis, por colaborar y supervisar nuestro trabajo, aportando su experiencia y sus conocimientos en nuestras investigaciones, y por supuesto al resto del laboratorio CLJ: Raka, Rafa, Isa, Carmencita, Nerea, Lucía, Diego...

A Leti y a Fonti. Creo que este es un buen lugar en el que plasmar cuánto os admiro, me fascina vuestra ambición y fortaleza, tanto dentro como fuera de la investigación. Siempre tan dispuestos a todo, poniendo todo vuestro empeño, sois unas personas maravillosas que conseguís tanto como os proponéis, el tipo de amistad que realmente aporta algo en la vida de los demás. Gracias por vuestro apoyo y ánimos en la recta final. Me ha encantado conoceros cada vez más y compartir mi tiempo con vosotros, pero sobre todo, saber que después de nuestras tesis seguiremos compartiéndolo.

A Raúl, porque desde que entré en la FJD me acogiste y me integraste en uno de los mejores momentos del día a día: los desayunos. Por todas las bromas, rimas, risas y tonterías, pero también por los sabios consejitos que me diste desde el primer día hasta hoy. Creo que se necesitan más personas como tú en el entorno científico.

A Morgui, por ser tan bueno y desprender tan buen rollo allá donde vas. Te aprecio un montón y sé que seguiremos diciéndonos tonterías aunque te marches un poquito lejos a continuar tu camino, en el que te deseo mucho éxito \*Kukiiiiii\*.

Al resto de “Grupo Marta” y “AO”. A Lau M., porque aún recuerdo cuando en mi entrevista de TFM bajé a conocerte al microscopio confocal y me transmitiste lo feliz que estabas dedicándote a la ciencia. A Antonio, por ser tan divertido y amenizar los desayunos y las quedaditas fuera del laboratorio. A Maca, porque te he visto trabajar mucho y sacar lo mejor de ti aún cuando todo iba a contracorriente, te deseo lo mejor. A Gina, por lo infinitamente buena, tierna y linda que eres con todos, y porque nos seguimos debiendo un crêpe!

Tampoco me olvido de otras personas que han estado presentes en mi camino en menor o mayor medida, y con las que también he compartido muchos ratitos: el bueno de Juanma, Julia y Amelia, Laura S., Lara, Zaza, Diego, y por supuesto “los de Inmuno” y “los de Reuma”, Isma, Juanpa y Emilio. También querría agradecer la ayuda prestada por Irene, Diego y Carlos (animalario).

Al mejor amigo que se puede tener: Carlos. Gracias por las infinitas conversaciones escuchándonos y ~~despertic...~~ comprendiéndonos\* mutuamente, y por prestarme siempre tu ayuda, desde que te conocí en aquel primero de carrera en 2011 en la UAH, pasando por un máster, otro máster y hasta hoy, con los peores momentos y papeleos de esta tesis. Gracias de corazón.

A mis amigos: Nacho (mono), por las conversaciones sobre cosas muy científicas o sobre conspiraciones (nada científicas), pero especialmente por enseñarme y repetirme lo pequeños e insignificantes que somos nosotros y nuestros problemas en el universo; y Pablo, por conseguir distraerme de vez en cuando con historias de gatitos y apuestas.

A mis amigas de Alcalá: Marta, Bea, Irene P, Mig, Ana, Teresa y Daniela. Gracias a este grupito (cuyo nombre no escribiré aquí porque quiero que parezcamos formales) tan estupendo, por todos

los momentos que hemos vivido juntas desde hace ya muchos años, todas las risas, los viajes y también las fiestas! Y también quiero acordarme de mis amiguitos del cole Andrés, Adriana y Tomás, porque son las típicas amistades en las que no importa el tiempo que llevemos sin vernos.

A mi **familia**. A mi abuelillo, que le encantará enterarse de que su nieta ha escrito un libro y querrá llevar alguna página en el bolsillo de su camisa, para presumir por ahí. A mi tía Mari, a la que me parezco más de lo que le gustaría admitir, y a mi campechanito tío Boga, que me esperará con una buena tortilla de patatas y un bizcocho XXL cuando defienda esta tesis. A mi primo más vacilón, Ángel, y a mi prima con mejor corazón, Cristina. A mi Tete, el que más me gusta que me llame y moleste, y a Nieves, un ejemplo de fortaleza y superación. A mi tía Inés y mi tío Felipe, porque nos llamamos poco, pero nos pensamos mucho. Y también a mis primas Lidia, Miriam y Bea. A Belén y a Ferchu, y a los pequeños babies risueños, Marco y Lucas. A mi tía Ana, a mis tíos Miguel y Fernando y a mis tías Carmen y Helena; a Ismael y María, y los ya no tan pequeños Miguelín y Alvarito. Tampoco me querría olvidar de mi familia gaditana, la que está al sur del sur. Y a mi huevito Kinder. Os quiero muchísimo a todos.

A **Nacho**, otra vez. Gracias de corazón. Esta tesis es también tuya, reflejo del tiempo y del trabajo que hemos compartido. Pero también refleja de alguna manera nuestro camino juntos, el comienzo de ciertas cosas y el final de otras. Gracias, por el difícil equilibrio que has conseguido mantener durante esta tesis, especialmente cuando yo me desequilibraba y caía. Gracias, por aportar un poquito de tu calma en mi vida. Y gracias, porque contemplar la inmensidad del universo en forma de infinitas estrellas es más bonito a tu lado. Ailoyiu!

A **Javí**, porque desde que llegaste a nuestras vidas me has acompañado en todos mis pasos. Gracias por apoyarme y apoyarnos, por todos los gestos bonitos y por estar a nuestro lado desde que yo era una niña hasta esta tesis y más allá. Gracias, porque siempre me has ayudado en todo lo que has podido pero sobre todo, por lo muchísimo que me has aguantado... Te quiero un montón!

A **mi madre**, la persona más importante de mi vida. Gracias por todo lo que me has dado. Me has visto crecer, caer, aprender, sufrir, reír, llorar, y lo has hecho siempre, siempre, a mi lado. Tengo la grandísima suerte de tenerte en mi día a día, de tener tu apoyo continuo e incondicional y de poder compartir contigo mis logros. No sé como agradecer la infinita paciencia que has tenido conmigo durante este proceso tan largo. Yo no sería nada de lo que soy ni hubiese llegado hasta aquí si no fuera por ti, por tu fortaleza, por la educación y los valores que me has enseñado e inculcado. Estoy muy orgullosa de ti. Te quiero más que a nada en este mundo.

Y por último, a las estrellas que más brillan en mi cielo particular: mi padre y mi abuela. Os marchasteis demasiado pronto y la vida se quedó un poco más vacía. Ojalá pudieseis estar aquí para cerrar este capítulo conmigo. Y a mi pequeñito de cuatro patas. Os echo muchísimo de menos.

# Resumen

La prevalencia de las enfermedades cardiovasculares y metabólicas se encuentra en aumento, constituyendo un problema de salud pública mundial. Tanto el aneurisma aórtico abdominal (AAA) como la esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) continúan en la actualidad sin ningún tratamiento farmacológico específico. Estas dos patologías tienen en común la activación de vías inflamatorias que contribuyen al inicio y progresión del daño vascular y hepático. Entre ellas, la vía Janus quinasa/Transductor de señales y activador de la transcripción (JAK/STAT), a través de la cual señalizan multitud de moléculas implicadas en procesos de inflamación, migración celular y fibrosis, entre otros. Las proteínas supresoras de la señalización por citoquinas (SOCS) constituyen una familia de reguladores negativos endógenos cuya función es controlar la magnitud y duración de la señalización mediada por JAK/STAT, por lo que se han propuesto como potencial diana terapéutica para prevenir la activación patológica de JAK/STAT en diversas enfermedades. Este trabajo se centra en la caracterización de los compuestos S1 y PS5, dos péptidos derivados de la proteína SOCS1 que inhiben la activación de JAK/STAT, para determinar si el tratamiento en modelos preclínicos es capaz de prevenir el desarrollo y progresión de AAA y NAFLD.

En primer lugar, se investigaron los efectos del péptido S1 en el modelo murino de AAA inducido por perfusión con elastasa. La terapia con S1 previno el desarrollo de AAA, reduciendo el diámetro de las lesiones aórticas y aumentando el contenido en fibras elásticas y células de músculo liso vascular (VSMC). S1 redujo la activación de STAT1/3 y la expresión de citoquinas inflamatorias y metaloproteinasas en la aorta abdominal. Además, el tratamiento con S1 modificó el patrón de expresión de diferentes marcadores fenotípicos, favoreciendo los característicos de fenotipo antiinflamatorio M2 en macrófagos y los de fenotipo contráctil en VSMC. *In vitro*, S1 atenuó la expresión de genes inflamatorios, oxidativos y de metaloproteinasas en macrófagos y VSMC estimulados con elastasa o péptidos derivados de elastina. Asimismo, S1 suprimió la migración de VSMC y los cambios fenotípicos en macrófagos y VSMC. Por el contrario, la ausencia de la proteína SOCS1 exacerbó la respuesta inflamatoria inducida por elastasa en VSMC.

En segundo lugar, se estudiaron las acciones de los péptidos PS5 y S1 en dos modelos nutricionales de NAFLD inducidos por dieta deficiente en metionina y colina (MCD) o por dieta alta en grasa. La inhibición de JAK/STAT mediada por PS5 y S1 redujo el contenido de lípidos intrahepáticos y modificó la expresión de transportadores lipídicos, mejorando la esteatosis inducida por dieta. Ambos péptidos redujeron el contenido en células inflamatorias y la expresión de moléculas implicadas en inflamación y estrés del retículo endoplasmático. Además, en el modelo asociado a dieta MCD, los péptidos derivados de SOCS1 frenaron la respuesta fibrogénica, disminuyendo la expresión de genes profibróticos y el acúmulo de fibras de colágeno en el tejido hepático. Por último, los estudios *in vitro* demostraron que los péptidos PS5 y S1 inhibieron la captación de lípidos y la respuesta inflamatoria en hepatocitos estimulados con ácido palmítico.

En conclusión, estos estudios evidencian que la modulación terapéutica de la vía JAK/STAT mediante el empleo péptidos basados en la proteína SOCS1 atenúa el desarrollo y progresión del daño vascular y hepático en modelos preclínicos de las patologías de AAA y NAFLD.



# Summary

The prevalence of cardiovascular and metabolic diseases is rising worldwide, becoming a current concern in global health. Nowadays, there is no specific medical therapy for Abdominal Aortic Aneurysm (AAA) and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). These pathologies share common inflammatory pathways whose activation contributes to the progression of tissue injury. Among them, the Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathway is implicated in the signaling of a broad range of mediators involved in inflammation, cell migration and fibrosis. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins are endogenous negative regulators that control the magnitude and duration and their function is suppress the signal transduction of JAK/STAT signaling pathway. SOCS family has been suggested as potential therapeutic target to prevent pathological activation of JAK/STAT in different diseases. This work focuses on the characterization of the compounds S1 and PS5, two peptides derived from SOCS1 protein that inhibit JAK/STAT activation, to determine whether the treatment in preclinical models can prevent the development and progression of AAA and NAFLD.

Firstly, this work investigates the effects of S1 peptide in a mouse model of elastase-induced AAA. S1 therapy prevented AAA development in mice, evidenced by reduced aortic diameter and increased content of elastic fibers and vascular smooth muscle cells (VSMC). S1 therapy suppressed STAT1/3 activation in abdominal aorta, downregulated cytokines and metalloproteinases and altered the expression of cell differentiation markers by favouring anti-inflammatory M2 macrophage and contractile VSMC phenotypes. *In vitro*, S1 ameliorated the expression of inflammatory and oxidative genes and reversed the phenotypic switch of macrophages and VSMC stimulated with elastase or elastin derived peptides. By contrast, SOCS1 silencing promoted the inflammatory response induced by elastase in cultured VSMC.

Secondly, the effects of PS5 and S1 peptides were studied in two different nutritional models of NAFLD induced by either methionine and choline-deficient diet (MCD) or high fat diet. JAK/STAT inhibition through PS5 and S1 peptides reduced intrahepatic lipid content and modified the expression of lipid transporters, thus improving diet induced steatosis. In addition, SOCS1-derived peptides limited infiltrating immune cells in the liver and the expression of genes involved in inflammation and endoplasmic reticulum stress. In MCD-induced steatohepatitis, PS5 and S1 prevented the expression of profibrotic genes and the accumulation of collagen fibers in hepatic tissue. Finally, *in vitro* studies demonstrated that PS5 and S1 mitigated lipid uptake and inflammatory response in palmitic acid-stimulated hepatocytes.

In conclusion, these preclinical studies evidence the therapeutic potential of SOCS1-derived peptides by suppressing JAK/STAT-mediated inflammation, therefore attenuating the development of vascular and hepatic injury in the AAA and NAFLD pathologies.

# Índice

I.	Abreviaturas.....	1
II.	Introducción.....	7
1.	ANEURISMA AÓRTICO ABDOMINAL.....	9
1.1	Fisiopatología del aneurisma aórtico abdominal.....	10
1.1.1	Hemodinámica .....	11
1.1.2	Inflamación .....	12
1.1.3	Degradación de la matriz extracelular .....	16
1.1.4	Estrés oxidativo .....	18
1.1.5	Papel de las VSMC .....	19
1.2	Nuevas dianas terapéuticas en AAA.....	20
2.	ESTEATOSIS HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA .....	21
2.1	Fisiopatología de NAFLD/NASH .....	22
2.1.1	Alteraciones en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono.....	23
2.1.2	Lipotoxicidad y estrés del retículo endoplasmático .....	26
2.1.3	Inflamación .....	28
2.1.4	Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial .....	29
2.1.5	Fibrogénesis.....	30
2.2	Estrategias terapéuticas en NAFLD .....	31
3.	LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT .....	33
3.1	Regulación de la vía JAK/STAT: las proteínas SOCS.....	34
3.2	La inhibición de la vía JAK/STAT como diana terapéutica.....	35
III.	Objetivos .....	39
IV.	Material y métodos .....	43
1.	PÉPTIDOS MIMÉTICOS DE SOCS1 .....	45
1.1	Péptido S1 .....	45
1.2	Péptido PS5 .....	45
2.	CULTIVOS CELULARES.....	45
2.1	Cultivos primarios .....	45
2.2	Líneas celulares.....	46
2.3	Tratamientos y estímulos .....	46
2.4	Ensayos de viabilidad celular .....	47
2.5	Ensayos de migración celular .....	48

2.6	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	48
2.7	Silenciamiento de SOCS1.....	48
2.8	Captación de lípidos.....	48
<b>3.</b>	<b>MODELOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>49</b>
3.1	Modelo de AAA mediante perfusión aórtica de elastasa .....	49
3.1.1	Experimentos de biodistribución del péptido S1.....	50
3.2	Modelos de esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) inducidos por dieta ...	51
3.2.1	Modelo de dieta deficiente en metionina y colina (MCD) .....	51
3.2.2	Modelos de dieta alta en grasa (HFD) .....	52
3.3	Procesamiento de los tejidos .....	53
3.4	Análisis de parámetros bioquímicos.....	53
3.5	Determinación de lípidos intrahepáticos .....	53
<b>4.</b>	<b>ANÁLISIS HISTOLÓGICO .....</b>	<b>54</b>
4.1	Tinciones histológicas .....	54
4.1.1	Tricrómico de Masson.....	54
4.1.2	Verhoeff-van Gieson .....	55
4.1.3	Hematoxilina – eosina .....	55
4.1.4	Oil Red O.....	55
4.1.5	Rojo Sirio.....	55
4.2	Técnicas inmunohistoquímicas .....	56
4.3	Inmunofluorescencia .....	57
4.4	Detección de anión superóxido.....	57
4.5	Score histopatológico NAFLD .....	57
<b>5.</b>	<b>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....</b>	<b>58</b>
5.1	Extracción de RNA.....	58
5.2	Retrotranscripción .....	58
5.3	PCR cuantitativa (qPCR) .....	58
<b>6.</b>	<b>ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>60</b>
6.1	Extracción y cuantificación de proteínas.....	60
6.2	Western blot .....	60
<b>7.</b>	<b>MEDIDA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE METALOPROTEINASAS.....</b>	<b>61</b>
<b>8.</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>61</b>
<b>V.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>65</b>
<b>1.</b>	<b>ESTUDIO PRECLÍNICO DEL PÉPTIDO S1 EN EL AAA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>67</b>

1.1	Activación del eje JAK/STAT/SOCS en AAA experimental .....	67
1.2	Biodistribución del péptido S1 en AAA.....	68
1.3	El tratamiento con S1 reduce la incidencia de AAA y el tamaño de las lesiones 69	
1.4	La terapia con S1 inhibe la activación de la vía JAK/STAT en aorta .....	70
1.5	El péptido S1 reduce la inflamación y el estrés oxidativo en el AAA experimental 71	
1.6	Efectos de S1 en la expresión y actividad enzimática de metaloproteinasas ...	74
1.7	El péptido S1 altera el fenotipo de VSMC y macrófagos .....	75
1.8	Análisis de correlación en el modelo experimental .....	76
<b>2.</b>	<b>EFFECTOS <i>IN VITRO</i> DEL PÉPTIDO S1 EN EL CONTEXTO DEL AAA .....</b>	<b>78</b>
2.1	El péptido S1 atenúa la activación de la vía JAK/STAT <i>in vitro</i> .....	78
2.2	El péptido S1 inhibe la expresión de genes de inflamación y estrés oxidativo .	79
2.3	Efectos de S1 en la expresión y actividad de metaloproteinasas.....	82
2.4	Papel del péptido S1 en la migración y diferenciación celular .....	83
2.5	La supresión de la proteína SOCS1 incrementa la respuesta inflamatoria .....	85
<b>3.</b>	<b>ESTUDIO DE LOS PÉPTIDOS PS5 Y S1 EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE NAFLD/NASH INDUCIDO POR DIETA MCD .....</b>	<b>86</b>
3.1	Caracterización del modelo murino de NAFLD/NASH con dieta MCD .....	86
3.2	Inhibición de la vía JAK/STAT mediada por los péptidos PS5/S1 en NAFLD/NASH experimental.....	88
3.3	Efectos del tratamiento con los péptidos PS5 y S1 en el daño hepático inducido por dieta MCD.....	90
3.4	El tratamiento con los péptidos PS5 y S1 disminuye el contenido lipídico hepático en animales alimentados con dieta MCD .....	92
3.5	La terapia con PS5 y S1 disminuye la inflamación hepática inducida por dieta MCD	93
3.6	Evaluación de la respuesta fibrogénica en el modelo de NAFLD/NASH inducido por dieta MCD.....	96
3.7	Estudio de otros genes implicados en la fisiopatología de NAFLD .....	97
<b>4.</b>	<b>ESTUDIO DE LOS PÉPTIDOS PS5 Y S1 EN NAFLD EXPERIMENTAL INDUCIDO POR DIETA ALTA EN GRASA.....</b>	<b>99</b>
4.1	Caracterización del modelo murino de NAFLD inducido por dieta alta en grasa 99	
4.2	Activación hepática de la vía JAK/STAT por dieta alta en grasa y efecto de los tratamientos con PS5 y S1 .....	101

4.3	Evaluación del daño hepático en el modelo de NAFLD inducido por dieta grasa	101
4.4	Estudio del contenido lipídico en NAFLD experimental.....	103
4.5	Estudio de la respuesta inflamatoria en el modelo murino de esteatosis hepática	104
4.6	Evaluación de la respuesta fibrogénica en esteatosis hepática experimental	107
<b>5.</b>	<b>EFFECTOS <i>IN VITRO</i> DE LOS PÉPTIDOS PS5 Y S1 EN HEPATOCITOS.....</b>	<b>108</b>
5.1	La activación de la vía JAK/STAT en hepatocitos estimulados con ácido palmítico y efecto de los péptidos PS5 y S1 .....	108
5.2	Los péptidos PS5 y S1 reducen la captación de ácido palmítico en hepatocitos	109
5.3	Análisis de expresión de genes implicados en inflamación, metabolismo lipídico y estrés del retículo endoplasmático .....	111
<b>VI.</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>115</b>
	Papel del eje JAK/STAT/SOCS en el desarrollo de AAA .....	117
	Implicación del eje JAK/STAT/SOCS en NAFLD.....	125
<b>VII.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>135</b>
<b>VIII.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>139</b>
<b>IX.</b>	<b>Anexo .....</b>	<b>169</b>

# **I. Abreviaturas**

4-HNE	4-Hidroxinonenal
8OHdG	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina
AAA	Aneurisma aórtico abdominal
ABC	Adenosín trifosfato (ATP) <i>Binding Cassette</i>
Ang	Angiotensina
Arg	Arginasa
$\alpha$ -SMA	Actina de músculo liso $\alpha$
AST	Aspartato aminotransferasa
BCA	Ácido Bicinconínico
BMDM	Macrófagos derivados de médula ósea
BSA	Albúmina de suero bovino
CCL/CXCL	Ligando de quimioquina con motivo CC/CXC
CCR/CXCR	Receptor de quimioquina CCL/CXCL
CD206	Receptor de manosa de macrófagos
CHOP	Proteína homóloga C/EBP
ChREBP	Proteína de unión a elementos reguladores de carbohidratos
CoA	Coenzima A
CPT1	Carnitina palmitoiltransferasa I
Cys(Acm)	Acetaminometil-L-cisteína
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHE	Dihidroetidina
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPX	Resina acrílica con base de xileno
ECM	Matriz extracelular
EDP	Péptidos derivados de elastina
EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FBS	Suero fetal bovino
GH	Hormona de crecimiento
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GPT (ALT)	Alanina aminotransferasa



HCC	Hepatocarcinoma
HDL/LDL/vLDL	Lipoproteínas.de alta/baja/muy baja densidad
HFD	Dieta alta en grasa
HRP	Peroxidasa de rábano
HSC	Células estelares hepáticas
ICAM/VCAM	Molecula de adhesión intercelular/vascular
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
JAK	Janus quinasa
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal
KIR	Región inhibidora de quinasas
Klf4	Factor de transcripción <i>Kruppel-like factor 4</i>
LPS	Lipopolisacárido
LXR	Receptor X del hígado
MCD	Deficiente en metionina y colina
MDA	Malondialdehído
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio
NAFLD	Esteatosis hepatica no alcohólica
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
NF-κB	Factor nuclear κ B
NK	Asesina natural
NOX	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa
PBS	Tampón fosfato salino
PGC1α	Coactivador del receptor γ 1 α activado por el proliferador de peroxisomas
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PPAR	Receptores activados por el proliferador de peroxisomas
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecilsulfato sódico

siRNA	RNA de interferencia pequeño
SM22 $\alpha$	Proteína de músculo liso 22- $\alpha$
SOCS	Proteínas supresoras de la señalización por citoquinas
SREBP	Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
Tat	Transactivador de la transcripción
TBS-T	Tampón Tris Salino con <i>Tween</i> 20
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
Th	Linfocitos T cooperadores o <i>helper</i>
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
TLRs	Receptores tipo <i>Toll</i>
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
Treg	T reguladoras
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
u.a.	Unidades arbitrarias
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
VSMC	Células de músculo liso vascular

## **II. Introducción**

## 1. ANEURISMA AÓRTICO ABDOMINAL

El **aneurisma aórtico abdominal** (AAA) es una patología vascular caracterizada por el debilitamiento y la dilatación progresiva de la aorta abdominal, generalmente localizada en la porción infrarrenal (**Fig. 1**), definiéndose como un incremento del diámetro aórtico abdominal igual o superior a 30 cm (Golledge, 2019).

La **prevalencia** del AAA es superior en el sexo masculino, afectando al 1-2% de los hombres mayores de 65 años, frente al 0.5% de mujeres. Entre los **factores de riesgo** que predisponen a la aparición y desarrollo del aneurisma se encuentran, además del sexo, el tabaquismo, la edad y la historia familiar. Asimismo, el AAA se presenta habitualmente asociado a hipertensión, hipercolesterolemia o enfermedad coronaria (Sakalihasan *et al.*, 2018).

El AAA suele cursar de manera **asintomática**, por lo que es frecuente que su **diagnóstico** mediante técnicas de imagen se realice de manera fortuita. No obstante, algunos pacientes con AAA pueden referir ciertos síntomas, como dolor y sensibilidad en la zona abdominal, que puede irradiarse a la zona dorsal y a la espalda, o sensación pulsátil en el área abdominal afectada. Estos síntomas pueden estar relacionados con complicaciones derivadas del AAA, como la compresión de órganos cercanos o la embolia distal (Wanhainen *et al.*, 2019).

Generalmente, la progresión del AAA es lenta, con **tasas de crecimiento** promedio de 2.6-5.2 mm/año (Hendy *et al.*, 2014), y no es constante en el tiempo, sino que alterna periodos de continuo crecimiento con otros periodos de inactividad (Vega de Céniga *et al.*, 2008). La tasa de crecimiento es muy variable y se ve afectada por diversos factores, por ejemplo, el cese del hábito tabáquico puede disminuirla hasta en un 20% (Sweeting *et al.*, 2012).

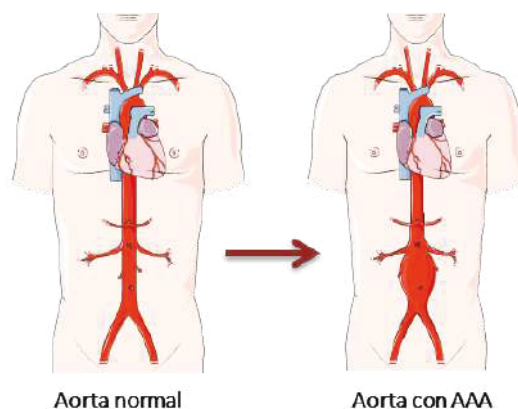


Figura 1. Representación esquemática de la localización y dilatación de la aorta en el AAA.

La principal complicación de esta patología es la **ruptura aórtica**, que causa hemorragia aguda, asociada a una elevada tasa de **mortalidad** del 65-85% en estos pacientes. Se estima que el AAA provoca unas 200.000 muertes cada año en todo el mundo, siendo los pacientes con mayor riesgo de ruptura aórtica aquellos con un mayor diámetro de AAA o con tasas de expansión más elevadas (Golledge, 2019).

La estrategia terapéutica para los pacientes con AAA se encuentra limitada a la **intervención quirúrgica**, mediante cirugía abierta o reparación aórtica endovascular, ambas técnicas asociadas a una importante morbilidad y mortalidad (Sakalihasan *et al.*, 2018). La cirugía resulta aplicable cuando el diámetro del AAA supera los 5.5 cm en hombres, o los 5 cm en mujeres (Chaikof *et al.*, 2018), así como en pacientes sintomáticos o con AAA de rápido crecimiento (>1cm/año) (Wanhainen *et al.*, 2019).

En la actualidad, **no existen tratamientos farmacológicos** específicos para el manejo del AAA, ya que ninguno de ellos ha demostrado la capacidad de limitar eficientemente el crecimiento del AAA o evitar su ruptura. La terapia actual para los pacientes se centra en el seguimiento periódico y en la reducción de los factores de riesgo, principalmente cardiovasculares, mediante el empleo de estatinas, antihipertensivos o antiplaquetarios, que pueden contribuir a la estabilización del AAA (Lindeman y Matsumura, 2019). Por su parte, el ejercicio físico no ha demostrado ningún beneficio en la reducción de la tasa de crecimiento del AAA (Sweeting *et al.*, 2012). Sin embargo, el 50-70% de los casos progresa hasta requerir la intervención quirúrgica (Golledge *et al.*, 2020), subrayando así la urgente necesidad de **investigar** y desarrollar **nuevos fármacos** que limiten el crecimiento del AAA.

## 1.1 Fisiopatología del aneurisma aórtico abdominal

Las **arterias** sanas están constituidas por una estructura trilaminar, compuesta por capas concéntricas (Fig. 2) dispuestas de la siguiente manera:

- **Túnica íntima.** Es la capa más interna, formada por células endoteliales en contacto directo con la sangre, una lámina basal y una capa de tejido conectivo laxo.
- **Túnica media.** Se encuentra entre las capas íntima y adventicia, suele ser la capa de mayor grosor y está formada principalmente por capas circunferenciales de células del músculo liso vascular (VSMC) y una membrana elástica externa.
- **Túnica adventicia.** Es la capa más externa, formada principalmente por tejido conectivo, compuesto en esencia por fibras de colágeno y elastina.

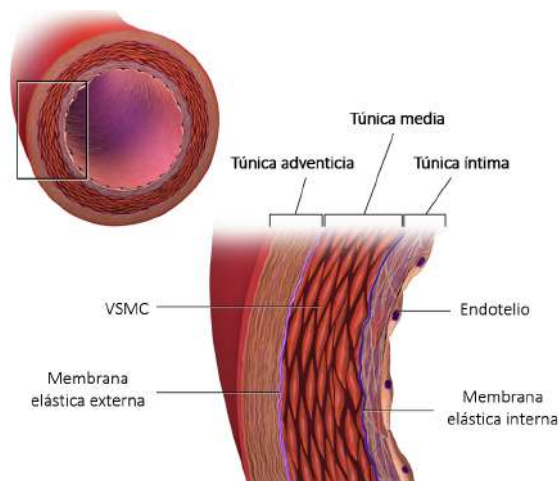


Figura 2. Estructura de la pared arterial.

El AAA es una patología de **etiología multifactorial**, resultado de una compleja interacción entre factores biomecánicos, bioquímicos y proteolíticos que originan cambios en la composición de la pared aórtica (Jeanmonod *et al.*, 2021). En el desarrollo de AAA se encuentran involucrados diferentes tipos celulares, entre los que destacan las VSMC, pero también es relevante la participación de monocitos/macrófagos, neutrófilos, células endoteliales, linfocitos, adipocitos, mastocitos, plaquetas o fibroblastos, que contribuyen en menor o mayor grado a la aparición y progresión del daño vascular. Entre los procesos fisiopatológicos más importantes se encuentran el estrés mecánico, el infiltrado de células inflamatorias, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la degradación de la matriz extracelular (ECM) y la disfunción de VSMC (Quintana y Taylor, 2019). El infiltrado de células inflamatorias en las láminas media y adventicia, junto con el estrés oxidativo y la actividad proteolítica, promueven la apoptosis de las VSMC, conduciendo al remodelado patológico y al debilitamiento de la pared vascular. En consecuencia, se produce la pérdida de la integridad estructural del vaso, lo que conlleva la dilatación y eventual ruptura aórtica (Raffort *et al.*, 2017).

### 1.1.1 Hemodinámica

Las fuerzas hemodinámicas presentes en la aorta, donde la **presión arterial** es elevada, conforman un aspecto relevante en la fisiopatología del AAA. Estas fuerzas biomecánicas son principalmente debidas a la presión intraluminal y a la tensión tangencial (*shear stress*) ejercidas sobre la pared vascular. En particular, la aorta infrarrenal es una región propensa a la dilatación aórtica, debido a las condiciones hemodinámicas específicas de esta región, próxima a la bifurcación ilíaca (Sakalihasan *et al.*, 2018). Estos fenómenos físicos, en ocasiones asociados a la presencia de placas de ateroma (Fig. 3), alteran la homeostasis arterial y contribuyen al

**remodelado patológico vascular**, pudiendo dar lugar a la formación de un **trombo intraluminal**, cuya presencia se asocia a mayor progresión y peor pronóstico del AAA (Zambrano *et al.*, 2016). El trombo intraluminal es un tejido biológicamente activo con un ambiente altamente inflamatorio, oxidativo y proteolítico (Haller *et al.*, 2018).

### 1.1.2 Inflamación

La inflamación constituye, sin duda, uno de los mecanismos de mayor relevancia en la aparición y progresión del AAA. La infiltración de células del sistema inmune, tanto innato como adaptativo, unida a la liberación de mediadores inflamatorios (principalmente citoquinas, quimioquinas y prostaglandinas) y a una mayor expresión y/o activación de receptores de quimioquinas y receptores *Toll-like* (TLRs), así como la activación del sistema renina-angiotensina, del complemento y de diferentes vías de señalización, participan en la compleja respuesta inflamatoria que se produce en las lesiones de AAA (Yoshimura *et al.*, 2018).

La infiltración de **neutrófilos** en el AAA ocurre en etapas tempranas de la enfermedad, favoreciendo la inflamación en la capa adventicia y participando de manera importante en la formación del trombo intraluminal, siendo la principal célula inflamatoria infiltrada en el mismo (**Fig. 3**) (Plana *et al.*, 2020). Durante la respuesta inflamatoria en el AAA, los neutrófilos activados liberan el contenido de sus gránulos, que incluye proteasas, mediadores inflamatorios o mieloperoxidasa, entre otros. De esta forma, los neutrófilos son importantes secretores de elastasa, proteasa capaz de digerir elastina, colágeno (tipos I-IV), proteoglicanos y fibronectina, todos ellos componentes esenciales de la ECM, favoreciendo la degradación proteolítica de la lámina media (Dollery *et al.*, 2003; Lockett *et al.*, 2018). Los neutrófilos contribuyen también al estrés oxidativo de la lesión mediante la producción de ROS, generada mayoritariamente por la actividad de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (NOX) y la mieloperoxidasa (Quintana y Taylor, 2019).

Los **linfocitos T y B** se encuentran de manera abundante en la lesión aneurismática, participando en el proceso inflamatorio y contribuyendo al desarrollo del AAA, con complejas interacciones entre sus diferentes subclases (**Fig. 3**) (Raffort *et al.*, 2017).

Las células T conforman un grupo de linfocitos muy heterogéneo que participa en multitud de acciones fisiológicas. Suelen clasificarse en función de los *clusters* de diferenciación CD4 o CD8, expresados en su superficie. Mientras que los linfocitos CD8<sup>+</sup> son citotóxicos, las células T CD4<sup>+</sup> comprenden la mayoría de los linfocitos T moduladores, son el tipo celular predominante en las lesiones de AAA y contribuyen a la patogénesis del AAA (Sagan *et al.*, 2019). Las células T CD4<sup>+</sup> se dividen en diferentes subpoblaciones de linfocitos T cooperadores o *helper*

(Th1, Th2 y Th17) y T reguladores (Treg). Cada subpoblación se clasifica en función del perfil de citoquinas requerido para su estimulación, los productos que secretan y sus acciones fisiológicas (Dale *et al.*, 2015). Así, las células Th1 secretan principalmente citoquinas como interleuquina (IL)-2 e interferón (IFN)  $\gamma$ , mientras que algunas de las citoquinas Th2 características son IL-4, IL-5, IL-8 e IL-10 (Joviliano *et al.*, 2017). Algunos estudios señalan que en AAA prevalecen las respuestas mediadas por citoquinas Th2, promoviendo la liberación de diversas citoquinas proinflamatorias, así como la apoptosis de VSMC (Schönbeck *et al.*, 2002), aunque las respuestas mediadas por citoquinas Th1 también participan en la inflamación vascular y en la degradación de la pared aórtica, inhibiendo la síntesis de colágeno (Hellenthal, Femke A. M. V. I. *et al.*, 2009). Las células Th17 secretan principalmente la citoquina IL-17, también implicada en la progresión del AAA (Wei *et al.*, 2014) y crítica para la producción de anión superóxido en la vasculatura (Madhur *et al.*, 2011). Por su parte, las células Treg resultan esenciales en la prevención de las respuestas autoinmunes y de la inflamación crónica, controlando la respuesta inmune tanto innata como adaptativa, y secretando potentes citoquinas antiinflamatorias, como IL-10 o el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Además, las células Treg actúan suprimiendo la proliferación de células T y previniendo la acumulación de células inflamatorias y la producción de citoquinas en el lugar de la lesión (Meng *et al.*, 2016).

Las células B se dividen fundamentalmente en subclase B1, crucial en la inmunidad innata, y subclase B2, implicada en la inmunidad humoral adaptativa. Las células B son reclutadas en las lesiones aórticas y se localizan frecuentemente en la capa adventicia, promoviendo el desarrollo del AAA a través de la producción de inmunoglobulinas (Ig)M e IgG, componentes del complemento, MMPs y citoquinas como IL-6 o IL-10 (Li *et al.*, 2018a). Esto provoca el reclutamiento y activación de diversos tipos celulares (macrófagos, mastocitos y otros linfocitos), que producen a su vez más citoquinas y MMPs, contribuyendo a la degradación de la ECM y al remodelado vascular patológico (Zhang y Wang, 2015).

En respuesta al daño vascular, los **monocitos** circulantes se infiltran en el tejido y allí se diferencian a **macrófagos**, convirtiéndose en células residentes (Fig. 3). Los macrófagos constituyen el tipo celular más común en las capas media y adventicia de las lesiones aneurismales (Davis *et al.*, 2015), donde liberan una gran cantidad de citoquinas, quimioquinas y MMPs. Además, pueden influir de manera directa en la función y el fenotipo de las VSMC y cumplen un importante rol en el remodelado de la ECM (Raffort *et al.*, 2017).

El **fenotipo** de los **macrófagos** puede clasificarse, de manera muy simplificada, en **M1** o **M2**. La polarización a uno u otro fenotipo depende del microambiente molecular que rodea al macrófago. El fenotipo M1 se caracteriza por una elevada producción de citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-12 e IL-23) y ROS, y se asocia en general con una



respuesta inflamatoria más sostenida en el tiempo (Li *et al.*, 2018b). Los macrófagos M1 presentan mayores niveles de expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y su diferenciación se induce por lipopolisacárido bacteriano (LPS) o citoquinas asociadas a respuestas Th1 como IFN $\gamma$ , factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) o factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Yunna *et al.*, 2020). Por el contrario, los macrófagos M2 participan en la resolución de la inflamación mediante la producción de citoquinas antiinflamatorias, principalmente IL-10 y TGF- $\beta$ . También actúan modulando o suprimiendo la respuesta inmune, contribuyendo de esta forma a la reparación y remodelado tisular o la fagocitosis de células apoptóticas, entre otras. Los macrófagos M2 se inducen en respuesta a citoquinas propias de respuestas Th2, como IL-4 e IL-13, y no expresan iNOS, pero sí altos niveles del receptor de superficie CD206 y de arginasa (Arg) 1 (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018). Debido a sus diferentes fenotipos y propiedades, los macrófagos tienen un papel dual, participando tanto en la patogénesis del AAA como en la respuesta antiinflamatoria y reparadora, siendo el balance M1/M2 esencial para evitar una respuesta inflamatoria exacerbada o patológica. No obstante, cabe destacar que la clasificación M1/M2 es más compleja, ya que se han descrito diversas subpoblaciones con funciones muy heterogéneas. Asimismo, el proceso de polarización de macrófagos es reversible, de manera que la exposición a diferentes señales puede inducir procesos de repolarización o rediferenciación (Raffort *et al.*, 2017).

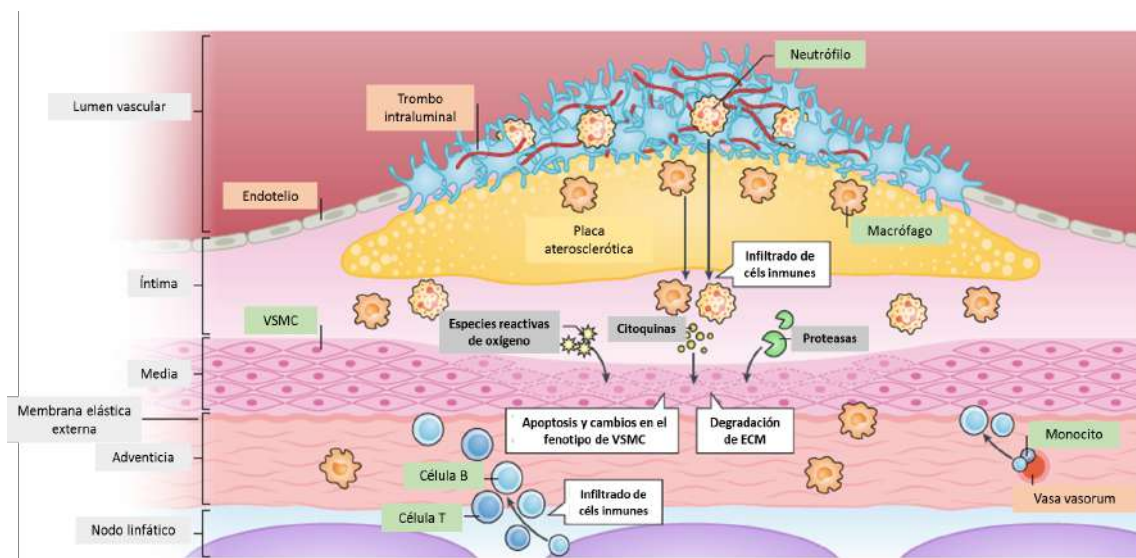


Figura 3. Resumen de los principales mecanismos implicados en la patogénesis del AAA. Modificado de Golledge, 2019.

Además de macrófagos, células T y B, las células *natural killer* (NK) circulantes se encuentran elevadas en la sangre periférica de pacientes con AAA, incrementando la actividad citotóxica y produciendo citoquinas inflamatorias como IL-2 e IFN $\gamma$  (Forester *et al.*, 2006). Por

último, los **mastocitos** también son reclutados al lugar de la lesión, principalmente en las capas media y adventicia (Mäyränpää *et al.*, 2009), donde liberan mediadores inflamatorios, proteoglicanos y proteasas (Zhang *et al.*, 2012).

Existen numerosos mediadores esenciales que participan en el comienzo y desarrollo de la reacción inflamatoria en el AAA. Además de las citoquinas ya mencionadas, las quimioquinas y las moléculas de adhesión son importantes moléculas efectoras en este proceso.

Las **quimioquinas** expresadas por los diferentes tipos celulares interactúan con una amplia familia de receptores específicos acoplados a proteínas G, y resultan críticas para inducir la quimiotaxis de las células inmunes tras la activación del sistema inmune innato. Entre las diversas quimioquinas que participan en AAA, destaca CCL2 (también denominada proteína quimioatrayente de monocitos-1, MCP-1), que a través de su receptor específico CCR2 se activa y amplifica la inflamación y tiene un papel crucial en el reclutamiento y la activación de macrófagos (Moran *et al.*, 2013). De hecho, la presencia de CCL2 se correlaciona con la infiltración de macrófagos en la pared arterial, actuando como promotora de la formación y desarrollo del AAA. Además, CCL2 también promueve la activación y migración de VSMC en el daño vascular (Potula *et al.*, 2009). Por otro lado, la quimioquina CCL5 es el ligando de los receptores CCR1/3/5 y promueve la migración de monocitos, neutrófilos, linfocitos Th1 y células dendríticas (Li *et al.*, 2018c). Asimismo, la quimioquina CXCL10 inducida por IFN $\gamma$  es ligando del receptor CXCR3, atrae principalmente monocitos y linfocitos, y tiene un papel en la proliferación y migración de células endoteliales y VSMC (van den Borne *et al.*, 2014).

En las lesiones de AAA también existe un aumento de la expresión de las **moléculas de adhesión**, como la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) (Davis *et al.*, 1993). Estas son también responsables del reclutamiento de células inflamatorias, especialmente leucocitos circulantes, que gracias a estas moléculas se unen a la superficie endotelial y se infiltran en la capa íntima, donde se diferencian y activan (Fan *et al.*, 2010). Por último, los receptores TLRs que se expresan en células inflamatorias (como monocitos/macrófagos y células B), células endoteliales y VSMC también contribuyen a la respuesta inflamatoria en la aorta (Li *et al.*, 2018).

En cuanto a los **mecanismos de señalización intracelular** más relevantes en el proceso inflamatorio del AAA, destaca la señalización mediada por IL-6 y la vía Janus quinasa/Transductor de señales y activador de la transcripción (**JAK/STAT**), que se detallará más adelante, el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), las quinasas c-Jun N-terminal (JNK) y las vías de TGF- $\beta$ , Notch e inflamasoma (Li y Kong, 2020). Tanto en aterogénesis como en AAA, los procesos de reclutamiento de leucocitos, migración y proliferación de VSMC, formación de células espumosas

y apoptosis, entre otros, en los que participan un gran número de citoquinas, activan la **vía JAK/STAT** (Agrawal *et al.*, 2007; Rizas *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2017). Por otra parte, existen numerosos estímulos asociados con el AAA que activan la vía NF-κB en el AAA, como angiotensina II o ROS (Shiraya *et al.*, 2006). Además, una gran cantidad de genes que median el proceso inflamatorio son regulados por NF-κB, entre ellas, citoquinas proinflamatorias como TNFα, IL-1 e IL-6 y quimioquinas como CCL2 y CCL5 (Zhang *et al.*, 2017). La vía JNK, típicamente activada por TLRs, también promueve el desarrollo de AAA mediante la inducción de citoquinas proinflamatorias (Qin *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2016). Finalmente, en los pacientes con AAA existe una mayor activación y señalización mediada por el inflamasoma, complejo multiproteico citoplasmático que desencadena la expresión y liberación de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y promueve la activación de vías proapoptóticas (Dihlmann *et al.*, 2014).

### 1.1.3 Degradación de la matriz extracelular

La ECM de los vasos sanguíneos es una estructura acelular tridimensional, activa y dinámica, que proporciona elasticidad mecánica y estabilidad a la pared vascular, y juega un papel fundamental en la regulación de la función vascular. La ECM está compuesta principalmente por colágeno, elastina, proteoglicanos/glicosaminoglicanos, fibronectina, laminina y otras glicoproteínas (Theocharis *et al.*, 2016). Las **alteraciones** en la **síntesis y/o degradación de la ECM** son responsables en gran medida del remodelado vascular patológico existente en el AAA. Tanto la fragmentación temprana de elastina, considerado un evento inicial en la formación del AAA asociado a la dilatación de la pared aórtica, como el daño al colágeno, relacionado con su posterior expansión y ruptura, son dos procesos clave en la fisiopatología del AAA. Así, en los aneurismas aórticos, tanto abdominales como torácicos, el volumen de elastina y colágeno se encuentra reducido, en comparación con las aortas sanas (Liu y Khalil, 2017a).

Existen, en esencia, dos familias principales de **proteasas** involucradas en la degradación de las proteínas estructurales de la ECM: las metaloproteinasas (MMPs) y las serina proteasas (**Fig. 3**). Las **MMPs** constituyen una gran familia de 28 endopeptidasas dependientes de zinc, que participan en procesos fisiológicos como angiogénesis, proliferación, migración, diferenciación o apoptosis, pero también en procesos fisiopatológicos, asociados al desarrollo de cáncer o enfermedades cardiovasculares (Maguire *et al.*, 2019a). Las MMPs son secretadas como proenzimas o proMMPs, que deben ser activadas para llevar a cabo su actividad enzimática (Nagase *et al.*, 2006). Una vez activadas, las MMPs tienen como sustratos diferentes componentes esenciales de la ECM (colágenos tipo I/IV, gelatina, laminina o fibronectina, entre otros) y pueden categorizarse según el sustrato que degraden. Algunas de las más relevantes son

las gelatinasas (MMP2 y MMP9), colagenasas (MMP1, MMP8, MMP13 y MMP18), matrilisinas (MMP7 y MMP26), metaloelastasas (MMP12) o estromelinas (MMP3 y MMP10) (Visse y Nagase, 2003). En la patogenia del AAA, dos de las más relevantes y estudiadas son MMP2 y MMP9, cuya expresión y actividad se encuentran incrementadas en las lesiones humanas y en modelos experimentales de AAA (Sakalihan *et al.*, 1996; Longo *et al.*, 2002).

En aortas sanas, los principales responsables de la producción de MMPs son células endoteliales, VSMC y fibroblastos de la adventicia. Sin embargo, en el contexto del AAA, las células inflamatorias infiltradas (como macrófagos o mastocitos) pueden constituir una fuente principal de MMPs (Liu y Khalil, 2017; Wang y Khalil, 2018). La expresión y actividad de las MMPs se encuentra regulada por los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs). En el AAA, hay un desequilibrio en la ratio MMP/TIMP, lo que conlleva una excesiva degradación de la ECM (Maguire *et al.*, 2019). Sin embargo, los TIMPs no son los únicos reguladores de las MMPs, ya que estas se modulan a diferentes niveles por factores de crecimiento, hormonas, citoquinas o proteasas (Nagase *et al.*, 2006). Algunos de los mecanismos más relevantes involucrados en la producción y/o actividad de MMPs, y que también participan en el proceso inflamatorio, son las vías de señalización de JNK, NF- $\kappa$ B y JAK/STAT, así como la señalización mediada por TGF- $\beta$  o TLR2/4 (Rabkin, 2017a; Li y Kong, 2020). De hecho, la activación del eje JAK/STAT1/3 se relaciona con un incremento en la secreción de MMP2 y MMP9 en aorta (Ghosh *et al.*, 2015), promoviendo el AAA.

Por otra parte, las proteasas liberadas en el entorno inflamatorio del AAA, principalmente elastasas, degradan la elastina nativa de la pared arterial, en detrimento de su elasticidad. Como se mencionó anteriormente, las enzimas elastolíticas son principalmente liberadas por los neutrófilos, pero también por las VSMC, especialmente cuando sufren una transición de un fenotipo contráctil a uno sintético (Antoniceilli *et al.*, 2007; Maurice *et al.*, 2013). La **degradación** de **elastina** o elastolisis libera como producto los llamados **péptidos derivados de elastina** (EDP), fragmentos bioactivos que participan en numerosos procesos fisiológicos a través de su unión a diferentes receptores, entre los que destaca el complejo receptor de elastina. De esta manera, los EDP estimulan la quimiotaxis y la producción de MMPs y ROS en las VSMC, favorecen procesos de migración, proliferación y diferenciación, oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y calcificación vascular, entre otros, favoreciendo la cronicidad de la inflamación (Duca *et al.*, 2016a). De hecho, las concentraciones de EDP en sangre suelen ser generalmente bajas en pacientes sanos, pero se encuentran especialmente elevadas en presencia de enfermedades como diabetes, aterosclerosis o aneurisma (Novinec *et al.*, 2007; Qin, 2015).

#### 1.1.4 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como aquella situación en la que la **producción de ROS** excede la capacidad de defensa antioxidante, causando un desequilibrio que provoca la oxidación de diversas moléculas (proteínas, lípidos, DNA), lo que se traduce en un daño celular y tisular progresivo (**Fig. 3**) (McCormick *et al.*, 2007).

El estrés oxidativo se encuentra implicado en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como aneurisma, aterosclerosis, hipertensión, o en complicaciones vasculares de la diabetes y la obesidad. Algunos de los principales sistemas enzimáticos productores de ROS en la vasculatura son el complejo NOX, la cadena respiratoria mitocondrial y la xantina oxidasa. En el lado opuesto, se encuentran los sistemas antioxidantes, encargados de suprimir el estrés oxidativo, destacando las enzimas glutatión peroxidasa, hemo oxigenasa, superóxido dismutasa y catalasa (Li y Kong, 2020).

La **NOX** es un complejo multienzimático con diferentes subunidades catalíticas y reguladoras cuya función primaria es la producción de ROS (anión superóxido y/o peróxido de hidrógeno), y participa en procesos fisiológicos de proliferación, migración o diferenciación celular. Se han descrito diferentes miembros de la familia NOX, expresados de forma diferencial en los diversos tipos celulares y tejidos. En el sistema cardiovascular son esenciales reguladores de la función vascular, predominando las isoformas NOX1, NOX2, NOX4 y NOX5. En concreto, en VSMC se expresan las subunidades NOX1 y NOX4, mientras que en células fagocíticas, como macrófagos, predomina NOX2 (Siu *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2020). Sin embargo, una excesiva actividad NOX incrementa la producción de ROS y favorece la aparición de estrés oxidativo, además de la activación de otros sistemas prooxidantes (Davis *et al.*, 2015). Las células inmunes infiltradas en las lesiones de AAA, pero también las VSMC, las células endoteliales o los fibroblastos residentes, tienen la capacidad de producir ROS a través de la NOX y otras enzimas, como la mieloperoxidasa (McCormick *et al.*, 2007). En este contexto, cabe destacar que la vía JAK/STAT se ha encontrado implicada en la regulación de las subunidades NOX1 y NOX4 en VSMC (Marrero, 2005; Manea *et al.*, 2010). Además, se ha constatado una mayor actividad enzimática de la NOX en tejidos aórticos de pacientes con AAA (Miller *et al.*, 2002), así como niveles elevados de diferentes subunidades (Guzik *et al.*, 2013).

El estrés oxidativo generado en las lesiones de AAA induce la expresión de **genes proinflamatorios, muerte celular** (de VSMC, principalmente) y promueve la activación de las **MMPs**, contribuyendo así a la exacerbación de la inflamación en el AAA y a la degradación de la ECM (Maguire *et al.*, 2019b). Otros factores, como el tabaquismo o las fuerzas mecánicas presentes en el AAA, potencian de manera notable el estrés oxidativo (Sakalihan *et al.*, 2018).

Además, tanto las ROS como las especies reactivas de nitrógeno (óxido nítrico y peroxinitrito) pueden causar **citotoxicidad** y también se encuentran involucradas en la **regulación** de la **transducción de señales** celulares, algunas de ellas mediadas por las MAP quinasas (MAPK), fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) o NF-κB (Li y Kong, 2020).

#### 1.1.5 Papel de las VSMC

Las VSMC constituyen un grupo de células contráctiles que mantienen la homeostasis del vaso, controlando el tono vascular y otros procesos fisiológicos vasculares, como la síntesis de proteínas de la ECM. Una vez maduras y diferenciadas, las VSMC expresan una serie de marcadores de músculo liso, característicos de un fenotipo **contráctil**, entre los que se incluyen  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), calponina y proteína 22  $\alpha$  de músculo liso (SM22 $\alpha$ ). Sin embargo, las VSMC poseen una gran plasticidad y, en respuesta a determinadas señales y estímulos patológicos, pueden modificar su fenotipo a uno **sintético** e inflamatorio (Li y Kong, 2020). Los fenotipos patogénicos de VSMC se caracterizan por alteraciones funcionales, con mayor tasa de migración, proliferación y síntesis proteica, así como una disminución de los marcadores contráctiles (Clément *et al.*, 2019) e incremento de otros marcadores, como MMPs (Wang y Khalil, 2018) o el factor de transcripción *Kruppel-like* (KLF)-4 (Salmon *et al.*, 2013). Esta transición, denominada **cambio fenotípico** de VSMC, se considera un evento relevante en el desarrollo de los aneurismas aórticos (Ailawadi *et al.*, 2009) que favorece de manera directa otros de los mecanismos fisiopatológicos del AAA ya mencionados, como la inflamación, la degradación de ECM y la apoptosis de las VSMC.

El AAA se caracteriza por una marcada **desaparición** de las **VSMC** de la lámina media del vaso, debido a mecanismos de **muerte celular**, generalmente apoptosis y necroptosis (**Fig. 3**) (Li y Kong, 2020). Además de los cambios fenotípicos y el entorno inflamatorio, oxidativo y proteolítico de la pared vascular, el estrés del retículo endoplasmático y el estrés mitocondrial se encuentran incrementados en el AAA y son asimismo responsables de la apoptosis de VSMC (Navas-Madroñal *et al.*, 2019). A las proteasas secretadas por las células inflamatorias, se suman las liberadas por las propias VSMC apoptóticas, favoreciendo así la degradación de la ECM. Esto, unido a que la desaparición de VSMC reduce la capacidad de síntesis de nuevas proteínas de matriz, provoca el debilitamiento de la pared vascular y la dilatación permanente del AAA (McCormick *et al.*, 2007). En lo que respecta a esta tesis, se ha descrito la implicación directa de la vía **JAK/STAT** en los cambios fenotípicos de VSMC (Kirchmer *et al.*, 2014; Liao, X. *et al.*, 2015).

## 1.2 Nuevas dianas terapéuticas en AAA

En la actualidad, ninguno de los fármacos prescritos para el tratamiento del AAA (estatinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina,  $\beta$ -bloqueantes o agentes antiplaquetarios, entre otros) se asocia con una reducción en el crecimiento del AAA o un menor riesgo de ruptura. En las últimas décadas, se han llevado a cabo ensayos clínicos para el tratamiento del AAA, empleando fármacos con dianas terapéuticas muy diversas, entre ellos: anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  (canakinumab), inhibidores del eje renina-angiotensina (telmisartán y valsartán), inhibidores plaquetarios (ticagrelor) o inhibidores de MMPs (doxicilina) (Wang *et al.*, 2018). Otra novedosa estrategia en experimentación es el empleo terapéutico de células madre que, por su capacidad de producción de citoquinas inmunomoduladoras, pueden reducir la inflamación aórtica y la degradación de ECM. También se ha demostrado el efecto protector de TGF- $\beta$ , ya que es capaz de promover la síntesis de ECM y la activación de células Treg, y de inhibir la inflamación, la muerte de VSMC y la degradación de ECM (Golledge, 2019).

A pesar de que en los últimos años se han descrito en profundidad algunos de los eventos clave involucrados en la fisiopatología del AAA en humanos, se desconocen muchos de los mecanismos subyacentes que conducen a la aparición y desarrollo de esta enfermedad. Por ello, resulta esencial el diseño de nuevos estudios para avanzar en el conocimiento y el desarrollo de nuevas terapias eficaces en el tratamiento del AAA.

## 2. ESTEATOSIS HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA

La **esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD)** es la causa más común de enfermedad hepática en el mundo, y las predicciones indican que próximamente será la primera causa de trasplante de hígado (Younossi, 2019). El concepto de NAFLD suele referirse al acúmulo de grasa (esteatosis) hepática, excluyendo otras causas de enfermedad hepática, como el consumo excesivo de alcohol, las enfermedades virales o fármacos esteatogénicos. La **esteatohepatitis no alcohólica (NASH)**, habitualmente englobada dentro del espectro clínico de NAFLD, se define como un proceso más severo, con presencia de inflamación y daño en los hepatocitos, acompañado de diferentes grados de fibrosis hepática (Friedman *et al.*, 2018). Tanto NAFLD como NASH pueden progresar hasta producir fibrosis avanzada, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (HCC), pudiendo estas condiciones producir la muerte de estos pacientes (Fig. 4) (Younossi, 2019).

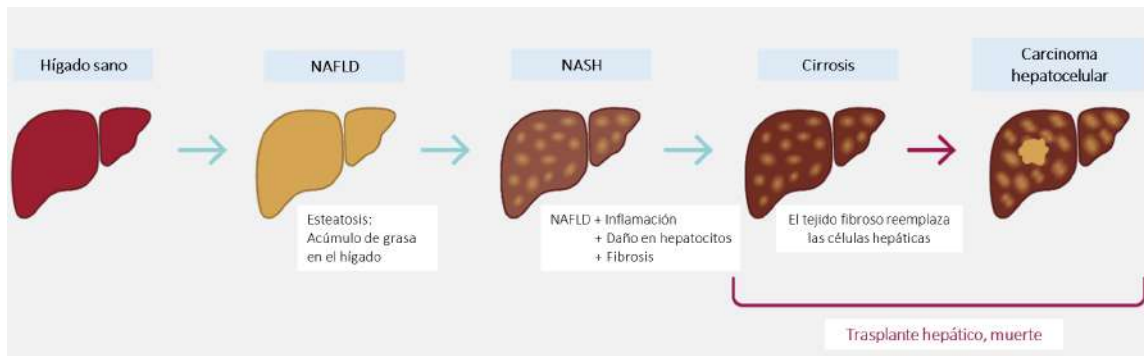


Figura 4. Representación esquemática de la progresión de NAFLD. Modificado de <https://cn-bio.com/disease-modelling>.

La patología de NAFLD difiere en sus características demográficas y epidemiológicas en las diferentes regiones del mundo. Globalmente, su **prevalencia** se estima en torno al 25% (Araújo *et al.*, 2018), siendo más común en hombres (30-40%) que en mujeres (15-20%), con mayor incidencia en Sudamérica y Oriente Medio, y menor en África. Mientras que en Norteamérica y Europa la NAFLD se encuentra típicamente asociada a obesidad (presente en un 83% de los pacientes), en regiones como Asia un gran número de pacientes mantiene un índice de masa corporal normal (Loomba y Sanyal, 2013).

Entre los principales **factores de riesgo** que predisponen a NAFLD, suelen encontrarse la presencia de otras comorbilidades metabólicas, entre las que se incluyen obesidad, resistencia a la insulina, dislipemias e hipertensión. Por ello, en muchas ocasiones la NAFLD es considerada una manifestación hepática del **síndrome metabólico** (Perumpail *et al.*, 2017). Las tasas globales de diabetes, obesidad y síndrome metabólico, tanto en niños como en adultos, incrementan de manera proporcional la prevalencia mundial de NAFLD. Al mismo tiempo, la acumulación de



lípidos hepáticos que se produce en NAFLD incrementa el riesgo de padecer diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares y enfermedad renal crónica. De hecho, tanto NAFLD como NASH conforman un factor añadido de riesgo cardiovascular, suponiendo las complicaciones extrahepáticas, principalmente cardiovasculares, la causa de muerte más frecuente en estos pacientes (Younossi, 2019).

La NAFLD posee un amplio espectro de manifestaciones clínicas, con tasas de progresión muy variables, pudiendo sus lesiones histológicas progresar, remitir o mantenerse estables a lo largo del tiempo. La principal característica histológica de NAFLD es la presencia de esteatosis, definida como la presencia de **gotas lipídicas** contenidas en el interior de más del 5% de hepatocitos, y que puede clasificarse según el tamaño de estas gotas en **micro- o macrovesicular** (Hardy *et al.*, 2016). Para su diagnóstico, se pueden emplear diferentes pruebas y técnicas de imagen que confirmen la presencia de esteatosis hepática (Friedman *et al.*, 2018).

Mientras que la esteatosis simple puede considerarse un proceso relativamente benigno y fácilmente reversible mediante modificaciones en el estilo de vida, su **progresión a NASH** constituye un proceso más severo. La enfermedad de NASH puede permanecer asintomática durante décadas o avanzar rápidamente, y su diagnóstico, relevante para diferenciarla de la esteatosis simple, únicamente puede confirmarse mediante biopsia hepática. Debido a esto, es difícil determinar la prevalencia real de NASH, pero se estima que esta condición se encuentra presente en el 3-15% de la población general. En poblaciones de riesgo (obesidad y/o diabetes tipo 2) su prevalencia se eleva hasta el 35% (Hardy *et al.*, 2016). Las características histológicas en NASH son esteatosis, inflamación lobular, daño celular degenerativo en hepatocitos (*ballooning* o “balonización”) y diferentes grados de fibrosis. Pese a que la presencia y estado de la fibrosis en NASH constituye un excelente marcador de esta enfermedad, indicativo de la severidad del pronóstico y su progresión hacia cirrosis y/o HCC, existe una importante necesidad de biomarcadores predictivos en NAFLD/NASH (Perumpail *et al.*, 2017).

## 2.1 Fisiopatología de NAFLD/NASH

La NAFLD es una compleja enfermedad **multifactorial** que engloba diversos factores metabólicos, genéticos y ambientales. Tradicionalmente, se ha tratado de explicar la patogénesis de NAFLD con la teoría, actualmente desfasada, de “*two-hits*”, donde la esteatosis sería el primer “*hit*”, que incrementa la susceptibilidad al daño hepático a partir de otros factores o “*second-hits*”, como el estrés oxidativo (Friedman *et al.*, 2018). Actualmente, la teoría de “*multiple-hit*” contempla un daño multifactorial, englobando los potenciales mecanismos involucrados en la

aparición y progresión de NAFLD, entre los que destacan alteraciones en el metabolismo lipídico, resistencia a insulina, síndrome metabólico y disbiosis de la microbiota intestinal, así como procesos de lipotoxicidad, inflamación, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Williams *et al.*, 2013). A continuación, se revisarán algunos de los mecanismos más relevantes.

### 2.1.1 Alteraciones en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono

La correcta homeostasis de los lípidos hepáticos resulta crítica para el balance entre la captación de ácidos grasos por el hígado, su empleo mediante esterificación/oxidación y su almacenamiento y exportación. Este proceso está orquestado por una compleja interacción entre hormonas, receptores nucleares, vías de señalización celular y factores de transcripción.

Los **ácidos grasos** cumplen un rol esencial en la patogénesis de NAFLD/NASH. Una de las principales fuentes de ácidos grasos (60%) la conforman los ácidos grasos no esterificados procedentes de la sangre, que han sido liberados por la lipólisis de triglicéridos del tejido adiposo, proceso regulado por la acción de la insulina en los adipocitos. Otra fuente importante de ácidos grasos (25%) es la lipogénesis *de novo*, proceso mediante el cual los hepatocitos convierten el exceso de carbohidratos (principalmente glucosa y fructosa) en nuevos ácidos grasos. Por último, existe una menor proporción de ácidos grasos (15%) que llegan al hígado procedentes de la dieta, en forma de quilomicrones (Machado y Cortez-Pinto, 2014) (Fig. 5).

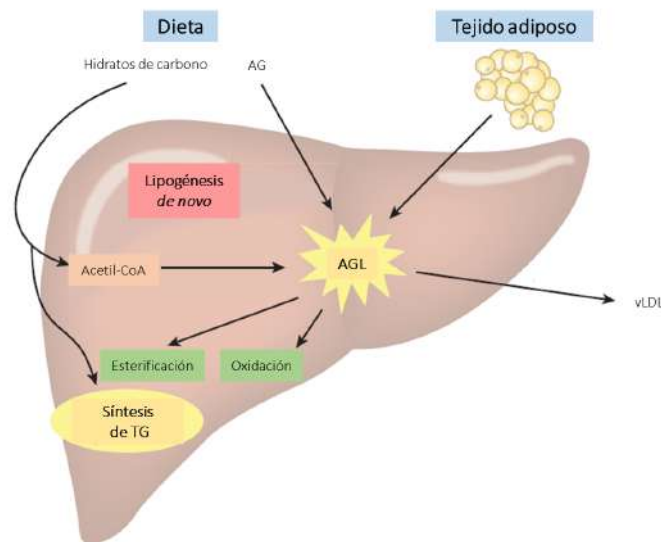


Figura 5. Resumen esquemático del flujo de ácidos grasos en el metabolismo lipídico hepático. Modificado de Hardy *et al.*, 2016. Abreviaturas: AG(L), ácidos grasos (libres); TG, triglicéridos.

La **captación de ácidos grasos** por los hepatocitos se realiza mediante diferentes transportadores transmembrana, como la translocasa de ácidos grasos CD36, las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP, especialmente FATP2 y FATP5) o las proteínas de unión a ácidos grasos (Drygalski *et al.*, 2017). Estos transportadores se encuentran regulados por diferentes proteínas, entre ellas, los receptores activados por el receptor de peroxisomas (PPAR) o el receptor de hígado X (LXR). Los receptores PPAR comprenden las isoformas PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$  que, junto con otros receptores, promueven la oxidación lipídica y regulan la expresión de proteínas transportadoras de ácidos grasos (Ipsen *et al.*, 2018).

Por otra parte, la **lipogénesis de novo** implica una serie de complejas reacciones que comienzan en el citosol y continúan en la mitocondria de los hepatocitos. El principal combustible para la síntesis de ácidos grasos es la acetil-coenzima A (CoA), derivada del catabolismo de hidratos de carbono y aminoácidos, que se convierte en malonil-CoA en una reacción catalizada por la enzima lipogénica citosólica acetil-CoA carboxilasa. A continuación, el malonil-CoA es convertido en ácido palmítico, producto principal de la síntesis *de novo* de los ácidos grasos, gracias a la enzima ácido graso sintasa. Los nuevos ácidos grasos formados sufrirán posteriormente una serie de pasos de desaturación, elongación y esterificación. La regulación transcripcional de la lipogénesis *de novo* se debe principalmente a la activación del factor de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP-1c), activado por insulina y el receptor LXR $\alpha$ , y del factor de transcripción de unión a elementos reguladores de carbohidratos (ChREBP), activado por carbohidratos (Ferramosca y Zara, 2014). Por ello, la señalización por insulina es crucial para el correcto metabolismo de los lípidos e hidratos de carbono, ya que controla las enzimas responsables de la lipogénesis *de novo*, a través de estos factores de transcripción, así como la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (vLDL) regulada por Akt (Hardy *et al.*, 2016).

En el hígado, los tres principales **destinos** de los **ácidos grasos** en los hepatocitos son: 1) la  $\beta$ -oxidación mitocondrial; 2) la esterificación en forma de triglicéridos, que serán almacenados en forma de gotas lipídicas, y 3) el ensamblaje y exportación de ácidos grasos en forma de vLDL (Ipsen *et al.*, 2018) (Fig. 5).

La  **$\beta$ -oxidación** de los ácidos grasos ocurre principalmente en la mitocondria, y proporciona una fuente de energía para generar adenosín trifosfato (ATP), especialmente cuando los niveles circulantes de glucosa son bajos. Este proceso se encuentra controlado por PPAR $\alpha$ , y la entrada de ácidos grasos a la mitocondria se realiza mediante la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1), situada en la membrana mitocondrial externa (Ipsen *et al.*, 2018).

La **formación de triglicéridos**, derivados de la esterificación de glicerol y ácidos grasos libres, constituye un mecanismo adaptativo de respuesta que se da cuando el aporte de ácidos grasos excede la capacidad del hígado de metabolizarlos. Las gotas lipídicas formadas sufren lipólisis, liberándose los ácidos grasos de su interior, volviendo a los hepatocitos en forma de ácidos grasos libres (Friedman *et al.*, 2018).

Ciertos **polimorfismos** de un solo nucleótido en el gen PNPLA3 (*Patatin-like phospholipase domain-containing 3*), el cual regula el proceso lipolítico de las gotas lipídicas de los hepatocitos, se encuentran fuertemente asociados con la presencia y progresión de NASH (Mazo *et al.*, 2019). Otras variantes genéticas comúnmente relacionadas con esta patología se han encontrado en los genes codificantes para TM6SF2 (*TransMembrane 6 Superfamily Member 2*), o para la proteína GCKR (*Glucokinase Regulatory protein*), que controla la lipogénesis *de novo*, regulando la entrada de glucosa en los hepatocitos (Eslam *et al.*, 2018).

Entre los **transportadores de salida** de lípidos se encuentra la familia de los transportadores de casete de unión a ATP (*ATP Binding Cassette, ABC*), proteínas integrales de membrana que median el eflujo de gran variedad de moléculas a través de las membranas celulares (Hou *et al.*, 2019). En hepatocitos, el transportador ABCA1 cataliza la transferencia de colesterol, fosfolípidos y otras moléculas lipofílicas desde la membrana plasmática hacia las proteínas apoA-I libres de lípidos, con el fin de formar lipoproteínas de alta densidad (HDL), mientras que ABCG1 facilita la salida del exceso de colesterol a las HDL (Liu, 2019). En la regulación de estos transportadores participan los receptores PPAR o LXR (Frambach, Sanne J. C. M. *et al.*, 2020) y citoquinas como TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-10 o IL-1 $\beta$  (Yin *et al.*, 2010).

Tanto la dieta como los **factores ambientales y genéticos** conducen al desarrollo de resistencia a la insulina, obesidad, mayor proliferación de adipocitos y cambios en el microbioma intestinal (Buzzetti *et al.*, 2016). Además de las grasas, los hidratos de carbono ingeridos en la dieta, especialmente la fructosa, han sido propuestos como un importante factor para el desarrollo de NAFLD, así como obesidad y diabetes tipo 2. La fructosa promueve directamente la esteatosis a través de la estimulación de la lipogénesis *de novo*, incrementa la expresión hepática de genes inflamatorios que promueven NASH y reduce la  $\beta$ -oxidación mitocondrial hepática y los niveles de ATP, induciendo disfunción metabólica (Schuster *et al.*, 2018).

La **resistencia a insulina** se define como una menor capacidad de los órganos para captar la glucosa procedente del torrente sanguíneo, en respuesta a la insulina. Esta condición se da especialmente en hígado, músculo esquelético, tejido adiposo y cerebro, y es considerada uno de los principales promotores de la esteatosis hepática. En cualquiera de sus grados, la

insulinorresistencia compromete la capacidad de los adipocitos de almacenar grasa, aumenta la actividad lipasa del tejido adiposo, promoviendo la lipólisis, lo que conduce a un exceso de ácidos grasos libres en la circulación sistémica y portal. Consecuentemente, existe un incremento del flujo de lípidos y los ácidos grasos son captados por los diferentes órganos, entre ellos el hígado (Buzzetti *et al.*, 2016). La situación de resistencia a insulina periférica potencia la lipogénesis *de novo* a través del incremento de la expresión de los factores de transcripción SREBP-1c y ChREBP (Hardy *et al.*, 2016). De hecho, se encuentran altas tasas de lipogénesis en los pacientes obesos con NAFLD (Lambert *et al.*, 2014), asociado a la hiperglucemia e hiperinsulinemia. Como consecuencia de la resistencia a insulina, se genera un desequilibrio en la regulación de glucosa, junto con la disfunción del tejido adiposo y del metabolismo lipídico, lo que a su vez provoca inflamación, tanto local como sistémica, y estrés oxidativo (Machado y Cortez-Pinto, 2014). Además, la esteatosis por sí misma promueve la resistencia a insulina, creándose un círculo patogénico que se perpetúa en NAFLD/NASH (Williams *et al.*, 2013).

Entre otras, la vía **JAK/STAT** cumple un importante papel en la señalización por insulina a través de la regulación del eje hormona de crecimiento (GH)-JAK2-factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF1)/STAT5, y los desequilibrios en esta señalización alteran el metabolismo lipídico hepático y se asocian con el desarrollo de NAFLD, tanto en humanos como en modelos murinos (Kaltenecker *et al.*, 2019).

Finalmente, la **microbiota intestinal** juega un importante papel en esteatosis hepática, necroinflamación y fibrosis. Los desequilibrios en la microbiota presentes en obesidad y síndrome metabólico producen mayor absorción de nutrientes procedentes de la dieta, alterando el metabolismo lipídico de todo el organismo, aumentando la lipogénesis *de novo* y la captación de ácidos grasos por parte del tejido adiposo, y disminuyendo su oxidación. Una absorción excesiva de ácidos grasos de cadena corta, como butirato, propionato y acetato, y de múltiples productos bacterianos (endotoxinas) favorece la activación de vías inflamatorias y la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF $\alpha$  (Machado y Cortez-Pinto, 2012; Ferro *et al.*, 2020).

### 2.1.2 Lipotoxicidad y estrés del retículo endoplasmático

La **lipotoxicidad** se define como un desequilibrio en los lípidos celulares y/o en la composición lipídica intracelular, lo que conduce al acúmulo de estos lípidos dañinos, que producen disfunción de diversos orgánulos, estrés y muerte celular. La lipotoxicidad, asociada a inflamación crónica, promueve el desarrollo de NAFLD y su progresión hacia NASH. Cuando se excede la capacidad hepática, bien porque el aporte de sustratos procedentes del metabolismo energético (ácidos grasos y carbohidratos) es excesivo, o bien porque su eliminación es

deficiente, los ácidos grasos sirven de sustrato para la generación y el acúmulo de especies lipotóxicas, como diacilgliceroles, ceramidas o lisofosfatidilcolina (Machado y Cortez-Pinto, 2014; Friedman *et al.*, 2018). Las especies lipotóxicas favorecen el daño celular a través de 3 mecanismos principales: 1) modificando la función biológica de orgánulos intracelulares, como retículo endoplasmático y mitocondria; 2) modificando de manera directa las vías de señalización intracelular y 3) interaccionando específicamente con quinasas celulares proinflamatorias. De esta forma, se promueve el estrés oxidativo, así como la activación del inflammasoma y de vías apoptóticas y se altera la señalización hepática de insulina, favoreciendo la aparición de fibrosis e inestabilidad genómica, lo que conduce finalmente a cirrosis hepática y HCC (Pierantonelli y Svegliati-Baroni, 2019).

La lipotoxicidad provoca la muerte celular de hepatocitos por apoptosis, proceso muy regulado y no inflamatorio, pero también mediante procesos de necrosis, necroptosis y piroptosis, siendo esta última una fuente importante de daño mitocondrial, estrés oxidativo e inflamación, mediante la activación de la vía **JNK** y la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los DAMPs estimulan el sistema inmune innato uniéndose a **receptores TLRs**, como TLR4 o TLR9, y a proteínas del **inflammasoma**, que se activa y libera una cascada de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (Farrell *et al.*, 2018), promoviendo la apoptosis de hepatocitos (Williams *et al.*, 2013).

El retículo endoplasmático es el orgánulo encargado del plegamiento de la mayoría de las proteínas sintetizadas en la célula y es sensible a multitud de respuestas celulares. Diversos desencadenantes, como el exceso de ácidos grasos libres, la disfunción primaria del retículo endoplasmático o la falta de ATP pueden producir en este orgánulo el acúmulo de proteínas que no han sido correctamente plegadas y no adquieren su conformación adecuada, formando agregados que activan un mecanismo adaptativo de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), generando el denominado **estrés del retículo endoplasmático**. Una consecuencia de la UPR es la activación de SREBP-1c, lo que perpetúa la acumulación de lípidos hepáticos y el estrés del retículo endoplasmático (Buzzetti *et al.*, 2016). En línea con esto, se han descrito diferentes niveles de activación de la UPR en pacientes con NAFLD y NASH (Puri *et al.*, 2008). Si la respuesta UPR falla, se inicia la apoptosis de hepatocitos a través de diferentes vías, como la activación de la proteína homóloga C/EBP (CHOP) y cascadas de señalización inflamatorias, promoviendo la disfunción mitocondrial y la excesiva producción de ROS (Pierantonelli y Svegliati-Baroni, 2019). Además, algunos estudios han demostrado que el estrés del retículo endoplasmático puede ser inducido como consecuencia de la activación de la vía **JAK/STAT**, conduciendo a la expresión de IL-6 y numerosas quimioquinas. De hecho, la activación de STAT3 es dependiente de la quinasa PERK, un componente central de la respuesta a estrés del retículo (Meares *et al.*, 2014; Sanchez

*et al.*, 2019). Al mismo tiempo, la presencia de estrés del retículo endoplasmático prolonga la señalización de la vía JAK/STAT (Flores-Morales *et al.*, 2001).

### 2.1.3 Inflamación

La activación de la respuesta inflamatoria e inmune es una característica importante en NAFLD y NASH, y se desencadena en respuesta a multitud de estímulos, como el exceso de ácidos grasos, las endotoxinas procedentes del intestino que alcanzan el hígado, los DAMPs o los cristales de colesterol.

Durante el desarrollo de NAFLD y NASH, existe una importante activación de vías de señalización intracelulares inflamatorias, principalmente JNK y NF- $\kappa$ B. Su activación incrementa la producción de moléculas inflamatorias secretadas por los hepatocitos (feutinas A y B, factor de crecimiento de fibroblastos-21, selenoproteína P, entre otras), denominadas hepatoquinas, e inhibe la fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina, agravando la resistencia a insulina (Meex y Watt, 2017). Como se comentó anteriormente, la señalización mediada por la vía **JAK/STAT** está implicada de forma directa en la señalización por insulina, pero también en la función hepática y el desarrollo de esteatosis a través de la activación de los ejes IL-6-STAT3 e IL4-STAT6 (Dodington *et al.*, 2018). En este entorno de daño hepatocelular lipotóxico se produce la secreción de otras moléculas inflamatorias, como IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, CCL2, CCL5, IL-12, o IL-33 (Arrese *et al.*, 2016), que atraen células inflamatorias al tejido.

La inflamación lobular hepática crónica en ausencia de patógenos, denominada inflamación estéril, es una de las características más relevantes en NASH, y suele presentarse como infiltrados de células inmunes, destacando macrófagos, linfocitos y neutrófilos (Hardy *et al.*, 2016). Pese a que los **hepatocitos** tienen gran relevancia en la inflamación hepática de NAFLD y NASH, los efectores clásicos son las **células de Kupffer** (macrófagos residentes específicos del hígado) y los macrófagos infiltrados en el tejido, atraídos y activados principalmente por las moléculas CCL2 y CCL5, que se disponen rodeando los hepatocitos balonizados. Al igual que el resto de los macrófagos, las células de Kupffer se activan en función del microambiente local y pueden expresar marcadores de fenotipo M1/M2 (Arrese *et al.*, 2016). Estas células son importantes para la activación del inflammasoma, liberando altos niveles de IL-1 $\beta$  (Buzzetti *et al.*, 2016). Por su parte, los **neutrófilos** liberan ROS y factores de crecimiento que potencian la actividad de los macrófagos M1, lo que facilita la activación de células hepáticas estelares (HSCs), promoviendo la fibrosis (Farrell *et al.*, 2018). Aunque en menor medida, los linfocitos T (Th1 y NK), las células dendríticas o las células endoteliales sinusoidales también participan en la respuesta inflamatoria (Brunt *et al.*, 2015).

Por último, a nivel sistémico, el **tejido adiposo** contribuye al estado de inflamación de bajo grado, produciendo citoquinas proinflamatorias (TNF $\alpha$  e IL-6, principalmente). En obesidad, la elevada secreción de TNF $\alpha$  y ácidos grasos procedentes de los adipocitos hipertróficos favorece la activación de macrófagos M1. Por otra parte, resultan relevantes las adipocitoquinas circulantes liberadas por el tejido adiposo. Entre ellas, adiponectina, con actividad antiinflamatoria y antifibrótica, que incrementa la sensibilidad insulínica y se halla disminuida en sujetos con NALFD; o leptina, típicamente proinflamatoria y profibrogénica, que se encuentra incrementada en obesidad (**Fig. 6**) (Machado y Cortez-Pinto, 2014).

#### 2.1.4 Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

En condiciones fisiológicas normales, los ácidos grasos sufren un proceso normal y seguro de  $\beta$ -oxidación, generalmente mitocondrial. Sin embargo, ante un exceso de lípidos como el que ocurre en NAFLD, se activan otras **vías minoritarias** de **oxidación** en peroxisomas, retículo endoplasmático y citocromos, que también contribuyen a la metabolización de ácidos grasos mediante  $\beta$ - o  $\omega$ -oxidación. Estos procesos generan una cantidad considerable de ROS, **estrés oxidativo** y ácidos dicarboxílicos tóxicos, promoviendo la inflamación y progresión de la enfermedad de NAFLD (Ipsen *et al.*, 2018). De hecho, se ha descrito una mayor activación de estas vías minoritarias de oxidación en pacientes con NASH (Robertson *et al.*, 2001).

A pesar de que la oxidación de ácidos grasos en la mitocondria y otros orgánulos es la principal fuente de ROS en los hepatocitos, varios sistemas enzimáticos como NOX (principal fuente de ROS en las células de Kupffer), xantina oxidasa, citocromo P450 o ciclooxigenasas, contribuyen asimismo a la generación de ROS, especialmente peróxido de hidrógeno. El estrés oxidativo causa daño en el DNA nuclear y mitocondrial, disrupción de los fosfolípidos de membrana por la peroxidación lipídica, y liberación de citoquinas proinflamatorias. La **peroxidación** de ácidos grasos poliinsaturados genera productos tóxicos, como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), que amplifican el daño en orgánulos intracelulares y provocan la muerte celular (George *et al.*, 2003). Estos productos tóxicos son capaces de activar las HSCs, que producen ROS a través de las isoformas NOX1, NOX2 y NOX4. En último término, las ROS constituyen un importante elemento implicado en el desarrollo de resistencia a insulina y modifican la expresión y actividad de enzimas clave implicadas en el metabolismo lipídico. Por ejemplo, el peróxido de hidrógeno incrementa la expresión de SREBP-1 y consecuentemente la de la enzima ácido graso sintasa, promoviendo la lipogénesis (Chen *et al.*, 2020).



La **disfunción mitocondrial**, consistente en alteraciones de la función bioenergética normal de la mitocondria, es otro de los mecanismos importantes en la patogénesis de NAFLD, y juega un papel esencial en su transición a NASH. Los principales desencadenantes del deterioro mitocondrial son la excesiva oxidación de ácidos grasos y la lipotoxicidad (Fig. 6), que incrementan la expresión y actividad de enzimas de la  $\beta$ -oxidación, como CPT1 o PPAR $\alpha$ . Los productos de peroxidación lipídica como MDA y 4-HNE, inducen daño en las membranas mitocondriales y afectan al funcionamiento normal de la cadena transportadora de electrones (Chen *et al.*, 2020). Finalmente, el flujo constante de ácidos grasos a través de la mitocondria y las ROS producidas en la membrana mitocondrial interna dañan los complejos proteicos de la cadena respiratoria e interaccionan con el DNA mitocondrial, provocando deleciones y mutaciones puntuales, perdiéndose finalmente la integridad de este orgánulo, lo que conlleva la **muerte celular** (Schuster *et al.*, 2018).

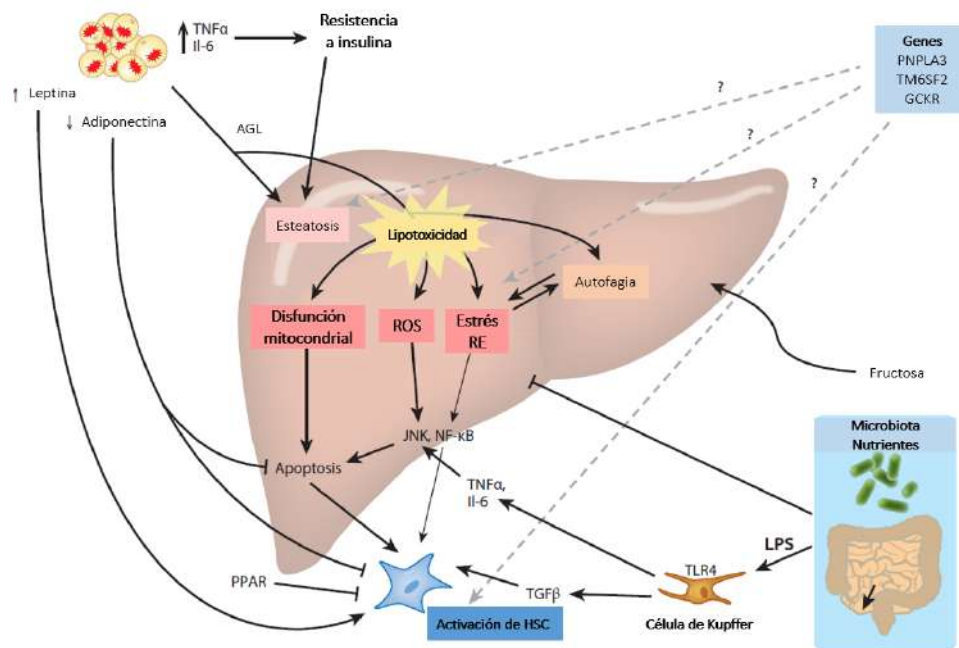


Figura 6. Representación esquemática de los principales mecanismos implicados en la patogénesis de NAFLD. Modificado de Hardy *et al.*, 2016. Abreviaturas: AGL, ácidos grasos libres; RE, retículo endoplasmático.

### 2.1.5 Fibrogénesis

La presencia y el grado de fibrosis hepática resultan cruciales en el desarrollo y pronóstico de NASH, así como en su progresión a cirrosis, y se correlacionan con el riesgo de mortalidad asociada a enfermedad hepática. El evento central del proceso fibrogénico es la **activación** de las HSCs que, al igual que las células inflamatorias, son susceptibles de activarse en respuesta a varios

componentes o estímulos presentes en NAFLD: DAMPs de hepatocitos dañados, endotoxinas, estrés oxidativo y lípidos, entre otros. De esta manera, se produce una activación de HSCs a miofibroblastos, que producen colágeno y generan así el depósito de matriz extracelular, formando en el tejido hepático cicatrices fibrosas (Brunt *et al.*, 2015).

Existen numerosos factores implicados en el proceso fibrogénico en NASH. Los macrófagos y **células de Kupffer** expresan TLRs y activan el inflamasoma, que también responden a la liberación de los compuestos perjudiciales mencionados anteriormente. Estas células, junto con las HSCs, presentan entonces una producción aumentada de quimioquinas proinflamatorias, destacando CCL2 y CCL5, que promueven la activación y migración de monocitos y otras células que se infiltran en el hígado, y favorecen el estrés oxidativo vía NOX2 (Mortezaeae, 2018), ayudando a la progresión de la fibrosis (Fig. 7) (Pierantonelli y Svegliati-Baroni, 2019).

La leptina produce un incremento de la expresión de TGF- $\beta$  por parte de las células de Kupffer y las células endoteliales sinusoidales. Por el contrario, la adiponectina ha demostrado tener efectos antifibróticos, modulando las HSCs a través de la inhibición de vías proinflamatorias como NF- $\kappa$ B. El sistema renina-angiotensina, regulador clave de la resistencia a insulina, favorece también la activación de NF- $\kappa$ B, promoviendo la supervivencia de miofibroblastos y la fibrogénesis hepática. Otros factores como estrés oxidativo, senescencia, autofagia, dieta (colesterol libre) o receptores nucleares (PPAR), también se encuentran involucrados en el proceso fibrogénico que ocurre en NASH (Hardy *et al.*, 2016).

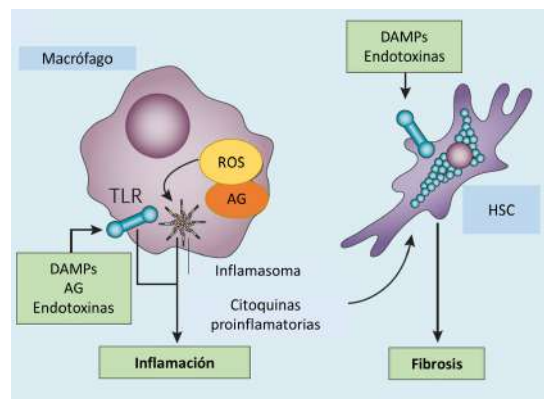


Figura 7. Representación esquemática del papel de macrófagos y HSCs en fibrosis hepática en NASH. Modificado de Brunt *et al.*, 2015. Abreviaturas: AG, ácidos grasos.

## 2.2 Estrategias terapéuticas en NAFLD

Actualmente, ninguna de las aproximaciones terapéuticas empleadas en NAFLD/NASH ha demostrado un beneficio real a largo plazo. Dado que el síndrome metabólico y sus características constituyen el factor de riesgo más importante, las estrategias dirigidas a la **mejora del síndrome**

**metabólico**, como la reducción del peso corporal, una dieta saludable o el ejercicio físico regular, tienen efectos beneficiosos en la reversión de NAFLD, en el riesgo cardiovascular asociado y en la mortalidad total (Leoni *et al.*, 2018). El control de la resistencia a insulina, las dislipidemias o la hipertensión arterial, esta última presente en el 50% de los pacientes con NAFLD, también ha demostrado mejorar la NASH y la fibrosis hepática (Machado y Cortez-Pinto, 2014; Hardy *et al.*, 2016). Una de las aproximaciones más estudiadas es la administración de vitamina E, potente antioxidante que ha demostrado efectos beneficiosos en esteatosis e inflamación lobular, pero no en fibrosis. Existe evidencia de la eficacia clínica de algunos compuestos en fase 3 de ensayos clínicos, entre ellos, un agonista dual de PPAR $\alpha/\delta$  (elafibrinor, NCT03028740) y un antagonista dual de los receptores CCR2/5 de quimioquinas (cencriviroc, NCT03028740) (Tacke, 2018). Por último, otras opciones terapéuticas contemplan dianas extrahepáticas, como los probióticos destinados al tratamiento de la disbiosis intestinal, o combinaciones de varios compuestos (Polyzos *et al.*, 2020). Pese a los recientes avances, no existe en estos momentos **ninguna terapia farmacológica** aprobada para el manejo de NAFLD.

### 3. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT

La vía de señalización intracelular JAK/STAT constituye un mecanismo esencial en multitud de procesos biológicos como diferenciación, proliferación, supervivencia o apoptosis, y tiene un papel clave en la inmunidad innata y adaptativa, así como en la respuesta inflamatoria. En mamíferos se han descrito cuatro miembros de la tirosina quinasa JAK (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2) y siete factores de transcripción STAT (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b y 6) (Xin *et al.*, 2020).

La vía JAK/STAT se activa en respuesta a numerosos ligandos, principalmente citoquinas y factores de crecimiento. Esta vía media la transducción de aproximadamente 60 **citoquinas** diferentes (como las de tipo IL e IFN, eritropoyetina o trombopoyetina, entre otras) así como **hormonas y factores de crecimiento** (GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)) (Xin *et al.*, 2020). Por ello, existe una gran cantidad de **receptores** involucrados en la activación de esta vía, como CCR2, CCR5, IL-6R e IL-10R, o los receptores de leptina, IFN $\gamma$ , GH e insulina (Bousoik y Montazeri Aliabadi, 2018)

La **cascada de señalización** comienza cuando el ligando se une de manera específica a los receptores transmembrana de tipo tirosina quinasa, posibilitando la aproximación entre las proteínas JAK asociadas, que se activan entonces por trans- y/o autofosforilación. Este cambio conformacional permite la fosforilación de residuos de tirosina en el dominio citoplasmático del receptor, creando sitios de reconocimiento SH2 (dominio de homología Scr-2) para las proteínas STAT. Así, los monómeros de STAT que se encuentran latentes en el citoplasma son fosforilados o activados por JAK, generando hetero- u homodímeros que se translocan al núcleo celular, donde se unen a secuencias específicas del DNA, promoviendo y modulando la transcripción de multitud de genes diana (Fig. 8) (Kiu y Nicholson, 2012; Villarino *et al.*, 2015).

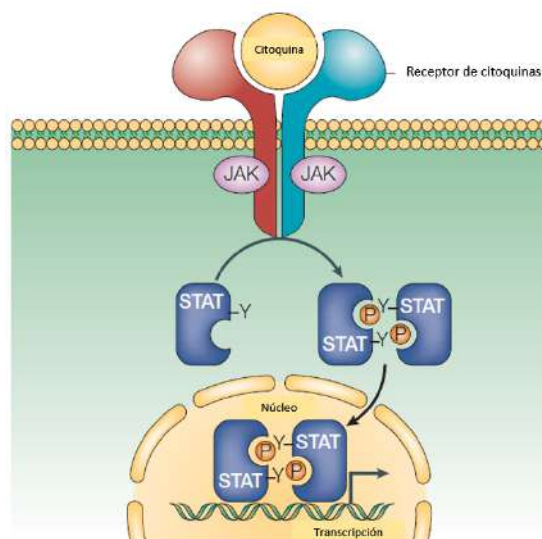


Figura 8. Esquema de la vía de señalización JAK/STAT Modificado de Shuai y Liu, 2003.

Son numerosos los **genes diana** regulados por la vía JAK/STAT. A continuación, se mencionan algunos de los que guardan relación con esta tesis: CCL2, CCL5, CXCL10, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, IFN $\gamma$ , MMP2, MMP9, CD36 y CPT1 (Barclay *et al.*, 2011; Gurzov *et al.*, 2016a; Bousoik y Montazeri Aliabadi, 2018).

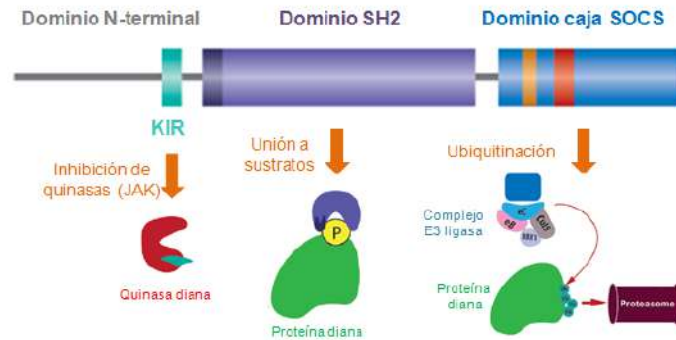
Además, se ha demostrado otro mecanismo de señalización empleado en esta vía a través de los factores de transcripción STAT no fosforilados, que pueden heterodimerizar con otras moléculas (Yang y Stark, 2008). Por ejemplo, STAT3 no fosforilado puede unirse a moléculas no fosforiladas de NF- $\kappa$ B, formando un complejo que activa genes dependientes de esta vía, como CCL5, IL-6 o ICAM-1 (Yang *et al.*, 2007).

### 3.1 Regulación de la vía JAK/STAT: las proteínas SOCS

La vía JAK/STAT controla numerosos procesos de la respuesta inmune, desencadenados por gran variedad de citoquinas y otras moléculas, por lo que es esencial que la transducción de la señal se encuentre finamente regulada, con el fin de evitar una activación excesiva que pueda resultar en una respuesta celular patogénica (inflamación crónica, proliferación aberrante o tumorigénesis, entre otras) (Shuai y Liu, 2003). Por ello, existen diversos mecanismos, principalmente a nivel postranscripcional, que modulan la magnitud y duración de la vía JAK/STAT. Brevemente, los mecanismos de regulación clásicos comprenden la internalización del receptor, la desfosforilación por tirosina fosfatasas (tanto del receptor como de JAK), las proteínas inhibidoras de STAT activado y, por último, de gran relevancia en esta tesis, las **proteínas supresoras de señalización por citoquinas (SOCS)**.

La familia SOCS está constituida por pequeñas proteínas intracelulares cuya función principal es extinguir la señalización de los receptores de citoquinas y factores de crecimiento, tratando de **prevenir una señalización prolongada**. Las proteínas SOCS se inducen directamente en respuesta a la activación de las cascadas de señalización que ellas mismas inhiben, creándose así un clásico bucle de retroalimentación negativa (Kershaw *et al.*, 2013). En mamíferos se han descrito ocho miembros de esta familia: SOCS1-7 y la proteína SH2 inducible por citoquinas. Todas ellas están compuestas por un dominio N-terminal poco conservado de longitud variable, un dominio central SH2 y un dominio C-terminal más conservado, denominado caja SOCS. Gracias a su dominio central, las proteínas SOCS se unen a los residuos de tirosina fosforilados de los receptores de citoquinas activados, o bien a esos mismos residuos de las proteínas JAK. Por otro lado, mediante la caja SOCS, estas proteínas favorecen la ubiquitinación y consecuente degradación proteasomal de ciertas proteínas de señalización celular. Adicionalmente, las

proteínas **SOCS1** y **SOCS3** contienen la denominada **región inhibidora de quinasas (KIR)** (Fig. 9) (Trengove y Ward, 2013). Por tanto, además de suprimir la señalización mediada por ubiquitina, el dominio KIR permite la **inhibición directa de la actividad quinasa**, siendo el mecanismo de supresión más importante de SOCS1 y SOCS3 (Yoshimura *et al.*, 2007).



**Figura 9. Estructura de las proteínas SOCS.** Modificado de Trengove y Ward, 2013.

Las proteínas SOCS tienen un importante papel en homeostasis y en la modulación de la respuesta inmune, promoviendo la resolución eficiente de las cascadas inflamatorias. Entre otras, regulan la señalización mediada por las familias de IL, IFN, la superfamilia TNF y factores de crecimiento (Suchy *et al.*, 2013). Por ejemplo, tanto SOCS1 como SOCS3, los miembros más estudiados por su relevancia, se inducen por IFN $\gamma$  e IL-6, citoquinas clásicamente sobreexpresadas en enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias, y ambos pueden inhibir las respuestas asociadas a estas citoquinas. De hecho, en ausencia de las proteínas SOCS, se produce una activación prolongada de STAT inducida por citoquinas (Kiu y Nicholson, 2012).

### 3.2 La inhibición de la vía JAK/STAT como diana terapéutica

La **desregulación** de la vía JAK/STAT y de las proteínas SOCS se ha descrito en numerosas **enfermedades inmunes e inflamatorias**, como cáncer, diabetes, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, lupus o psoriasis (Gurzov *et al.*, 2016b; Banerjee *et al.*, 2017; Owen *et al.*, 2019; Salas *et al.*, 2020). La vía JAK/STAT conforma una de las vías de señalización más relevantes en enfermedad cardiovascular, participando en la mayoría de las respuestas inflamatorias vasculares (Marrero, 2005) y en desequilibrios metabólicos, como resistencia a insulina y obesidad (Wunderlich *et al.*, 2013a). Concretamente, en esta tesis se ha estudiado la implicación del eje JAK/STAT/SOCS en el daño vascular (AAA) y hepático (NAFLD).

Numerosas moléculas (principalmente citoquinas y factores de crecimiento, pero también LPS, AngII, lipoproteínas, inmunocomplejos, alta glucosa e insulina) que resultan clave en la patogénesis de enfermedades inflamatorias e inmunes transducen su señal a través de la vía JAK/STAT, lo que la convierte a esta vía en una excelente **diana terapéutica** a la que dirigir nuevos tratamientos (Yoshimura *et al.*, 2007).

Los inhibidores de la JAK quinasa o JAKinibs constituyen un conjunto de fármacos sintéticos que inhiben de selectivamente diferentes isoformas de JAK. En los últimos años se ha demostrado su eficacia clínica en el tratamiento de patologías inflamatorias y autoinmunes como artritis reumatoide, colitis ulcerativa o artritis psoriásica, entre otras (T Virtanen *et al.*, 2019). La inhibición de JAK se presenta como una potencial estrategia terapéutica en enfermedades cardiovasculares y metabólicas, que cada vez son más consideradas como un proceso inminentemente inflamatorio, al modularse la señalización de citoquinas clave, como IL-6 o IFN (Schwartz *et al.*, 2017).

El **uso de las proteínas SOCS** para suprimir la señalización de citoquinas puede ser una terapia útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Una de las aproximaciones estudiadas por diversos grupos es la expresión aumentada de las proteínas SOCS. Existe evidencia de que SOCS1 previene la aterosclerosis experimental, mediante la preservación de la función endotelial normal, modulando la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión, y disminuyendo el infiltrado inflamatorio vascular (Qin *et al.*, 2014). Nuestros estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de SOCS1 y SOCS3 suprime la activación de STAT y protege contra la inflamación en modelos experimentales de nefropatía diabética y aterosclerosis (Ortiz-Muñoz *et al.*, 2010; Recio *et al.*, 2015), mientras que su ausencia exacerba la respuesta inflamatoria de las lesiones y acelera el proceso aterogénico (Ortiz-Muñoz *et al.*, 2009). Recientemente, nuestro grupo constató que la expresión aumentada de SOCS1 mediada por adenovirus tiene efectos antioxidantes en las lesiones renales y vasculares en modelos de diabetes experimental (Lopez-Sanz *et al.*, 2018).

Otra aproximación interesante es el desarrollo de **péptidos** permeables, **miméticos de SOCS**, que atraviesan la membrana para introducirse en el interior celular e inhibir específicamente a JAK. Estos péptidos pueden mimetizar o modular la expresión y actividad endógena de las proteínas SOCS en ciertas patologías (Liang, Y. *et al.*, 2014). Los miméticos de SOCS1 y, en concreto, los **miméticos** de la región **KIR-SOCS1** y sus análogos se muestran prometedores en enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes (Ahmed *et al.*, 2015; Durham *et al.*, 2019).

Esta tesis se basa en la **inhibición** de la vía **JAK/STAT** mediante el empleo de **péptidos derivados de SOCS1** en modelos experimentales de AAA y de NAFLD/NASH. Para ello, se han empleados dos péptidos diferentes, denominados **S1** y **PS5**, ambos derivados de la región KIR de la proteína SOCS1. Mientras que S1 mimetiza la región KIR completa (Recio *et al.*, 2014; Recio *et al.*, 2017), PS5 contiene en su secuencia una sustitución por el aminoácido no natural acetaminometil-L-cisteína (Cys(Acm)), que proporciona una mayor resistencia a la degradación por proteasas, confiriéndole mayor estabilidad (La Manna *et al.*, 2017). Los estudios llevados a cabo por nuestro grupo en los últimos años demuestran que el péptido S1 reduce la inflamación y el estrés oxidativo en el daño renal y vascular en modelos animales de diabetes (Recio *et al.*, 2017; Lopez-Sanz *et al.*, 2018; Opazo-Ríos *et al.*, 2020). Recientemente, nuestro grupo ha corroborado que el péptido PS5 muestra propiedades similares en aterosclerosis experimental (La Manna *et al.*, 2020a) y se ha dado comienzo a nuevos estudios con algunos de sus análogos. Por ello, el estudio preclínico de los péptidos miméticos de SOCS1 para inhibir la activación y respuestas dependientes de la vía JAK/STAT podría contribuir al desarrollo de un nuevo abordaje terapéutico para patologías vasculares y hepáticas.



## **III. Objetivos**

Esta tesis se centra en el estudio del aneurisma aórtico abdominal (AAA) y de la esteatosis/esteatohepatitis no alcohólica (NAFLD/NASH), condiciones patológicas muy diferentes entre sí, pero con algunos mecanismos fisiopatológicos comunes. En la actualidad, no disponemos de tratamientos farmacológicos efectivos para ninguna de estas patologías. Por tanto, la posibilidad de una terapia basada en la inhibición de la vía JAK/STAT, una de las principales vías de señalización intracelular que regula múltiples respuestas en el daño vascular y hepático, resulta de potencial interés en el tratamiento de AAA y NAFLD.

La **hipótesis** de este trabajo es que la modulación de la vía JAK/STAT, basada en la familia de proteínas SOCS, y concretamente en SOCS1, puede ser clave para prevenir el desarrollo de las patologías del AAA y de la NAFLD/NASH.

Por tanto, el **objetivo general** de esta tesis es el desarrollo preclínico de dos peptidomiméticos derivados de la región KIR de SOCS1 (S1 y PS5) como potencial estrategia terapéutica para reducir la activación crónica de la vía JAK/STAT en modelos experimentales de daño vascular (AAA) y hepático (NAFLD/NASH).

Los **objetivos específicos** son los siguientes:

**Objetivo 1. Caracterizar las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes del péptido S1 en el daño vascular asociado a AAA:**

- Investigar las propiedades vasculoprotectoras de la terapia con el péptido S1 en un modelo murino de AAA, analizando su impacto en los indicadores de inflamación, estrés oxidativo y proteólisis.
- Explorar *in vitro* los efectos del péptido S1 en la respuesta inflamatoria y el fenotipo de células vasculares y macrófagos.

**Objetivo 2. Estudiar el efecto del tratamiento con los péptidos S1 y PS5 en el desarrollo de daño hepático en modelos experimentales de NAFLD/NASH.**

- Desarrollar y caracterizar dos modelos experimentales diferentes de NAFLD/NASH inducidos por dieta.
- Evaluar las consecuencias del tratamiento con los péptidos S1 y PS5 en modelos animales de NAFLD/NASH, analizando marcadores de metabolismo lipídico, inflamación y fibrosis.
- Analizar en hepatocitos *in vitro* la inhibición de la vía JAK/STAT mediada por S1 y PS5, y sus potenciales efectos antiinflamatorios.

## **IV. Material y métodos**

## 1. PÉPTIDOS MIMÉTICOS DE SOCS1

### 1.1 Péptido S1

El péptido S1 consta de 16 aminoácidos derivados de la región KIR de la proteína SOCS1 murina (residuos 53-68). El dominio KIR es el encargado del bloqueo de la actividad catalítica de las proteínas quinasas JAK, lo que resulta en la inhibición selectiva de la vía de señalización JAK/STAT. La síntesis peptídica se realizó por el método Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) en fase sólida (Proteogenix), adicionando un residuo hidrofóbico (lisina-palmitato) en su extremo N-terminal, lo que confiere al péptido permeabilidad celular. El péptido sintetizado (Pm=2540.81) se purificó mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa y se analizó por espectrofotometría de masas y dicroísmo circular (Recio *et al.*, 2014; Recio *et al.*, 2017). Para los estudios de biodistribución, el péptido se conjugó con el fluoróforo rodamina. El péptido S1 liofilizado se disolvió en tampón fosfato salino (PBS) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración stock de 2 mg/mL, se esterilizó por filtración y las alícuotas se conservaron a -80 C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> para evitar su oxidación.

### 1.2 Péptido PS5

Al igual que S1, PS5 es un péptido basado en la región KIR de la proteína SOCS1 (concretamente los residuos 52-61, cruciales para la interacción con JAK2), pero su secuencia contiene una sustitución en un aminoácido no natural (Cys(Acm)), que proporciona mayor resistencia a la degradación por proteasas, confiriéndole más estabilidad (La Manna *et al.*, 2017). El péptido PS5 está conjugado con una secuencia de permeabilización celular, derivada de la región Tat (transactivador de la transcripción génica) del virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1). El diseño, síntesis y purificación se realizó mediante estrategia Fmoc y cromatografía líquida (La Manna *et al.*, 2017; La Manna *et al.*, 2020b), en estrecha colaboración con el grupo de la Dra. Daniela Marasco (Universidad de Nápoles, Italia). El péptido PS5 (Pm=3177.57) es hidrosoluble, por lo que se disolvió en PBS a una concentración de 1mM, se realizaron alícuotas y se almacenó a -20°C hasta su uso.

## 2. CULTIVOS CELULARES

### 2.1 Cultivos primarios

Las VSMC fueron aisladas a partir de tejido aórtico de ratones C57BL/6 (machos, 12-16 semanas de edad). Los animales fueron sacrificados, las aortas fueron extraídas y se eliminó la

grasa adherida y el tejido conectivo adyacente. Los vasos fueron troceados con bisturí, obteniéndose porciones de aproximadamente 1 mm, que fueron digeridas durante 45 minutos a 37°C en presencia de colagenasa tipo II (4 mg/mL, C6885, Sigma-Aldrich) diluida en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, D6546, Sigma-Aldrich) suplementado con 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina. Tras varias centrifugaciones para retirar la colagenasa, las células se resuspendieron en DMEM con 20% de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) y se sembraron en *flask* de cultivo (25 mm<sup>2</sup>) hasta alcanzar la confluencia adecuada. Las VSMC se mantuvieron a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y su medio fue reemplazado cada 2-3 días. Se realizaron pases sucesivos, disminuyendo la concentración de FBS al 10%, y las células se emplearon para los experimentos correspondientes entre el tercer y el octavo pase.

Los macrófagos derivados de médula ósea (BMDM, del inglés *Bone Marrow Derived Macrophages*) se obtuvieron de ratones C57BL/6 (machos, 12-16 semanas de edad). Tras el sacrificio, se extrajo en esterilidad la médula ósea de fémur y tibia, y la suspensión celular resultante se sembró para su diferenciación durante 7 días en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina y 20% de medio condicionado de L-929 (línea celular de fibroblastos productora de GM-CSF), para inducir la diferenciación celular a macrófagos.

## 2.2 Líneas celulares

Las líneas celulares murinas empleadas fueron: 1) MOVAS, VSMC inmortalizadas con virus SV40 (ATCC® #CRL-2797); 2) RAW 264.7, macrófagos inmortalizados con virus A-MULV (ATCC® TIB-71) y 3) hepatocitos, línea generada a partir de la inmortalización del cultivo primario de hepatocitos neonatales, cedida por el grupo de la Dra. Ángela Valverde (Instituto de Investigaciones Biomédicas – Alberto Sols, Madrid). Todas las líneas descritas fueron sembradas en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina. Además, en las células MOVAS, el medio se suplementó con 0.2 mg/mL de antibiótico G-418 (G1868, Sigma-Aldrich), siguiendo las indicaciones de su ficha técnica. Las células se mantuvieron a 37°C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y se realizaron pases y/o reemplazos del medio de cultivo cada 2-3 días.

## 2.3 Tratamientos y estímulos

Para los experimentos *in vitro*, las células fueron deplecionadas (medio con 0-0.5% FBS) durante 24 horas. Posteriormente, se trataron con los péptidos S1 (59 µM) o PS5 (25 µM) durante los 90 minutos previos al estímulo correspondiente. Las dosis empleadas fueron seleccionadas

en base a los estudios previos del grupo en los que se evaluó la dosis-eficacia y el efecto en la viabilidad celular (Recio *et al.*, 2017; Lopez-Sanz *et al.*, 2018; La Manna *et al.*, 2020).

Las VSMC y los macrófagos (cultivos primarios y líneas celulares) fueron estimulados durante 6 o 24 horas con elastasa pancreática porcina tipo I (actividad específica 7 U/mg, Sigma-Aldrich, E1250; rango de dosis 0.75-2.5 µg/mL) o con péptidos EDP (rango de dosis 0.1-1 µg/mL). Los EDP son pequeños fragmentos liberados por la proteólisis de elastina, e incluyen la secuencia VGVAPG, comúnmente repetida en la molécula de elastina. El hexapéptido EDP (VGVAPG) y la secuencia desordenada empleada como control negativo (VVGPPAG, *Scramble*), fueron sintetizados (Proteogenix), disueltos en 100% DMSO hasta una concentración stock de 1 mg/mL, y conservados a -80 °C hasta su uso. Los rangos de concentraciones empleados se establecieron de acuerdo con la literatura previa (Desforges *et al.*, 2015; Dale *et al.*, 2015) y los estudios de viabilidad realizados antes de los experimentos.

En hepatocitos, se empleó ácido palmítico (PA) (Sigma-Aldrich, P-0500) como estímulo. Para ello, se preparó una solución stock de PA conjugado con albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, A-6003) (2:1), con una concentración final de PA 5 mM, verificada mediante el kit de medición de ácidos grasos no esterificados (NEFA-HR(2), FUJIFILM). La solución resultante se filtró y las alícuotas se mantuvieron a -20°C hasta su uso posterior. Durante los experimentos, los hepatocitos se estimularon durante 6 o 16 horas con la solución de PA. La concentración final de PA en el medio de cultivo (400 µM) se encuentra dentro del rango observado de concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres en pacientes con NASH (200-800 µM) (Sanyal *et al.*, 2001; Belfort *et al.*, 2006).

## 2.4 Ensayos de viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada mediante ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT, M-5655, Sigma-Aldrich). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos por dupli- o triplicado y se deplecionaron durante 24 horas (medio con 0-0.5% FBS). Posteriormente, se añadieron diferentes concentraciones de los estímulos empleados (elastasa, EDP/*Scramble* o PA), empleando 10% de FBS como control positivo. Tras 24 horas, las células se tiñeron con 0.5 mg/mL de MTT y se incubaron durante 1 hora a 37°C. El MTT metabolizado (precipitado púrpura) se dejó secar, se resuspendió en 100 µL/pocillo de DMSO y la absorbancia se midió en un espectrofotómetro a  $\lambda=570$  nm.

## 2.5 Ensayos de migración celular

La capacidad de migración celular se evaluó mediante el ensayo de cierre de herida (*wound-healing in vitro*). Las VSMC inmortalizadas (MOVAS) se cultivaron en placas de 12 pocillos hasta alcanzar el 90-95% de confluencia, se deplecionaron (medio con 0.5% FBS, 24 horas) y se realizaron surcos en forma de "H" en la monocapa celular con la ayuda de una punta de micropipeta P200 estéril. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS y se añadió medio fresco con el estímulo (elastasa, 2.5 µg/mL), en presencia/ausencia del péptido S1. Se monitorizó el cierre de las hendiduras realizadas mediante la toma de imágenes a diferentes tiempos en un microscopio invertido para cultivos celulares (Leica DMI1, Leica Microsystems). Para determinar la velocidad del cierre de herida se cuantificó a distintos tiempos el área libre de células (Image-Pro Plus, Media Cybernetics) y se normalizó respecto al tiempo inicial.

## 2.6 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

La concentración de CCL2 en los sobrenadantes de cultivos celulares se determinó por duplicado mediante ensayo de ELISA, empleando una curva estándar de CCL2 y siguiendo las instrucciones y recomendaciones del kit comercial empleado (DY479, DuoSet ELISA, R&D Systems).

## 2.7 Silenciamiento de SOCS1

Los experimentos de silenciamiento de la proteína SOCS1 se realizaron en la línea de VSMC (MOVAS) con una confluencia del 60-80% en medio de transfección Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher) durante 24 horas, empleando varias dosis (20-40 nmol) de RNA pequeño de interferencia (siRNA) específico para SOCS1 (siRNA SOCS1 Silencer Select s63995, Thermo Fisher) o un siRNA inespecífico como control negativo (Silencer Select Negative Control No.1 siRNA, 4390843, Thermo Fisher), incubados con lipofectamina RNAiMax (13778075, Thermo Fisher). Tras 24 horas de transfección, las células fueron deplecionadas y estimuladas con elastasa para su posterior análisis.

## 2.8 Captación de lípidos

El estudio de la captación de lípidos *in vitro* se realizó en los hepatocitos sembrados en portaobjetos de cultivo celular con cámara (Falcon). Previamente, las células fueron pretratadas con los péptidos S1/PS5 y estimuladas con PA a diferentes tiempos, en las condiciones descritas anteriormente. Para la tinción, las células se lavaron con PBS estéril y se fijaron con formalina 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución madre de tinción se preparó diluyendo

300 mg de Oil Red O (Sigma-Aldrich, O0628) en 100 mL de isopropanol 99%. La solución de trabajo se obtuvo diluyendo la solución madre en H<sub>2</sub>O (2:1), se dejó reposar durante 10 minutos y se filtró. Se retiró la formalina de las células y se lavó con H<sub>2</sub>O. Posteriormente, se añadió isopropanol 60% durante 5 minutos, se retiró para añadir la solución de tinción Oil Red O durante 5 minutos a temperatura ambiente y se realizaron varios lavados con H<sub>2</sub>O. Finalmente, se contrastó con hematoxilina, se lavó con H<sub>2</sub>O y se realizó el montaje del portaobjetos de cultivo con Glycergel (DAKO).

### 3. MODELOS EXPERIMENTALES

Los animales se mantuvieron en jaulas con agua y comida *ad libitum* en ciclos de 12 horas de luz/oscuridad. El cuidado y mantenimiento de los animales empleados, así como los procedimientos llevados a cabo, se realizaron de acuerdo con la normativa nacional y europea vigente relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Real Decreto 53/2013, Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y Recomendación 2007/526/CE). Todos los procedimientos animales realizados fueron previamente evaluados y autorizados por el Comité Ético de Bienestar Animal de IIS-FJD, y por la Comunidad de Madrid (PROEX 116/16 y PROEX 217/19).

#### 3.1 Modelo de AAA mediante perfusión aórtica de elastasa

Para la inducción del AAA experimental se emplearon ratones C57BL/6 (machos, 10-12 semanas de edad, Charles River), a los que se les practicó la perfusión de elastasa en la zona aórtica abdominal infrarrenal. Para ello, a los animales, previamente anestesiados con isoflurano vía inhalatoria, se les practicó una laparotomía vertical y el flujo sanguíneo aórtico fue detenido temporalmente entre las arterias renal e ílica con la ayuda de unas pinzas (*clamps*) de microcirugía vascular. Empleando el estereomicroscopio quirúrgico, se realizó una aortotomía a la altura abdominal indicada con una aguja 30G de calibre y la aorta fue exanguinada. Entonces, se introdujo una aguja no metálica de calibre 34 (MicroFil, World Precision Instruments) con punta roma en la aortotomía realizada y se perfundió la aorta durante 5 minutos con elastasa pancreática porcina tipo I (actividad específica 7 U/mg, Sigma-Aldrich, E1250) o suero salino fisiológico (grupo Sham, NaCl 0.9%). Tras la perfusión, la aortotomía fue reparada con adhesivo tisular Vetbond™ (3M), los *clamps* fueron retirados y se comprobó la restauración del flujo sanguíneo aórtico. Las incisiones practicadas se cerraron con suturas quirúrgicas reabsorbibles (peritoneo) y no reabsorbibles (piel) de 6/0 de grosor. Los animales fueron reanimados y



colocados en una fuente de calor (jaula con base térmica a 37°C), para evitar la hipotermia derivada de la anestesia y contribuir a su recuperación, antes de ser estabulados en condiciones estándar.

Los ratones fueron aleatoriamente distribuidos en tres grupos:

- I) **Sham** (n=19): perfusión aórtica de suero fisiológico.
- II) **AAA Control** (n=22): perfusión aórtica de elastasa + administración de vehículo (3% DMSO).
- III) **AAA + S1** (n=21): perfusión aórtica de elastasa y administración de péptido S1 (125  $\mu$ M, 25 nmol/ratón en 200  $\mu$ L).

Los tratamientos comenzaron un día antes de la inducción del AAA (Fig. 10) y se administraron por vía intraperitoneal, 3 veces por semana. A los 14 días tras la inducción del AAA, los animales fueron eutanasiados mediante sobredosis de anestesia, empleando una mezcla 2:1 de ketamina (Ketolar, Pfizer) e hidrocloreuro de xilacina (Rompun, Bayer). A continuación, tras abrir la cavidad abdominal, se canuló el corazón por el ventrículo izquierdo para perfundir con suero fisiológico, realizando una punción de escape en la vena cava inferior. Se recogieron muestras de sangre y se extrajo la aorta desde el corazón hasta la bifurcación ilíaca, se eliminó el tejido graso adherido y se procesó la región abdominal para estudios histológicos (Sham, n=10; AAA Control, n=12; AAA+S1, n=12) o de expresión génica, en cuyo caso también se recogió la región torácica como control interno individual (Sham, n=9; AAA Control, n=10; AAA+S1, n=9).

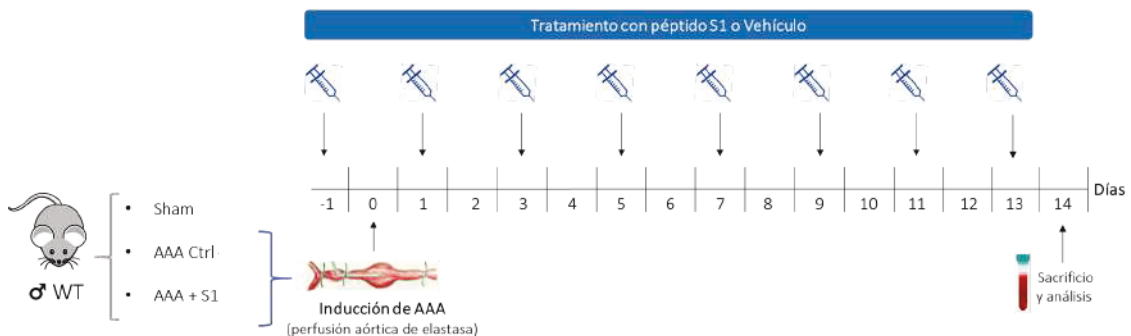


Figura 10. Representación esquemática del modelo de AAA (14 días) mediante perfusión de elastasa.

### 3.1.1 Experimentos de biodistribución del péptido S1

Para los ensayos de biodistribución macroscópica, el péptido S1 marcado con rodamina se inyectó por vía intraperitoneal (n=3 animales) a los 7 días tras la perfusión de elastasa. A las 3, 6, 18 y 24 horas postinyección, los animales fueron anestesiados con isoflurano y observados mediante el sistema de imagen *in vivo* IVIS-Lumina (Caliper Life Sciences,  $\lambda_{exc}$ =540 nm y  $\lambda_{em}$ =570 nm), acoplado al *software* de imagen Living Image (Xenogen). Inmediatamente después del

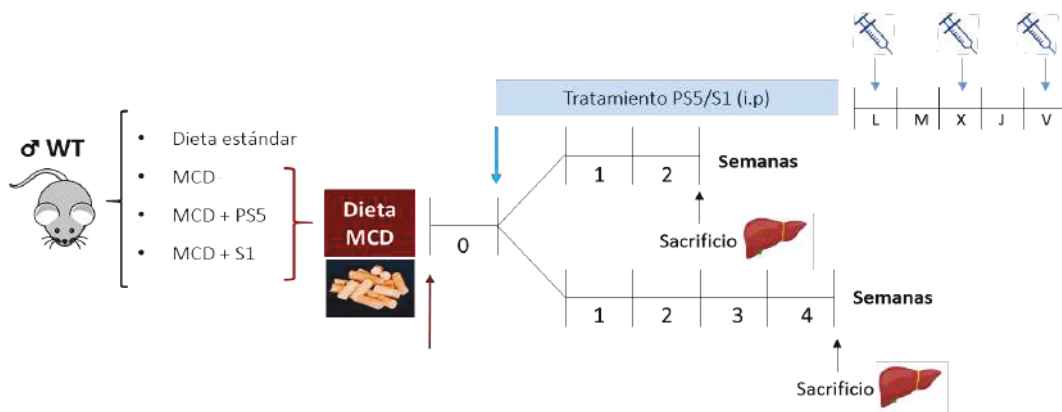
sacrificio de los animales, fueron registradas las imágenes *ex vivo* de diferentes tejidos (corazón, aorta, hígado, bazo y riñón). En paralelo, para comparar la intensidad de fluorescencia del péptido S1 inyectado, se realizaron diluciones seriadas (0.25 – 2 mg/mL) en una placa de 96 pocillos.

### 3.2 Modelos de esteatosis hepática no alcohólica (NAFLD) inducidos por dieta

#### 3.2.1 Modelo de dieta deficiente en metionina y colina (MCD)

Para la inducción de NAFLD/NASH se emplearon ratones C57BL/6 (machos, 20 semanas de edad, Charles River) alimentados con dieta deficiente en metionina y colina (MCD, TD.90262, Envigo). Inicialmente, los animales fueron alimentados durante una semana con dieta MCD y posteriormente, durante 2 o 4 semanas más, a la vez que recibieron el tratamiento con los péptidos PS5 y S1 (dosis de 125  $\mu$ M, 25 nmol/ratón en 200  $\mu$ L) o sus correspondientes vehículos, 3 veces por semana por vía intraperitoneal (**Fig. 11**). Los animales se dividieron aleatoriamente en los diferentes grupos experimentales:

- 1) **Dieta estándar** (n=8).
- o Modelo **MCD a 2 semanas**:
- 2) **MCD** (n=10): administración de vehículos de péptido PS5 (suero fisiológico, n=5) o de péptido S1 (3% DMSO, n=5). Se unifican los grupos vehículo al no encontrarse diferencias entre ellos.
  - 3) **MCD + PS5** (n=7): administración de péptido PS5.
  - 4) **MCD + S1** (n=4): administración de péptido S1.
- o Modelo **MCD a 4 semanas**:
- 5) **MCD** (n=11): administración de vehículos de péptido PS5 (n=5) o de péptido S1 (n=6). Se unifican los grupos vehículo al no encontrarse diferencias entre ellos.
  - 6) **MCD + PS5** (n=7): administración de péptido PS5.
  - 7) **MCD + S1** (n=5): administración de péptido S1.

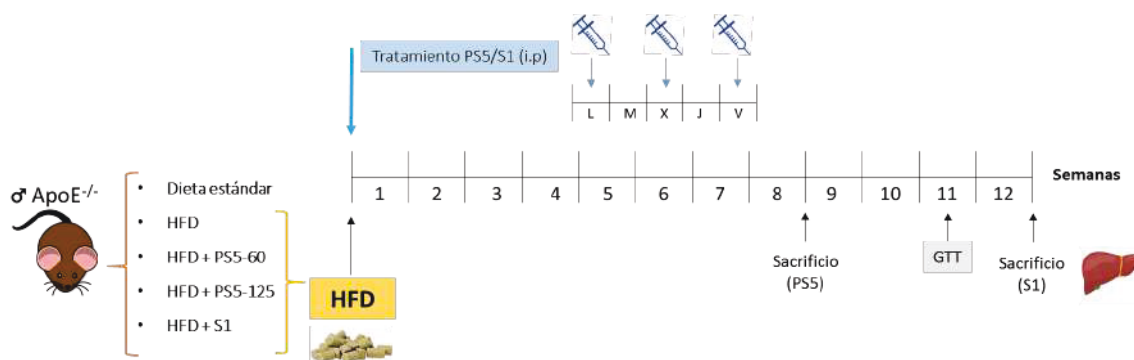


**Figura 11. Representación esquemática del modelo de NAFLD/NASH inducido por dieta deficiente en metionina y colina (MCD).** La dieta MCD se comenzó a suministrar la semana previa al inicio de los tratamientos (PS5/S1), que fueron administrados durante las 2-4 semanas posteriores.

### 3.2.2 Modelos de dieta alta en grasa (HFD)

Para el modelo experimental de NAFLD se emplearon ratones deficientes en apolipoproteína ApoE (ApoE<sup>-/-</sup>) (machos, 10-14 semanas de edad, The Jackson Laboratory) que fueron alimentados con dieta alta en grasa (HFD, *High Fat Diet*) durante 8 semanas (modelo 1) y 12 semanas (modelo 2) (Fig. 12). La dieta empleada (TD.88137, Envigo) contiene en su composición 21% de grasa (el 42% de las calorías ingeridas) y 0.15% de colesterol. Todos los tratamientos o vehículos se inyectaron por vía intraperitoneal, 3 veces por semana. Los animales se dividieron aleatoriamente en los grupos experimentales que se detallan a continuación:

- 1) Dieta estándar (n=6).
- Modelo 1 **HFD, 8 semanas:**
  - 2) HFD (n=9): administración de vehículo (suero fisiológico).
  - 3) HFD+PS5-60 (n=10): administración de péptido PS5, dosis 60 µM (12 nmol/ratón en 200 µL).
  - 4) HFD+PS5-125 (n=8): administración de péptido PS5 125, dosis 125 µM (25 nmol/ratón en 200 µL).
- Modelo 2 **HFD, 12 semanas:**
  - 5) HFD (n=7): administración de vehículo (3% DMSO).



- 6) HFD + S1 (n=7): administración de péptido S1, dosis 125 µM (25 nmol/ratón en 200 µL).

**Figura 12. Representación esquemática del modelo de NAFLD inducido por dieta alta en grasa (HFD).** Los ratones ApoE<sup>-/-</sup> fueron alimentados con dieta estándar o HFD durante 8 semanas (modelo 1, tratamiento con péptido PS5) o 12 semanas (modelo 2, tratamiento con péptido S1).

Para el seguimiento de los modelos de NAFLD/NASH inducidos por dietas, se monitorizó semanalmente el peso corporal y la glucemia de los ratones. Al término de cada modelo, los animales se sacrificaron mediante sobredosis de anestesia, como se describió anteriormente, y se tomaron muestras de sangre. Los hígados extraídos se pesaron para determinar la ratio peso hepático/peso corporal de cada ratón.

### 3.3 Procesamiento de los tejidos

Para los estudios histológicos, los tejidos extraídos se fijaron en 4% paraformaldehído durante 24 horas para su posterior procesamiento e inclusión en parafina, o bien se incluyeron en moldes con OCT (Tissue Tek Compound, Sakura), se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80°C. Para los estudios de expresión génica y proteica, los tejidos fueron congelados en N<sub>2</sub> líquido inmediatamente tras su extracción. Para las determinaciones bioquímicas, se centrifugaron las muestras de sangre (2500 rpm, 15 minutos a 4°C) y se recogió la fase superior resultante (suero).

### 3.4 Análisis de parámetros bioquímicos

La determinación de los niveles de glucosa en sangre se realizó mediante extracción de gotas de sangre capilar, empleando un glucómetro y tiras reactivas convencionales (NovaPro, Menarini Diagnostics). El test de tolerancia a glucosa fue llevado a cabo en un grupo de animales del modelo con HFD para determinar una posible resistencia a la insulina. Para ello, tras 16 horas de ayuno, se administró a los ratones suero glucosado (Braun, 1 mg/kg peso, vía intraperitoneal) y se midieron las glucemias a 0, 15, 30, 60 y 120 minutos.

La concentración de lípidos séricos se llevó a cabo empleando kits comerciales colorimétricos para la determinación de colesterol total (STA-384, Cell Biolabs) y triglicéridos (Ref. 11528, Biosystems). Los niveles de la enzima hepática alanina transaminasa (ALT o GPT) en suero se midieron empleando tiras reactivas específicas (Reflotron Plus, Roche).

### 3.5 Determinación de lípidos intrahepáticos

La extracción de lípidos intrahepáticos fue llevada a cabo a partir de la homogeneización de 10-20 mg de muestra de tejido hepático congelado. Para la extracción y cuantificación del colesterol hepático total, se emplearon los reactivos y se siguieron las instrucciones del kit comercial indicado en el apartado anterior. Para la extracción de triglicéridos, el tejido fue lisado en 500 µL de tampón fosfato pH 7.4, se añadió 1 mL de mezcla 1:1 cloroformo:metanol y se homogeneizó antes de mantenerse en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo y 160  $\mu\text{L}$  de 0.74% KCl, se agitó nuevamente y se centrifugaron las muestras a 2000 rpm durante 5 minutos, recogiendo la fase líquida inferior que se dejó evaporar a 65°C durante 1 hora, tras lo cual los lípidos fueron disueltos en 250  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Para la cuantificación de triglicéridos, se empleó el kit colorimétrico mencionado anteriormente y los valores se normalizaron por la concentración de proteína contenida en cada muestra.

## 4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

En los tejidos incluidos en parafina se realizaron cortes seriados con microtomo (Leica) a 3-4  $\mu\text{m}$ , mientras que los tejidos incluidos en OCT se cortaron en criostato (Leica) a 7  $\mu\text{m}$ . Todas las preparaciones fueron visualizadas mediante microscopía óptica (DMD108, Leica) o microscopía de fluorescencia (Eclipse 4000, *software* ACT-1, Nikon). La adquisición de imágenes se realizó de forma manual en los microscopios indicados, o bien de forma automática con un escáner de portaobjetos (iScan Coreo Slide Scanning System, Roche). El análisis y cuantificación se realizó en 5-10 campos/muestra mediante *software* de imagen Image ProPlus (Media Cybernetics) o ImageJ (National Institutes of Health, NIH).

### 4.1 Tinciones histológicas

#### 4.1.1 Tricrómico de Masson

Los cortes se desparafinaron y se tiñeron empleando un kit comercial (04-0108020/L, Bio Optica), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Esta tinción marca en color verde/azul las fibras de colágeno y en rosa/rojo tejido muscular, citoplasmas y eritrocitos. Las muestras se montaron con resina no acuosa con base de xileno (DPX Mounting Medium, Merck). En las muestras de AAA, la tinción de Masson se empleó para realizar el análisis histomorfométrico de las diferentes secciones aórticas, cuantificando el perímetro de la pared vascular de las lesiones. A partir de la medida máxima para cada lesión de AAA se calculó el diámetro aórtico. El porcentaje de dilatación (incremento del diámetro aórtico) a 14 días se obtuvo considerando que el diámetro medio de una aorta sana es de 0.4 mm. En los cortes de hígado, la tinción sirvió para evaluar la presencia de fibrosis hepática.

#### 4.1.2 Verhoeff-van Gieson

La tinción de fibras elásticas se llevó a cabo en muestras de AAA desparafinadas utilizando el kit de tinción de Verhoeff-van Gieson (HT25A, Sigma-Aldrich) y posterior montaje en medio DPX. Esta tinción marca las fibras elásticas y los núcleos celulares en color negro, y el colágeno en color rosa. En este caso, permitió determinar el grado de preservación o fragmentación de las láminas de elastina (negro), siguiendo la siguiente clasificación: grado 1, láminas intactas y bien organizadas; grado 2, láminas elásticas con algunas interrupciones o rupturas; grado 3, láminas elásticas con múltiples interrupciones o rupturas; grado 4, fragmentación severa de láminas elásticas o pérdida completa de las mismas (Sun *et al.*, 2007).

#### 4.1.3 Hematoxilina – eosina

Los cortes de tejido hepático se desparafinaron y se hidrataron con pases sucesivos de 5 minutos en etanol 99%, etanol 96%, etanol 70% y agua destilada. Una vez hidratados, se sumergieron en hematoxilina de Harris durante 4 minutos y se lavó con flujo continuo de agua. Seguidamente, se realizó la tinción con eosina alcohólica durante 3 minutos. Tras un lavado de 5 minutos con agua, los cortes se deshidrataron con pases sucesivos a etanol en concentraciones crecientes y se montaron con medio DPX.

#### 4.1.4 Oil Red O

La solución de tinción Oil Red O (Sigma-Aldrich) se empleó para la detección y cuantificación del contenido lipídico en secciones congeladas de tejido hepático. Esta tinción permite visualizar los lípidos neutros en color rojo intenso. Las muestras teñidas fueron contrastadas con hematoxilina y se montaron con medio de montaje acuoso (Glycergel, DAKO). Se cuantificaron las gotas lipídicas (rojo), expresándose el resultado como porcentaje de tinción Oil Red O positiva por área total de tejido.

#### 4.1.5 Rojo Sirio

La tinción de Rojo Sirio se empleó para detectar la presencia de fibrosis hepática, evaluándose el contenido de fibras colágeno. Los cortes fueron desparafinados durante 24 horas e hidratados, permaneciendo 5 días en etanol al 70%. Posteriormente, fueron lavados y teñidos con solución de Rojo Sirio en ácido pícrico (rojo picrosirio) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras un lavado de 5 minutos con etanol 100%, las muestras se sumergieron en xilol 5 minutos, y se montaron con medio DPX.

## 4.2 Técnicas inmunohistoquímicas

Para las técnicas inmunohistoquímicas, los cortes fueron desparafinados e hidratados (xilol y gradiente decreciente de etanol). Tras la recuperación antigénica con 0.01 M de tampón citrato pH 6 durante 20 minutos (PT Link, DAKO), se inactivó la actividad peroxidasa endógena con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol (1:1) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS, se realizó el bloqueo de las uniones inespecíficas durante 1 hora a temperatura ambiente empleando una solución de PBS conteniendo 5-8% BSA y 1-4% suero del huésped utilizado en el respectivo anticuerpo secundario. Los anticuerpos primarios se incubaron a 4°C durante toda la noche, según las condiciones indicadas en la **Tabla 1**. Para descartar tinciones inespecíficas, se realizaron controles negativos en cada caso, omitiendo el anticuerpo primario. Al día siguiente, tras un lavado con PBS, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con los anticuerpos secundarios correspondientes (dilución 1/200, Jackson ImmunoResearch) conjugados a peroxidasa de rábano (HRP). En algunos casos, se emplearon anticuerpos secundarios biotinilados, por lo que se utilizó un kit comercial para la detección/amplificación del complejo avidina-biotina-HRP (VECTASTAIN, Vector Laboratories). La detección específica de los anticuerpos fue realizada mediante sustratos cromógenos de la peroxidasa 3'-diaminobenzidina (DAB, Abcam) o 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, DAKO). En su mayoría, se contrastaron durante 30 - 60 segundos con hematoxilina, se deshidrataron y se procedió a su montaje con medio DPX.

Anticuerpo primario	Dilución	Casa comercial (Referencia)	Anticuerpo secundario
<b>Calponina</b>	1/100	Abcam (ab46794)	Conejo-HRP
<b>CD3</b>	1/100	Agilent - Dako (A0452)	Conejo-HRP
<b>CD45R</b>	1/100	BD Biosciences (550286)	Rata-biotina
<b>CD68</b>	1/50	Abcam (ab53444)	Rata-biotina
<b>F4/80</b>	1/70	BioRad (MCA497R)	Rata-biotina
<b>Ly6G</b>	1/20	BioLegend (108402)	Rata-biotina
<b>p-STAT1 (Tyr701)</b>	1/50	Invitrogen (33-3400)	Ratón-HRP
<b>p-STAT3 (Ser727)</b>	1/50	Cell Signaling (9134)	Conejo-HRP
<b>8OHdG</b>	1/200	Abcam (ab10802)	Cabra-biotina

**Tabla 1.** Listado de anticuerpos empleados para técnicas inmunohistoquímicas.

### 4.3 Inmunofluorescencia

La detección de VSMC en lesiones de AAA se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia directa con un anticuerpo específico de  $\alpha$ -SMA conjugado con el fluoróforo Cy3 (Clon 1A4, Sigma, dilución 1/200) y contraste nuclear con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, Sigma; dilución 1/10.000) durante 3 minutos. Las muestras teñidas se montaron con el medio de montaje específico para fluorescencia (FluorSave, Calbiochem) y se realizó la adquisición de imágenes. Esta tinción se empleó para evaluar el grado de pérdida o conservación de VSMC, siguiendo la siguiente puntuación: grado 1, VSMC intactas, bien organizadas; grado 2, VSMC con alteraciones mínimas; grado 3, algunas interrupciones en VSMC y cierta desorganización; grado 4, pérdida severa de VSMC y desorganización marcada (Sun *et al.*, 2007).

### 4.4 Detección de anión superóxido

La producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ) en secciones de tejido aórtico fue analizada mediante tinción con la sonda fluorescente dihidroetidina (DHE, Molecular Probes). Las muestras se incubaron en oscuridad con 5  $\mu$ M de DHE disuelto en tampón KRB-HEPES (119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM glucosa, 10 mM HEPES; pH 7.4) durante 30 minutos a 37°C. Después de 3 lavados en PBS para eliminar el exceso de sonda fluorescente, se realizó el contraste de núcleos con DAPI, se montaron las muestras (FluorSave, Calbiochem) y se procedió a la adquisición de imágenes ( $\lambda_{exc}=518nm$ ,  $\lambda_{em}=606nm$ ). La tinción positiva se expresó como porcentaje o número de células positivas por área de lesión.

### 4.5 Score histopatológico NAFLD

Las tinciones histológicas de las muestras de tejido hepático obtenidas en los modelos de NAFLD/NASH fueron examinadas por el Dr. Hernán Darío Quiceno Arias (H. Fundación Jiménez Díaz) con el fin de cuantificar el daño hepático, empleando para ello el score histopatológico NAFLD establecido para roedores (Liang, W. *et al.*, 2014). Con este criterio, se determinó el grado de esteatosis micro- y/o macrovesicular, la inflamación (infiltrados de células inmunes), la hipertrofia hepatocelular y la presencia de fibrosis.



## 5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

### 5.1 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA de tejidos o cultivos celulares, se empleó el reactivo TRI Reagent (Molecular Research Center), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la adición de 200  $\mu$ L de cloroformo (Merck), las muestras fueron agitadas por inversión, incubadas durante 3 minutos a temperatura ambiente y centrifugadas a 12.000 rpm (4°C) durante 15 minutos. A la fase superior recolectada se le añadieron 500  $\mu$ L de alcohol isopropílico para la precipitación del RNA, que permaneció congelada durante toda la noche a -80°C. Tras lavados y centrifugaciones sucesivas con etanol al 70% y 100%, el pellet de RNA resultante se dejó secar a temperatura ambiente para posteriormente ser resuspendido en agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del RNA resultante se evaluó mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) y las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

### 5.2 Retrotranscripción

La retrotranscripción a DNA complementario se realizó a partir de 1-1.5  $\mu$ g RNA empleando un kit comercial (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) en un termociclador estándar (Applied Biosystems) con las condiciones previamente establecidas (10 minutos 25°C, 2 horas 37°C y 5 minutos 85°C).

### 5.3 PCR cuantitativa (qPCR)

El análisis cuantitativo de los niveles de mRNA se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Para la mayoría de los genes estudiados se emplearon cebadores comerciales Taqman (Thermo Fisher) (**Tabla 2**) y el sistema de detección secuencial con TaqDNA polimerasa activada por calor (Pmix Taq DNA Polymerase, Takara), realizando un paso de inicial de 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C, y 40 ciclos posteriores de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. En algunos casos, se emplearon cebadores no comerciales diseñados (*software* Primer-BLAST, NCBI-NIH) y sintetizados por Eurofins (**Tabla 3**), realizándose la reacción de amplificación con la mezcla SYBR Premix Ex Taq (Takara) y un programa de tres etapas: desnaturalización inicial (2 minutos a 50°C y 5 minutos a 95°C), reacción en cadena de la polimerasa (40 ciclos de 1 minuto a 94°C y 40 segundos a 60°C) y disociación (15 segundos a 98°C). La amplificación de los genes de interés se realizó siempre por duplicado en un termociclador (7500 de Applied Biosystems) y los resultados fueron normalizados por los niveles

de expresión del gen 18S rRNA (4333760T, Applied Biosystems), amplificado en paralelo. Los datos se analizaron empleando el *software* 7500 System SDS v1.2b1c3 (Applied Biosystems).

Gen	Referencia	Gen	Referencia
<i>Abca1</i>	Mm00442646_m1	<i>Il-10</i>	Mm00439614_m1
<i>Abcg1</i>	Mm00437390_m1	<i>Il-17</i>	Mm00439618_m1
<i>Acta2</i>	Mm01546133_m1	<i>Klf4</i>	Mm00516104_m1
<i>Ccl2</i>	Mm00441242_m1	<i>Mmp2</i>	Mm00439498_m1
<i>Ccl5</i>	Mm01302428_m1	<i>Mmp9</i>	Mm00442991_m1
<i>Cd206</i>	Mm01329362_m1	<i>Pgc1α</i>	Mm01208835_m1
<i>Cd36</i>	Mm01135198_m1	<i>Sm22α</i>	Mm00441660_m1
<i>Chop</i>	Mm01135937_m1	<i>Socs1</i>	Mm00782550_s1
<i>Col1a1</i>	Mm00801666_g1	<i>Socs3</i>	Mm00545913_s1
<i>Cpt1a</i>	Mm01231183_m1	<i>Stat1</i>	Mm00439531_m1
<i>Cxcl10</i>	Mm00445235_m1	<i>Stat3</i>	Mm01219775_m1
<i>Icam1</i>	Mm00516023_m1	<i>Tgf-β</i>	Mm01178819_m1
<i>Ifnγ</i>	Mm01168134_m1	<i>Timp1</i>	Mm00441818_m1
<i>Il-1β</i>	Mm00434228_m1	<i>Timp2</i>	Mm00441825_m1
<i>Il-6</i>	Mm00446190_m1	<i>Tnfa</i>	Mm00443258_m1

Tabla 2. Listado de sondas Taqman (ThermoFisher) empleadas en qPCR.

Gen	Secuencia cebador directo (5'-3')	Secuencia cebador inverso (3'-5')
<i>Arg1</i>	TAGGGTTACGGCCGGTGGAGAGGA	TGCTGCATGTGCTCGGGCTGT
<i>Arg2</i>	TTGGCCTGAGAGATGTGGAGCCTCC	ACTCAGGTGGATTGGCCTCTGCC
<i>Inos</i>	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG
<i>Nox1</i>	CCAACAGGCCATGGATGGAT	CACTCCAGTAAGGCCAGCAA
<i>Nox2</i>	AACTCAGAATCCGGCCCGCGT	AGGGGGCCTGTGTCATTGTGATT
<i>18S rRNA</i>	CCGTCGTAGTCCGACCATAA	CAGCTTTGCAACCATACTCCC

Tabla 3. Listado de cebadores murinos SYBR empleados en qPCR.

## 6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

### 6.1 Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas de cultivos celulares, las células fueron despegadas de la placa de cultivo y lavadas con PBS frío. Para la extracción de proteína de órganos animales, el tejido congelado fue disgregado con un homogeneizador manual. En ambos casos, se empleó un tampón de lisis compuesto por 10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl con 1% Triton X-100, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF, 0.2 mM PMSF y 10 µL/mL de cóctel de inhibidor de proteasas. Los lisados resultantes fueron centrifugados a 12.000 rpm (4°C) durante 15 minutos y los sobrenadantes obtenidos se congelaron a -80°C hasta su posterior detección y cuantificación mediante ensayo colorimétrico de ácido bicinconínico (BCA, Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific).

### 6.2 Western blot

Se tomaron 30-35 µg de cada muestra en volúmenes iguales de tampón Laemmli (0.5M Tris-HCl pH 6.8, 10% dodecil sulfato sódico (SDS), 30% glicerol y 0.5% azul de bromofenol) con 8% β-mercaptoetanol y se desnaturalizaron (5 minutos a 95°C). Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis (25 mA/gel) en geles de poliacrilamida al 10% con SDS y se transfirieron mediante método semiseco (50 minutos a 20V) a membranas de fluoruro de polivinilideno (Millipore) previamente activadas con metanol, en tampón de transferencia 5 mM Tris pH 8.3, 150 mM glicina y 20% de metanol. Las membranas fueron bloqueadas con 8% de leche desnatada en tampón Tris-salino (1 mM Tris pH 7.5 y 10 mM NaCl con 0.1% Tween-20) (TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente, con el fin de evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios a las membranas. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 4**) durante toda la noche a 4°C en rotación. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo, y fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (Jackson ImmunoResearch) conjugado con HRP (dilución 1/2000). El revelado de las proteínas se realizó mediante detección quimioluminiscente, empleando el reactivo comercial Luminata Crescendo (Millipore) en el sistema Imager 600 (Amersham). Los anticuerpos frente a β-actina o β-tubulina se emplearon como controles de carga (**Tabla 4**).

Proteína	Reactividad	Huésped	Dilución	Casa comercial (Referencia)
<b>p-STAT1 (Tyr701)</b>	Ratón	Ratón	1/1000	Invitrogen (33-3400)
<b>p-STAT3 (Ser727)</b>	Ratón	Conejo	1/1000	Cell Signaling (9134)
<b>STAT1</b>	Ratón	Conejo	1/1000	Cell Signaling (9172)
<b>STAT3</b>	Ratón	Ratón	1/1000	Cell Signaling (9139)
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Ratón	Ratón	1/5000	Sigma (A1978)
<b><math>\beta</math>-tubulina</b>	Ratón	Ratón	1/5000	Sigma (T5168)

Tabla 4. Listado de anticuerpos empleados en Western blot.

## 7. MEDIDA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE METALOPROTEINASAS

La actividad de las MMPs se midió en suero de ratones y en sobrenadantes de cultivos celulares mediante zimografía en geles de acrilamida con gelatina. Los sobrenadantes de cultivos celulares fueron recogidos, centrifugados para eliminar las partículas en suspensión y concentrados 4-6 veces con un dispositivo de filtración centrífuga (Amicon Ultra-0.5 10KDa, Millipore). Se tomaron iguales volúmenes de todas las muestras, que se resuspendieron en tampón Laemmli en condiciones nativas (sin  $\beta$ -mercaptoetanol ni desnaturalización por calor) para preservar la integridad de las MMPs, y se cargaron en geles comerciales de 10% acrilamida con 1mg/mL gelatina (Novex Zymogram Plus Gels, ThermoFisher Scientific). Tras la electroforesis (90-110 V durante 2.5-3 horas) se realizaron 3 lavados de 30 minutos en agitación con 2.5% Triton X-100, y un último lavado de 30 minutos con H<sub>2</sub>O. Los geles se incubaron durante toda la noche a 37°C en una solución que favorece la actividad enzimática de las MMPs (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>) y posteriormente se tiñeron con colorante Azul de Coomassie (R-250, diluido en 10% ácido acético y 20% metanol) durante 1 hora, eliminando el exceso al finalizar. Las bandas de color blanco sobre el fondo azul indican actividad gelatinolítica de las MMPs. Los geles fueron fotografiados con transiluminación (Amersham Imager 600) para su posterior densitometría (Quantity One, BioRad).

## 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las valoraciones en las muestras procedentes de animales o experimentos celulares se determinaron por dupli- o triplicado y los resultados se expresan como datos individuales y/o

promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM). Los análisis estadísticos correspondientes se han llevado a cabo empleando el programa GraphPad Prism v.8 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Los datos fueron sometidos al test de normalidad de D'Agostino-Pearson, y al test de Barlett para comprobar la homogeneidad de la varianza. Los análisis de correlación se diseñaron para parámetros que seguían una distribución normal. La significancia estadística ha sido fijada en  $p < 0.05$ , empleando la prueba t de Student (dos colas) y la prueba ANOVA de una o dos vías, seguida del test *post hoc* para comparaciones múltiples (Bonferroni o Tukey, respectivamente). Los resultados expresados como incrementos (número de veces o porcentaje) respecto a condiciones Sham o Basal fueron sometidos al test no paramétrico de Mann-Whitney o al test de Kruskal-Wallis junto con el test de comparaciones múltiples de Dunn, para evitar variación indeseada.

# V. Resultados

# 1. ESTUDIO PRECLÍNICO DEL PÉPTIDO S1 EN EL AAA EXPERIMENTAL

## 1.1 Activación del eje JAK/STAT/SOCS en AAA experimental

Para investigar la interacción entre la activación de la vía JAK/STAT y la formación del AAA, se estudió la fosforilación de los factores de transcripción STAT1 (p-STAT1) y STAT3 (p-STAT3) mediante inmunohistoquímica en secciones aórticas del modelo murino de AAA por perfusión de elastasa. Los resultados mostraron una clara activación de STAT1 (Fig. 13A) y STAT3 (Fig. 13B) en las lesiones de AAA, colocalizando con zonas de tinción positiva de macrófagos F4/80.

Adicionalmente, se estableció una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los niveles de activación de STAT1/3 en las lesiones y el tamaño (incremento del diámetro aórtico) de las mismas (Fig. 13C). Los análisis de regresión también mostraron una correlación positiva entre los niveles de expresión de *Socs1/3* y *Stat1* (Fig. 13D) o *Stat3* (Fig. 13E) en aorta.

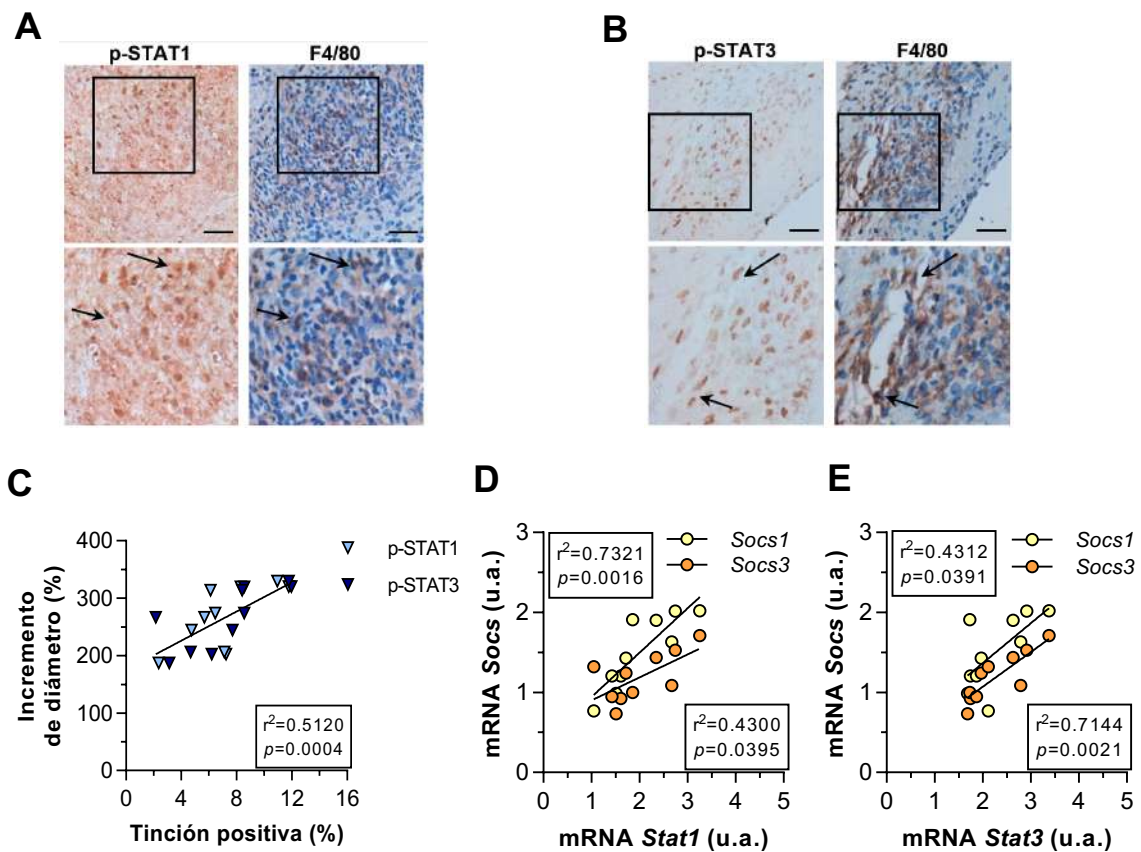
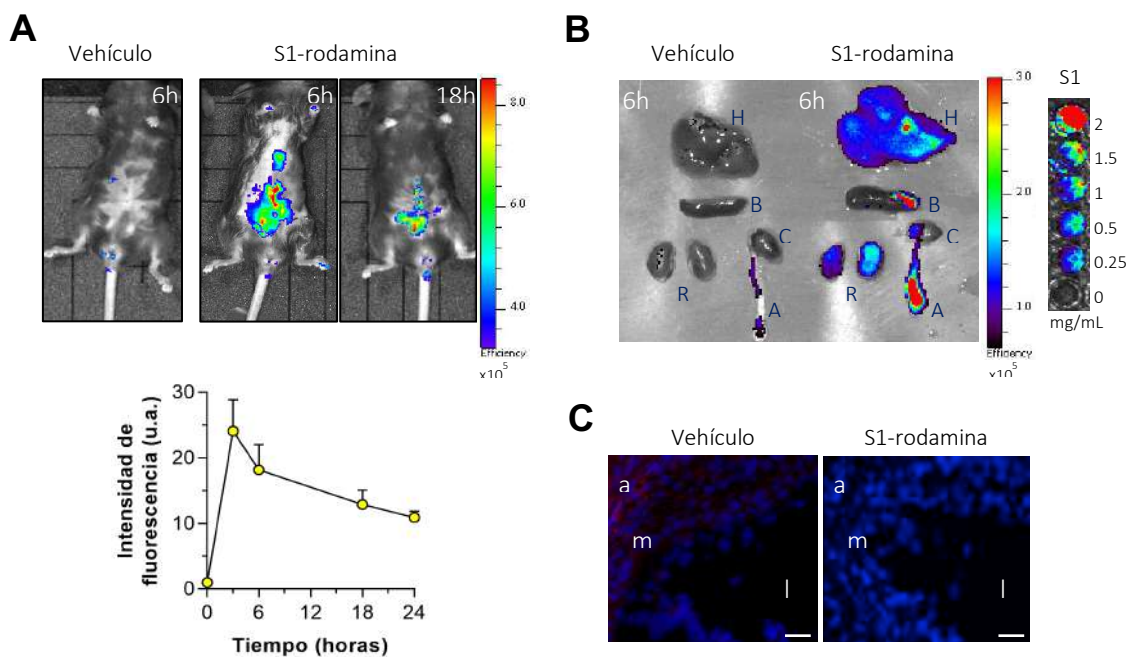


Figura 13. Activación de la vía JAK/STAT en el AAA experimental. Inmunohistoquímica de (A) p-STAT1 y (B) p-STAT3 y colocalización con macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) en aortas del modelo murino de perfusión de elastasa. Imágenes representativas (barra de escala = 50  $\mu$ m) y áreas rectangulares aumentadas. Las flechas indican células positivas. (C) Análisis de correlación de Pearson entre la tinción positiva p-STAT1/3 (% del área total) y el tamaño de las lesiones (% diámetro). (D, E) Correlación de la expresión de *Socs1/3* con (D) *Stat1* y (E) *Stat3* en tejido aórtico murino con AAA (n=10). Los valores de qPCR se encuentran normalizados con respecto al gen 18S rRNA y expresados como unidades arbitrarias (u.a.). En recuadros se indican los valores de correlación ( $r^2$ ) y significación (p).

## 1.2 Biodistribución del péptido S1 en AAA

Antes de analizar el efecto del tratamiento con péptido S1 en el modelo experimental de AAA, se llevaron a cabo estudios de biodistribución mediante imagen *in vivo* y *ex vivo*. Para ello, se realizó una inyección intraperitoneal del péptido S1 marcado con rodamina en ratones a los 7 días tras la inducción del AAA mediante perfusión aórtica de elastasa. Las imágenes *in vivo*, tomadas a las 3, 6, 18 y 24 horas después de la administración del péptido S1, evidenciaron un acúmulo de fluorescencia en los tejidos de los animales, incluyendo la región abdominal donde se localizan las lesiones, mientras que no se observó señal fluorescente en los animales que recibieron vehículo (Fig. 14A).

Posteriormente, las imágenes *ex vivo* mostraron fluorescencia en el área de la lesión aórtica, así como en los órganos principales (hígado, riñones, bazo y corazón) (Fig. 14B). Además, se examinó la distribución microscópica del péptido en secciones aórticas, confirmando que S1 se localiza en el área de la lesión aneurismática (Fig. 14C).

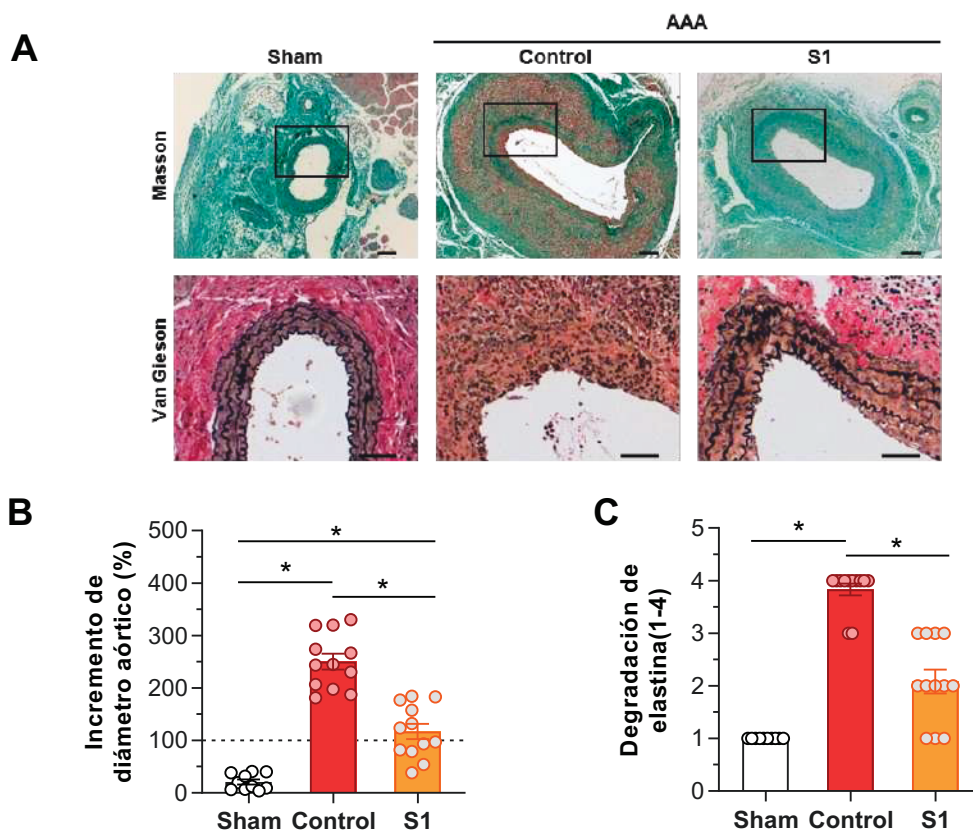


**Figura 14. Biodistribución del péptido S1 en el modelo murino de AAA. (A)** Imágenes representativas *in vivo* (sistema IVIS) de la fluorescencia en ratones con AAA a las 6 y 18 horas de la inyección de péptido S1 marcado con rodamina (arriba) y resumen de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo (abajo). **(B)** Imágenes *ex vivo* de los tejidos murinos extraídos 6 horas tras la inyección de S1 (izquierda) y fluorescencia de diluciones seriadas del péptido S1 en placa de 96 pocillos (derecha). H, hígado; B, bazo; C, corazón; R, riñones; A, aorta. **(C)** Imágenes de microscopía de fluorescencia en secciones aórticas (barra de escala = 25 $\mu$ m) mostrando la distribución de S1 (rojo) y contraste nuclear con DAPI (azul) a las 6 horas de su administración (a, adventicia; m, media; l, lumen).



### 1.3 El tratamiento con S1 reduce la incidencia de AAA y el tamaño de las lesiones

Para examinar los efectos de la terapia con S1 en la formación del AAA, se administró el compuesto o su vehículo a los ratones perfundidos con elastasa. A los 14 días de la inducción del modelo, se realizó el examen histológico de las lesiones vasculares mediante tinción de tricrómico de Masson en secciones consecutivas de la aorta abdominal, determinando para cada animal el valor máximo del diámetro aórtico. Las imágenes revelaron una importante dilatación en la aorta abdominal de los animales perfundidos con elastasa (grupos con AAA) en comparación con aquellos perfundidos con suero fisiológico (grupo Sham) (Fig. 15, A y B).



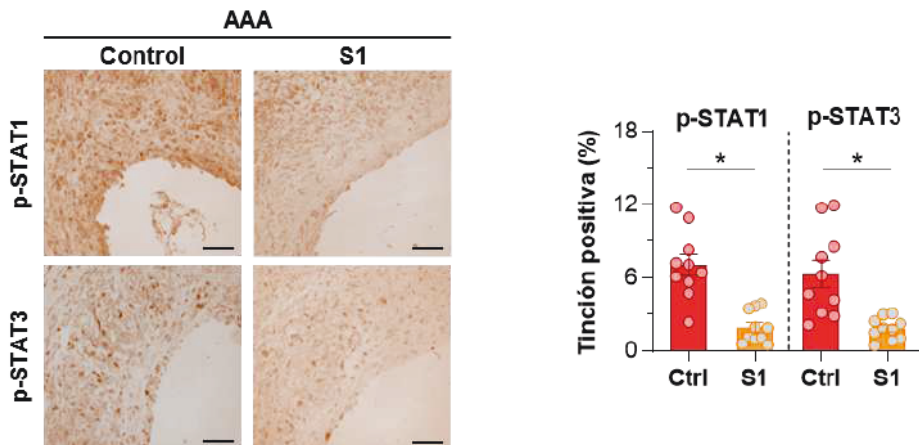
**Figura 15. La administración del péptido S1 reduce la formación de AAA inducido por elastasa y disminuye el tamaño de las lesiones.** (A) Imágenes representativas (barra de escala = 100  $\mu$ m) de las tinciones de tricrómico de Masson y Verhoeff-van Gieson (rectángulos aumentados) en secciones aórticas de ratones Sham (n=10) y AAA (Control, n=12; S1, n=12) a los 14 días de la inducción del AAA. (B) Cuantificación del incremento del diámetro aórtico en tinciones Masson. (C) Cuantificación de la degradación de fibras elásticas en tinciones Verhoeff-van Gieson (puntuación 1-4). Se muestran los datos individuales y el promedio  $\pm$  EEM del total de animales por grupo. \*,  $p < 0.05$ .

La incidencia de AAA, definida como un incremento del 100% sobre el diámetro aórtico inicial, fue sustancialmente menor en los animales perfundidos con elastasa y tratados con péptido S1 (incidencia del 50%, 6/12) en comparación con el grupo control que recibió vehículo (incidencia del 100%, 12/12). Además, el tratamiento con S1 redujo de forma significativa la

dilatación aórtica máxima, observándose una disminución del  $47\pm 6\%$  con respecto al grupo control (Fig. 15B). Por último, para evaluar la degradación de las fibras elásticas en la lámina media de las lesiones AAA se realizó la tinción histológica de Verfoeff-van Gieson (Fig. 15A). La cuantificación mostró una mayor conservación de las láminas de elastina en los animales tratados con S1 en comparación con el grupo control (Fig. 15C).

#### 1.4 La terapia con S1 inhibe la activación de la vía JAK/STAT en aorta

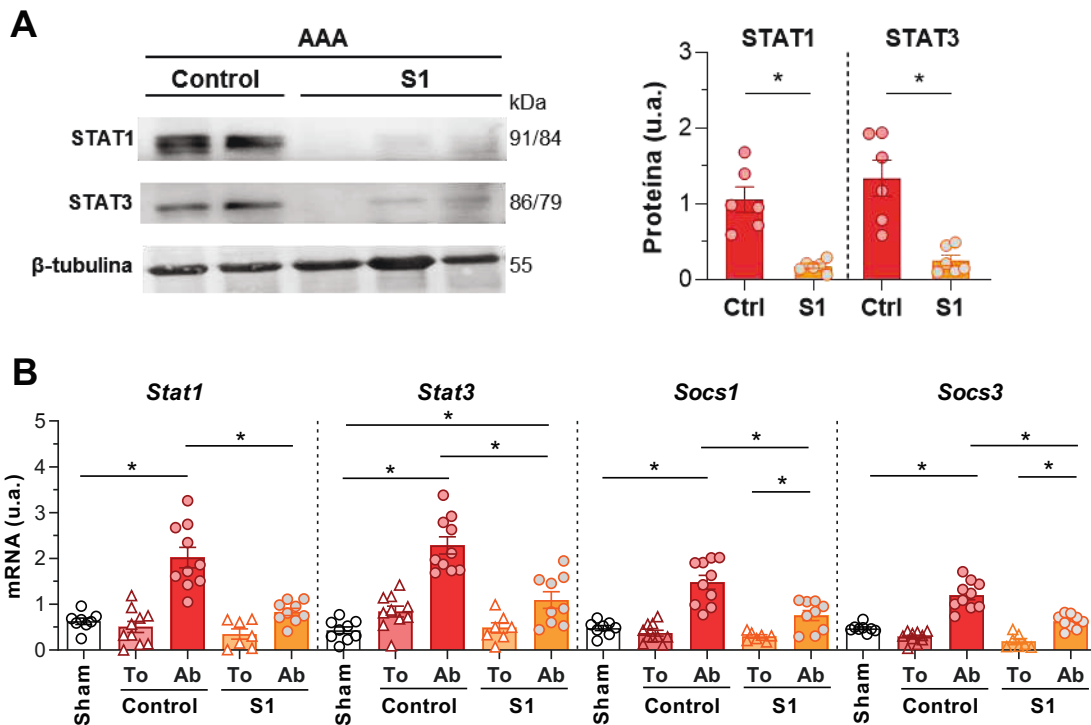
Para examinar los efectos de la terapia con S1 en los ratones con AAA, se valoró en primer lugar la capacidad del péptido de inhibir la activación de la vía JAK/STAT *in vivo*. Mediante inmunohistoquímica de p-STAT1/3, se observó que los animales tratados con péptido S1 mostraban una reducción significativa de los niveles de activación de STAT1 y STAT3 en las lesiones aórticas (Fig. 16).



**Figura 16. Inhibición de la activación de la vía JAK/STAT mediada por S1 en el AAA experimental.** Imágenes representativas (barra de escala = 50  $\mu\text{m}$ ) de la detección inmunohistoquímica de p-STAT1/3 en lesiones de AAA a 14 días y cuantificación del porcentaje de la tinción positiva (Control, n=10; S1, n=10). Se muestran valores individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo. \*,  $p < 0.05$ .

De manera complementaria, se analizó la expresión proteica de los factores de transcripción STAT1 y STAT3 mediante Western blot, confirmándose menores niveles de estas proteínas en los extractos de aorta abdominal de los animales tratados con S1, comparado con el grupo control que recibió vehículo (Fig. 17A). Los análisis mediante qPCR corroboraron una disminución notable de los niveles de expresión génica de *Stat1*, *Stat3*, *Socs1* y *Socs3* en la aorta

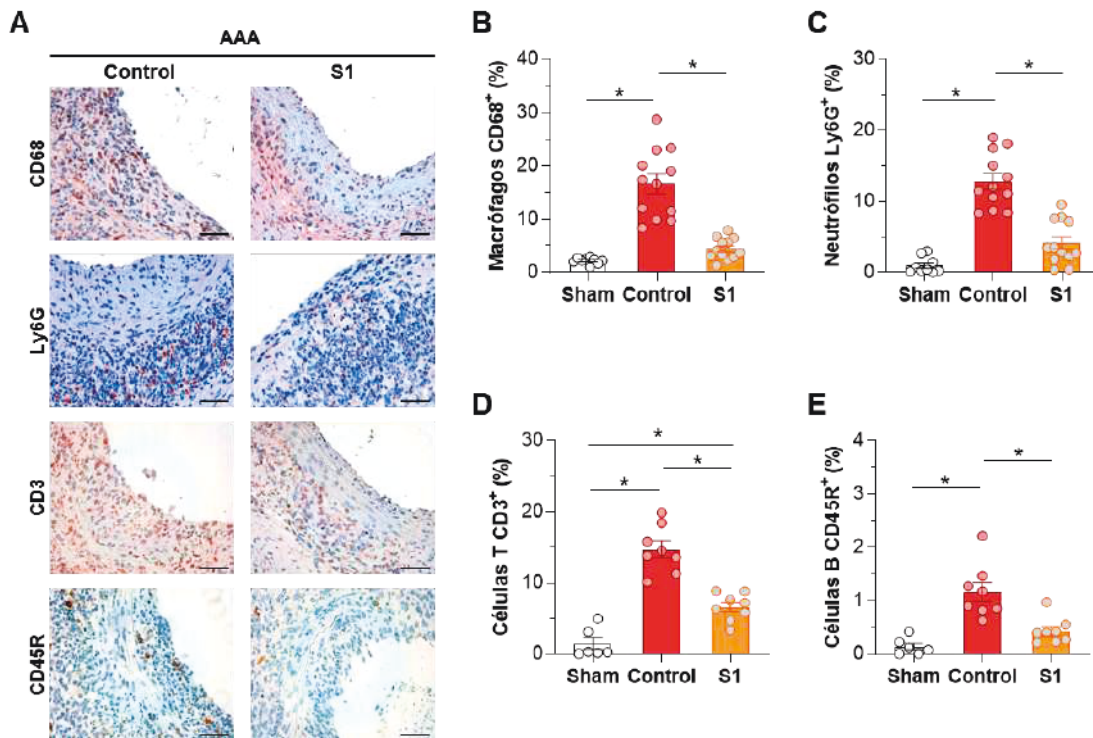
abdominal de los animales tratados con péptido S1, comparado con las regiones torácicas aórticas de estos mismos animales con AAA (Fig. 17B).



**Figura 17.** Inhibición de la vía JAK/STAT mediada por S1 en el AAA experimental. **(A)** Western blot representativo de proteínas STAT1/3 y  $\beta$ -tubulina (control de carga) en aorta abdominal a 14 días tras la inducción de AAA y cuantificación por densitometría (Control, n=6; S1, n=6), normalizada por control de carga y expresada en unidades arbitrarias (u.a.). **(B)** Análisis de qPCR a tiempo real de mRNA de *Stat1/3* y *Socs1/3* en aorta torácica (To) y aorta abdominal (Ab) de ratones con AAA, y en aorta abdominal de ratones Sham. Se muestran los datos individuales y el promedio  $\pm$  el EEM del total de animales por grupo (Sham, n=9; Control, n=10; S1 n=9). \*, p<0.05.

### 1.5 El péptido S1 reduce la inflamación y el estrés oxidativo en AAA experimental

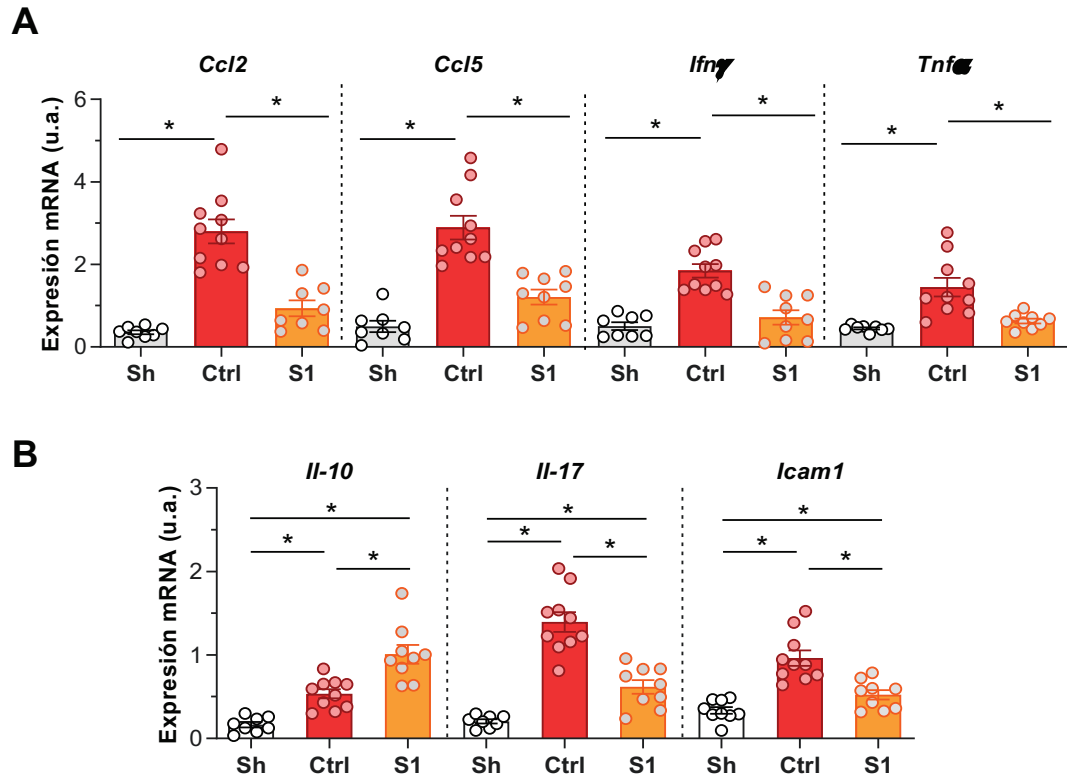
Las secciones aórticas con AAA que presentaban la máxima dilatación se analizaron mediante técnicas inmunohistoquímicas para evaluar su contenido en células inflamatorias y la expresión de moléculas inflamatorias relevantes implicadas en la fisiopatología del AAA. En comparación con el grupo control, los animales tratados con péptido S1 exhibían un menor contenido de macrófagos (CD68<sup>+</sup>), neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>), linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) y linfocitos B (CD45R<sup>+</sup>) infiltrados en el lugar de la lesión (Fig. 18).



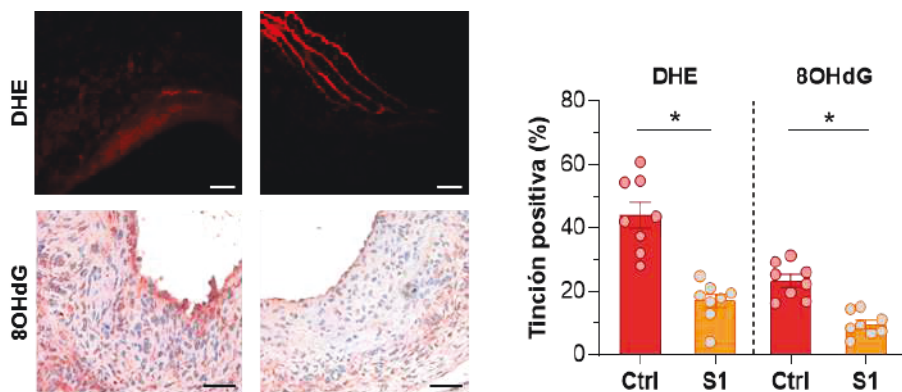
**Figura 18. Estudio del infiltrado inflamatorio en las lesiones de AAA.** (A) Imágenes representativas (barra de escala = 50  $\mu$ m) de la detección inmunohistoquímica de macrófagos (CD68<sup>+</sup>), neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>), linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) y B (CD45R<sup>+</sup>). Análisis cuantitativo de (B) macrófagos, (C) neutrófilos, (D) linfocitos T y (E) linfocitos B, expresado como % de células positivas por área de lesión. Se muestran los datos individuales y el promedio  $\pm$  EEM del total de animales por grupo (Sham, n=6-9; Control, n=8-12; S1, n=8-12). \*, p<0.05.

Simultáneamente, se analizó la expresión de génica de quimioquinas (*Ccl2* y *Ccl5*) y citoquinas proinflamatorias (*Ifny*, *Tnfa* e *Il-17*) y de la molécula de adhesión intercelular *Icam1*. El tratamiento con S1 redujo significativamente la expresión génica de estas moléculas inflamatorias en aorta, a la vez que incrementó los niveles de mRNA de la citoquina antiinflamatoria *Il-10* (Fig. 19).

Debido a la relevancia del estrés oxidativo en la progresión del AAA, se analizaron marcadores específicos en las lesiones aórticas. Por una parte, se evaluó la producción de ROS, en concreto, los niveles de anión superóxido, empleando la sonda fluorescente DHE. Por otra parte, se realizó la detección inmunohistoquímica de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8OHdG), un indicador del daño oxidativo en el DNA. La cuantificación de la tinción positiva demostró una disminución significativa de ambos marcadores de estrés oxidativo en las lesiones AAA de los ratones tratados con péptido S1 (Fig. 20).



**Figura 19.** La terapia con S1 reduce la expresión de genes inflamatorios en el AAA experimental. (A, B) Análisis de qPCR de la expresión de mRNA en tejido aórtico abdominal de animales 14 días tras la perfusión con suero fisiológico (Sham) o elastasa (Control o S1). Los valores se encuentran normalizados respecto al gen 18S rRNA y expresados como unidades arbitrarias (u.a.). Se muestran los datos individuales y el promedio  $\pm$  EEM del total de animales por grupo (Sham, n=6-9; Control, n=8-12; S1, n=8-12). \*, p<0.05.

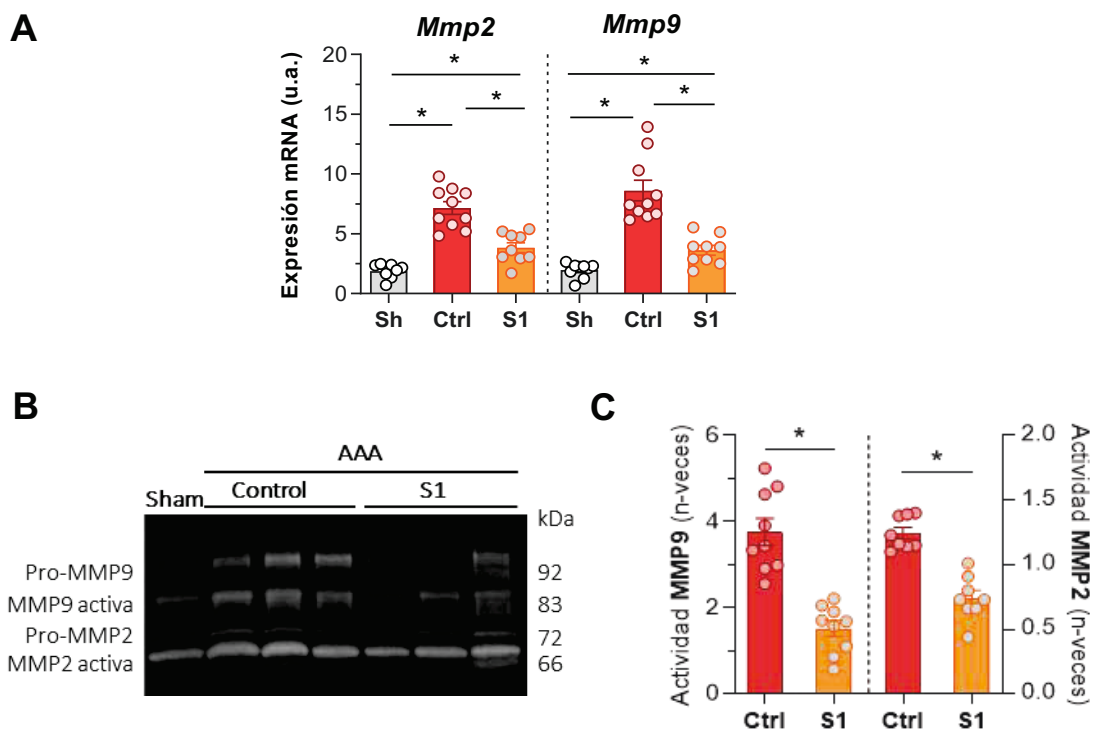


**Figura 20.** El péptido S1 reduce marcadores de estrés oxidativo en secciones aórticas de AAA. Imágenes representativas de la tinción de anión superóxido (fluorescencia DHE) y del marcador de daño oxidativo en DNA (8OHdG) en lesiones de AAA 14 días tras la inducción de elastasa (barra de escala = 50  $\mu$ m) y cuantificación de la tinción positiva de DHE y 8OHdG por área de lesión. Se muestran los datos individuales y el promedio  $\pm$  EEM del total de animales por grupo (Control, n=8; S1, n=8). \*, p<0.05.

## 1.6 Efectos de S1 en la expresión y actividad enzimática de metaloproteinasas

Las MMPs cumplen un papel crucial en la fisiopatología del AAA. Entre las diferentes MMPs implicadas, evaluamos la expresión de mRNA de *Mmp2* y *Mmp9* en el tejido aórtico de los animales con AAA. En comparación con el grupo Sham, los ratones del grupo control mostraron un incremento en la expresión de ambas MMPs, que se redujo significativamente en el grupo de tratamiento con péptido S1 (Fig. 21A).

A continuación, se estudió la actividad gelatinolítica de MMP2 y MMP9 en el suero de los animales. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de zimografía en geles de poliácridamida con gelatina. La cuantificación de las bandas degradadas constató una menor actividad enzimática, tanto de MMP2 como de MMP9, en los sueros de animales con AAA que habían sido tratados con S1, con respecto al grupo control (Fig. 21, B y C).



**Figura 21. El péptido S1 disminuye la expresión génica y actividad enzimática de MMPs. (A)** Análisis de qPCR en tejido aórtico abdominal de animales del modelo experimental de AAA. Los valores se encuentran normalizados respecto al gen 18S rRNA y expresados como unidades arbitrarias (u.a.). **(B)** Imágenes representativas de zimografía (gelatina) en muestras de suero de los diferentes grupos experimentales. Se indican las bandas correspondientes a las formas inmaduras (pro-MMP) y las formas activas de las enzimas. **(C)** Cuantificación por densitometría de las regiones degradadas correspondientes a la actividad enzimática de MMP2/9, representada respecto al grupo Sham (valor fijado arbitrariamente en 1). Se muestran los datos individuales y el promedio  $\pm$  EEM del total de animales por grupo. \*,  $p < 0.05$ .



## 1.7 El péptido S1 altera el fenotipo de VSMC y macrófagos

Durante el desarrollo del AAA, se produce la apoptosis de las VSMC que conforman la lámina media aórtica. Además, en condiciones fisiológicas las VSMC muestran un fenotipo diferenciado, contráctil, con una mayor expresión de proteínas contráctiles como  $\alpha$ -SMA, SM22 $\alpha$ , calponina u osteopontina, mientras que en condiciones patológicas predomina un fenotipo típicamente sintético o secretor y menos diferenciado, caracterizado por la expresión de marcadores como MMPs o el factor de transcripción Klf4. Para evaluar el grado de preservación de VSMC tras la infusión aórtica de elastasa, se llevó a cabo la inmunodetección de dos marcadores específicos de VSMC,  $\alpha$ -SMA y calponina. En comparación con el grupo control, los animales tratados con S1 mostraron mayor conservación del contenido de VSMC en las lesiones aórticas (Fig. 22, A y B).

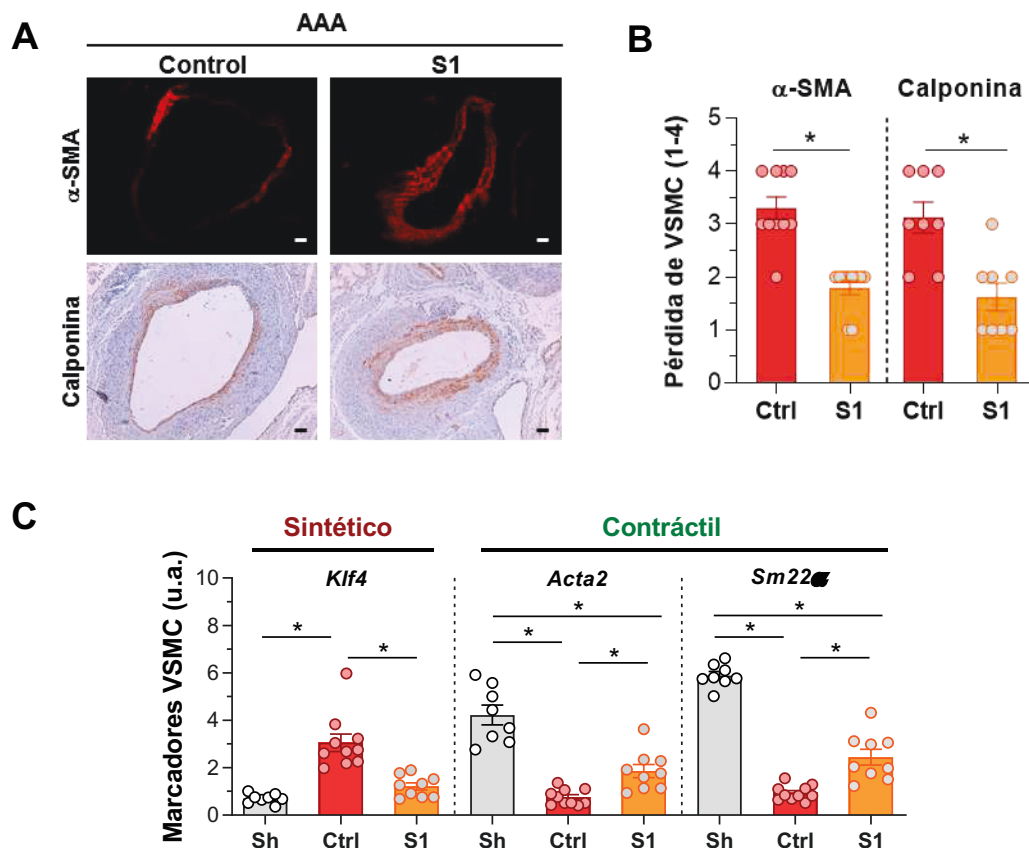


Figura 22. Marcadores de VSMC en lesiones aneurismáticas inducidas por elastasa. (A) Imágenes representativas (barra de escala = 100  $\mu$ m) de la detección de  $\alpha$ -SMA (inmunofluorescencia directa) y calponina (inmunohistoquímica) en secciones de aorta abdominal. (B) Cuantificación del grado de pérdida de VSMC (puntuación 1-4). (C) Niveles de expresión de marcadores fenotípicos (sintético/contráctil) de VSMC mediante qPCR. Los valores se encuentran normalizados con respecto al gen 18S rRNA y expresados como unidades arbitrarias (u.a.). Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales por grupo (n=8-10/grupo). \*, p<0.05.

Por otra parte, el análisis de expresión génica mostró que la inducción de AAA reducía notablemente los marcadores asociados a un fenotipo contráctil de VSMC ( $\alpha$ -Sma, Sm22 $\alpha$ ) mientras que aumentaba el marcador de fenotipo sintético *Klf4*. Estos cambios se restauraron parcialmente en los animales tratados con péptido S1 (Fig. 22C).

Además de las VSMC, el contenido y fenotipo de los macrófagos presentes en el lugar de la lesión resulta relevante en la patología del AAA. Por ello, tras haber comprobado que el tratamiento con S1 reduce el número de macrófagos en la lesión de AAA (Fig. 18, A y B), se cuantificó la expresión génica de algunos marcadores de fenotipo de macrófagos M1/M2. La inducción de AAA provocó un incremento de los marcadores M1 *Arg2* e *Inos*, característicos de un fenotipo proinflamatorio, disminuyendo de manera significativa en el grupo que recibió tratamiento. Por el contrario, los niveles de marcadores de fenotipo M2 *Arg1* y *Cd206*, asociados a una resolución favorable de la inflamación y disminuidos en las lesiones del grupo control, se restauraron parcialmente por el tratamiento con S1 (Fig. 23).

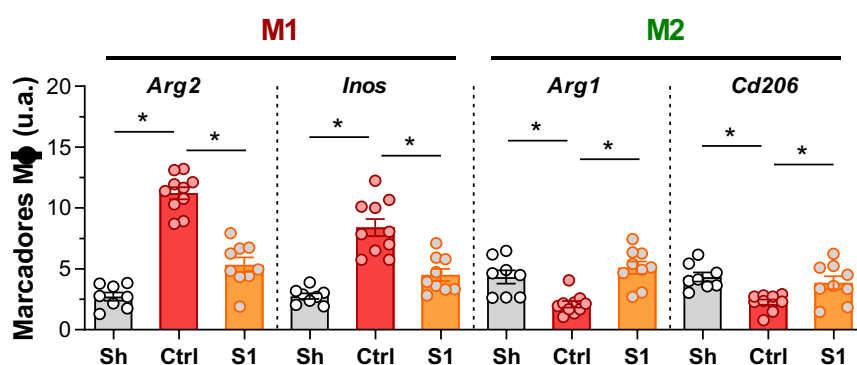


Figura 23. Expresión de marcadores fenotípicos de macrófagos (M1/M2) en el AAA experimental. qPCR en tejido aórtico abdominal de animales 14 días tras la perfusión con suero fisiológico (Sham) o elastasa (Control y S1). Los valores se encuentran normalizados con respecto al gen 18S rRNA y expresados como unidades arbitrarias (u.a.). Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=8-10). \*, p<0.05.

### 1.8 Análisis de correlación en el modelo experimental

Por último, con todos los parámetros y marcadores analizados en el modelo experimental de AAA, realizamos un análisis de correlación de Pearson que confirmó que los niveles de activación (fosforilación) de STAT1/3 se encuentran estrechamente relacionados con el grado de preservación de las VSMC, pero no de las láminas elásticas, y con el contenido de células inflamatorias y los marcadores de estrés oxidativo en las lesiones de AAA (Tabla 5).



ANÁLISIS HISTOLÓGICO		
Marcador	Tinción p-STAT1	Tinción p-STAT3
$\alpha$ -SMA	0.5886 ( $p=0.0063$ )	0.6449 ( $p=0.0021$ )
Degradación elastina	0.3518 (ns)	0.3571 (ns)
Macrófagos CD68 <sup>+</sup>	0.5758 ( $p=0.0079$ )	0.6648 ( $p=0.0014$ )
Neutrófilos Ly6G <sup>+</sup>	0.7054 ( $p=0.0005$ )	0.6552 ( $p=0.0017$ )
Linfocitos T CD3 <sup>+</sup>	0.6851 ( $p=0.0034$ )	0.6966 ( $p=0.0027$ )
Linfocitos B CD45R <sup>+</sup>	0.8385 ( $p<0.0001$ )	0.8467 ( $p<0.0001$ )
DHE	0.6527 ( $p=0.0061$ )	0.7073 ( $p=0.0022$ )
8OHdG	0.6932 ( $p=0.0029$ )	0.6964 ( $p=0.0027$ )

Tabla 5. Correlación entre los niveles de fosforilación de STAT y diversos marcadores histológicos. Coeficientes de correlación r de Pearson (y valores de p) en el modelo de AAA (n=10). ns = no significativo.

De la misma manera, se estableció una correlación directa y estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de algunos de los genes inflamatorios estudiados y la expresión de *Stat1* y *Stat3* en las aortas del modelo experimental de AAA (Tabla 6).

ANÁLISIS qPCR		
Gen	mRNA Stat1	mRNA Stat3
<i>Ccl2</i>	0.6180 ( $p=0.0048$ )	0.7891 ( $p<0.0001$ )
<i>Ccl5</i>	0.5425 ( $p=0.0164$ )	0.5441 ( $p=0.016$ )
<i>Ifny</i>	0.5728 ( $p=0.0104$ )	0.6454 ( $p=0.0028$ )
<i>Tnf<math>\alpha</math></i>	0.6902 ( $p=0.0011$ )	0.4376 (ns)
<i>Mmp2</i>	0.5001 ( $p=0.0292$ )	0.6503 ( $p=0.0026$ )
<i>Mmp9</i>	0.6178 ( $p=0.0048$ )	0.6593 ( $p=0.0021$ )
<i>Il-10</i>	-0.382 (ns)	-0.2997 (ns)
<i>Il-17</i>	0.4762 ( $p=0.0393$ )	0.6005 ( $p=0.0066$ )
<i>Icam1</i>	0.5976 ( $p=0.0069$ )	0.613 ( $p=0.0053$ )

Tabla 6. Correlación entre la expresión génica de *Stat1/3* y diversos genes inflamatorios. Coeficientes de correlación r de Pearson (y valores de p) en el modelo de AAA (n=10). ns = no significativo.

## 2. EFECTOS *IN VITRO* DEL PÉPTIDO S1 EN EL CONTEXTO DEL AAA

Una vez demostrada la implicación de la vía JAK/STAT en el AAA experimental, se estudiaron los mecanismos involucrados en el efecto protector del péptido S1. Para ello, se diseñaron una serie de experimentos *in vitro* en VSMC y macrófagos, dos de los tipos celulares más relevantes en la patología del AAA. Empleamos células murinas procedentes de cultivos primarios de VSMC y de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM), así como las líneas celulares MOVAS (VSMC) y RAW 264.7 (macrófagos).

Con el objetivo de simular *in vitro* un entorno inflamatorio similar al que ocurre en el modelo experimental de AAA realizado, se empleó elastasa como estímulo. En algunos experimentos se utilizó una secuencia de péptido derivado de elastina (EDP), ya que la generación de pequeños fragmentos proteicos producto de la degradación de elastina es un evento de gran relevancia en el inicio y progresión del AAA, constituyendo por tanto un estímulo más fisiológico. Como control negativo se empleó un péptido análogo de secuencia desordenada (*Scramble*). Ninguno de estos estímulos, a las concentraciones empleadas, afectaba la viabilidad celular de VSMC y macrófagos (Fig. 24). En los experimentos *in vitro*, las células quiescentes (24 horas en medio con 0-0.5% FBS), se pretrataron con péptido S1 (59  $\mu$ M) durante 90 minutos previos a la estimulación.

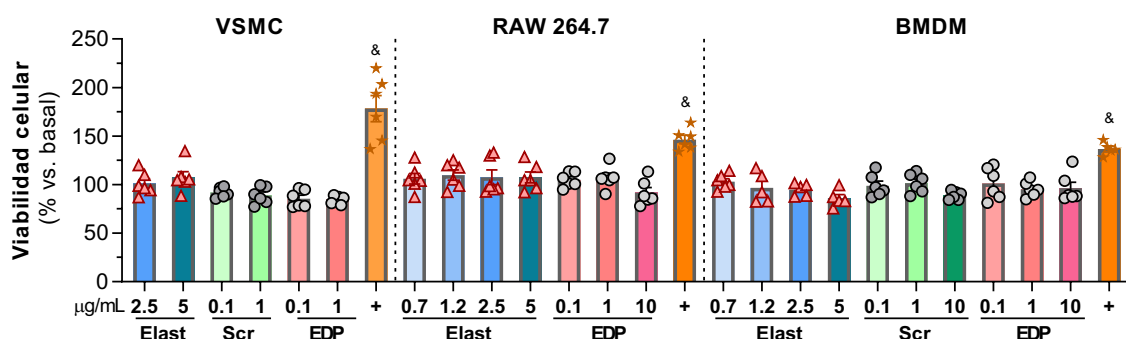
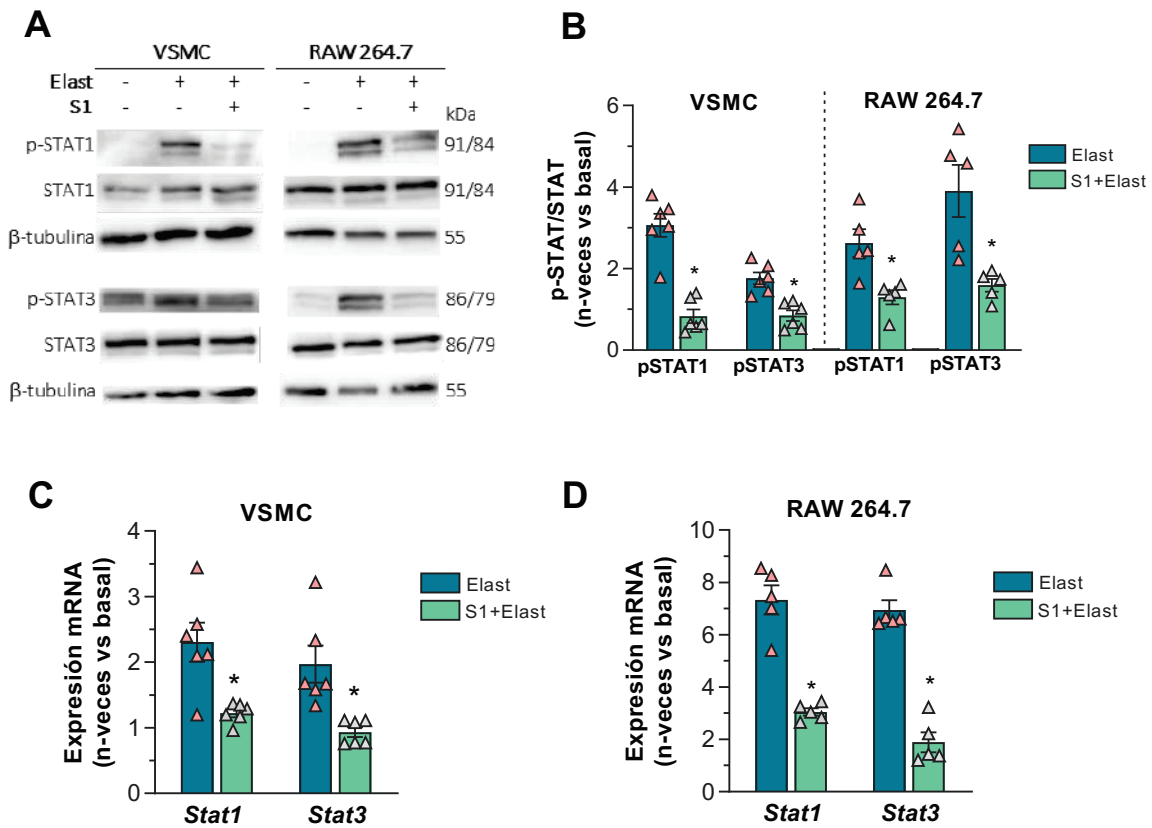


Figura 24. Viabilidad celular en VSMC y macrófagos expuestos a diferentes dosis de estímulos. Ensayo MTT en células incubadas durante 24 horas con diferentes concentraciones de elastasa (Elast) y péptidos EDP o *Scramble* (Scr, control negativo), empleando 10% FBS (+) como control positivo (n=6/condición). La viabilidad celular se expresa en % respecto a la condición basal. &p < 0.05 versus basal.

### 2.1 El péptido S1 atenúa la activación de la vía JAK/STAT *in vitro*

En primer lugar, se evaluó la activación de la vía JAK/STAT en VSMC y macrófagos estimulados con elastasa. Comparado con la condición basal, la exposición a elastasa induce la fosforilación de STAT1 y STAT3 en ambos tipos celulares, efecto que se redujo significativamente en presencia del péptido S1 (Fig. 25, A y B). Acorde con estos resultados, el estímulo con elastasa

se tradujo en una expresión aumentada de los genes *Stat1/3* en VSMC (Fig. 25C) y macrófagos (Fig. 25D), que también se redujo en aquellas células pretratadas con péptido S1.



**Figura 25.** El péptido S1 reduce la activación de la vía JAK/STAT inducida por elastasa *in vitro*. (A) Western blot representativos de STAT1/3 (fosforilado y total) y  $\beta$ -tubulina (control de carga) en extractos celulares de VSMC y macrófagos estimulados con elastasa (Elast, 2.5  $\mu$ g/mL a 24 horas y 0.75  $\mu$ g/mL a 6 horas, respectivamente) en presencia/ausencia del péptido S1 (59  $\mu$ M). (B) Cuantificación densitométrica de los niveles de STAT, normalizados por control de carga. (C, D) Análisis de expresión génica mediante qPCR de *Stat1* y *Stat3* en VSMC (C) y macrófagos (D). Los valores de expresión se encuentran normalizados con respecto al gen 18S rRNA y representados como incremento versus basal. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM de n=5-6 experimentos independientes. \*, p<0.05 versus Elast.

## 2.2 El péptido S1 inhibe la expresión de genes de inflamación y estrés oxidativo

Tras comprobar que el péptido S1 inhibe *in vitro* la activación de JAK/STAT inducida por elastasa, se decidió examinar su efecto en la expresión de algunos de los genes dependientes de esta vía, de la misma manera que se hizo en el modelo experimental. En concreto, se estudiaron quimioquinas y citoquinas inflamatorias (*Ccl2*, *Ccl5*, *Cxcl10* y *Tnfa*), así como subunidades del complejo multienzimático NOX (*Nox1* y *Nox2*), una de las principales fuentes de producción de ROS. Los resultados revelaron que el estímulo de elastasa incrementaba de manera notable la

expresión de mRNA de todos estos genes, mientras que la presencia de S1 la atenuaba significativamente, tanto en VSMC (Fig. 26A) como en macrófagos (Fig. 26, B y C).

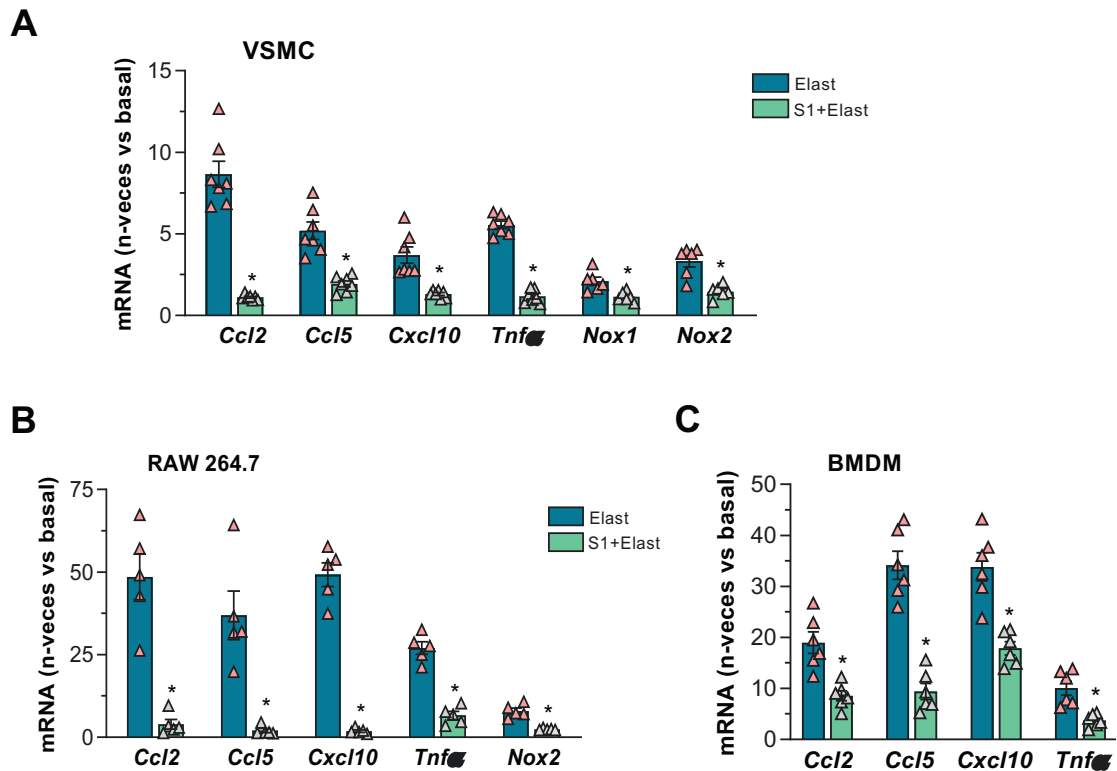


Figura 26. Expresión de genes de inflamación y estrés oxidativo en células estimuladas con elastasa. Análisis de qPCR en VSMC (A), macrófagos RAW 264.7 (B) y BMDM (C) estimulados con elastasa (2.5 µg/mL a 24 horas y 0.75 µg/mL a 6 horas, respectivamente) en presencia/ausencia del péptido S1 (59 µM). Los valores se encuentran normalizados con respecto al gen 18S rRNA y representados como incremento versus basal. Se muestran datos individuales y promedio ± EEM de n=5-7 experimentos. \*, p<0.05 versus Elast.

A continuación, se midieron los niveles proteicos de CCL2, la principal quimioquina atrayente de monocitos, en los sobrenadantes de los cultivos celulares de VSMC y macrófagos. Así, mientras que la incubación con elastasa indujo la secreción de CCL2 al medio de cultivo celular, el pretratamiento con péptido S1 redujo estos niveles de forma significativa (Fig. 27).

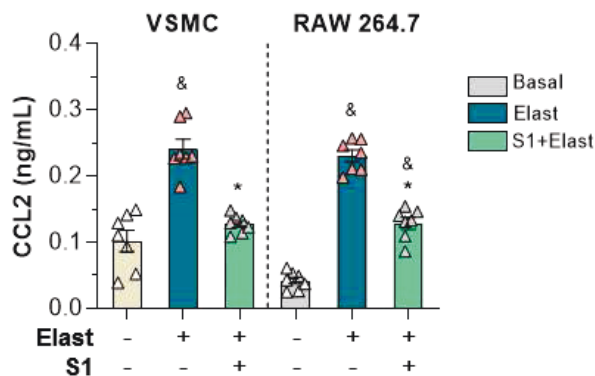


Figura 27. El péptido S1 reduce la secreción de CCL2 *in vitro*. Análisis ELISA en sobrenadantes celulares de VSMC y RAW 264.7 estimulados con elastasa (2.5 µg/mL a 24 horas y 0.75 µg/mL a 6 horas, respectivamente). Se muestran datos individuales y promedio ± EEM de n=7 experimentos. \*, p<0.05 versus Elast; &, p<0.05 versus Basal.

En otra serie de experimentos, se estudió la expresión de genes inflamatorios en VSMC empleando como estímulo dos concentraciones diferentes (0.1 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de EDP o *Scramble* (control negativo). La incubación durante 24 horas con EDP, pero no con *Scramble*, aumentó de manera dosis-dependiente la expresión de las quimioquinas *Ccl2* y *Ccl5* en VSMC. Por el contrario, la preincubación con S1 previno esta expresión inducida por EDP (Fig. 28A).

Experimentos similares se llevaron a cabo en BMDM, en este caso estimulando con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de EDP a diferentes tiempos. Se observó un aumento en la expresión de mRNA de *Ccl2*, *Ccl5*, *Cxcl10* y *Tnfa* inducida por EDP, mientras que la incubación con S1 dio como resultado una reducción significativa de la expresión de estos genes proinflamatorios, tanto a 6 como a 24 horas (Fig. 28B).

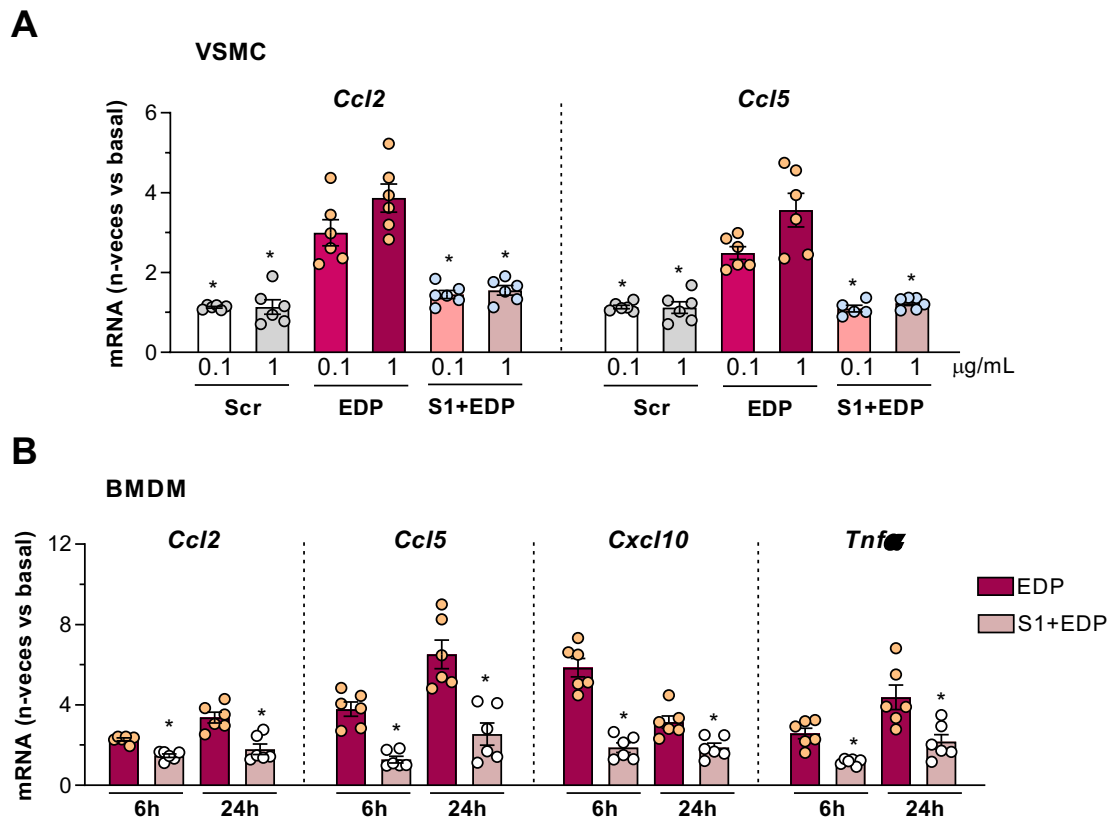


Figura 28. S1 reduce la expresión de quimioquinas y citoquinas en células estimuladas con EDP. Análisis de qPCR en (A) VSMC estimuladas con 0.1 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EDP o *Scramble* (Scr) durante 24 horas y (B) BMDM estimulados con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EDP durante 6 y 24 horas, en presencia o ausencia del péptido S1 (59  $\mu\text{M}$ ). Los valores de expresión se encuentran normalizados con respecto al gen 18S rRNA y representados como incremento versus basal. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM de n=5-6 experimentos independientes. \*,  $p < 0.05$  versus EDP.

### 2.3 Efectos de S1 en la expresión y actividad de metaloproteinasas

Para determinar el efecto que tiene el péptido S1 en la expresión de MMPs, se analizó la expresión de mRNA de *Mmp2* y *Mmp9*, así como de sus inhibidores *Timp1* y *Timp2*, tanto en VSMC como en macrófagos RAW 264.7. Los resultados mostraron que el péptido S1 alteró el patrón de expresión de MMPs inducido por la estimulación con elastasa, con reducciones significativas en los niveles de *Mmp2*, *Mmp9* y *Timp1*, pero no *Timp2* (Fig. 29A). En paralelo, se examinó la actividad enzimática de las MMPs secretadas a los medios de cultivo de VSMC y macrófagos RAW 264.7. Los ensayos de zimografía demostraron una menor actividad de MMP2 y MMP9 en las células estimuladas con elastasa que habían sido pretratadas con péptido S1 (Fig. 29, B y C).

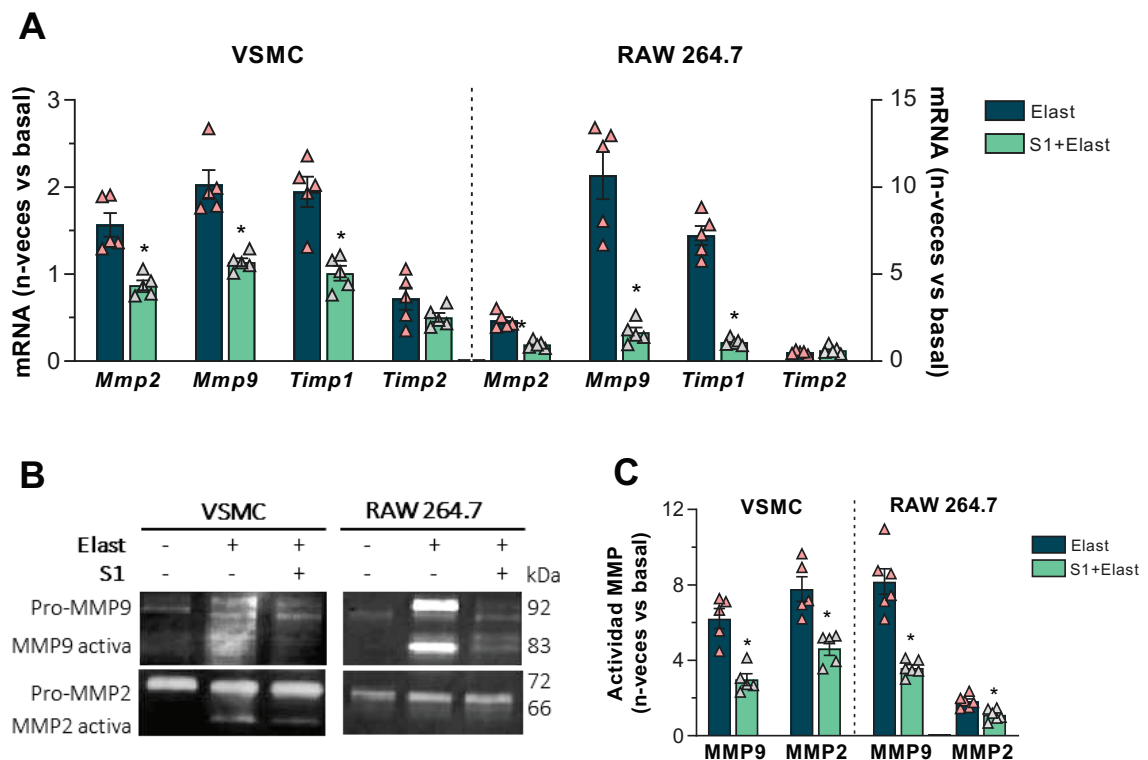
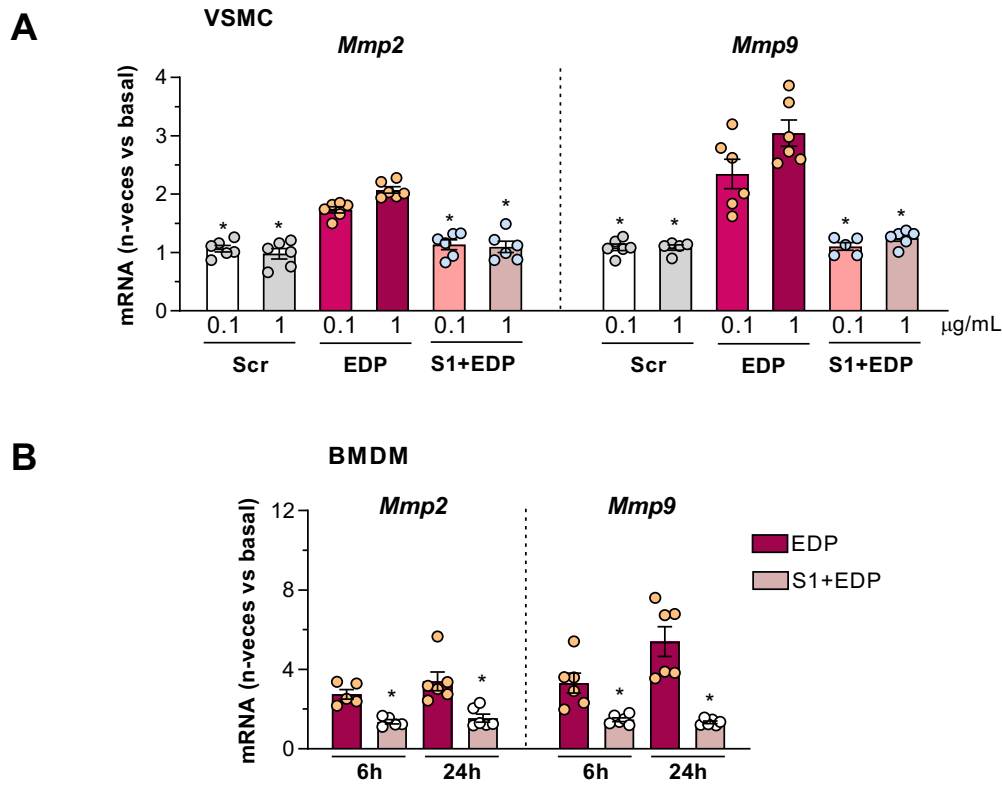


Figura 29. Análisis de expresión génica de MMPs y TIMPs *in vitro* y actividad enzimática de MMPs secretadas al medio. VSMC y macrófagos RAW 264.7 estimulados con elastasa (2.5 µg/mL a 24 horas y 0.75 µg/mL a 6 horas, respectivamente) en presencia/ausencia del péptido S1 (59 µM). (A) Análisis mediante qPCR de expresión génica de *Mmp2/9* y *Timp1/2*. Los valores de expresión se encuentran normalizados con respecto al gen 18S rRNA y representados como incremento versus basal. (B) Imágenes representativas de zimografía de muestras de sobrenadantes de cultivos celulares de VSMC y macrófagos. Se indican las bandas correspondientes a las formas inmaduras (pro-MMP) y las formas activas de MMP. (C) Cuantificación por densitometría de las bandas correspondientes a la actividad gelatinolítica de MMP2/9, representada respecto a la condición basal. Se muestran datos individuales y promedio ± EEM de n=5-6 experimentos independientes. \*, p<0.05 versus Elast.

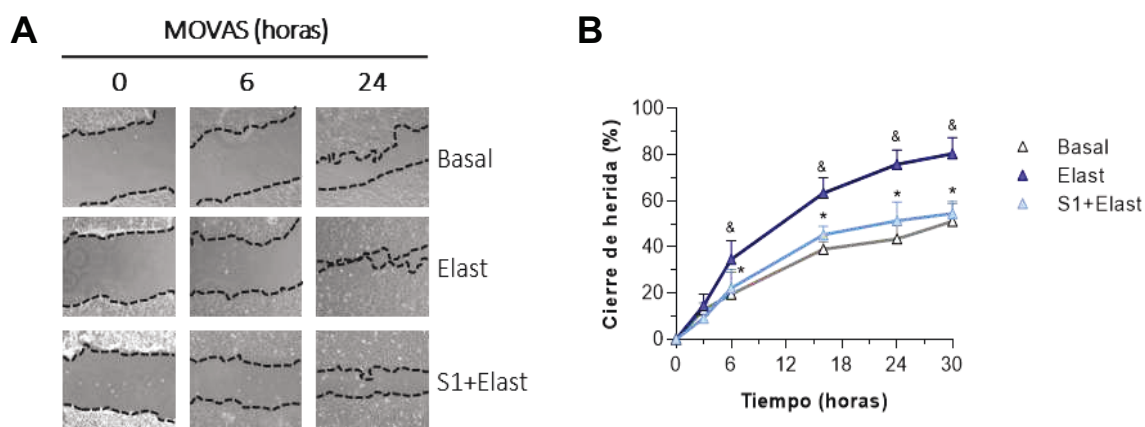
La expresión de MMPs también se evaluó en VSMC y BMDM estimuladas con EDP a diferentes dosis (0.1 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y tiempos (6 y 24 horas). La exposición a EDP incrementó la expresión de *Mmp2* y *Mmp9* en ambos tipos celulares. De manera similar a lo que ocurría en las células estimuladas con elastasa, el péptido S1 redujo la expresión de ambas MMPs, tanto en VSMC (Fig. 30A), como en BMDM (Fig. 30B).



**Figura 30. Análisis de expresión génica de MMPs en células expuestas a EDP.** Análisis de qPCR en (A) VSMC estimuladas con 0.1 y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EDP o *Scramble* (Scr) durante 24 horas y (B) BMDM estimulados con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EDP durante 6 y 24 horas, en presencia o ausencia del péptido S1 (59  $\mu\text{M}$ ). Los valores de expresión se encuentran normalizados con respecto al gen 18S rRNA y representados como incremento versus basal. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM de  $n=6$  experimentos independientes. \*,  $p < 0.05$  versus EDP.

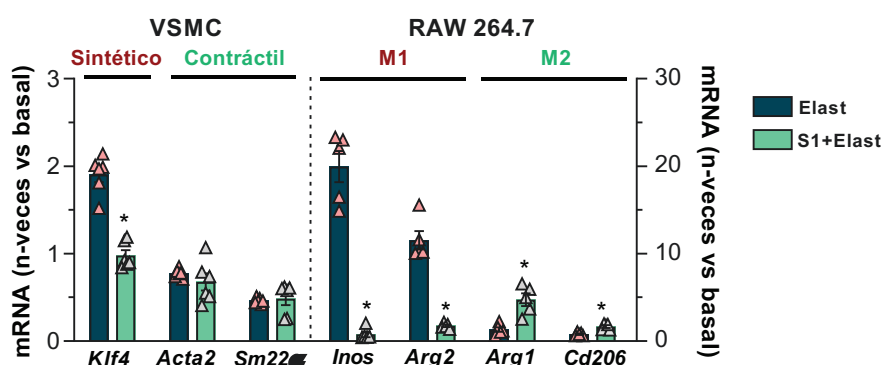
## 2.4 Papel del péptido S1 en la migración y diferenciación celular

Para evaluar los efectos del péptido S1 sobre la capacidad migratoria y proliferativa de VSMC, se diseñaron experimentos de cierre de herida en MOVAS, línea celular inmortalizada de VSMC. En comparación con las condiciones basales, las VSMC expuestas a elastasa mostraron un incremento notable en la migración a lo largo del tiempo, mientras que las células tratadas con péptido S1 exhibieron una menor migración y un cierre de herida más lento y progresivo (Fig. 31).



**Figura 31.** El péptido S1 reduce la migración de VSMC inducida por elastasa. Ensayo de cierre de herida en MOVAS (línea celular de VSMC), estimuladas con elastasa (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en presencia/ausencia del péptido S1 (59  $\mu\text{M}$ ) **(A)** Imágenes representativas de microscopio de contraste de fases, mostrando las células migradas en el área de la herida a diferentes tiempos. **(B)** Cuantificación del área cubierta de células a lo largo del tiempo, expresada como porcentaje versus área de herida inicial (n=6). \*,  $p < 0.05$  versus Elast; &,  $p < 0.05$  versus Basal.

En línea con los estudios *in vivo*, evaluamos la expresión de marcadores fenotípicos de VSMC y macrófagos estimulados con elastasa. En VSMC, encontramos que el péptido S1 previno la expresión del marcador de fenotipo sintético *Klf4*; sin embargo, no afectó a los marcadores de fenotipo contráctil *Acta2* y *Sm22 $\alpha$*  (Fig. 32). En macrófagos RAW 264.7, S1 redujo la expresión de los marcadores de fenotipo M1 (*Arg2* e *Inos*), mientras que restauró parcialmente la expresión de marcadores M2 (*Arg1* y *Cd206*) (Fig. 32).



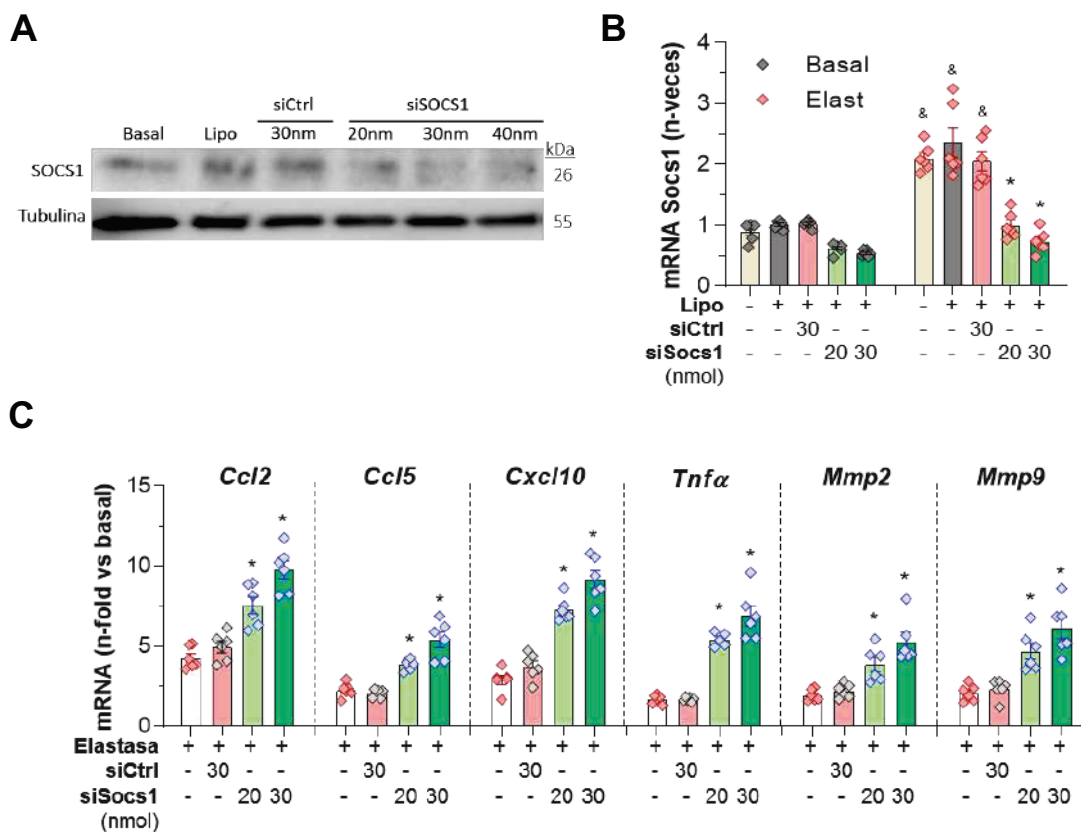
**Figura 32.** El péptido S1 altera de manera favorable la expresión de marcadores fenotípicos de VSMC y macrófagos. Análisis de qPCR de marcadores de fenotipo sintético/contráctil en VSMC y marcadores M1/M2 en macrófagos tras la estimulación con elastasa en presencia/ausencia de S1. Los valores de expresión se encuentran normalizados con respecto al gen 18S rRNA y representados como incremento versus basal. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM de n=5-6 experimentos independientes. \*,  $p < 0.05$  versus Elast.



## 2.5 La supresión de la proteína SOCS1 incrementa la respuesta inflamatoria

Por último, para explorar la acción directa de la proteína SOCS1 completa en las respuestas celulares, se realizaron experimentos de silenciamiento en VSMC, mediante transfección con siRNA específicos para SOCS1 o con un siRNA control. Primeramente, el silenciamiento de la proteína se corroboró mediante la inmunodetección de SOCS1 en VSMC (Fig. 33A). Además, el siRNA específico fue capaz de inhibir la expresión de mRNA de SOCS1, tanto en condiciones basales como tras la estimulación con elastasa (Fig. 33B).

Una vez confirmado el silenciamiento de SOCS1, se examinaron los niveles de mRNA de los genes estudiados anteriormente. Se demostró así que la supresión del gen *Socs1* incrementa aún más la respuesta inflamatoria en VSMC estimuladas con elastasa, con una mayor expresión de citoquinas, quimioquinas y MMPs (Fig. 33C). Estos resultados *in vitro* permiten corroborar el efecto protector que tiene la proteína SOCS1 en las respuestas inflamatorias.



**Figura 33. Efecto del silenciamiento de la proteína SOCS1 completa en VSMC.** Las células se transfectaron con siRNA específico de SOCS1 (siSOCS1), empleando como controles lipofectamina sola (Lipo) o siRNA control (siCtrl). **(A)** Western blot representativo de SOCS1 en VSMC. **(B, C)** Análisis de expresión qPCR de **(B)** *Socs1* y **(C)** genes inflamatorios y MMPs en VSMC en condiciones basales y/o expuestas a elastasa. Los valores de expresión están normalizados respecto a 18S rRNA y representados como incremento versus basal. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM de n=5-6 experimentos independientes. \*, p<0.05 versus Elast; &, p<0.05 versus Basal.

### 3. ESTUDIO DE LOS PÉPTIDOS PS5 Y S1 EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE NAFLD/NASH INDUCIDO POR DIETA MCD

#### 3.1 Caracterización del modelo murino de NAFLD/NASH con dieta MCD

Como se comentó anteriormente, la secuencia de los péptidos S1 y PS5 procede de la región KIR de SOCS1. Mientras que S1 contiene la región KIR completa, PS5 tiene menor tamaño y una sustitución de un aminoácido no natural (Cys(Acm)) que le confiere mayor estabilidad. El objetivo de los experimentos descritos a continuación fue conocer si la administración de los péptidos PS5 y S1 reduce el daño hepático en modelos nutricionales de NAFLD/NASH.

La dieta deficiente en metionina y colina (MCD) se suministró a ratones C57BL/6 durante una semana inicial, seguido de 2 o 4 semanas adicionales en las que se administraron por vía intraperitoneal los péptidos PS5 o S1 (125  $\mu$ M), o el vehículo correspondiente (suero fisiológico o 3% DMSO, respectivamente), 3 veces por semana. Es importante señalar que los dos grupos vehículo han sido unificados para su representación gráfica a ambos tiempos al no haberse encontrado diferencias entre ellos.

En comparación con el grupo control alimentado con dieta estándar, los animales con dieta MCD sufrieron una rápida y significativa pérdida de peso a lo largo del tiempo (Fig. 34A), así como una reducción en los niveles de glucosa en sangre (Fig. 34B). No se observaron diferencias en el peso corporal y la glucemia entre los diferentes grupos con dieta MCD que recibieron vehículo o tratamiento con los péptidos derivados de SOCS1 (Fig. 34).

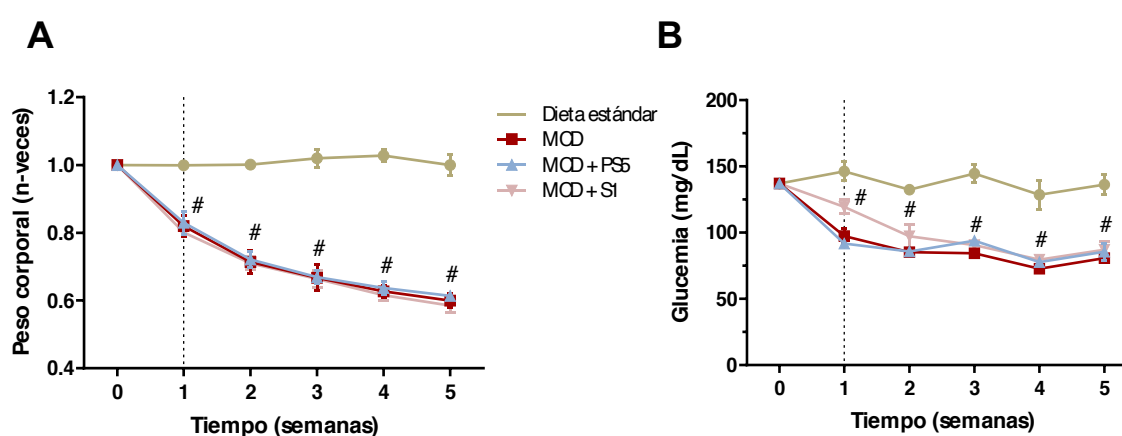


Figura 34. Caracterización del modelo murino de NAFLD/NASH inducido por dieta MCD. Representación gráfica de la evolución (A) del peso corporal, expresado en n-veces versus tiempo inicial y (B) de la glucemia, en los diferentes grupos experimentales con dieta estándar o MCD. La línea discontinua indica el comienzo del tratamiento (vehículo o péptidos PS5/S1), que se realizó durante 2 o 4 semanas adicionales. Se muestran los valores promedio  $\pm$  EEM del total de animales por grupo. MCD. #p < 0.05 versus dieta estándar.

Al término del estudio, tanto a 2 como a 4 semanas de modelo, se observó una reducción en el tamaño (Fig. 35A) y peso de los hígados extraídos. Sin embargo, la ratio peso hepático/peso corporal se mantuvo sin diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos experimentales (Fig. 35B).

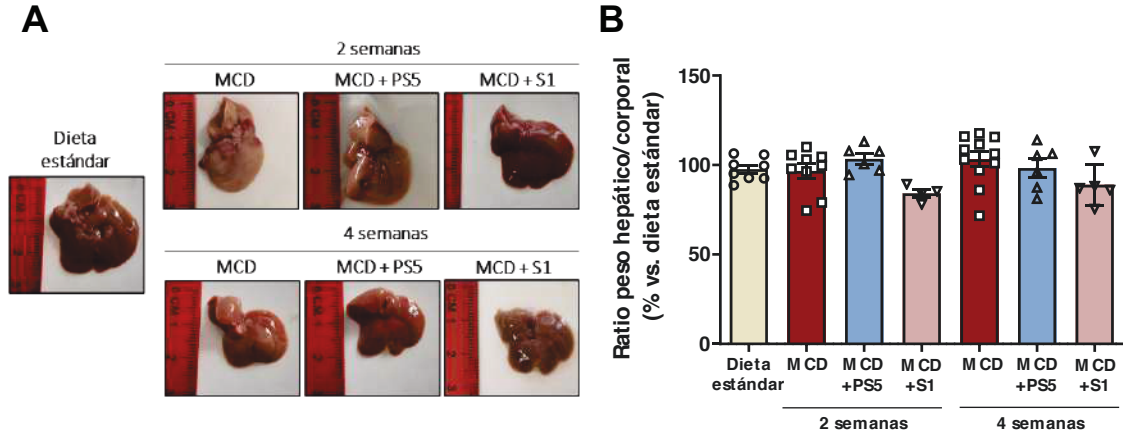


Figura 35. Morfología y peso hepático en el modelo de NAFLD/NASH inducido por dieta MCD. (A) Fotografías representativas de hígados pertenecientes a los diferentes grupos experimentales al término del modelo. (B) Ratio peso hepático/peso corporal. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=4-11).

Con el fin de conocer el perfil lipídico de los ratones de estudio, se midieron los niveles de colesterol total y triglicéridos en suero. Comparado con el grupo de dieta estándar, la dieta MCD provocó una disminución significativa de colesterol total (Fig. 36A) y triglicéridos (Fig. 36B) en todos los grupos experimentales. En cuanto al efecto de los péptidos derivados de SOCS1, el tratamiento a 2 semanas restableció parcialmente los niveles de colesterol y triglicéridos séricos, mientras que a 4 semanas solamente se observaron cambios significativos en los niveles de colesterol con el péptido S1 (Fig. 36).

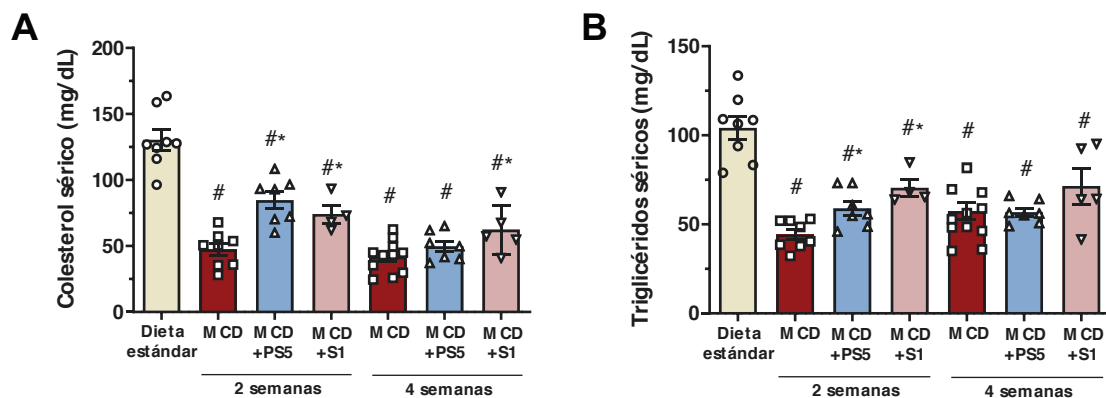
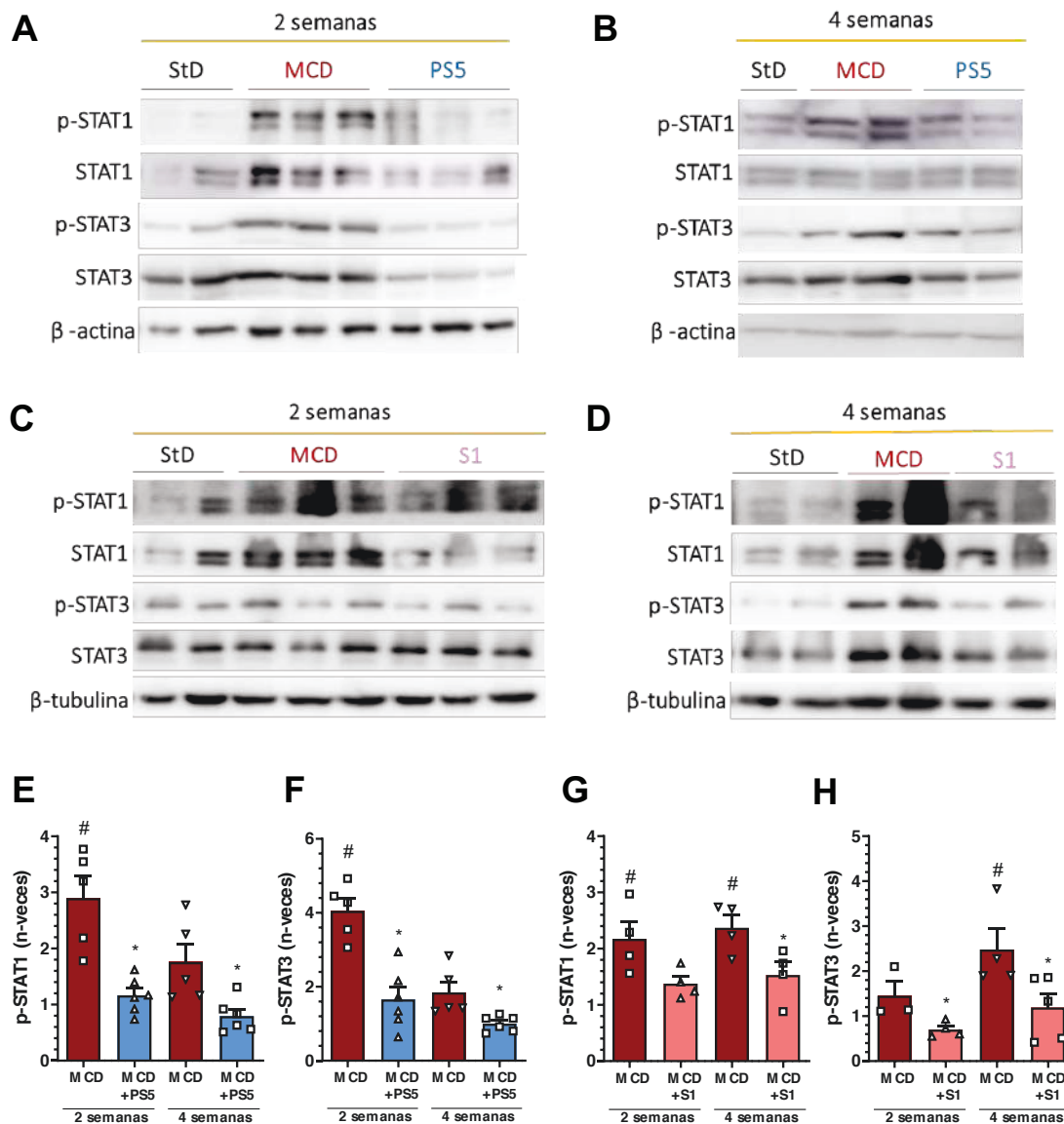


Figura 36. Niveles séricos de lípidos en el modelo experimental de NAFLD/NASH inducido por dieta MCD. Medida de la concentración de (A) colesterol total y (B) triglicéridos en el suero de los diferentes grupos experimentales. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=4-11). \*, p<0.05 versus MCD; #, p<0.05 versus dieta estándar.

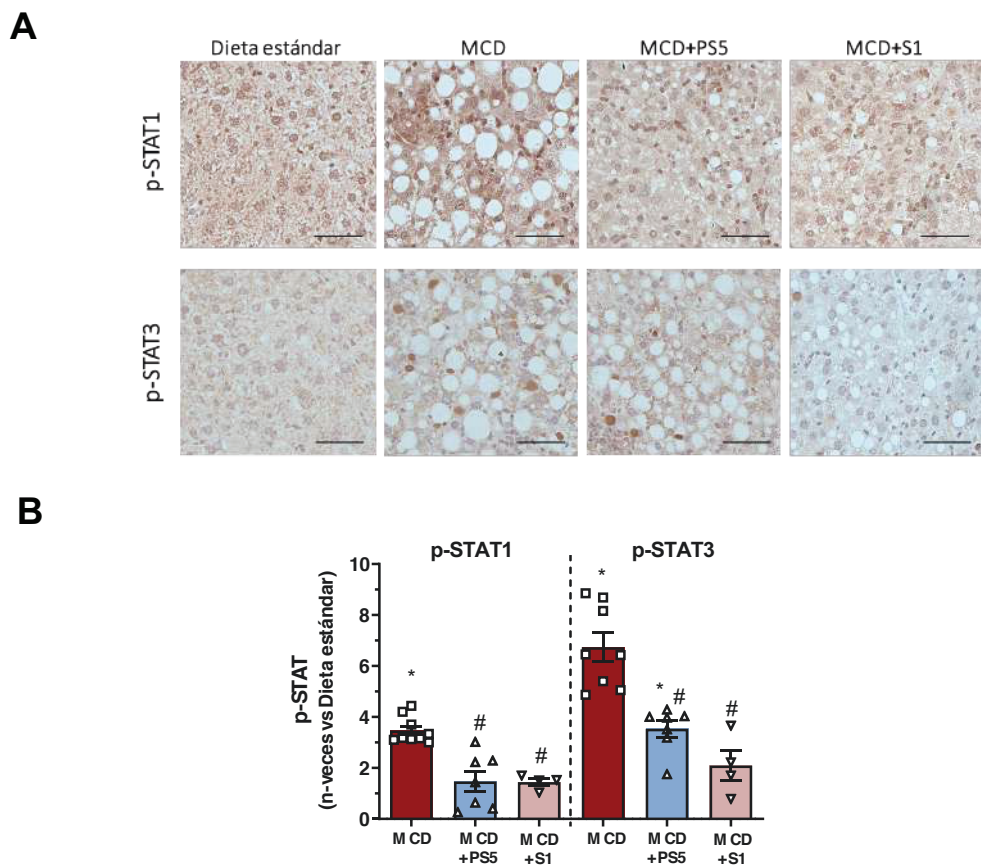
### 3.2 Inhibición de la vía JAK/STAT mediada por los péptidos PS5/S1 en NAFLD/NASH experimental

Los péptidos PS5 y S1, ambos derivados de la región KIR de la proteína SOCS1, ejercen sus efectos a través de la inhibición de la vía JAK/STAT. Para comprobar que los tratamientos con PS5 y S1 tienen efectos directos sobre esta vía de señalización en el modelo de NAFLD/NASH inducido por dieta MCD, se analizaron los niveles de activación y expresión de los factores de transcripción STAT1 y STAT3 mediante Western blot e inmunohistoquímica.



**Figura 37. Activación de la vía JAK/STAT en el modelo NAFLD/NASH inducido por dieta MCD.** (A-D) Western blot representativos de p-STAT1/3, STAT1/3 total y  $\beta$ -actina/ $\beta$ -tubulina (control de carga) en hígados del modelo de dieta MCD con 2 y 4 semanas de tratamiento con los péptidos PS5 (A, B) y S1 (C, D). (E-H) Cuantificación densitométrica de los niveles de p-STAT1 y p-STAT3 (normalizados por STAT total y control de carga) expresados como incremento versus dieta estándar. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=3-6). \*, p<0.05 versus MCD; #, p<0.05 versus dieta estándar.

Los experimentos de Western blot en extractos proteicos de hígado permitieron comprobar que, en comparación con el grupo control, la dieta MCD promueve la activación (fosforilación) de STAT1 y STAT3 (Fig. 37). Además, los niveles de p-STAT1 y p-STAT3 disminuyeron de forma significativa en los grupos de tratamiento con los péptidos PS5 y S1, tanto a 2 como a 4 semanas (Fig. 37). Para corroborar estos resultados, se analizó la activación de STAT1/3 en secciones de tejido hepático mediante inmunohistoquímica. Se constató que la dieta MCD aumenta significativamente a 2 semanas los niveles de p-STAT1/3, inhibidos por el tratamiento con los péptidos PS5 y S1 (Fig. 38, A y B).



**Figura 38. Inhibición de la vía JAK/STAT mediada por los péptidos PS5 y S1 en NAFLD/ NASH experimental. (A)** Imágenes representativas (barra de escala = 50  $\mu$ m) de la detección inmunohistoquímica de p-STAT1 y p-STAT3 en tejido hepático del modelo de dieta MCD a 2 semanas. **(B)** Cuantificación de la tinción positiva, expresada como n-veces versus dieta estándar. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=4-9). \*, p<0.05 versus MCD; #, p<0.05 versus dieta estándar.

Por último, se analizó la expresión génica de los factores de transcripción STAT en los hígados con NAFLD/NASH experimental. La administración de dieta MCD indujo la expresión de *Stat1/3*, mientras que el tratamiento con PS5 y S1 la disminuyó de forma significativa, tanto a 2 como a 4 semanas de tratamiento (Fig. 39).

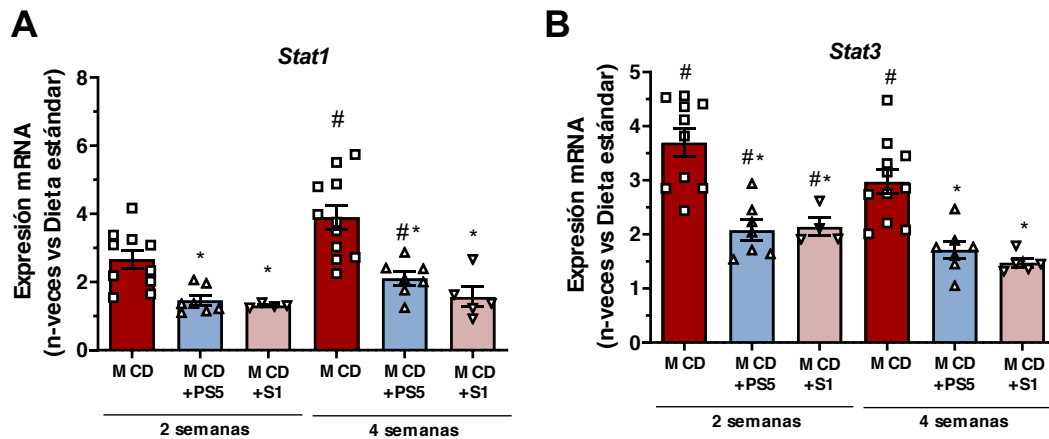


Figura 39. Niveles de expresión de factores de transcripción STAT en hígados con NAFLD/NASH. Análisis mediante qPCR de la expresión de (A) *Stat1* y (B) *Stat3* en tejido hepático. Los valores se encuentran normalizados respecto al gen 18S rRNA y expresados como n-veces versus dieta estándar. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=4-11). \*, p<0.05 versus MCD; #, p<0.05 versus dieta estándar.

### 3.3 Efectos del tratamiento con los péptidos PS5 y S1 en el daño hepático inducido por dieta MCD

Se evaluaron los niveles séricos de la transaminasa GPT (ALT), típicamente alterados en situaciones de daño hepático. Comparado con el grupo control, los niveles de GPT se elevaron de manera notable y significativa en todos los grupos alimentados con dieta MCD, tanto a 2 como a 4 semanas. El tratamiento con PS5 y S1 redujo el incremento de GPT inducido por la dieta MCD, aunque esta reducción solo fue estadísticamente significativa a las 2 semanas (Fig. 40).

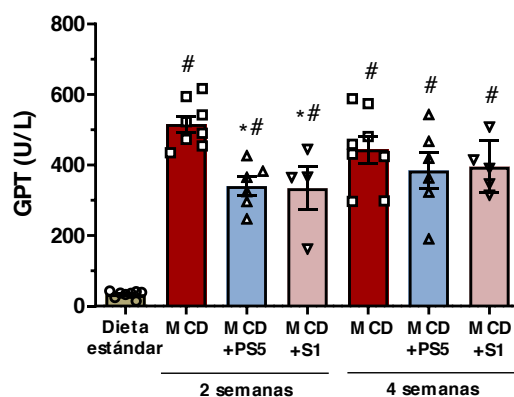
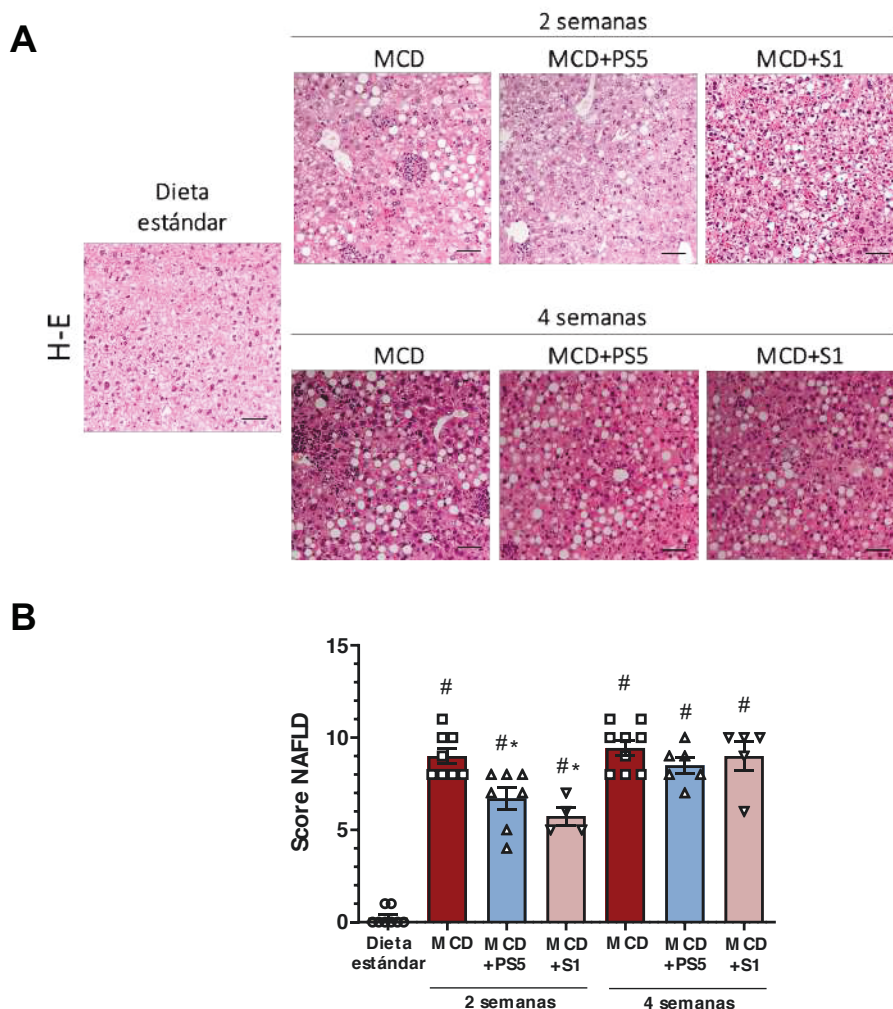


Figura 40. Determinación de los niveles séricos de enzima transaminasa GPT inducidos en el modelo de dieta MCD. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=4-7). \*, p<0.05 versus MCD; #, p < 0.05 versus dieta estándar.



Para el estudio del daño hepático se realizaron tinciones histológicas de hematoxilina-eosina en secciones de tejido hepático incluidas en parafina. En los grupos experimentales que habían recibido dieta MCD se evidenciaron claras diferencias en la estructura hepática, con presencia de vacuolas lipídicas (esteatosis) y focos inflamatorios (Fig. 41A).

Las muestras teñidas con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson fueron evaluadas por un hepatopatólogo siguiendo el criterio establecido en el score NAFLD para roedores, que analiza separadamente los niveles de esteatosis micro- y macrovesicular, inflamación, hipertrofia hepatocelular y fibrosis (Liang *et al.*, 2014). El estudio de las muestras determinó una elevada puntuación del daño hepático en los grupos experimentales que recibieron dieta MCD, que se redujo parcialmente en los animales tratados durante 2 semanas con los péptidos PS5 y S1 (Fig. 41B). No se encontró fibrosis en ninguno de los grupos de estudio.



**Figura 41. Evaluación del daño hepático en el modelo murino de NAFLD/NASH por dieta MCD. (A)** Imágenes representativas (barra de escala = 50  $\mu$ m) de secciones hepáticas teñidas con hematoxilina-eosina. En los grupos MCD se observan focos inflamatorios y esteatosis micro- y macrovesicular. **(B)** Puntuación total del índice NAFLD para roedores (suma de las puntuaciones individuales de esteatosis, inflamación e hipertrofia) en los diferentes grupos de animales. Se muestran datos individuales promedio  $\pm$  EEM (n=4-9/grupo). \*,  $p < 0.05$  versus MCD.

### 3.4 El tratamiento con los péptidos PS5 y S1 disminuye el contenido lipídico hepático en animales alimentados con dieta MCD

Para una mejor caracterización de la esteatosis hepática inducida por la dieta MCD, se cuantificó el contenido de lípidos presentes en cortes de tejido teñidos con Oil Red O. En comparación con la dieta estándar, la dieta MCD aumentó considerablemente el contenido de lípidos intrahepáticos, mientras que el tratamiento con los péptidos miméticos de SOCS1 lo disminuyó de forma estadísticamente significativa, tanto a 2 como a 4 semanas (Fig. 42, A y B). Asimismo, se midió la concentración hepática de colesterol (Fig. 42C) y triglicéridos (Fig. 42D), observándose que el incremento asociado a la dieta MCD disminuyó significativamente en los grupos tratados con PS5 y S1.

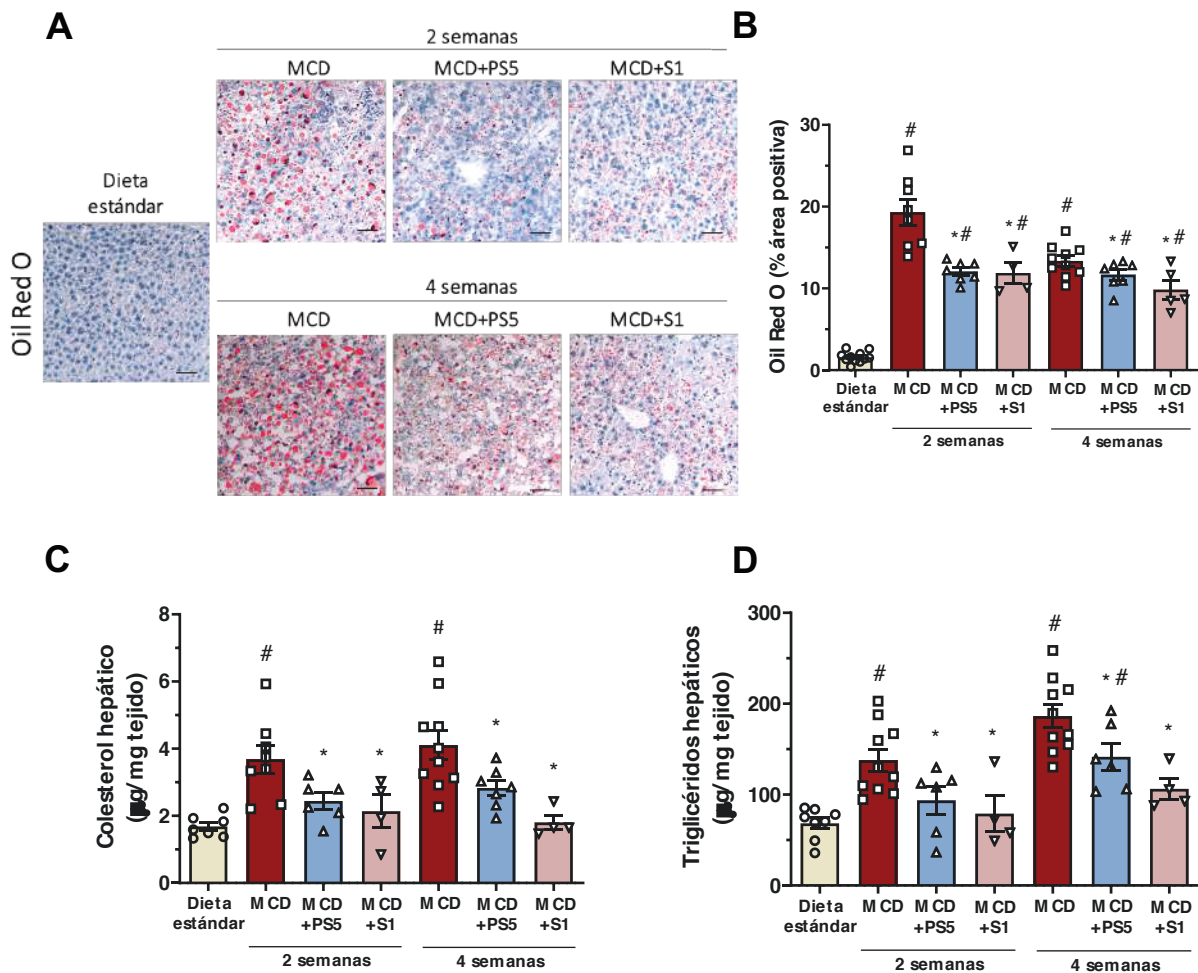


Figura 42. La terapia con los péptidos PS5 y S1 reduce el contenido hepático de lípidos en animales alimentados con dieta MCD. (A) Imágenes representativas (barra de escala = 50  $\mu$ m) de secciones hepáticas teñidas con Oil Red O. (B) Cuantificación de las gotas lipídicas (tinción roja) en los diferentes grupos experimentales. Niveles intrahepáticos de (C) colesterol y (D) triglicéridos. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=4-10). \*, p<0.05 vs MCD; #, p<0.05 vs dieta estándar.



Con el objetivo de profundizar en los mecanismos involucrados en los cambios observados en el contenido lipídico hepático en el modelo experimental de NAFLD/NASH, se estudió la expresión de algunos transportadores de entrada (CD36) y de salida (ABCA1, ABCG1) de lípidos hepáticos. Por una parte, se constató una sobreexpresión del transportador de entrada de lípidos *Cd36* en animales alimentados con dieta MCD, que se redujo a las 2 semanas y 4 semanas de tratamiento con PS5 y S1 (Fig. 43A). Por otro lado, comparado con la dieta estándar, la expresión del transportador de eflujo de lípidos *Abca1* no mostró diferencias significativas a ningún tiempo (Fig. 43B), mientras que la expresión de *Abcg1* aumentó en todos los grupos con MCD, particularmente en presencia de los tratamientos con PS5 y S1 (Fig. 43C).

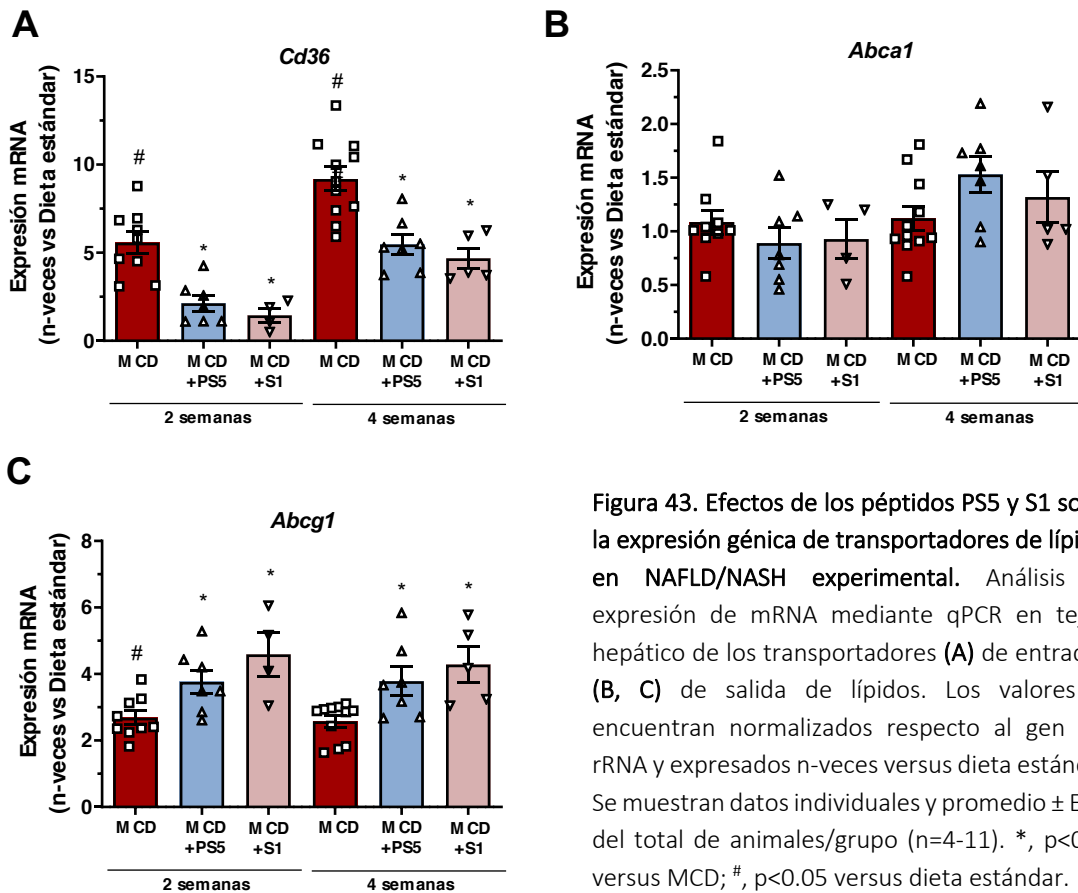
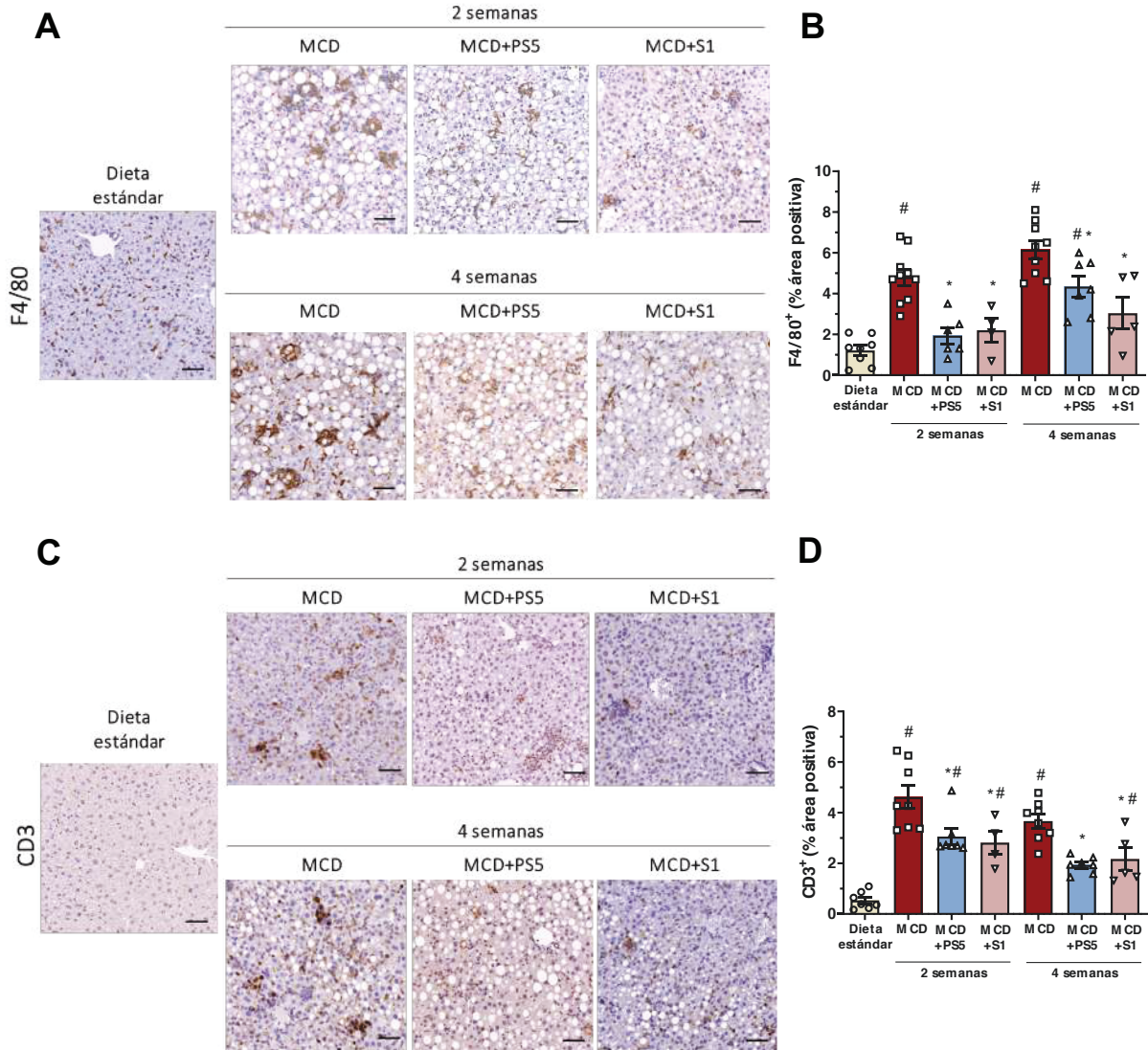


Figura 43. Efectos de los péptidos PS5 y S1 sobre la expresión génica de transportadores de lípidos en NAFLD/NASH experimental. Análisis de expresión de mRNA mediante qPCR en tejido hepático de los transportadores (A) de entrada y (B, C) de salida de lípidos. Los valores se encuentran normalizados respecto al gen 18S rRNA y expresados n-veces versus dieta estándar. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=4-11). \*,  $p < 0.05$  versus MCD; #,  $p < 0.05$  versus dieta estándar.

### 3.5 La terapia con PS5 y S1 disminuye la inflamación hepática inducida por dieta MCD

La inflamación es un proceso clave en el inicio y progresión de NASH. Tras constatar la presencia de infiltrados inflamatorios en el tejido hepático de los ratones alimentados con dieta MCD, se realizó la inmunodetección específica de macrófagos (F4/80) y linfocitos T (CD3). Los

ratones alimentados con dieta MCD mostraron un mayor contenido hepático de macrófagos (Fig. 44A) y de linfocitos T (Fig. 44C), comparado con el grupo control. La cuantificación de estos infiltrados permitió determinar que, tanto a 2 como a 4 semanas, los péptidos PS5 y S1 reducen la cantidad de macrófagos (Fig. 44, A y B) y linfocitos T en el hígado (Fig. 44, C y D).



**Figura 44. Efectos del tratamiento con PS5 y S1 en el contenido hepático de macrófagos y linfocitos T.** Imágenes representativas (barra de escala = 50  $\mu$ m) y análisis cuantitativo (expresado como % de células positiva por área) de la detección inmunohistoquímica de (A, B) macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) y (C, D) linfocitos T (CD3<sup>+</sup>). Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=4-10). \*, p<0.05 versus MCD; #, p<0.05 versus dieta estándar.

Tanto los hepatocitos como las células inmunes infiltradas en el tejido hepático dañado liberan moléculas proinflamatorias que contribuyen a perpetuar la respuesta inflamatoria en

NASH. Por ello, se analizó la expresión génica de algunas de las principales quimioquinas (*Ccl2*, *Ccl5* y *Cxcl10*) y citoquinas (*Il-6*, *Il-1 $\beta$*  y *Tnfa*) involucradas en esta patología.

Como se muestra a continuación, la administración de dieta MCD incrementó la expresión hepática de estos genes proinflamatorios, observándose una notable reducción en los grupos PS5 y S1, tanto a 2 como a 4 semanas de tratamiento (Fig. 45).

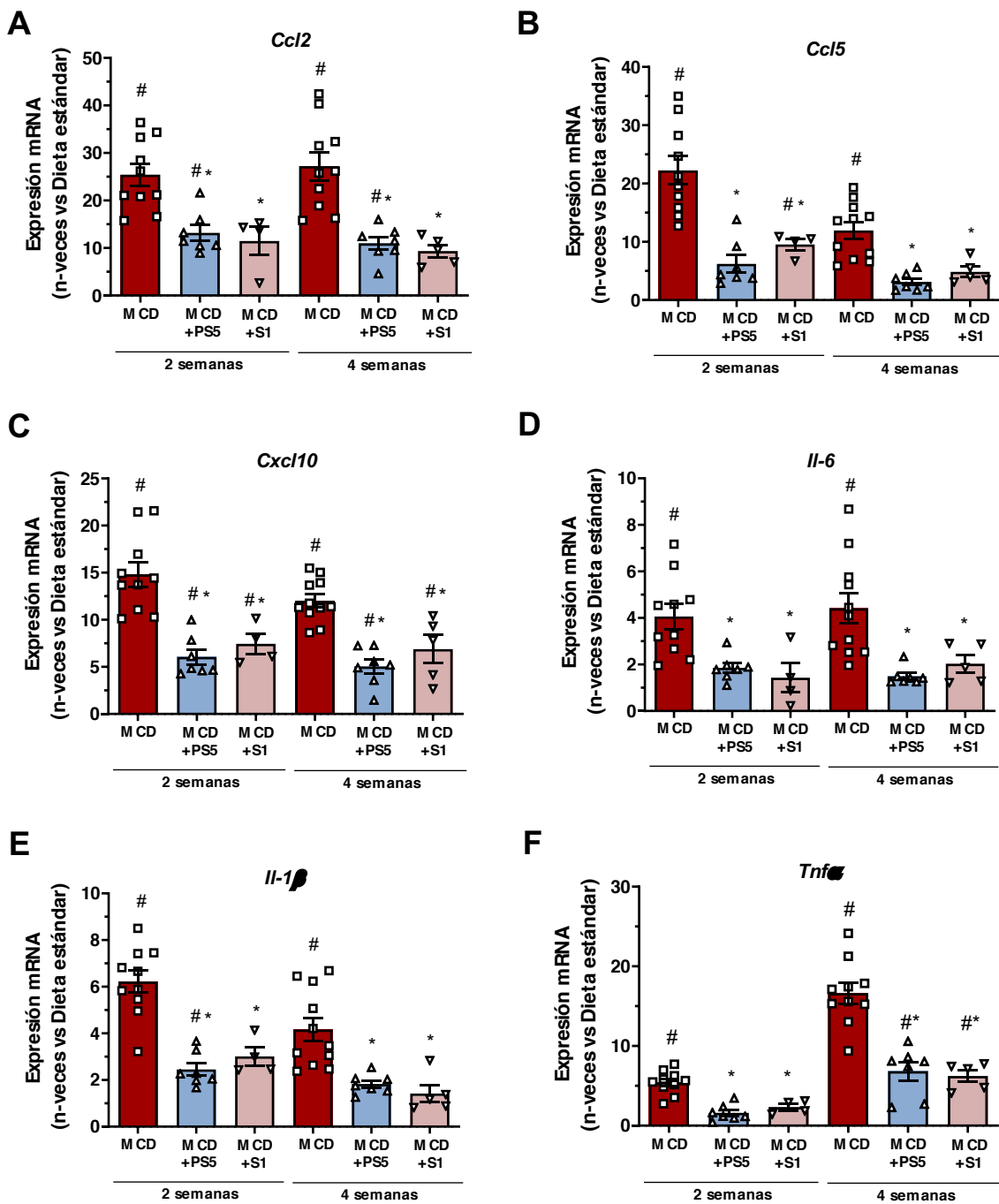
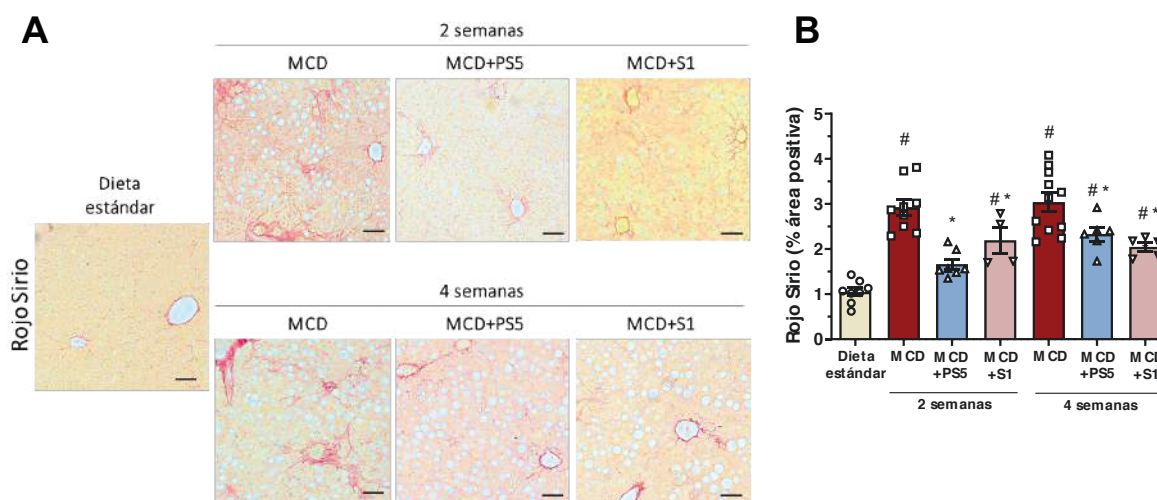


Figura 45. Expresión de genes inflamatorios en NAFLD/NASH experimental. Análisis de expresión de mRNA mediante qPCR de (A-C) quimioquinas y (D-F) citoquinas en tejido hepático. Los valores se encuentran normalizados respecto al gen 18S rRNA y expresados como incremento versus dieta estándar. Se muestran

datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=4-11). \*, p<0.05 versus MCD; #, p<0.05 versus dieta estándar.

### 3.6 Evaluación de la respuesta fibrogénica en el modelo de NAFLD/NASH inducido por dieta MCD

La aparición de fibrosis en NASH es considerada un evento relevante, generalmente irreversible, que determina un peor pronóstico e incrementa las probabilidades de desarrollar cirrosis hepática o HCC. Para evaluar la presencia de fibrosis hepática en el modelo experimental inducido con dieta MCD, se realizó tinción de Rojo Sirio. A pesar de no existir una fibrosis establecida en las muestras puntuadas con el score histopatológico NAFLD para roedores, la cuantificación de la tinción positiva mostró un aumento en el contenido de colágeno en los grupos alimentados con MCD, en comparación con la dieta estándar, y una reducción significativa en los grupos de tratamiento con PS5 y S1 (Fig. 46).



**Figura 46. Evaluación de fibrosis hepática en el modelo de NAFLD/NASH experimental. (A)** Imágenes representativas (barra de escala = 50  $\mu$ m) de secciones hepáticas teñidas con Rojo Sirio. **(B)** Cuantificación del área de tinción positiva (rojo) en los diferentes grupos experimentales. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=4-10). \*, p<0.05 versus MCD; #, p<0.05 versus dieta estándar.

A continuación, se analizó la expresión de genes que codifican factores involucrados en la respuesta hepática fibrogénica: un marcador de fibrosis (colágeno tipo I, *Col1a1*), una proteína clave en la activación de HSCs (*Acta2*) y un factor profibrótico (*Tgf- $\beta$* ). Se observó una sobreexpresión de los tres genes de fibrosis en los grupos alimentados con dieta MCD que no recibieron tratamiento. Por el contrario, dicha expresión disminuyó significativamente en los grupos tratados con PS5 y S1 (Fig. 47).

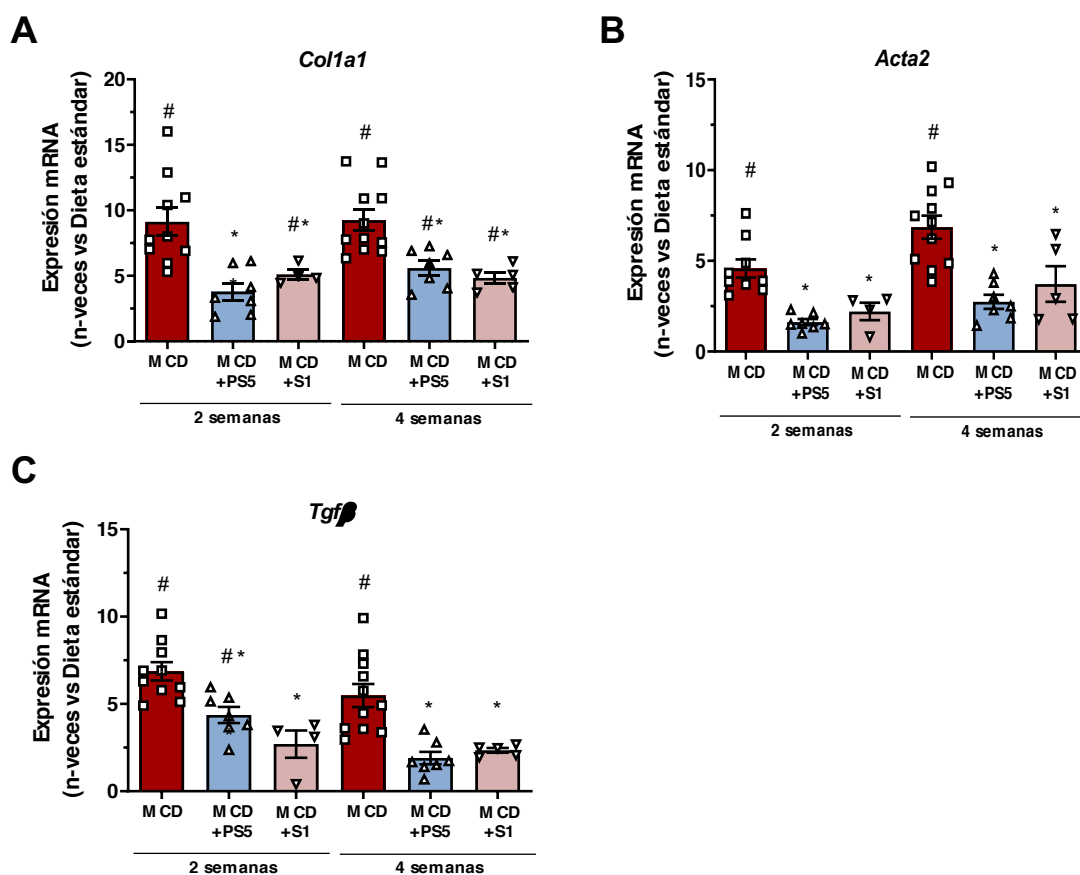


Figura 47. Expresión de genes fibrogénicos en ratones alimentados con dieta MCD. Análisis de expresión de mRNA mediante qPCR en tejido hepático. Los valores se encuentran normalizados respecto al gen 18S rRNA y expresados como incremento versus dieta estándar. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=4-11). \*, p<0.05 versus MCD; #, p<0.05 versus dieta estándar.

### 3.7 Estudio de otros genes implicados en la fisiopatología de NAFLD

De manera complementaria, se analizó la expresión de algunos genes relevantes en procesos que participan en el metabolismo lipídico y en la fisiopatología NAFLD.

Por una parte, estudiamos la enzima mitocondrial CPT1, que media el transporte de ácidos grasos para su posterior  $\beta$ -oxidación. En comparación con la dieta estándar, la expresión de génica de la isoforma *Cpt1a* se elevó de forma significativa en todos los grupos experimentales, siendo mayor la expresión en aquellos grupos tratados con PS5 y S1 (Fig. 48A).

Asimismo, se analizó el coactivador 1 $\alpha$  de PPAR $\gamma$  (PGC1 $\alpha$ ), que regula genes involucrados en el metabolismo energético, interaccionando con múltiples factores de transcripción. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de *Pgc1 $\alpha$*  entre los grupos MCD y los grupos tratamiento (Fig. 48B).

Por último, se estudió la expresión de CHOP, proteína asociada a estrés del retículo endoplasmático e implicada en la iniciación de la apoptosis. La expresión génica de *Chop* se elevó de manera significativa en todos los grupos experimentales que recibieron dieta MCD, comparado con el grupo control, pero disminuyó en los grupos que habían sido tratados con los péptidos PS5 y S1, tanto a 2 como a 4 semanas (Fig. 48C).

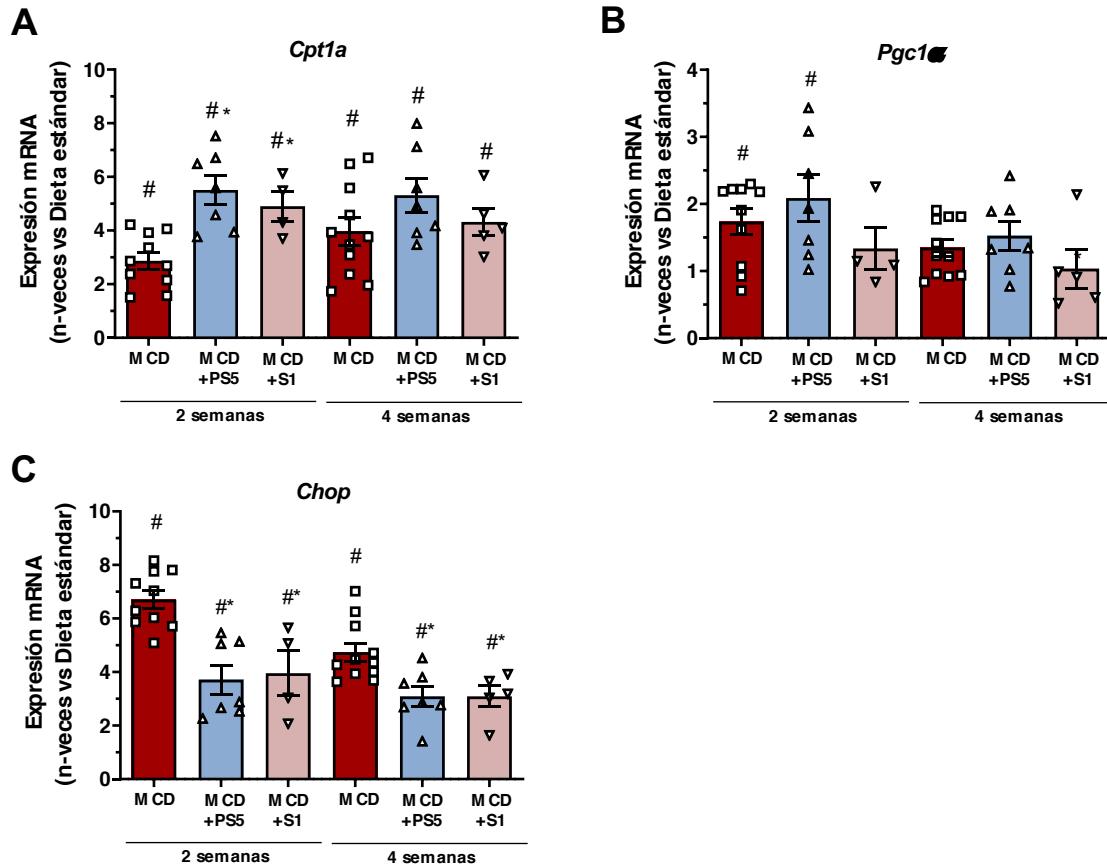


Figura 48. Expresión de genes involucrados metabolismo lipídico y estrés del retículo endoplasmático. Análisis mediante qPCR de expresión de (A) *Cpt1a*, (B) *Pgc1α* y (C) *Chop* en tejido hepático. Los valores se encuentran normalizados respecto al gen 18S rRNA y expresados como incremento versus dieta estándar. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=4-11). \*, p<0.05 versus MCD; #, p<0.05 versus dieta estándar.

## 4. ESTUDIO DE LOS PÉPTIDOS PS5 Y S1 EN NAFLD EXPERIMENTAL INDUCIDO POR DIETA ALTA EN GRASA

El modelo de dieta MCD es uno de los más empleados en el estudio de los mecanismos de inflamación, estrés oxidativo y fibrosis involucrados en NAFLD/NASH. Sin embargo, este modelo no reproduce algunas de las características patológicas observadas en humanos, ya que los animales alimentados con dieta MCD muestran un descenso en el peso corporal y en los niveles de triglicéridos y colesterol en sangre, y no exhiben resistencia a la insulina, siendo lo opuesto a lo observado en individuos con obesidad/sobrepeso y NAFLD. Por ello, en nuestros estudios se quiso comparar el efecto de los péptidos derivados de SOCS1 en otro modelo de NAFLD basado en la administración de dieta HFD en ratones ApoE<sup>-/-</sup>. Este modelo de NAFLD es menos agresivo que el inducido por dieta MCD, pero reproduce características histopatológicas y alteraciones metabólicas propias de la enfermedad.

### 4.1 Caracterización del modelo de NAFLD inducido por dieta alta en grasa

El modelo de esteatosis hepática inducida por una dieta rica en grasa se realizó en ratones ApoE<sup>-/-</sup> de 10-14 semanas de edad, que se alimentaron con dieta HFD durante 8 y 12 semanas en las que se administró a los animales el tratamiento con los péptidos PS5 (dosis de 60 µM y 125 µM) y S1 (125 µM) o su vehículo correspondiente, en las condiciones ya descritas anteriormente.

El peso corporal de los animales aumentó progresivamente durante las semanas de seguimiento (**Fig. 49, A y B**). Sin embargo, el incremento respecto al grupo control (dieta estándar) solamente fue significativo en el grupo con PS5-60µM en las últimas 4 semanas de HFD (**Fig. 49B**). Tras 12 semanas de seguimiento, se evidenció un aumento en el peso hepático de los animales que recibieron HFD sin tratamiento (1.73g±0.05g) y con tratamiento con S1 (1.80g±0.05g), en comparación con el grupo control (1.55±0.05g), manteniéndose la ratio peso hepático/peso corporal individual.

En el modelo con péptido S1, los valores de glucosa en sangre no experimentaron cambios entre ninguno de los grupos experimentales (**Fig. 49C**). Además, el test de tolerancia a glucosa llevado a cabo para evaluar una posible resistencia a insulina no mostró tampoco diferencias significativas entre los grupos tras 12 semanas de HFD (**Fig. 49D**).



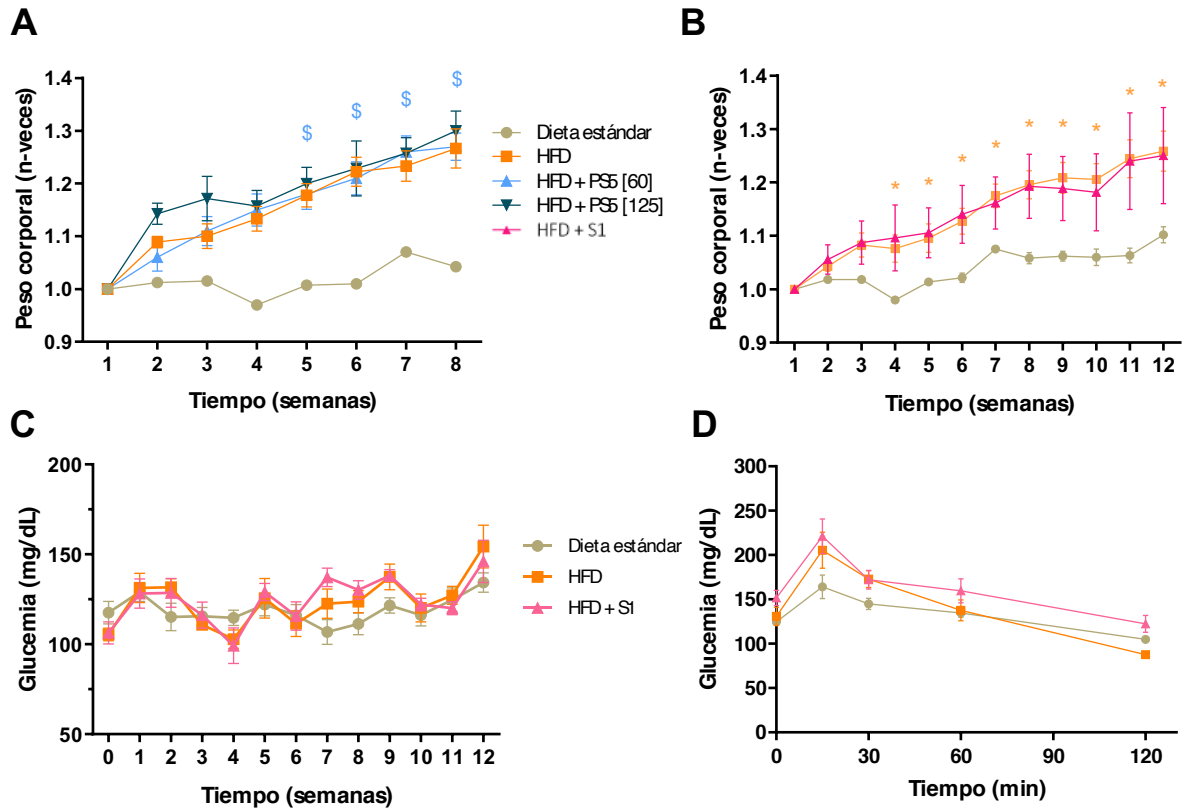


Figura 49. Seguimiento del peso corporal y la glucemia en el modelo de NAFLD asociado a HFD. (A) Evolución del peso corporal (A) durante 8 semanas de HFD y tratamiento con péptido PS5 y (B) durante 12 semanas de HFD y tratamiento con péptido S1. (C) Evolución de la glucemia durante 12 semanas de HFD y tratamiento con S1. (D) Test de tolerancia a glucosa realizado en la semana 11 del estudio. Se muestran los valores promedio del total de animales/grupo a cada tiempo  $\pm$  EEM. \*,  $p < 0.05$  HFD versus dieta estándar.  $^{\S}$ ,  $p < 0.05$  PS5-60 versus dieta estándar.

A continuación, se evaluaron los niveles de triglicéridos en suero, sin observarse cambios entre el grupo de dieta estándar y los grupos de HFD, ni tampoco entre estos grupos respectivos de tratamiento con péptidos PS5 y S1 (Fig. 50).

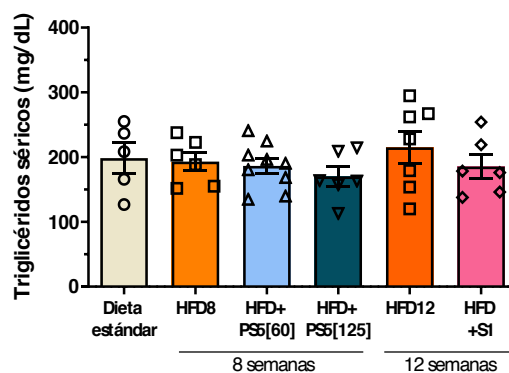
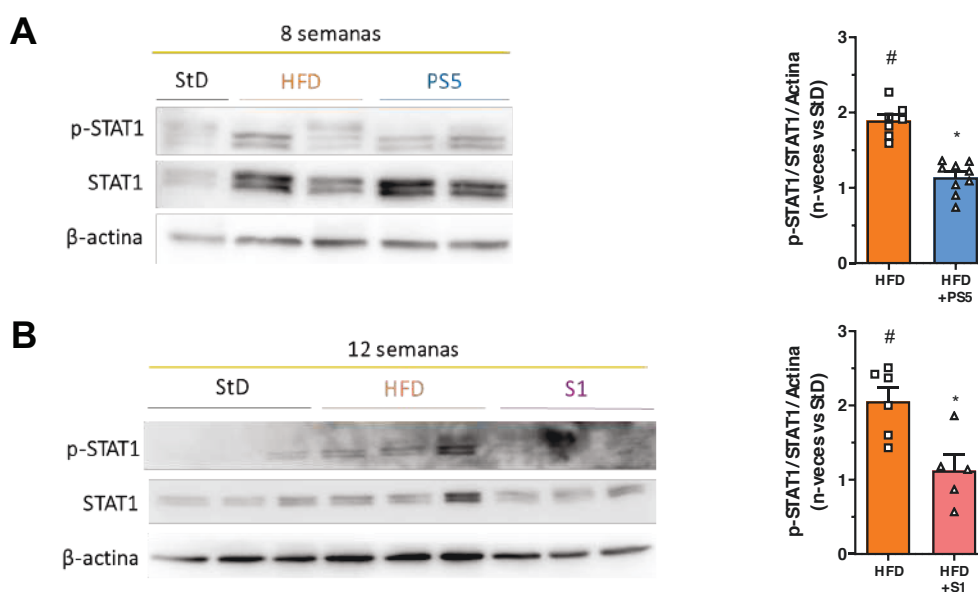


Figura 50. Niveles séricos de triglicéridos en el modelo experimental de NAFLD inducido por HFD. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo ( $n=5-8$ ).



## 4.2 Activación hepática de la vía JAK/STAT por dieta alta en grasa y efecto de los tratamientos con PS5 y S1

Para evaluar la activación de la vía JAK/STAT en el modelo de NAFLD inducido por HFD y confirmar que los péptidos PS5 y S1 ejercen sus efectos a través de la inhibición de dicha vía, se realizaron experimentos de Western blot en los hígados de los animales estudiados. De esta manera, en los grupos HFD se observó un aumento significativo de la fosforilación de STAT1 tanto a 8 como a 12 semanas (Fig. 51). Por el contrario, los tratamientos con PS5 y S1 redujeron la activación de STAT1 inducida por HFD (Fig. 51).



**Figura 51. Activación hepática de la vía JAK/STAT en NAFLD experimental.** Western blot representativos de STAT1 (fosforilado y total) y  $\beta$ -actina (control de carga) en hígados de ratones alimentados con dieta HFD durante **(A)** 8 semanas y **(B)** 12 semanas. Las gráficas muestran la cuantificación densitométrica de los niveles de p-STAT1, normalizados por STAT total y control de carga a ambos tiempos, expresada como incremento versus dieta estándar. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=5-9). \*, p<0.05 versus HFD; #, p<0.05 versus dieta estándar (StD).

## 4.3 Evaluación del daño hepático en el modelo de NAFLD inducido por dieta grasa

Para la evaluación del daño hepático, se realizaron tinciones histológicas con hematoxilina-eosina y se midieron los niveles de GPT en suero en los modelos de HFD. La evaluación histopatológica reveló que la esteatosis observada en los grupos con HFD fue principalmente microvesicular, con presencia de algunos focos inflamatorios (inflamación lobular) (Fig. 52).

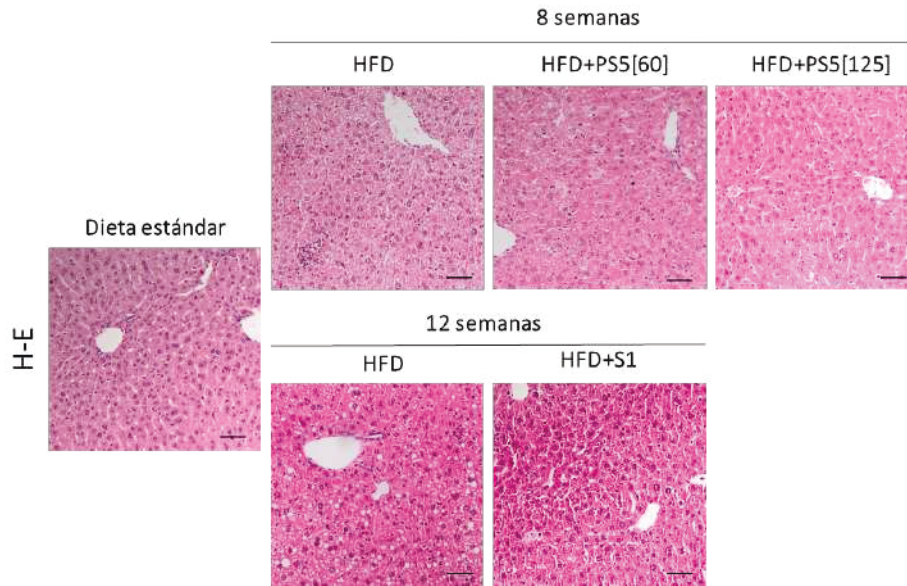


Figura 52. Caracterización del daño hepático en el modelo murino de NAFLD inducido por HFD. Imágenes representativas (barra de escala = 50  $\mu$ m) de secciones hepáticas teñidas con hematoxilina-eosina en el modelo de 8 semanas de HFD con péptido PS5 y de 12 semanas de HFD con péptido S1.

En el modelo de 8 semanas, los niveles séricos de GPT se mantuvieron invariables en los grupos experimentales alimentados con HFD, sin existir diferencias tras la administración del péptido PS5 (Fig. 53). Tras 12 semanas, se incrementó ligeramente el promedio de GPT en el grupo de HFD, en comparación con el grupo equivalente a 8 semanas. En este caso, el tratamiento con el péptido S1 disminuyó de manera significativa los niveles séricos de GPT (Fig. 53).

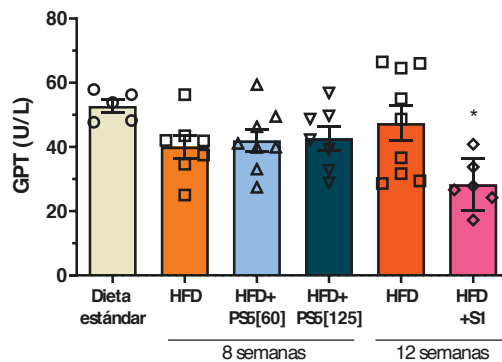
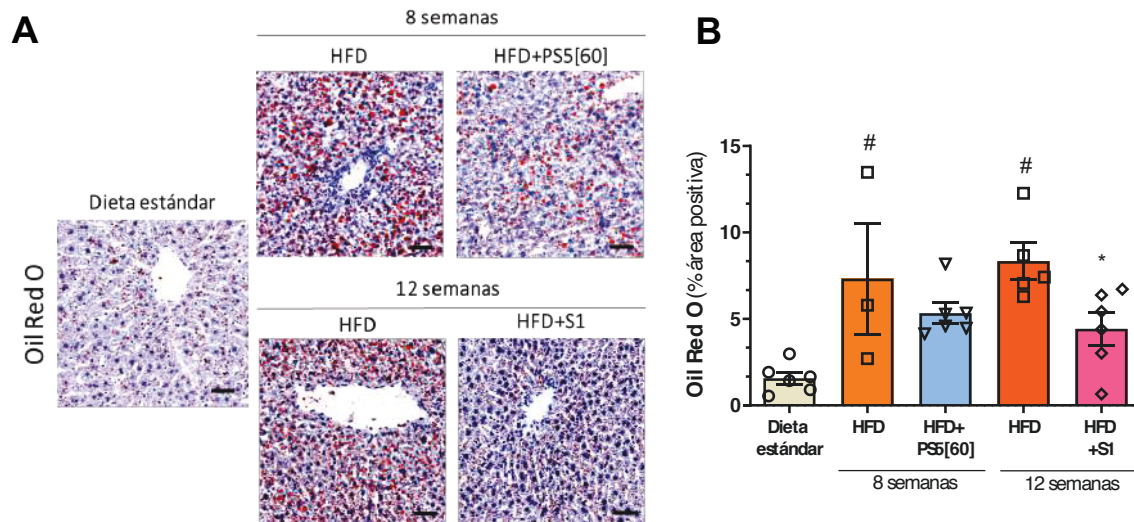


Figura 53. Niveles séricos de enzima transaminasa GPT en modelo murino de HFD. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=5-10). \*,  $p < 0.05$  versus HFD (12).

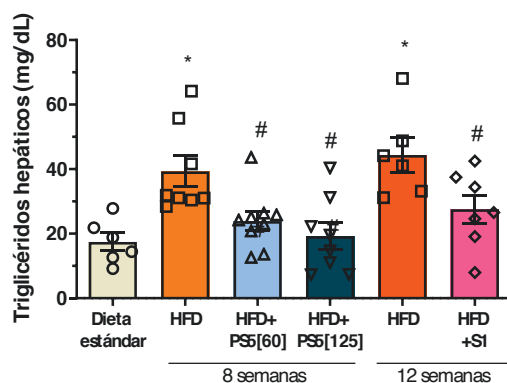
#### 4.4 Estudio del contenido lipídico en NAFLD experimental

Con el objeto de cuantificar el contenido lipídico intrahepático en los ratones ApoE<sup>-/-</sup> con HFD, se realizaron tinciones histológicas de Oil Red O en secciones de tejido hepático. La cuantificación de la tinción positiva reveló un mayor acúmulo de gotas lipídicas en los grupos alimentados con HFD a 8 y 12 semanas, sin diferencias entre ambos tiempos, existiendo una disminución significativa en el grupo que recibió tratamiento con S1 (Fig. 54).



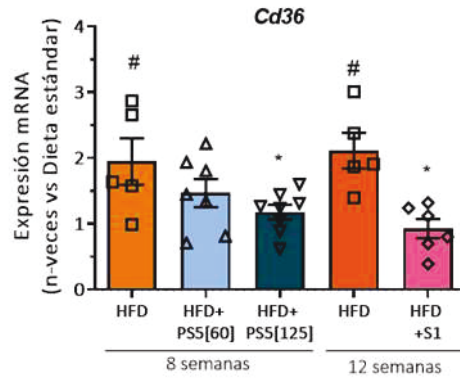
**Figura 54.** Estudio del contenido lipídico intrahepático en NAFLD inducido por HFD. (A) Imágenes representativas (barra de escala = 50  $\mu$ m) de secciones hepáticas teñidas con Oil Red O. (B) Cuantificación de la tinción (rojo) expresado como % de tinción positiva. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=3-6). #, p<0.05 vs dieta estándar; \*, p<0.05 versus HFD.

A continuación, se aislaron y cuantificaron los triglicéridos intrahepáticos de los diferentes grupos experimentales. Tanto a 8 como a 12 semanas se elevaron significativamente los niveles de triglicéridos en los grupos de HFD, existiendo un descenso en los grupos tratados con los péptidos PS5 y S1 (Fig. 55).



**Figura 55.** Cuantificación de triglicéridos hepáticos en modelos de HFD. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=6-9). \*, p<0.05 versus HFD. #, p<0.05 versus dieta estándar.

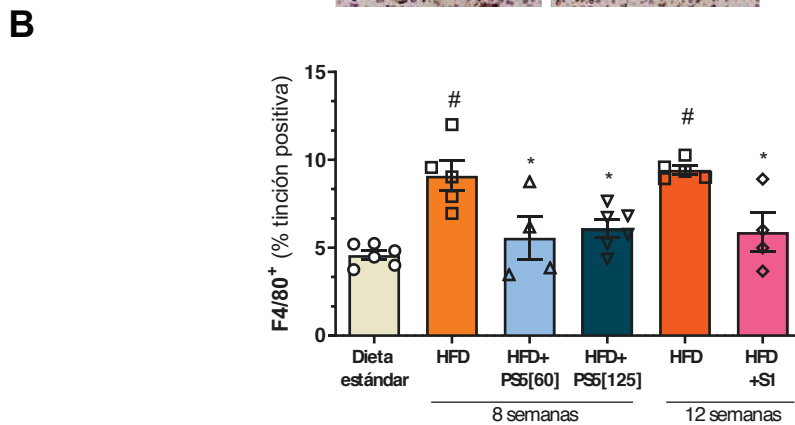
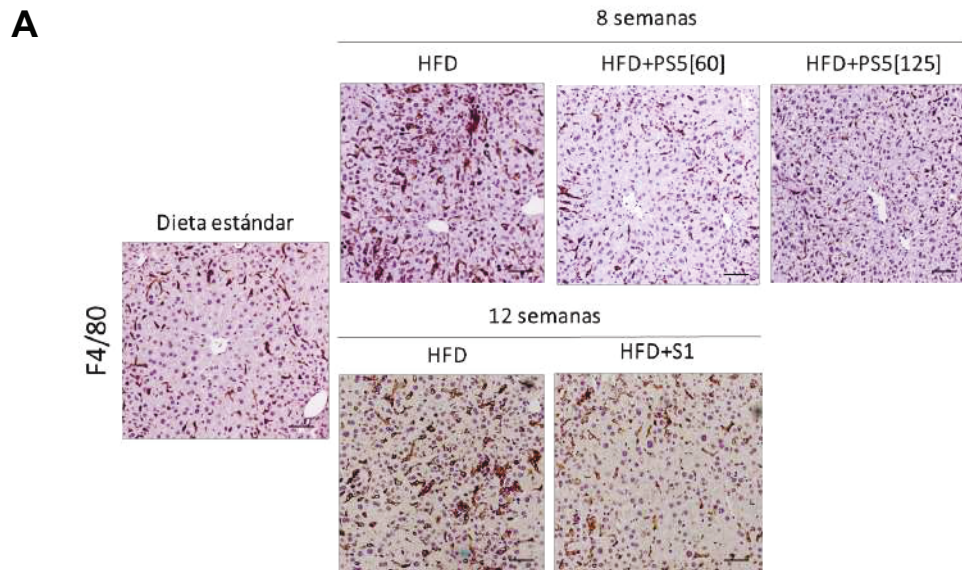
Se estudió la expresión génica de algunos transportadores de entrada y salida de lípidos. La expresión del transportador de entrada *Cd36* se incrementó de manera significativa tanto a 8 como a 12 semanas, disminuyendo su expresión en los grupos tratados con péptido PS5 (dosis de 125  $\mu$ M) y péptido S1 (Fig. 56). Por el contrario, el incremento de la expresión de los transportadores de eflujo de lípidos *Abca1* y *Abcg1* no fue significativo con la administración de HFD, ni se modificó en presencia de los péptidos PS5 y S1 (no mostrado).



**Figura 56. Expresión génica de transportador de entrada de lípidos en tejido hepático en modelo murino de HFD.** Análisis de expresión de mRNA mediante qPCR en tejido hepático. Los valores se encuentran normalizados respecto al gen 18S rRNA y expresados como unidades arbitrarias (u.a.). Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=5-7). \*, p<0.05 versus HFD; #, p<0.05 versus dieta estándar.

#### 4.5 Estudio de la respuesta inflamatoria en el modelo murino de esteatosis hepática

La caracterización histológica reveló la presencia de inflamación lobular en los hígados de los ratones ApoE<sup>-/-</sup> alimentados con HFD. Por ello, se decidió estudiar mediante técnicas inmunohistoquímicas el contenido en macrófagos presentes en el tejido hepático de estos animales. La tinción de F4/80<sup>+</sup> reveló una mayor presencia de macrófagos en los hígados de los grupos HFD a 8 y 12 semanas, que disminuía de manera estadísticamente significativa en los grupos de tratamiento con PS5 y S1 (Fig. 57).



**Figura 57. Contenido hepático de macrófagos en NAFLD experimental. (A)** Imágenes representativas (barra de escala = 50 μm) de la detección inmunohistoquímica macrófagos F4/80<sup>+</sup>. **(B)** Análisis cuantitativo (expresado como % de células positivas por área) de macrófagos F4/80<sup>+</sup>. Se muestran datos individuales y promedio ± EEM del total de animales/grupo (n=4-7). \*, p<0.05 versus HFD; #, p<0.05 versus dieta estándar.

A continuación, se evaluó la expresión génica de algunas moléculas inflamatorias en los hígados de los animales del modelo de NAFLD experimental. En líneas generales, la administración de HFD incrementó la expresión de las quimioquinas y citoquinas hepáticas estudiadas (*Ccl2*, *Ccl5*, *Cxcl10*, *Il-6*, *Tnfa* e *Ifny*), sin existir diferencias significativas entre 8 y 12 semanas de dieta (Fig. 58, A-F). Además, la terapia con los péptidos PS5 y S1 inhibió significativamente este incremento (Fig. 58, A-F).

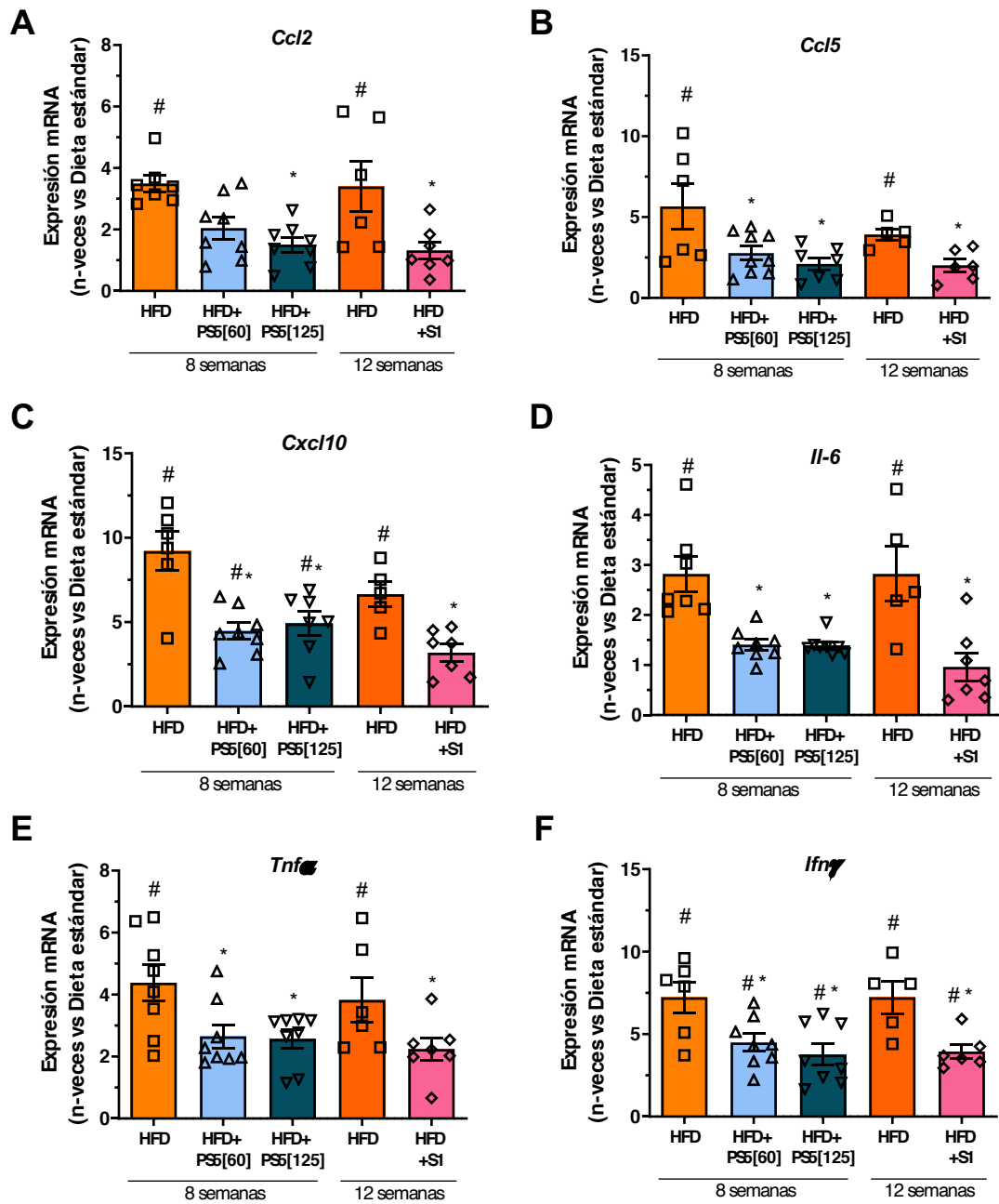


Figura 58. Estudio de expresión génica de moléculas inflamatorias en el tejido hepático de animales con HFD. Análisis mediante qPCR de la expresión de (A-C) quimioquinas y (D-F) citoquinas en tejido hepático. Los valores se encuentran normalizados respecto al gen 18S rRNA y expresados como unidades arbitrarias (u.a.). Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=5-9). \*, p<0.05 versus HFD; #, p<0.05 versus dieta estándar.



#### 4.6 Evaluación de la respuesta fibrogénica en esteatosis hepática experimental

A pesar de no hallar un daño hepático severo en los animales alimentados durante 8 o 12 semanas con HFD, se realizaron tinciones histológicas de tricrómico de Masson en secciones hepáticas para confirmar que no existía fibrosis en ninguno de los grupos experimentales (Fig. 59A). No obstante, se estudió la expresión de genes profibróticos, comprobándose que *Tgf-β* se incrementó tras 12 semanas de dieta, y disminuyó con el tratamiento de S1, mientras que la expresión de *Col1a1* no experimentó cambios entre los grupos experimentales de estudio (Fig. 59, B y C).

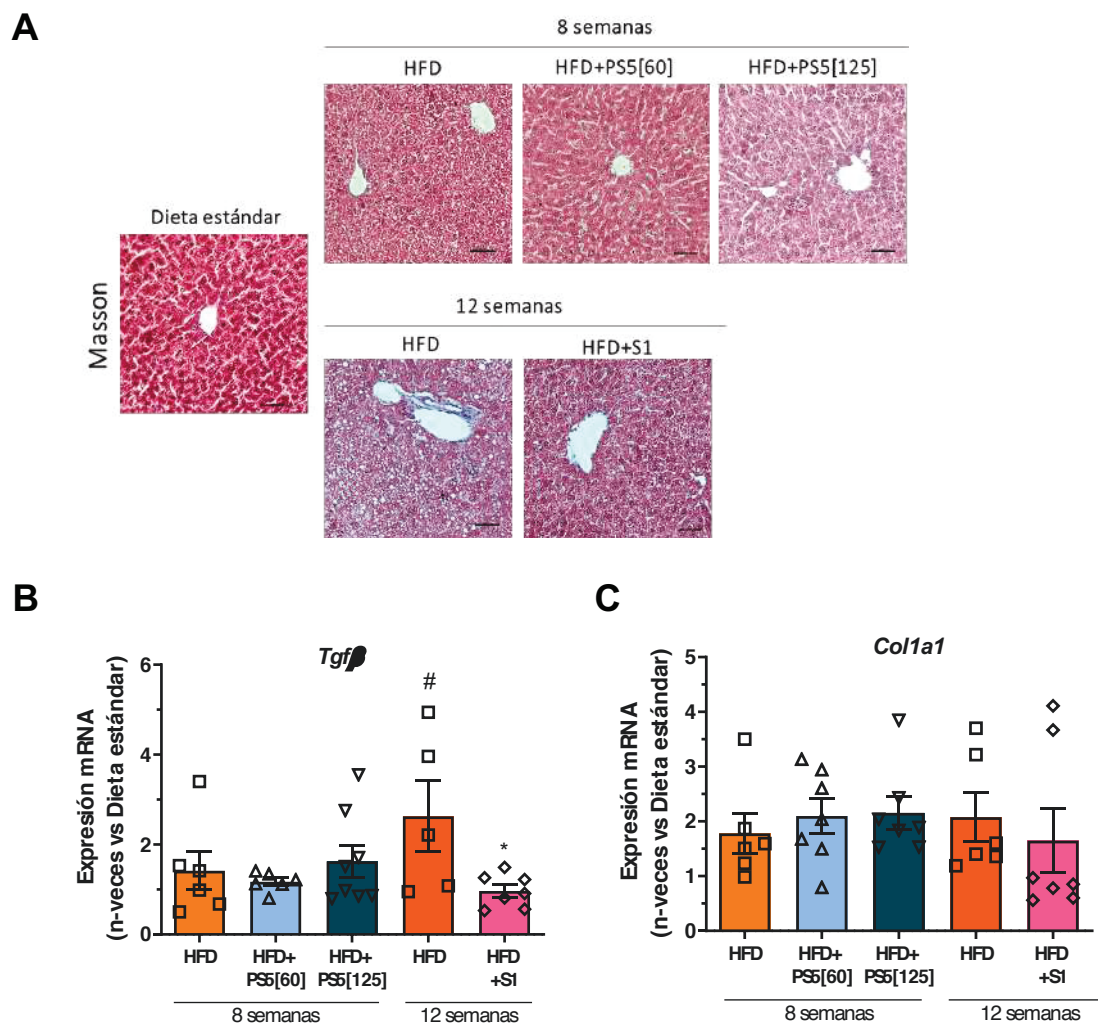
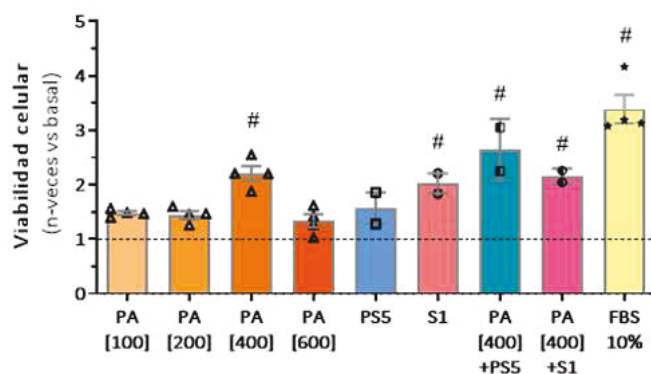


Figura 59. Estudio de presencia de fibrosis y expresión de genes profibróticos en tejido hepático del modelo murino de esteatosis inducida por HFD. (A) Imágenes representativas (barra de escala = 50  $\mu$ m) de secciones hepáticas teñidas con tricrómico de Masson. (B, C) Análisis de expresión de mRNA mediante qPCR en tejido hepático. Los valores se encuentran normalizados respecto al gen 18S rRNA y expresados como unidades arbitrarias (u.a.). Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de animales/grupo (n=5-8). \*, p<0.05 versus HFD; #, p<0.05 versus dieta estándar.

## 5. EFECTOS *IN VITRO* DE LOS PÉPTIDOS PS5 Y S1 EN HEPATOCITOS

Los experimentos *in vitro* en el contexto de NAFLD se llevaron a cabo en una línea celular de hepatocitos murinos inmortalizados estimulados con ácido palmítico (PA). En primer lugar, los ensayos MTT de viabilidad celular a 24 horas descartaron un posible efecto citotóxico de PA (200-600  $\mu$ M) y de los péptidos PS5 (25  $\mu$ M) y S1 (59  $\mu$ M), e incluso algunas combinaciones tuvieron un efecto proliferativo (Fig. 60). Sin embargo, a partir de 24 horas algunas dosis de PA indujeron mortalidad celular (no mostrado). Por ello, en el resto de los experimentos las células se pretrataron durante 90 minutos con los péptidos PS5 y S1 y posteriormente se estimularon con PA 400  $\mu$ M durante 6 y 16 horas.

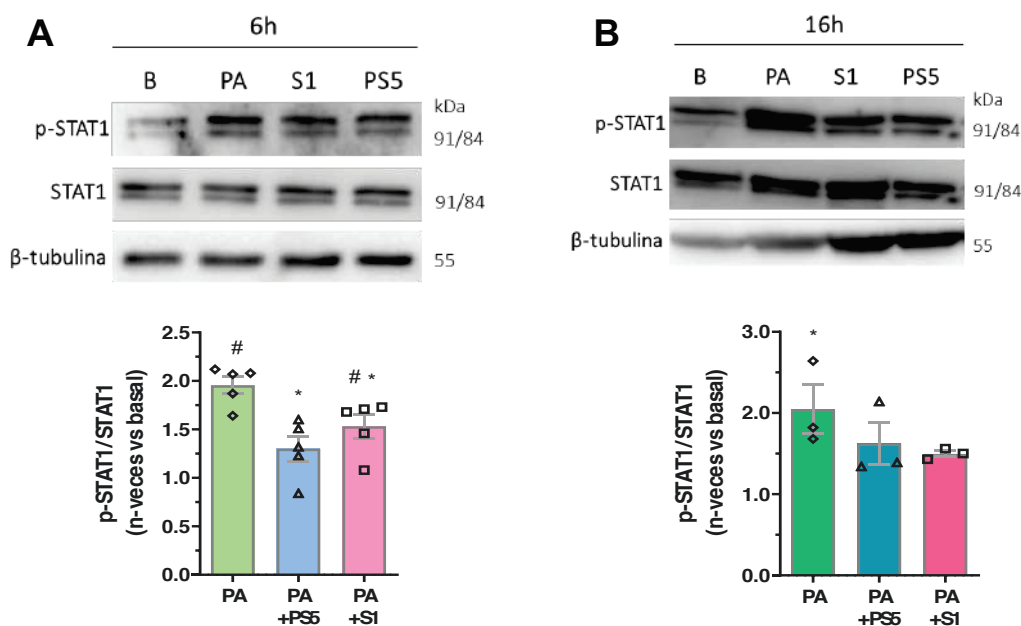


**Figura 60. Viabilidad celular en hepatocitos expuestos a PA y/o péptidos PS5 y S1.** Ensayo MTT en células incubadas durante 24 horas con diferentes concentraciones de PA y péptidos PS5 (25  $\mu$ M) o S1 (59  $\mu$ M), empleando 10% FBS como control positivo. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de experimentos (n=2-4). # $p$  < 0.05 versus basal.

### 5.1 La activación de la vía JAK/STAT en hepatocitos estimulados con ácido palmítico y efecto de los péptidos PS5 y S1

La activación de la vía JAK/STAT se estudió mediante Western blot en los hepatocitos estimulados con PA durante 6 y 16 horas en presencia o ausencia de los péptidos PS5 y S1. Los resultados obtenidos permitieron confirmar que el PA induce la fosforilación de STAT1 en hepatocitos a ambos tiempos de estimulación y que los péptidos PS5 y S1 fueron capaces de reducir parcialmente esta activación (Fig. 61).



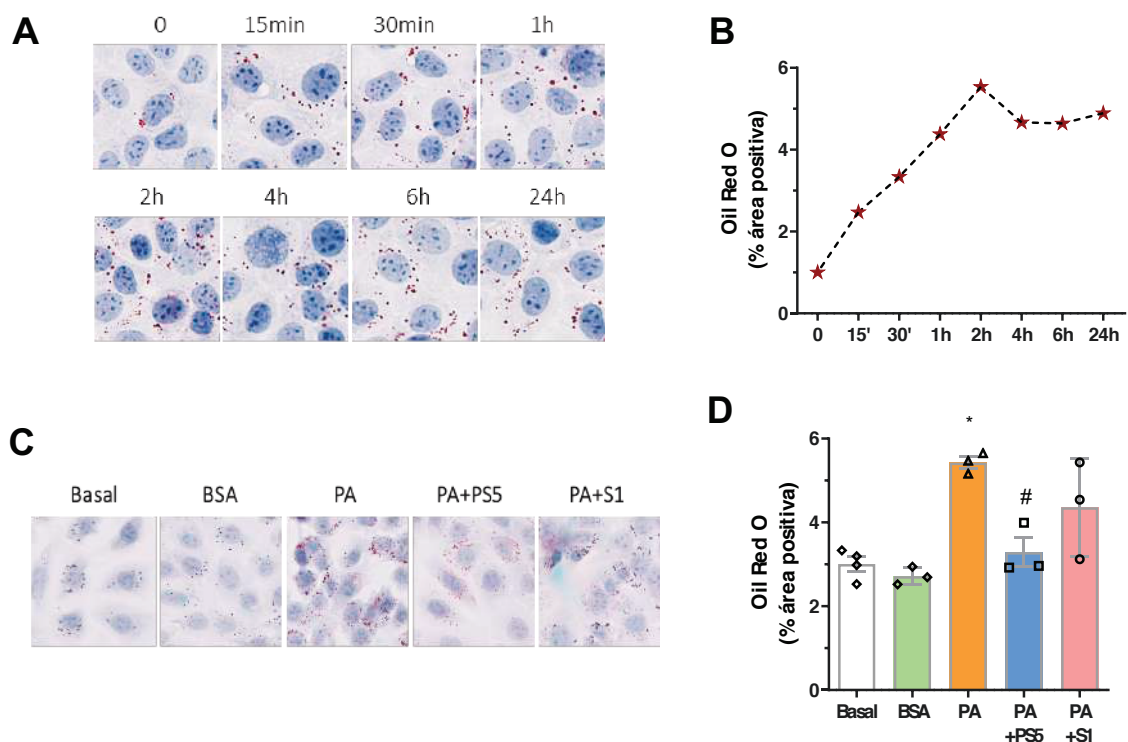


**Figura 61. Activación de STAT1 en hepatocitos estimulados con PA.** Western blot representativos de STAT1 (fosforilado y total) y  $\beta$ -tubulina (control de carga) en hepatocitos pretratados con los péptidos PS5 (25  $\mu$ M) y S1 (59  $\mu$ M) y estimulados con PA (400 $\mu$ M) durante **(A)** 6 horas y **(B)** 16 horas. Las gráficas inferiores muestran la cuantificación densitométrica de los niveles de p-STAT1, normalizados por STAT1 total expresados como incremento versus basal. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de experimentos (n=3-5). # $p < 0.05$  versus basal. \* $p < 0.05$  versus PA.

## 5.2 Los péptidos PS5 y S1 reducen la captación de ácido palmítico en hepatocitos

La capacidad de captación de lípidos por los hepatocitos *in vitro* se estudió empleando la tinción de Oil Red O en las células previamente estimuladas con PA y fijadas. En una primera aproximación, se estudió el contenido de lípidos captado por los hepatocitos a diferentes tiempos, observándose que existía un pico máximo en torno a las 2 horas tras la adición de PA (Fig. 62, A y B).

Una vez establecido este tiempo, se realizaron experimentos de captación de PA a 2 horas en presencia de los péptidos PS5 y S1, empleando BSA como control negativo. La cuantificación de las gotas lipídicas intracelulares demostró un menor contenido lipídico en los hepatocitos pretratados con los péptidos PS5 y S1, siendo la diferencia estadísticamente significativa en el caso de PS5 (Fig. 62, C y D).



**Figura 62. Estudio de la captación de PA en hepatocitos *in vitro*.** (A) Imágenes representativas de tinción Oil Red O en hepatocitos estimulados con PA (400 $\mu$ M) a diferentes tiempos. (B) Curva de la captación de lípidos (% tinción positiva) a diferentes tiempos. (C) Imágenes representativas de tinción Oil Red O en hepatocitos pretratados con los péptidos PS5 (25  $\mu$ M) o S1 (59  $\mu$ M) y estimulados con PA (400 $\mu$ M) durante 2 horas, empleando BSA como control negativo. (D) Cuantificación de gotas lipídicas (% tinción positiva). Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de experimentos (n=3-4). # $p < 0.05$  versus basal. \* $p < 0.05$  versus PA.

Para dilucidar si la menor captación de lípidos observada en los hepatocitos en presencia de los péptidos PS5 y S1 es debida a cambios en la expresión de los transportadores de entrada y salida de lípidos, se analizaron los niveles de *Cd36C*, *Abca1* y *Abcg1*, genes ya estudiados *in vivo*.

La expresión génica del transportador de entrada *Cd36* en los hepatocitos se elevó tras 6 horas de incubación con PA, reduciéndose, aunque no de forma significativa, con el pretratamiento con PS5 y S1 (Fig. 63A), lo que indicaría una menor entrada de PA. Sin embargo, no se observaron cambios significativos tras 16 horas de estímulo (Fig. 63B). De forma complementaria, la expresión del transportador de salida de lípidos *Abca1* se elevó en presencia de PA tanto a 6 como a 16 horas, en comparación con la condición basal (Fig. 63, A y B). Además, este incremento fue superior con ambos péptidos a 6 horas (no significativo) y con el péptido S1 a 16 horas (Fig. 63, A y B), lo que sugiere una mayor tendencia a la salida de los lípidos captados por los hepatocitos. En cuanto a *Abcg1*, no se detectaron cambios en su expresión en estas condiciones experimentales (no mostrado).

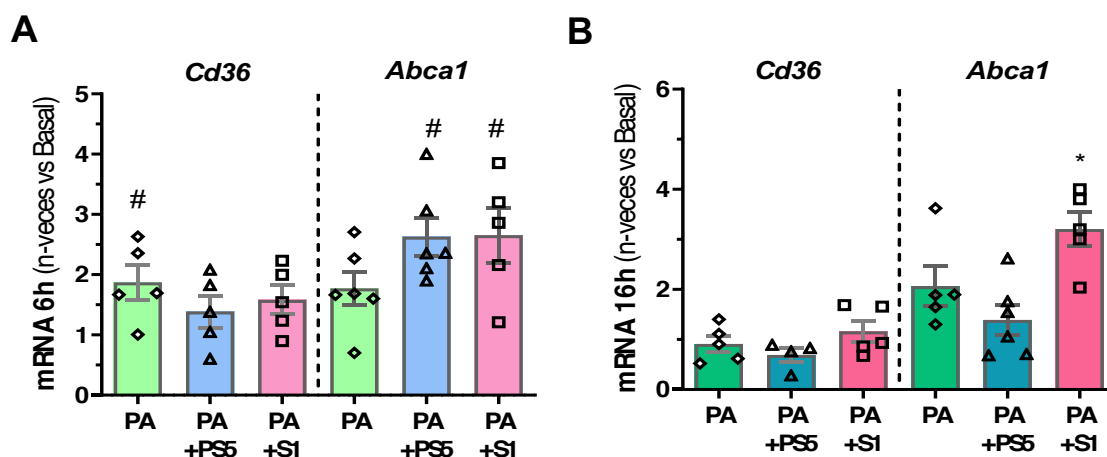


Figura 63. Expresión génica de transportadores lipídicos en hepatocitos. Análisis de expresión de mRNA mediante qPCR en hepatocitos estimulados con PA 400 $\mu$ M durante (A) 6 horas y (B) 16 horas en presencia/ausencia de los péptidos PS5 y S1. Los valores se encuentran normalizados respecto al gen 18S rRNA y expresados como n-veces versus Basal. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de experimentos (n=4-6). \*, p<0.05 versus PA; #, p<0.05 versus Basal.

### 5.3 Análisis de expresión de genes implicados en inflamación, metabolismo lipídico y estrés del retículo endoplasmático

Por último, se analizó la expresión de diversos genes implicados en la respuesta inflamatoria en hepatocitos para estudiar cómo afecta el estímulo con PA a diferentes tiempos y comprobar si el pretratamiento con los péptidos PS5 y S1 induce cambios en dicha expresión. Tanto a 6 como a 16 horas, la adición de PA incrementó significativamente la expresión génica de *Ccl2*, *Ccl5*, *Cxcl10* e *Il-6* (Fig. 64, A y B). El pretratamiento con péptido PS5 y S1 revirtió el incremento de la expresión génica de todas las moléculas inflamatorias estudiadas tras 6 horas de incubación con PA (Fig. 64A). Sin embargo, tras 16 horas con PA solamente se observaron cambios significativos en la reducción de los niveles de expresión de *Ccl5* con péptido S1, y en *Il-6* con péptido PS5 (Fig. 64B).

Adicionalmente, se estudió la expresión de genes implicados en metabolismo lipídico (*Cpt1a* y *Pgc1a*) y estrés del retículo endoplasmático (*Chop*). Comparado con la condición basal, la expresión de *Cpt1a* se incrementó a ambos tiempos, sin experimentar cambios con los péptidos (Fig. 64, C y D), mientras que la expresión de *Pgc1a* se redujo notablemente tras 16 horas en todas las condiciones (Fig. 64D). Por último, tanto PS5 como S1 inhibieron el incremento de la expresión génica de *Chop* inducida por PA, tanto a 6 horas (Fig. 64C) como a 16 horas (Fig. 64D).

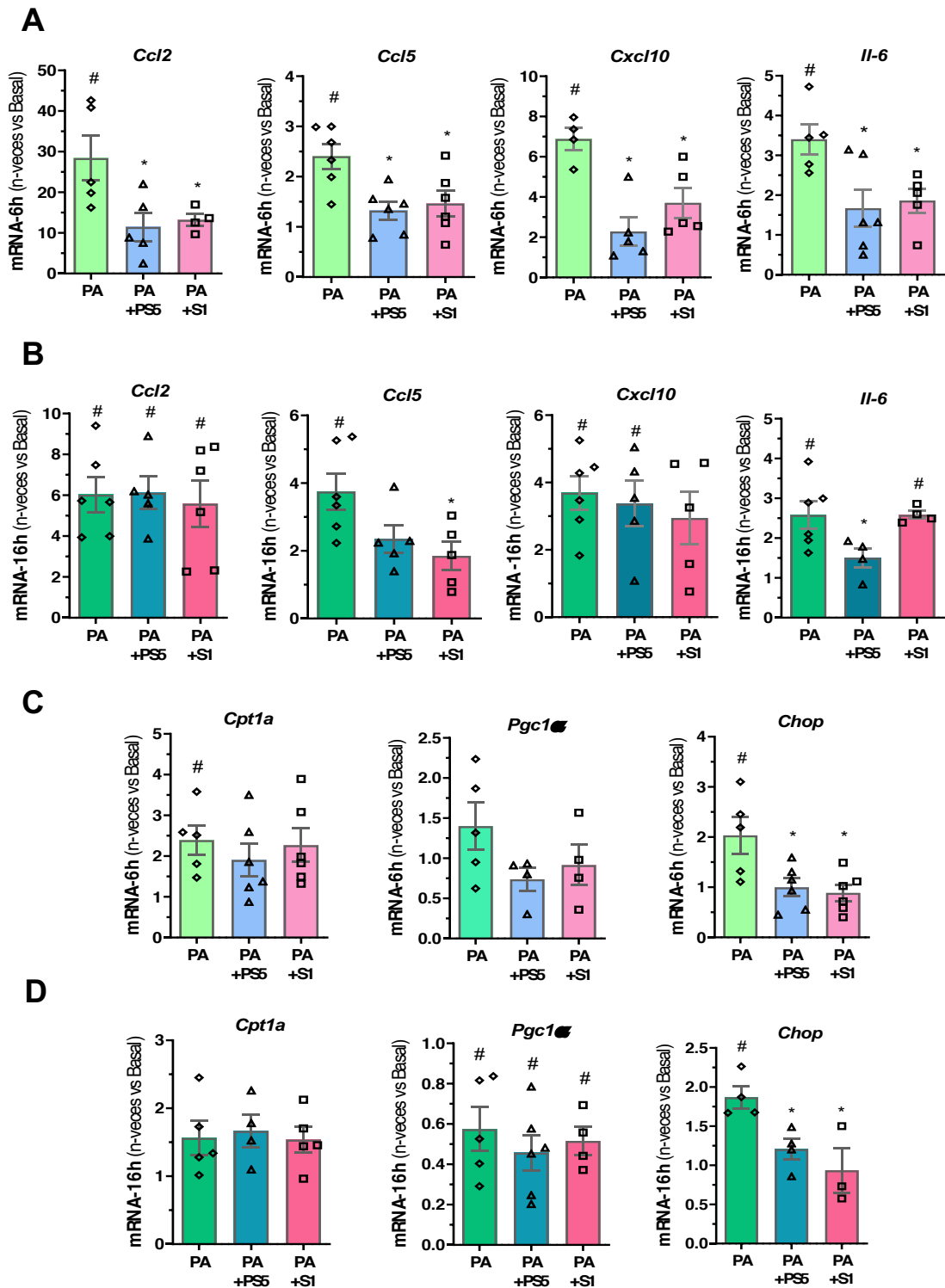


Figura 64. Expresión de genes de inflamación, metabolismo y estrés del retículo en hepatocitos. Análisis mediante qPCR de la expresión de genes indicados en hepatocitos estimulados con PA (A, C) durante 6 horas y (B, D) 16 horas en presencia/ausencia de los péptidos PS5 y S1. Los valores se encuentran normalizados respecto al gen 18S rRNA y expresados como n-veces versus Basal. Se muestran datos individuales y promedio  $\pm$  EEM del total de experimentos (n=4-6). \*, p<0.05 versus PA; #, p<0.05 versus Basal.

## **VI. Discusión**

Actualmente, las enfermedades cardiovasculares continúan siendo la primera causa de muerte prematura en el mundo y conllevan importantes costes en nuestros sistemas sanitarios. Además de los factores de riesgo cardiometabólicos, resultan también relevantes aquellos relacionados con el estilo de vida, así como los ambientales y socioeconómicos (Leong *et al.*, 2017). Por ello, la prevalencia mundial de las enfermedades cardiovasculares y metabólicas se ha incrementado notablemente en las últimas décadas, acompañada de las crecientes tasas de obesidad y de la incidencia de otros factores de riesgo cardiometabólicos, como hipertensión, diabetes tipo 2, síndrome metabólico o dislipemias (Gerds y Regitz-Zagrosek, 2019).

Esta tesis se centra en **AAA** y **NAFLD**, dos patologías que continúan en la actualidad sin ninguna terapia farmacológica específica aprobada. Los estudios realizados durante esta tesis contribuyen a la investigación de nuevas aproximaciones terapéuticas en las patologías de AAA y NAFLD. En concreto, este trabajo está dirigido a la caracterización de mecanismos implicados en el efecto protector de dos péptidos derivados de la proteína SOCS1, a través de la modulación de la vía JAK/STAT durante el daño vascular y hepático. El péptido S1, que mimetiza la secuencia KIR de SOCS1, se encuentra conjugado a una secuencia hidrofóbica que le permite penetrar en el interior celular para suprimir la actividad quinasa de JAK, y la consecuente activación de STAT. Por su parte, la secuencia PS5 contiene una serie de modificaciones que le confieren hidrosolubilidad y una mayor estabilidad. Este trabajo revela la primera **evidencia preclínica** de una novedosa aproximación terapéutica basada en las proteínas SOCS1 en modelos experimentales de AAA y NAFLD.

## Papel del eje JAK/STAT/SOCS en el desarrollo de AAA

Numerosos grupos de investigación han demostrado la importancia funcional de la vía de señalización JAK/STAT y de las proteínas SOCS en la enfermedad cardiovascular, mediando la mayoría de las respuestas inflamatorias que ocurren durante el proceso de aterogénesis y en la formación del AAA. Una de las herramientas de mayor utilidad de las que disponemos para profundizar en los mecanismos fisiopatológicos involucrados en AAA, así como en la búsqueda de nuevas aproximaciones farmacológicas, son los modelos experimentales desarrollados en animales. Entre ellos, destacan los modelos de AAA en roedores inducidos mediante perfusión aórtica de elastasa, infusión sistémica de AngII o aplicación periaórtica de cloruro cálcico. Estos modelos animales reproducen algunas características patológicas clave de esta enfermedad, como inflamación, destrucción de la ECM y dilatación aórtica (Lysgaard Poulsen *et al.*, 2016; Patelis *et al.*, 2017). Sin embargo, todos los modelos tienen limitaciones y ninguno de ellos recapitula a la perfección la patología del AAA humano. En esta tesis se empleó el **modelo murino**

**de AAA inducido por elastasa** para determinar el efecto de la terapia con peptidomiméticos de SOCS1, por ser uno de los modelos más empleados en la caracterización preclínica de nuevas terapias farmacológicas. La solución de elastasa aplicada en el lumen aórtico del ratón penetra en la lámina media y provoca la fragmentación de las fibras elásticas, produciendo dilatación arterial, acompañado de un gran infiltrado de leucocitos y muerte de VSMC. Se instaura así en el vaso un entorno de inflamación aguda y daño, que involucra VSMC, células endoteliales y fibroblastos, y promueve el reclutamiento de células T, monocitos/macrófagos y neutrófilos que a su vez liberan MMPs y elastasa en el lugar de la lesión (Sénémaud *et al.*, 2017).

Existe evidencia experimental de la **activación crónica** de la vía **JAK/STAT** y del papel clave de las proteínas **SOCS** en el **daño vascular**. Un ejemplo lo encontramos en la demostración de que la pérdida de SOCS1 en ratones con aterosclerosis provoca una compleja inflamación sistémica y acelera el proceso de aterogénesis (Grothusen *et al.*, 2012). Otro estudio remarca la importancia de estas proteínas, ya que la ausencia de SOCS1 agrava la arteriosclerosis experimental y la disfunción endotelial (Qin *et al.*, 2014). Por el contrario, nuestro grupo demostró que la sobreexpresión de SOCS1 y SOCS3 mediante vectores adenovirales protege frente a la inflamación vascular y el estrés oxidativo en modelos de aterosclerosis y diabetes experimental (Recio *et al.*, 2014; Recio *et al.*, 2017; Lopez-Sanz *et al.*, 2018).

Diversos estudios han descrito un aumento en los niveles de expresión de JAK2, STAT1/3 y SOCS1/3 en muestras de AAA humano en comparación con aortas sanas, junto con un incremento de citoquinas proinflamatorias (Eagleton *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2012; Harrison *et al.*, 2013; Kokje *et al.*, 2016; Ohno *et al.*, 2018; Xiao *et al.*, 2020). Nuestro grupo también describió niveles elevados de SOCS1/3 en VSMC y macrófagos de placas de ateroma humanas y murinas (Ortiz-Muñoz *et al.*, 2009). Los resultados del presente trabajo en el modelo de AAA inducido por elastasa corroboran la activación de la vía JAK/STAT en las lesiones murinas. Se observó que la generación de AAA incrementó los niveles de fosforilación de STAT1/3 en las lesiones aórticas murinas, así como la expresión génica de *Stat1/3* y *Socs1/3*. La sobreexpresión de *Socs1/3* hallada en este y otros estudios podría indicar un mecanismo compensatorio, aunque no suficiente, para frenar la inhibición crónica de la vía JAK/STAT en patologías inflamatorias. Además, se detectó la colocalización de p-STAT1/3 con macrófagos de la lesión vascular. Este resultado concordaría con la activación previamente descrita de STAT1, STAT2, STAT3 y STAT5 en las células inflamatorias residentes de la lámina adventicia del tejido aneurismático humano (Liao *et al.*, 2012).

La **inhibición terapéutica** de la vía **JAK/STAT** ha demostrado tener efectos beneficiosos en diversas patologías cardiovasculares. Tofacitinib, un inhibidor selectivo de JAK1-3, suprime la inflamación crónica en un modelo experimental de vasculitis (Zhang *et al.*, 2018), mientras que los inhibidores de JAK1/2 baricitinib y upadacitinib se encuentran actualmente en evaluación

clínica para su uso en arteritis (ClinicalTrials.gov, identificadores NCT03026504 y NCT03725202). Sin embargo, cabe destacar que ninguno de los Jakinibs ha sido testado en el contexto del AAA. Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que la inhibición de la vía JAK/STAT basada en **peptidomiméticos de SOCS1** tiene **efectos antiinflamatorios** y **antioxidantes** en diferentes modelos experimentales de aterosclerosis y nefropatía asociada a diabetes tipo 1 o tipo 2 (Recio *et al.*, 2014; Recio *et al.*, 2017; Lopez-Sanz *et al.*, 2018; Opazo-Ríos *et al.*, 2020; La Manna *et al.*, 2020; La Manna *et al.*, 2021). En el contexto del AAA, un estudio reciente describe que la incubación de tejido de AAA humano con piridona 6, un inhibidor pan-JAK, suprime la fosforilación de STAT3 y la secreción de citoquinas (Ohno *et al.*, 2018). En el presente trabajo experimental se ha comprobado que la administración del péptido S1, derivado de la proteína SOCS1, inhibe significativamente la activación de STAT1/3 y los niveles de expresión de *Stat1/3* y *Socs1/3* en las lesiones aórticas del modelo murino de AAA por perfusión de elastasa. El tratamiento con péptido S1 reduce la incidencia de AAA y el diámetro aórtico de las lesiones, acompañado de una menor pérdida de fibras elásticas y VSMC. Además, nuestros datos demuestran una correlación positiva entre los niveles de fosforilación de STAT1/3 y el tamaño del aneurisma. Una de las limitaciones de este estudio radica en el tipo de intervención que se realizó: aunque el tratamiento preventivo (el día previo a la perfusión aórtica de elastasa) ha demostrado ser beneficioso en la formación del AAA experimental, este hallazgo no podría extrapolarse a la práctica clínica donde los pacientes diagnosticados ya han desarrollado el AAA. Por ello, sería conveniente realizar modelos animales de administración terapéutica, por ejemplo, comenzando el día 7 después de la perfusión de elastasa, para determinar el impacto del péptido S1 en la progresión del AAA ya establecido.

Nuestros hallazgos contradicen un estudio previo en el que la pérdida de STAT1 en ratones ApoE<sup>-/-</sup> se traduce en aneurismas de mayor tamaño y en un aumento de la ruptura aórtica en un modelo de disección aórtica (Eagleton *et al.*, 2010). Sin embargo, en los últimos años diversos grupos de investigación han llevado a cabo estudios similares a los nuestros en modelos de AAA mediante infusión de AngII en ratones ApoE<sup>-/-</sup>, cuyos resultados apoyarían fuertemente nuestra hipótesis acerca de la relevancia de la vía JAK/STAT y el efecto protector de su inhibición durante la progresión del AAA. Por una parte, el grupo de Wu *et al.* constató que el tratamiento con BP-1-102, inhibidor específico de STAT3 que atenúa la inflamación mediada por las vías de JAK2/STAT3 y NF-κB, y disminuye la apoptosis en el tejido aórtico durante la formación del AAA (Wu *et al.*, 2020). Por otra parte, Xiao *et al.* demostraron que WP1066, un compuesto que inhibe específicamente JAK2/STAT3, disminuye la incidencia del AAA murino y atenúa su progresión. Estos investigadores observaron que la menor expresión de JAK2 y STAT3 se acompaña de una reducción en la degradación de elastina y en la neovascularización de la lámina media de las



lesiones aneurismáticas, junto con un incremento en la supervivencia en su modelo experimental de AAA (Xiao *et al.*, 2020). En 2015, Qin *et al.* demostraron que S3I-201, una pequeña molécula inhibidora de STAT3, era capaz de revertir los niveles de p-STAT3 y la expresión de TLR4, disminuyendo la incidencia y la severidad de los AAA inducidos por AngII (Qin *et al.*, 2015). Finalmente, en un modelo de disección aórtica inducida por AngII en ratones C57BL/6, se ha descrito que la señalización mediada por IL-6 y STAT3 media la ruptura del vaso, mientras que la aplicación de un inhibidor de STAT3 disminuyó la dilatación aórtica y el reclutamiento de linfocitos Th17 (Ju *et al.*, 2013).

La **vía JAK/STAT**, activada en respuesta a gran variedad de moléculas, promueve la expresión de numerosas citoquinas y quimioquinas que participan en los **procesos inflamatorios vasculares**, promoviendo el infiltrado de células inmunes en el tejido y contribuyendo a perpetuar la respuesta inflamatoria (Ohno *et al.*, 2018). Existe evidencia de que la inhibición de moléculas diana de la vía JAK/STAT, como CCL2 (Ishibashi *et al.*, 2004), TNF $\alpha$  (Hingorani *et al.*, 1998), IL-1 $\beta$  (Johnston *et al.*, 2013), IFN $\gamma$  (Shimizu *et al.*, 2004) o GM-CSF (Son *et al.*, 2015), resulta efectiva para frenar el desarrollo de AAA en modelos experimentales. En este sentido, nuestros resultados sugieren que el péptido S1 posee un marcado efecto antiinflamatorio en el AAA experimental, con un menor contenido de células inmunes infiltradas en la pared aórtica (macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y B) y una menor expresión de genes inflamatorios implicados en la formación de AAA, como CCL22, CCL5, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-17. Las investigaciones de Xiao *et al.*, Wu *et al.* y Qin *et al.* reportaron resultados similares en el modelo de AAA con AngII, constatando que las lesiones de animales tratados con inhibidores de STAT3 exhibían un menor infiltrado inflamatorio y una reducción en la expresión de citoquinas inflamatorias como CCL2, CCL5, IL-6 y CXCL10 (Qin *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2020; Xiao *et al.*, 2020). Resulta interesante que, al igual que sucede en nuestros estudios con el péptido S1, Wu *et al.* también reportaron un incremento en la expresión de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en AAA de animales tratados con el inhibidor de STAT3 (Wu *et al.*, 2020). Asimismo, la inhibición de JAK/STAT mediada por el péptido S1 reduce la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1. Este resultado concordaría con los estudios que indican que moléculas proinflamatorias como IL-6 estimulan la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 vía STAT3 (Didion, 2017).

Los macrófagos juegan un papel esencial en la patogénesis del AAA, tanto en el desarrollo inicial como en su crecimiento y posible ruptura, participando en procesos de inflamación, estrés oxidativo, reparación tisular y remodelado de la ECM (Raffort *et al.*, 2019). Durante la progresión del AAA, los macrófagos reclutados en las capas media y adventicia de la pared aórtica pueden polarizarse hacia diferentes fenotipos con funciones patogénicas y/o reparadoras. Como se explicó anteriormente, los macrófagos M1 proinflamatorios se activan clásicamente por

citoquinas como TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , que amplifican la inflamación local y liberan citoquinas, quimioquinas, ROS y MMPs, contribuyendo a la degradación de la ECM y a la apoptosis de VSMC, lo que conduce a la dilatación y debilitamiento de la pared aórtica (Dale *et al.*, 2016). En cambio, los macrófagos M2 facilitan la resolución de la inflamación y los procesos reparativos en el tejido, así como la deposición de ECM, a través de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 (Pope *et al.*, 2016). Diferentes investigaciones señalan la importancia de la polarización de macrófagos en la formación de AAA. Prueba de ello es que el aumento de la expresión génica y proteica de Arg2 (marcador de fenotipo M1) en la pared aórtica incrementa la dilatación de las lesiones en el modelo de AAA inducido por elastasa (Raffort *et al.*, 2019). Por el contrario, un aumento de macrófagos M2 inhibe el desarrollo de AAA murino (Pope *et al.*, 2016). Tanto la vía JAK/STAT como las **proteínas SOCS**, y en concreto SOCS1, participan en la **función y polarización de macrófagos** M1/M2 (Wilson, 2014; Zhou *et al.*, 2017). De hecho, estos procesos se encuentran finamente regulados por el balance correcto entre STAT1 y STAT3/6 (Wang *et al.*, 2014). Por otra parte, SOCS1 influye de manera directa en la polarización de macrófagos M2 a través de la señalización por IL-4 (Whyte *et al.*, 2011). En modelos experimentales de aterosclerosis se ha demostrado que la pérdida de SOCS1 se asocia con un mayor contenido macrófagos M1 activados en las placas de ateroma (Grothusen *et al.*, 2012), mientras que su sobreexpresión suprime la polarización de macrófagos M1 mediada por JAK2/STAT1 y promueve el fenotipo M2 (Recio *et al.*, 2015). En el contexto del AAA, la inhibición específica de STAT3 disminuye la ratio M1/M2 de los macrófagos infiltrados en las lesiones de AAA del modelo de infusión de AngII (Qin *et al.*, 2015). De forma similar, nuestros hallazgos en el modelo de AAA inducido por elastasa concluyen que la inhibición de la vía JAK/STAT mediante el péptido S1 altera favorablemente la expresión de marcadores fenotípicos de macrófagos, incrementando los marcadores M2 (Arg1, CD206 e IL-10) y disminuyendo los marcadores M1 (iNOS y Arg2).

Además de los macrófagos y otras células inflamatorias infiltradas en la lesión, las VSMC residentes en el tejido juegan un papel muy importante en la patogenia del AAA. Como ya se detalló anteriormente, son características del AAA la pérdida (apoptosis) de VSMC y la transición desde un fenotipo contráctil hacia uno sintético (Wang *et al.*, 2017). Relacionado con nuestro estudio, se ha descrito que la señalización mediada por **JAK/STAT** regula la **diferenciación, migración y proliferación de VSMC**. De hecho, la activación de STAT1/3 suprime la expresión de marcadores específicos de VSMC contráctiles como  $\alpha$ -SMA, SM22 $\alpha$ , calponina, osteopontina y la isoforma de músculo liso de la cadena pesada de miosina, proteínas necesarias para la adecuada contracción de las VSMC en el vaso (Kirchmer *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2015). Los resultados expuestos en esta tesis muestran que S1 frena la pérdida de VSMC asociada al daño vascular en AAA, al mismo tiempo que aumenta la expresión de proteínas contráctiles ( $\alpha$ -SMA y calponina)

en el tejido aórtico. Además, la administración de S1 aumenta la expresión génica de marcadores típicos de fenotipo contráctil (ACTA2 y SM22 $\alpha$ ) y reduce la de KLF4, un importante regulador asociado al fenotipo sintético de VSMC durante la formación de AAA (Salmon *et al.*, 2013).

Existe una compleja interacción entre inflamación y estrés oxidativo en el AAA. Así, los macrófagos y las VSMC activadas en la lesión liberan moléculas inflamatorias que no solo conducen al reclutamiento de más células inmunes, sino que también inducen la producción de ROS (McCormick *et al.*, 2007). Las ROS, y particularmente el anión superóxido, promueven disfunción endotelial y alteraciones en la estructura vascular, a través de moléculas proinflamatorias como IL-6, que activan la vía JAK/STAT (Didion, 2017). A pesar de que en esta tesis no ha profundizado en el estudio del estrés oxidativo en el AAA, se ha constatado que la terapia con péptido S1 disminuye los niveles de anión superóxido y del marcador de daño oxidativo en el DNA en las lesiones aórticas, lo que confirma investigaciones previas de nuestro grupo sobre las **propiedades antioxidantes** de terapias basadas en SOCS1 en modelos preclínicos de aterosclerosis y diabetes (Lopez-Sanz *et al.*, 2018; La Manna *et al.*, 2020; Opazo-Ríos *et al.*, 2020; La Manna *et al.*, 2021). Concretamente, en un modelo combinado de diabetes tipo 1 e hipercolesterolemia, el péptido S1 redujo el estrés oxidativo vascular y renal, previniendo la producción de ROS mediada por el sistema enzimático NOX, al mismo tiempo que potenció la actividad antioxidante local y sistémica. Además, se describió que el efecto del péptido S1 en la generación de ROS estaba mediado por dos mecanismos: a) el bloqueo de la activación y ensamblaje del complejo NOX a través de la inhibición del eje JAK2/PI3K; y b) la supresión de la expresión génica de subunidades NOX regulada por el eje JAK2/STAT1 (Lopez-Sanz *et al.*, 2018). Por ello, sería interesante ampliar el estudio del efecto antioxidante de S1 en AAA experimental.

La **degradación proteolítica** de la ECM constituye un evento fisiopatológico clave en el AAA. Junto con los procesos de inflamación y estrés oxidativo, un balance incorrecto entre las MMPs y sus inhibidores (TIMPs) produce importantes cambios en la estructura de la pared aórtica, contribuyendo a su debilitamiento y ruptura (Maguire *et al.*, 2019). En las lesiones de AAA, MMP9 se expresa abundantemente y es producida principalmente por los macrófagos infiltrados en la lesión; mientras que MMP2, secretada mayoritariamente por VSMC y fibroblastos, es aquella con mayor actividad elastolítica (Wang y Khalil, 2018). Paralelamente, en muestras de AAA humano se ha detectado una disminución de los inhibidores TIMP1 y TIMP2, en comparación con aortas sanas (Liu y Khalil, 2017b). Los niveles plasmáticos de las MMPs también se encuentran elevados en pacientes con AAA, especialmente en aquellos con riesgo de ruptura inminente (Wilson *et al.*, 2008). Algunos estudios afirman que los niveles plasmáticos de MMP9 se correlacionan con el tamaño del AAA y su expansión, reduciéndose sustancialmente tras la

reparación del AAA (Hovsepian *et al.*, 2000). En cualquier caso, parece claro que tanto MMP2 como MMP9 son indispensables en la inducción de AAA en modelos murinos (Longo *et al.*, 2002).

Entre las diferentes vías de señalización que conducen a la secreción y activación de las MMPs, se encuentra la vía JAK/STAT (Rabkin, 2017b). Dada la gran importancia del tabaquismo en la aparición y progresión del AAA, es interesante mencionar que el tabaco (humo de cigarrillo y/o nicotina) provoca el aumento de los niveles de MMP2/9 en la aorta a través de la activación de la vía JAK/STAT, tanto en humanos como en modelos experimentales (Ghosh *et al.*, 2015; Rabkin, 2016). Otros estudios sugieren que la proteína SOCS1 juega un papel relevante en la **modulación de MMPs y TIMPs**, ya que la sobreexpresión de la proteína SOCS1 en células pulmonares humanas (fibroblastos y células cancerosas) inhibe los niveles de MMP1, MMP2 y MMP9 (Zhang *et al.*, 2015). En línea con este enfoque, nuestro estudio en el modelo de AAA inducido por elastasa demuestra que el tratamiento con S1 previene el incremento de la expresión de MMP2 y MMP9 en las lesiones aórticas y reduce su actividad enzimática circulante. De acuerdo con nuestros resultados, otros investigadores han confirmado que el empleo de inhibidores de STAT3 disminuye la expresión y/o actividad de MMP2/9 en lesiones de AAA generadas por la infusión de AngII (Qin *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020). De forma similar, se ha descrito que bazedoxifeno, fármaco aprobado para el tratamiento de osteoporosis, atenúa la formación del AAA experimental y reduce la expresión de MMP2 y MMP9, ejerciendo sus efectos a través de la inhibición de la señalización mediada por IL-6 y STAT3 (Yan *et al.*, 2020).

Finalmente, los experimentos *in vitro* llevados a cabo en **VSMC** y **macrófagos** corroboraron los resultados obtenidos con el péptido S1 en AAA experimental. Por una parte, se utilizó **elastasa** como estímulo por ser el agente empleado en nuestro modelo experimental para inducir AAA. Estudios previos han demostrado que la incubación de macrófagos y VSMC con elastasa genera un entorno inflamatorio, con mayor expresión y/o secreción de moléculas inflamatorias como las quimioquinas CCL2 y CCL5 (Colonnello *et al.*, 2003) y MMPs (Ghosh *et al.*, 2014). Otro aspecto interesante es que la estimulación con elastasa altera de manera importante la morfología y funcionalidad de las VSMC (Riches *et al.*, 2013), disminuyendo las proteínas contráctiles (Salmon *et al.*, 2019) e incrementando marcadores propios de un fenotipo sintético (Salmon *et al.*, 2013). En otra serie de experimentos se trataron las células con un estímulo más fisiológico, los **EDP** generados en la pared arterial cuando las proteasas liberadas degradan la ECM. También denominados elastoquinas, estos fragmentos EDP procedentes de la liberación de elastina tienen marcadas propiedades quimiotácticas, favorecen procesos de migración y proliferación celular y estimulan la producción de MMPs y ROS (Maurice *et al.*, 2013). Se ha descrito que los EDP estimulan la migración y la producción de ROS en monocitos *in vitro* (Duca

*et al.*, 2016b), incrementan la expresión de MMP9 en macrófagos y alteran su polarización, promoviendo el fenotipo proinflamatorio M1 (Dale *et al.*, 2016). En VSMC, estimulan la migración y proliferación, modulan su transición fenotípica e incrementan los niveles de MMP2 (Maurice *et al.*, 2013; Qin, 2015).

En primer lugar, nuestros experimentos *in vitro* confirman que el péptido S1 es capaz de prevenir la activación y expresión de STAT1/3 inducida por elastasa en VSMC y macrófagos. Como consecuencia de este efecto inhibitorio, se detectó una reducción en la expresión de mediadores asociados con inflamación (CCL2, CCL5, CXCL10 y TNF $\alpha$ ), estrés oxidativo (subunidades NOX1/2) y degradación de la ECM (MMP2/9), tanto en VSMC como en macrófagos estimulados con elastasa o EDP. Además, la presencia de péptido S1 previno la secreción de CCL2 y la actividad de MMP2/9 inducida por elastasa en ambos tipos celulares. Estas evidencias concuerdan con las de la literatura previa, donde la inhibición de STAT3 en VSMC y macrófagos estimulados con AngII resulta en una menor expresión de moléculas inflamatorias y MMPs (Qin *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2020) y son consistentes con los estudios que demuestran que la sobreexpresión de la proteína SOCS1 reduce las MMPs en otros tipos celulares (Qin *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2018).

En segundo lugar, de forma similar a lo ocurrido en el modelo experimental, se observó que la elastasa altera los marcadores fenotípicos de macrófagos y VSMC, mientras que el tratamiento con S1 revierte en parte estos cambios. Acompañando las modificaciones favorables en los marcadores fenotípicos de VSMC, el péptido S1 también atenúa la migración inducida por elastasa, lo que confirmaría la participación de la vía JAK/STAT en los procesos de transición fenotípica de VSMC (Salmon *et al.*, 2013; Kirchmer *et al.*, 2014; Liao *et al.*, 2015). Relacionado con esto último, se ha descrito que el bazedoxifeno reduce la migración de VSMC *in vitro* inducida por AngII a través de la inhibición de IL-6/STAT3 (Yan *et al.*, 2020).

En último lugar, se quiso confirmar *in vitro* el papel regulador de la proteína completa SOCS1 en las funciones celulares durante el daño vascular. Desde hace años, se conoce la importancia que tienen las proteínas SOCS en la regulación de las respuestas inmunes. Un ejemplo claro es que la deleción génica de SOCS1 en ratones desencadena un síndrome inflamatorio severo letal con infiltrados inflamatorios en múltiples tejidos y una activación excesiva de linfocitos T que conduce a la muerte en las primeras semanas de vida (Alexander *et al.*, 1999; Marine *et al.*, 1999). En el contexto de la aterogénesis, Qin *et al.* describieron bajos niveles de SOCS1 en el endotelio de placas ateroscleróticas humanas y demostraron que la deficiencia de SOCS1 en ratones promueve el reclutamiento de leucocitos y la formación de neointima en la aorta (Qin *et al.*, 2014), resaltando así el papel esencial de la proteína SOCS1 en la regulación de las respuestas proinflamatorias inducidas por citoquinas en la vasculatura. En el mismo sentido, la deleción génica de SOCS1 incrementa los niveles circulantes de las citoquinas

proinflamatorias y proaterogénicas TNF $\alpha$ , CCL2 e IL-6 en la aterosclerosis experimental (Grothusen *et al.*, 2012), mientras que su sobreexpresión mediante adenovirus recombinantes presenta un efecto ateroprotector (Recio *et al.*, 2015). Nuestros estudios *in vitro* demuestran que el **silenciamiento génico de SOCS1** mediante transfección con siRNA específico potencia la respuesta inflamatoria de las VSMC estimuladas con elastasa, incrementando los niveles de expresión de quimioquinas, citoquinas y MMPs. Estos hallazgos confirman el efecto protector que tanto la proteína SOCS1 como el peptidomimético S1 pueden ejercer en el daño vascular asociado a AAA.

### Implicación del eje JAK/STAT/SOCS en NAFLD

En los últimos años, existe evidencia creciente del papel que juega el **eje JAK/STAT/SOCS** en **desequilibrios metabólicos**, como resistencia a insulina, diabetes y obesidad (Wunderlich *et al.*, 2013). En este sentido, se ha descrito que la señalización mediada por IL-6-STAT3 es fundamental para el correcto metabolismo de ácidos grasos en el hígado (Gavito *et al.*, 2016) y para el mantenimiento de la homeostasis hepática (Kinoshita *et al.*, 2008). Diversos estudios también han documentado la relación que existe entre los niveles de activación de STAT3 en el hígado y el desarrollo de inflamación, fibrosis (Zhao *et al.*, 2020) y hepatocarcinogénesis (He y Karin, 2011). De hecho, en humanos se ha constatado una asociación entre polimorfismos de STAT3 y la susceptibilidad de sufrir NAFLD y su severidad (Sookoian *et al.*, 2008). Asimismo, la activación crónica del eje JAK/STAT3/SOCS3 en obesidad produce efectos negativos en la señalización por leptina e insulina, promoviendo la ganancia de peso (Wunderlich *et al.*, 2013b). Recientemente, se ha descrito que la obesidad conduce a NASH y HCC a través de la señalización hepática de STAT1 y STAT3, promoviendo inflamación, reclutamiento de células T y fibrosis (Grohmann *et al.*, 2018). También se ha demostrado que la adipocitoquina proinflamatoria visfatina es capaz de incrementar la producción de IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  e inhibir la señalización por insulina en hepatocitos a través de las vías JAK2/STAT3 y NF- $\kappa$ B (Heo *et al.*, 2019).

Las **proteínas SOCS** actúan como reguladores esenciales de los procesos de **inflamación, esteatosis y fibrosis hepática**, así como en la patogénesis del síndrome metabólico y de la resistencia a insulina (Jamieson *et al.*, 2005; Ueki *et al.*, 2005). Un estudio reciente en pacientes con NAFLD ha descrito ciertos polimorfismos de SOCS1 que se asocian con dislipidemia, resistencia a insulina y sobrepeso/obesidad (Kempinska-Podhorodecka *et al.*, 2019). En particular, la proteína SOCS1 constituye un importante mecanismo regulatorio hepático, controlando la señalización por citoquinas y factores de crecimiento en hepatocitos, macrófagos, HSCs y otras células inmunes. Se ha descrito que la pérdida de SOCS1 promueve fibrosis hepática

y HCC en humanos y en modelos murinos, lo cual demuestra su importancia en la fisiopatología de la enfermedad hepática (Mafanda *et al.*, 2019). Uno de los mecanismos propuestos es que SOCS1 podría inhibir las respuestas inmunes mediadas por TLR4/NF- $\kappa$ B en NASH (Fujimoto y Naka, 2010). Por su parte, SOCS3 también resulta relevante en este contexto, habiéndose demostrado que su deficiencia en modelos murinos promueve la fibrosis hepática, a través de la activación de STAT3 y una mayor producción de TGF- $\beta$ 1 (Ogata *et al.*, 2006). Por tanto, los desequilibrios en la señalización mediada por JAK/STAT/SOCS resultan en la desregulación de la producción hepática de glucosa, esteatosis y resistencia a insulina.

Los modelos preclínicos resultan cruciales para el avance en la investigación de la patogénesis de NAFLD en humanos, así como para la identificación de dianas terapéuticas y el empleo de nuevos fármacos. Actualmente, los modelos animales establecidos para la inducción de NAFLD/NASH se pueden clasificar en tres grupos principales: 1) genéticos (ratones deficientes en para el gen de leptina (*ob/ob*) o su receptor (*db/db*), sobreexpresión de SREBP1-c o deficiencia en el gen PPAR $\alpha$ , entre otros); 2) inducidos por dieta y 3) inducidos con dieta y toxinas, como tetracloruro de carbono o tioacetamida (Peng *et al.*, 2020). En esta tesis, el efecto hepatoprotector de los péptidos derivados de SOCS1 se ha evaluado en dos modelos nutricionales de NAFLD diferentes. A continuación se discuten individualmente los principales hallazgos obtenidos con estos modelos.

El **modelo de dieta MCD** es uno de los más ampliamente utilizados para el desarrollo de NAFLD/NASH en animales. La metionina es un aminoácido esencial que no puede ser sintetizado *de novo* por nuestro organismo y resulta crucial para la síntesis de diversas macromoléculas necesarias (cisteína, lecitina, fosfatidilcolina y otras), mientras que la colina es un constituyente esencial en las membranas mitocondriales y celulares, y es precursor de acetilcolina. La deficiencia de ambos componentes resulta en una disminución del ensamblaje y exportación de vLDL; como consecuencia se produce una reducción en el aclaramiento de triglicéridos y los lípidos se acumulan en el hígado. Entre las características patológicas de este modelo se encuentran inflamación severa, daño mitocondrial, alteraciones en citoquinas y adipocitoquinas, estrés oxidativo, apoptosis y fibrogénesis. Una de sus principales limitaciones es que no reproduce las características principales del síndrome metabólico, creándose un perfil metabólico muy diferente al existente en humanos con NAFLD/NASH. Así, los animales con dieta MCD sufren una significativa pérdida de peso, con disminución de los niveles séricos de triglicéridos, colesterol, insulina y leptina y de la ratio peso hepático/corporal, sin resistencia a insulina ni cambios en adiponectina (Stephenson *et al.*, 2018; Nevzorova *et al.*, 2020).

En nuestro estudio se ha comprobado que la administración de dieta MCD a ratones C57BL/6 durante 3 y 5 semanas provoca una pérdida gradual del peso, reduce los niveles de glucosa y lípidos y aumenta la transaminasa GPT en sangre. A nivel hepático, la dieta MCD induce la activación de la vía JAK/STAT, junto con un incremento del infiltrado de células inmunes y de la expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias (CCL2, CCL5, CXCL10, IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ ) involucradas en la progresión de NAFLD y NASH, algunas de las cuales ya se han demostrado en estudios previos (Itagaki *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2015). Cabe señalar que la terapia con los péptidos PS5 y S1 no altera el peso y la glucemia de los animales, pero consigue revertir parcialmente los niveles de lípidos y GPT. Se reduce además la **inflamación hepática** inducida por la dieta MCD, observándose en los tejidos una disminución de los niveles de p-STAT1/3, un menor contenido de macrófagos y linfocitos T y expresión reducida de genes inflamatorios. De forma complementaria, el estudio histopatológico corroboró que la dieta MCD genera NASH, evidenciándose un **daño hepático severo** con **extensa esteatosis** micro- y macrovesicular, acompañada de infiltrados inflamatorios e hipertrofia de hepatocitos. Sin embargo, la acción beneficiosa de los péptidos PS5 y S1 en la puntuación del daño hepático (score NAFLD) se evidencia mayoritariamente a las 2 semanas de tratamiento, mientras que a tiempos más largos los cambios asociados al tratamiento no alcanzan significación estadística, probablemente debido a la severidad y progresión del daño asociado a la dieta MCD. Nuestros hallazgos en el modelo MCD concordarían con los del grupo de Jung *et al.*, donde la inhibición de STAT3 en un modelo genético murino de NASH y HCC previene el daño hepático, disminuye los niveles de transaminasas y el score histopatológico (Jung *et al.*, 2017a). Otro estudio realizado en ratones alimentados con dieta deficiente en colina demuestra mayores niveles hepáticos de expresión de STAT1 y genes activados por interferones e involucrados en la respuesta inmune (Mitsumoto *et al.*, 2017). En la misma línea, la delección específica de JAK2 en hepatocitos protege a los ratones frente al desarrollo de NASH inducida por dieta MCD, reduciendo la inflamación hepática y los niveles de IL-6, IL-1 $\beta$  e IFN $\gamma$  (Shi *et al.*, 2012). De forma similar, el tratamiento con tofacitinib (inhibidor de JAK1/3) frena la evolución del daño hepático en un modelo de hepatitis inducida por concanavalina A, disminuyendo la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-2, IL-6, IL-17a, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , e incrementando las citoquinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10, junto con una mejora en la ratio de células Treg/Th17 (Wang *et al.*, 2019).

Nuestro estudio demuestra que la terapia con PS5 y S1 reduce de manera eficiente el acúmulo de **lípidos intrahepáticos** en los animales alimentados con dieta MCD, con menores niveles de colesterol total y triglicéridos. Esta reducción se acompañó de una disminución en la expresión del transportador de entrada de lípidos CD36, lo que indicaría una menor captación de ácidos grasos en el hígado. Este hallazgo es de relevancia, ya que el transportador CD36 tiene un



rol esencial en NAFLD y NASH. De hecho, CD36 se encuentra incrementado en la membrana plasmática de hepatocitos de pacientes con NASH, comparado con pacientes sanos o con esteatosis simple (Zhao *et al.*, 2018) y se asocia con resistencia a insulina e hiperinsulinemia (Miquilena-Colina *et al.*, 2011). Su forma soluble (sCD36) también está elevada en pacientes con NAFLD y se correlaciona positivamente con el grado de esteatosis (García-Monzón *et al.*, 2014). En modelos experimentales, la sobreexpresión de CD36 incrementa la captación de lípidos y el acúmulo de grasa hepática (Koonen *et al.*, 2007), mientras que su deficiencia en modelos nutricionales y genéticos conlleva una reducción en los niveles de triglicéridos hepáticos (Wilson *et al.*, 2016). Más recientemente, en macrófagos murinos estimulados con LPS se ha descrito que la expresión de CD36 y la captación de LDL están reguladas por un mecanismo dependiente de JAK/STAT1 (Hashimoto *et al.*, 2020). Por todo esto, la disminución de CD36 puede constituir un mecanismo a través del cual la inhibición de la vía JAK/STAT mediada por los péptidos derivados de SOCS1 revierte la esteatosis generada por la dieta MCD.

Investigaciones previas han descrito alteraciones en el metabolismo del colesterol asociadas con la patogénesis de NAFLD y NASH. En este sentido, existe menor expresión de los transportadores de salida de lípidos ABCA1 y ABCG1 en los hepatocitos de pacientes con NASH, lo que conduce a una mayor captación y acumulación de colesterol hepático (Musso *et al.*, 2013). Algunos estudios indican que ABCA1 es un gen diana de la vía JAK/STAT. Por ejemplo, en macrófagos M1 estimulados *in vitro*, la reducción de la expresión de ABCA1 afecta directamente a la capacidad de eflujo de colesterol, mientras que la inhibición de la vía JAK/STAT preserva dicha capacidad (O'Reilly *et al.*, 2019). Otro estudio muestra que la señalización de IFN $\gamma$  en células espumosas provoca la reducción de LXR $\alpha$  a través de la vía JAK/STAT, disminuyendo consecuentemente la expresión de ABCA1 y el eflujo de colesterol (Hao *et al.*, 2009). Este mismo mecanismo se ha descrito en una línea celular de monocitos con productos avanzados de oxidación de proteínas humanos, donde se ha comprobado que la inhibición de JAK/STAT bloquea los efectos negativos sobre el eflujo de colesterol mediados por ABCA1 (Mo *et al.*, 2011). Menos se conoce sobre ABCG1, aunque su modulación (epi)genética parece ser esencial en el mantenimiento de la homeostasis de lípidos y en la secreción de moléculas que controlan el metabolismo de glucosa y lípidos, cumpliendo un papel crítico en enfermedades cardiometabólicas (Hardy *et al.*, 2017). En nuestro modelo de dieta MCD, los péptidos PS5 y S1 aumentaron la expresión de ABCG1, pudiendo indicar una mayor tendencia a la salida de lípidos en los hepatocitos de animales tratados, mientras que no afectaron a la expresión de ABCA1. Serían, por tanto, necesarios más estudios para determinar el papel que cumple la vía JAK/STAT sobre los principales transportadores lipídicos hepáticos y cómo afectarían los péptidos PS5 y S1 al eflujo de colesterol en el contexto de NAFLD.

En pacientes, la presencia y el grado de **fibrosis hepática** es una característica determinante de la severidad y progresión de NASH, que predispone a sufrir complicaciones como cirrosis y HCC. En modelos experimentales, la administración de dieta MCD puede producir fibrosis; sin embargo, el tiempo requerido para ello resulta muy difícil de determinar, variando ampliamente entre las 2 y las 15 semanas (Stephenson *et al.*, 2018). Por ejemplo, Itagaki *et al.* describen estados muy iniciales de fibrosis a partir de la semana 10 de dieta MCD, que progresa a partir de la semana 16 (Itagaki *et al.*, 2013). En nuestro modelo, la administración de dieta MCD durante 3-5 semanas no generó una fibrosis hepática establecida. No obstante, la terapia con PS5 y S1 sí es capaz de reducir en el tejido hepático el contenido de fibras de colágeno y la expresión de los factores profibróticos ACTA2, colágeno tipo I y TGF- $\beta$ , lo que podría indicar que los péptidos derivados de SOCS1 son capaces de retardar el inicio de la respuesta fibrogénica. Nuestros datos coincidirían con los de Mafanda *et al.*, quienes afirman que SOCS1 tiene un papel esencial en la regulación de la respuesta fibrogénica, atenuando la amplificación de la respuesta inflamatoria asociada y controlando la deposición de ECM a través de la modulación MMPs, factores profibróticos y quimioquinas. De hecho, estos investigadores demostraron que la pérdida de SOCS1 en hepatocitos y macrófagos potencia la respuesta inflamatoria y fibrogénica hepática (Mafanda *et al.*, 2019). Adicionalmente, Yoshida *et al.* también sugieren que SOCS1 es un supresor de la fibrosis hepática y de la hepatocarcinogénesis, ya que tanto su silenciamiento en humanos mediante modificaciones epigenéticas (hipermetilaciones) como su deficiencia en roedores conducen a la progresión del daño hepático a través de la hiperactivación de STAT1 (Yoshida *et al.*, 2004). En cualquier caso, nuestros resultados corroborarían la importancia de las proteínas SOCS en fibrosis, pero también apoyarían las investigaciones previas que describen que la inhibición de la vía JAK/STAT atenúa la fibrosis hepática. Ejemplo de ello es una investigación muy reciente que evidencia el potencial terapéutico de exosomas que contienen siRNA y oligonucleótidos antisentido frente a STAT3 para frenar la fibrosis hepática en modelos murinos, reduciendo la deposición de ECM y mejorando la función hepática (Tang *et al.*, 2021). Resultados similares se han obtenido con un inhibidor de STAT3 en NASH y HCC experimental (Jung *et al.*, 2017b) y con tofacitinib en ratones con hepatitis autoinmune (Wang *et al.*, 2019). No obstante, sería preciso profundizar en otros aspectos de la respuesta fibrogénica en nuestros estudios. Por ejemplo, investigar si los péptidos PS5 y S1 pueden, al igual que las proteínas SOCS, inhibir la activación de HSCs (Cheng *et al.*, 2014) o su diferenciación a HSCs con un fenotipo similar a miofibroblastos, ya que se este tipo celular juega un papel clave en la fibrogénesis hepática.

De acuerdo con lo descrito por otros autores (Serviddio *et al.*, 2011), nuestro estudio muestra que la administración de dieta MCD reduce la expresión hepática de CPT1 $\alpha$ , enzima limitante en la  $\beta$ -oxidación, revirtiéndose parcialmente por el tratamiento con péptidos derivados

de SOCS1. Esto podría indicar un aumento de la **oxidación de los ácidos grasos** en los animales tratados. Por el contrario, en un modelo de NAFLD murino la activación de la vía JAK/STAT a partir de péptidos derivados de kéfir resulta beneficiosa al producir un aumento de expresión de CPT1 (Chen *et al.*, 2016). Esta discrepancia con nuestros resultados puede ser debida a que los péptidos de kéfir son una mezcla heterogénea de compuestos con múltiples acciones, y es probable que sean menos selectivos que los péptidos SOCS1 en cuanto a la modulación de la vía JAK/STAT.

Por otra parte, se ha demostrado que el **estrés del retículo endoplasmático** y la consecuente UPR cumplen un rol importante en la fisiopatología de NAFLD/NASH (Puri *et al.*, 2008). En línea con esto, se ha descrito que la dieta MCD provoca un gran incremento en los mediadores de la UPR (Machado *et al.*, 2015). En nuestro modelo, el empleo de los péptidos PS5 y S1 redujo la expresión de CHOP inducida por dieta MCD. Es interesante destacar que la deficiencia de CHOP en ratones alimentados con dieta MCD mejora la inflamación, la apoptosis y la fibrosis (Toriguchi *et al.*, 2014). En ratones, la activación del eje IFN $\gamma$ /STAT1 es clave en la inducción del daño hepático asociado a diabetes tipo 1 y requiere la activación coordinada del factor de transcripción activador 3, un inductor de genes proapoptóticos y de estrés del retículo endoplasmático, entre ellos CHOP (Kim *et al.*, 2009). Otras investigaciones llevadas a cabo en macrófagos señalan la relación entre CHOP y STAT1/3 (Zhao *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2021). Por tanto, sería necesario profundizar en el estudio de la relación entre CHOP y la vía JAK/STAT en el contexto de NAFLD.

Los **modelos de dieta con una composición alta en grasa** tienen como objetivo principal generar obesidad y NAFLD en los animales, promoviendo niveles de glucosa postprandiales elevados, esteatosis hepática y síndrome metabólico (Takahashi *et al.*, 2012). Dadas las limitaciones de la dieta MCD, descritas en el apartado anterior, en la segunda parte de nuestro estudio se quiso emplear una aproximación que reprodujese mejor las características de la patología de NAFLD en humanos. Para ello, se suministró dieta HFD a ratones ApoE<sup>-/-</sup> durante 8 y 12 semanas a la vez aue se trataron con los péptidos PS5 y S1, respectivamente. A pesar del aumento del peso y la glucemia, no se observó resistencia a insulina, hipertrigliceridemia ni elevación de los niveles de GPT en los ratones ApoE<sup>-/-</sup> tras 8 y/o 12 semanas de HFD. Estos hallazgos contrastan con estudios que describen modelos similares con un daño hepático más severo en ratones ApoE<sup>-/-</sup> alimentados con HFD durante 7 semanas (Schierwagen *et al.*, 2015) o en ratones C57BL/6N con HFD durante 12 semanas (Dorn *et al.*, 2014).

En este estudio, se ha demostrado que la administración de HFD en ratones ApoE<sup>-/-</sup> genera **esteatosis**, principalmente microvesicular, con presencia de algunos **focos inflamatorios**, y promueve la activación hepática de la vía JAK/STAT. Por el contrario, los peptidomiméticos de

SOCS1 inhiben la activación de STAT1 inducida por HFD y reducen el contenido de triglicéridos intrahepáticos y la expresión de CD36, atenuando el desarrollo de NAFLD. Acorde con nuestros resultados, se ha descrito que la expresión génica y proteica de CD36 aumenta en condiciones HFD (Ipsen *et al.*, 2018), mientras que su delección en hepatocitos mejora la esteatosis y protege frente a la inflamación sistémica y a la resistencia a insulina (Shi *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2016). Las dietas ricas en grasa inducen la expresión de moléculas proinflamatorias en modelos experimentales (Dorn *et al.*, 2014; Schierwagen *et al.*, 2015), incluso en ausencia de una inflamación hepática severa (Kirovski *et al.*, 2010). En nuestro estudio, se ha demostrado que la inhibición de la vía JAK/STAT reduce la expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias inducida por HFD y el contenido de macrófagos infiltrados en el tejido hepático, mostrando similitudes con los resultados descritos con dieta MCD. Finalmente, el modelo HFD a 8 y 12 semanas no generó fibrosis hepática. No obstante, cabe destacar que tras 12 semanas de HFD se observó una elevación del gen profibrótico TGF- $\beta$ , que se inhibía en el grupo de tratamiento con péptido S1. Como ya se mencionó anteriormente, los resultados sobre el daño hepático generado en el modelo de HFD difieren de los de otros autores que describen presencia de fibrosis a tiempos similares a los utilizados en nuestro modelo (Dorn *et al.*, 2014; Schierwagen *et al.*, 2015).

En este punto, es relevante señalar que la severidad y las características del NAFLD en los modelos dietéticos es altamente variable debido a multitud de factores, como son la gran heterogeneidad en la composición y duración de las dietas administradas (Stephenson *et al.*, 2018), la especie y la cepa animal, siendo unas más susceptibles que otras, incluso el género, siendo las hembras más resistentes al desarrollo de esteatosis (Takahashi *et al.*, 2012). Así, en la literatura se pueden encontrar ejemplos de modelos de NAFLD con HFD de 60 y 80 semanas de duración, donde el daño hepático final no es tan severo como cabría esperar (Nakamura y Terauchi, 2013; Velázquez *et al.*, 2019). En nuestra experiencia, no existen diferencias relevantes entre 8 y 12 semanas de HFD. Aunque con la desventaja de ser modelos lentos y progresivos en los que puede resultar muy complicado alcanzar estados de NASH o fibrosis avanzada (Nakamura y Terauchi, 2013), los modelos de HFD mimetizan bien el curso natural de NAFLD humano. Por todo ello, en futuros modelos resultaría interesante la adición de fructosa en la bebida de los animales y/o el enriquecimiento de las dietas con colesterol, estrategias frecuentemente empleadas para acelerar el daño hepático (Nevzorova *et al.*, 2020).

Como complemento a los hallazgos *in vivo* en los dos modelos nutricionales de NAFLD, en este trabajo se incluyen **resultados *in vitro*** en **hepatocitos**. Es bien sabido que los ácidos grasos tienen un rol esencial en el desarrollo de NAFLD, contribuyendo en mayor o menor medida a generar lipotoxicidad. El **palmitato** o PA, ácido graso saturado, es el más frecuentemente

sintetizado *de novo* en los tejidos humanos, principalmente por el hígado (Hliwa *et al.*, 2021), y el más abundante en la dieta y en el suero (Juárez-Hernández *et al.*, 2016). Además, el PA es ampliamente utilizado como estímulo *in vitro* porque es capaz de inducir procesos implicados en NAFLD/NASH, como acumulación de triglicéridos, lipotoxicidad, inflamación, estrés del retículo endoplasmático, estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, modificaciones en el metabolismo lipídico o resistencia a insulina (Lee *et al.*, 2010; Pfaffenbach *et al.*, 2010; Pardo *et al.*, 2015; Bai *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Alnahdi *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2020). De acuerdo con lo descrito previamente por otros autores, en esta tesis se ha constatado que el empleo de PA en hepatocitos *in vitro* provoca acúmulo de lípidos intracelulares, acompañado de activación en la vía JAK/STAT y un aumento en la expresión de mediadores implicados en inflamación (CCL2, CCL5, CXCL10 e IL-6) y en estrés del retículo endoplasmático (CHOP). En línea con nuestros resultados, Pardo *et al.* describen activación de STAT3 en hepatocitos estimulados con PA durante 6 horas, así como una mayor expresión de CHOP tras 16 horas de estímulo. Sin embargo, estos investigadores señalan que no se produce activación de STAT3 en hepatocitos con PA en tiempos de estimulación inferiores a 4 horas (Pardo *et al.*, 2015).

En nuestro estudio, corroboramos que los péptidos PS5 y S1 inhiben la activación de la vía JAK/STAT y la captación de lípidos por los hepatocitos. Esto último, unido a la menor expresión génica de CD36 y al aumento de expresión de ABCA1 tras 6 horas, podría indicar una menor tendencia a la entrada de lípidos en las células tratadas, de acuerdo con los resultados obtenidos *in vivo*, así como mayor facilidad para su salida. En línea con nuestros resultados, se ha demostrado que la sobreexpresión de ABCA1 disminuye el contenido de ácidos grasos y triglicéridos en hepatocitos *in vitro*, mientras que su supresión conduce a la acumulación de lípidos (Yang *et al.*, 2010). De la misma manera que observamos *in vivo*, los péptidos derivados de SOCS1 atenúan la expresión de moléculas inflamatorias inducida por PA durante 6 horas. De forma similar, se ha reportado que el empleo de un inhibidor específico de JAK2 disminuye la expresión de citoquinas proinflamatorias y restaura la señalización por insulina en hepatocitos estimulados con visfatina (Heo *et al.*, 2019). En nuestro estudio, los resultados obtenidos tras 16 horas de estímulo con PA no son concluyentes, lo que podría indicar un tiempo excesivo de estimulación en los hepatocitos. No obstante, estos experimentos constituirían una primera aproximación *in vitro*, por lo que quizás sería conveniente realizar nuevos experimentos empleando tiempos de estimulación más cortos.

En líneas generales, la inhibición de la vía JAK/STAT mediada por los péptidos derivados de SOCS1 se traduce en un efecto beneficioso en NAFLD experimental. En los modelos *in vivo*, PS5 y S1 muestran unos efectos muy similares en las concentraciones empleadas, inhibiendo la activación de la vía JAK/STAT y mejorando los parámetros hepáticos estudiados. Debido a que el

péptido PS5 aún no ha sido tan ampliamente caracterizado como S1, se emplearon dos concentraciones diferentes (60 y 125  $\mu\text{M}$ ) en el modelo HFD. Sin embargo, las diferencias en los resultados obtenidos con ambas concentraciones fueron escasas y no se observó una clara dosis-respuesta. Por otra parte, los efectos de PS5 y S1 en hepatocitos *in vitro* con las concentraciones empleadas (59 y 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente), elegidas en base a los estudios previos del grupo (Recio *et al.*, 2017; Lopez-Sanz *et al.*, 2018; La Manna *et al.*, 2020; La Manna *et al.*, 2021), tampoco mostraron diferencias relevantes. No obstante, es necesario puntualizar que estos estudios son los primeros llevados a cabo empleando los péptidos PS5 y S1 en modelos de daño hepático. Por ello, sería necesaria una caracterización comparativa de ambos péptidos, por ejemplo, mediante nuevos estudios de biodistribución, toxicidad y dosis-eficacia en modelos de NAFLD. Otra limitación de estos estudios es que los resultados de algunos grupos experimentales se han obtenido a partir de una muestra pequeña, por lo que sería conveniente ampliar la investigación con un tamaño muestral mayor.

En conclusión, los resultados expuestos en esta tesis revelan algunos de los mecanismos implicados en las patologías de AAA y NAFLD y evidencian que los **péptidos derivados de la proteína SOCS1 atenúan la inflamación y otros procesos fisiopatológicos asociados al daño vascular y/o hepático a través de la inhibición de la vía JAK/STAT**. En primer lugar, el péptido S1 reduce la incidencia y diámetro de las lesiones de AAA y atenúa la inflamación a través de la disminución en la expresión de moléculas proinflamatorias, lo que conduce a una reducción del infiltrado inflamatorio en las lesiones. Asimismo, la terapia con S1 reduce el estrés oxidativo y la actividad y/o expresión de MMPs implicadas en la degradación de la ECM y promueve cambios fenotípicos favorables en macrófagos y VSMC en el modelo experimental de AAA inducido por elastasa. En segundo lugar, se ha demostrado el efecto hepatoprotector de los péptidos PS5 y S1 en NAFLD, tanto en el modelo de dieta MCD, donde se instaura un daño hepático severo y NASH, como en el modelo de dieta HFD, que proporciona información sobre el daño hepático en etapas tempranas de la enfermedad. En líneas generales, la inhibición de la vía JAK/STAT mediada por los péptidos PS5 y S1 mejora de forma similar la esteatosis hepática, altera la expresión de transportadores de ácidos grasos, reduce la inflamación y el infiltrado leucocitario y atenúa el inicio de la respuesta fibrogénica. Por último, los estudios *in vitro* en células vasculares y hepatocitos corroboran los hallazgos de los modelos experimentales de AAA y NAFLD, confirmando el efecto beneficioso de los péptidos derivados de SOCS1 como moduladores de las respuestas celulares implicadas en el desarrollo de ambas patologías.

# VII. Conclusiones

## **1. Caracterización preclínica del efecto terapéutico del péptido S1 en el AAA**

- 1.1 En el modelo murino de AAA inducido por elastasa, el tratamiento con el péptido S1 previene la activación de STAT1 y STAT3 en aorta y reduce la incidencia del AAA. Las lesiones AAA de los ratones tratados se caracterizan por un menor diámetro aórtico, preservación de las láminas elásticas y mayor contenido de VSMC.
- 1.2 El péptido S1 reduce el componente inflamatorio (macrófagos, neutrófilos y linfocitos), los niveles de citoquinas proinflamatorias y marcadores de estrés oxidativo y la expresión/actividad de MMP2 y MMP9, además de inducir citoquinas antiinflamatorias.
- 1.3 El péptido S1 modifica el patrón de expresión de diferentes marcadores fenotípicos, favoreciendo los característicos de fenotipo antiinflamatorio M2 en macrófagos y los de fenotipo contráctil en VSMC.
- 1.4 *In vitro*, el pretratamiento con péptido S1 en macrófagos y VSMC estimulados con elastasa y/o EDP atenúa la respuesta inflamatoria, reduce los niveles de MMPs, recupera los marcadores fenotípicos y previene la migración celular. Además, el silenciamiento génico de SOCS1 en VSMC exagera la respuesta inflamatoria generada por elastasa, lo que confirma el efecto protector de la proteína SOCS1.

## **2. Evidencias experimentales de los péptidos PS5 y S1 como posible terapia en NAFLD**

- 2.1 En dos modelos nutricionales de NAFLD (ratones con dieta MCD y HFD), el tratamiento con los péptidos PS5 y S1 inhibe la activación hepática de la vía JAK/STAT, reduciendo el infiltrado de células inmunes y la expresión de genes de inflamación y estrés celular.
- 2.2 La terapia con PS5 y S1 disminuye el contenido de lípidos intrahepáticos, altera la expresión de transportadores de entrada/salida de ácidos grasos y mejora la esteatosis hepática.
- 2.3 Los péptidos derivados de SOCS1 frenan el comienzo de la respuesta fibrogénica inducida por dieta MCD, disminuyendo el contenido hepático de fibras de colágeno y la expresión de genes profibróticos.
- 2.4 *In vitro*, los péptidos PS5 y S1 previenen la activación de JAK/STAT, la captación de lípidos y la expresión de mediadores inflamatorios en hepatocitos estimulados con ácido palmítico.

En conclusión, la presente tesis constituye la primera evidencia preclínica de la modulación de la vía JAK/STAT con péptidos derivados de SOCS1 en modelos experimentales de AAA y NAFLD, dos patologías prevalentes que continúan en la actualidad sin terapia farmacológica aprobada. Estos estudios sugieren, por tanto, que el tratamiento con los péptidos S1 y PS5 puede constituir una novedosa estrategia para frenar el desarrollo y/o progresión del daño vascular y hepático asociado a estas enfermedades.



## **VIII. Bibliografía**

Agrawal, S., Febbraio, M., Podrez, E., Cathcart, M.K., Stark, G.R. & Chisolm, G.M. (2007). Signal transducer and activator of transcription 1 is required for optimal foam cell formation and atherosclerotic lesion development. *Circulation*, 115(23): 2939-2947. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.696922.

Ahmed, C.M.I., Larkin, J. & Johnson, H.M. (2015). SOCS1 Mimetics and Antagonists: A Complementary Approach to Positive and Negative Regulation of Immune Function. *Frontiers in Immunology*, 6: 183. doi: 10.3389/fimmu.2015.00183.

Ailawadi, G., Moehle, C.W., Pei, H., Walton, S.P., Yang, Z., Kron, I.L., Lau, C.L. & Owens, G.K. (2009). Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 138(6): 1392-1399. doi: 10.1016/j.jtcvs.2009.07.075.

Alexander, W.S., Starr, R., Fenner, J.E., Scott, C.L., Handman, E., Sprigg, N.S., Corbin, J.E., Cornish, A.L., Darwiche, R., Owczarek, C.M., Kay, T.W., Nicola, N.A., Hertzog, P.J., Metcalf, D. & Hilton, D.J. (1999). SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell*, 98(5): 597-608. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80047-1.

Alnahdi, A., John, A. & Raza, H. (2019). Augmentation of Glucotoxicity, Oxidative Stress, Apoptosis and Mitochondrial Dysfunction in HepG2 Cells by Palmitic Acid. *Nutrients*, 11(9) doi: 10.3390/nu11091979.

Antonicelli, F., Bellon, G., Debelle, L. & Hornebeck, W. (2007). Elastin-elastases and inflammaging. *Current Topics in Developmental Biology*, 79: 99-155. doi: 10.1016/S0070-2153(06)79005-6.

Araújo, A.R., Rosso, N., Bedogni, G., Tiribelli, C. & Bellentani, S. (2018). Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 38 Suppl 1: 47-51. doi: 10.1111/liv.13643.

Arrese, M., Cabrera, D., Kalergis, A.M. & Feldstein, A.E. (2016). Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(5): 1294-1303. doi: 10.1007/s10620-016-4049-x.

Bai, Y., Zheng, J., Yuan, X., Jiao, S., Feng, C., Du, Y., Liu, H. & Zheng, L. (2018). Chitosan Oligosaccharides Improve Glucolipid Metabolism Disorder in Liver by Suppression of Obesity-Related Inflammation and Restoration of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ). *Marine Drugs*, 16(11) doi: 10.3390/md16110455.

Banerjee, S., Biehl, A., Gadina, M., Hasni, S. & Schwartz, D.M. (2017). JAK-STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. *Drugs*, 77(5): 521-546. doi: 10.1007/s40265-017-0701-9.

Barclay, J.L., Nelson, C.N., Ishikawa, M., Murray, L.A., Kerr, L.M., McPhee, T.R., Powell, E.E. & Waters, M.J. (2011). GH-dependent STAT5 signaling plays an important role in hepatic lipid metabolism. *Endocrinology*, 152(1): 181-192. doi: 10.1210/en.2010-0537.

Belfort, R., Harrison, S.A., Brown, K., Darland, C., Finch, J., Hardies, J., Balas, B., Gastaldelli, A., Tio, F., Pulcini, J., Berria, R., Ma, J.Z., Dwivedi, S., Havranek, R., Fincke, C., DeFronzo, R., Bannayan, G.A., Schenker, S. & Cusi, K. (2006). A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *The New England Journal of Medicine*, 355(22): 2297-2307. doi: 10.1056/NEJMoa060326.

Bousoik, E. & Montazeri Aliabadi, H. (2018). Do we know jack about JAK? A closer look at JAK/STAT signaling pathway. *Frontiers in Oncology*, 8: 287. doi: 10.3389/fonc.2018.00287.

Brunt, E.M., Wong, V.W.-., Nobili, V., Day, C.P., Sookoian, S., Maher, J.J., Bugianesi, E., Sirlin, C.B., Neuschwander-Tetri, B.A. & Rinella, M.E. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Reviews. Disease Primers*, 1: 15080. doi: 10.1038/nrdp.2015.80.

Buzzetti, E., Pinzani, M. & Tsochatzis, E.A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: Clinical and Experimental*, 65(8): 1038-1048. doi: 10.1016/j.metabol.2015.12.012.

Chaikof, E.L., Dalman, R.L., Eskandari, M.K., Jackson, B.M., Lee, W.A., Mansour, M.A., Mastracci, T.M., Mell, M., Murad, M.H., Nguyen, L.L., Oderich, G.S., Patel, M.S., Schermerhorn, M.L. & Starnes, B.W. (2018). The Society for Vascular Surgery practice guidelines on the care of patients with an abdominal aortic aneurysm. *Journal of Vascular Surgery*, 67(1): 2-77.e2. doi: 10.1016/j.jvs.2017.10.044.

Chen, H.L., Tsai, T.C., Tsai, Y.C., Liao, J.W., Yen, C.C. & Chen, C.M. (2016). Kefir peptides prevent high-fructose corn syrup-induced non-alcoholic fatty liver disease in a murine model by modulation of inflammation and the JAK2 signaling pathway. *Nutrition & Diabetes*, 6(12): e237. doi: 10.1038/nutd.2016.49.

Chen, Z., Tian, R., She, Z., Cai, J. & Li, H. (2020). Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 152: 116-141. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025.

Cheng, C., Huang, C., Ma, T., Xu, T., Wang, Y., Zhang, L. & Jun, L. (2014). New surprises of suppressor of cytokine signalling in liver fibrosis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 18(4): 415-426. doi: 10.1517/14728222.2014.885953.

Clément, M., Chappell, J., Raffort, J., Lareyre, F., Vandestienne, M., Taylor, A.L., Finigan, A., Harrison, J., Bennett, M.R., Bruneval, P., Taleb, S., Jørgensen, H.F. & Mallat, Z. (2019). Vascular Smooth Muscle Cell Plasticity and Autophagy in Dissecting Aortic Aneurysms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(6): 1149-1159. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311727.

Colonnello, J.S., Hance, K.A., Shames, M.L., Wyble, C.W., Ziporin, S.J., Leidenfrost, J.E., Ennis, T.L., Upchurch, G.R. & Thompson, R.W. (2003). Transient exposure to elastase induces mouse aortic wall smooth muscle cell production of MCP-1 and RANTES during development of experimental aortic aneurysm. *Journal of Vascular Surgery*, 38(1): 138-146. doi: 10.1016/s0741-5214(03)00125-3.

Dale, M.A., Ruhlman, M.K. & Baxter, B.T. (2015). Inflammatory cell phenotypes in AAAs: their role and potential as targets for therapy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(8): 1746-1755. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305269.

Dale, M.A., Xiong, W., Carson, J.S., Suh, M.K., Karpisek, A.D., Meisinger, T.M., Casale, G.P. & Baxter, B.T. (2016). Elastin-Derived Peptides Promote Abdominal Aortic Aneurysm Formation by Modulating M1/M2 Macrophage Polarization. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 196(11): 4536-4543. doi: 10.4049/jimmunol.1502454.

Davis, C.A., Pearce, W.H., Haines, G.K., Shah, M. & Koch, A.E. (1993). Increased ICAM-1 expression in aortic disease. *Journal of Vascular Surgery*, 18(5): 875-880.

Davis, F.M., Rateri, D.L. & Daugherty, A. (2015). Abdominal aortic aneurysm: novel mechanisms and therapies. *Current Opinion in Cardiology*, 30(6): 566-573. doi: 10.1097/HCO.0000000000000216.

Desforges, M., Harris, L.K. & Aplin, J.D. (2015). Elastin-derived peptides stimulate trophoblast migration and invasion: a positive feedback loop to enhance spiral artery remodelling. *Molecular Human Reproduction*, 21(1): 95-104. doi: 10.1093/molehr/gau089.

Didion, S.P. (2017). Cellular and Oxidative Mechanisms Associated with Interleukin-6 Signaling in the Vasculature. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12) doi: 10.3390/ijms18122563.

Dihlmann, S., Erhart, P., Mehrabi, A., Nickkholgh, A., Lasitschka, F., Böckler, D. & Hakimi, M. (2014). Increased expression and activation of absent in melanoma 2 inflammasome components in lymphocytic infiltrates of abdominal aortic aneurysms. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 20: 230-237. doi: 10.2119/molmed.2013.00162.

Dodington, D.W., Desai, H.R. & Woo, M. (2018). JAK/STAT - Emerging Players in Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 29(1): 55-65. doi: 10.1016/j.tem.2017.11.001.

Dollery, C.M., Owen, C.A., Sukhova, G.K., Krettek, A., Shapiro, S.D. & Libby, P. (2003). Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages. *Circulation*, 107(22): 2829-2836. doi: 10.1161/01.CIR.0000072792.65250.4A.

Dorn, C., Engelmann, J.C., Saugspier, M., Koch, A., Hartmann, A., Müller, M., Spang, R., Bosserhoff, A. & Hellerbrand, C. (2014). Increased expression of c-Jun in nonalcoholic fatty liver disease. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 94(4): 394-408. doi: 10.1038/labinvest.2014.3.

Drygalski, K., Berk, K., Charytoniuk, T., Iłowska, N., Łukaszuk, B., Chabowski, A. & Konstantynowicz-Nowicka, K. (2017). Does the enterolactone (ENL) affect fatty acid transporters and lipid metabolism in liver?. *Nutrition & Metabolism*, 14: 69. doi: 10.1186/s12986-017-0223-1.

Duca, L., Blaise, S., Romier, B., Laffargue, M., Gayral, S., El Btaouri, H., Kawecki, C., Guillot, A., Martiny, L., Debelle, L. & Maurice, P. (2016a). Matrix ageing and vascular impacts: focus on elastin fragmentation. *Cardiovascular Research*, 110(3): 298-308. doi: 10.1093/cvr/cvw061.

Duca, L., Blaise, S., Romier, B., Laffargue, M., Gayral, S., El Btaouri, H., Kawecki, C., Guillot, A., Martiny, L., Debelle, L. & Maurice, P. (2016b). Matrix ageing and vascular impacts: focus on elastin fragmentation. *Cardiovascular Research*, 110(3): 298-308. doi: 10.1093/cvr/cvw061.

Durham, G.A., Williams, J.J.L., Nasim, M.T. & Palmer, T.M. (2019). Targeting SOCS Proteins to Control JAK-STAT Signalling in Disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(5): 298-308. doi: 10.1016/j.tips.2019.03.001.

Eagleton, M.J., Xu, J., Liao, M., Parine, B., Chisolm, G.M. & Graham, L.M. (2010). Loss of STAT1 is associated with increased aortic rupture in an experimental model of aortic dissection and aneurysm formation. *Journal of Vascular Surgery*, 51(4): 951-961; discussion 961. doi: 10.1016/j.jvs.2009.11.075.

Eslam, M., Valenti, L. & Romeo, S. (2018). Genetics and epigenetics of NAFLD and NASH: Clinical impact. *Journal of Hepatology*, 68(2): 268-279. doi: 10.1016/j.jhep.2017.09.003.

Fan, J., Li, X., Zhong, L., Hao-Tong, n., Di, J., Liu, F., Zhao, H. & Bai, S. (2010). MCP-1, ICAM-1 and VCAM-1 are present in early aneurysmal dilatation in experimental rats. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*, 48(3): 455-461. doi: 10.2478/v10042-010-0042-y.

Farrell, G.C., Haczeyni, F. & Chitturi, S. (2018). Pathogenesis of NASH: How Metabolic Complications of Overnutrition Favour Lipotoxicity and Pro-Inflammatory Fatty Liver Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1061: 19-44. doi: 10.1007/978-981-10-8684-7\_3.

Ferramosca, A. & Zara, V. (2014). Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World Journal of Gastroenterology*, 20(7): 1746-1755. doi: 10.3748/wjg.v20.i7.1746.

Ferro, D., Baratta, F., Pastori, D., Cocomello, N., Colantoni, A., Angelico, F. & Del Ben, M. (2020). New Insights into the Pathogenesis of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Gut-Derived Lipopolysaccharides and Oxidative Stress. *Nutrients*, 12(9) doi: 10.3390/nu12092762.

Flores-Morales, A., Fernández, L., Rico-Bautista, E., Umana, A., Negrín, C., Zhang, J.G. & Norstedt, G. (2001). Endoplasmic reticulum stress prolongs GH-induced Janus kinase (JAK2)/signal transducer and activator of transcription (STAT5) signaling pathway. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 15(9): 1471-1483. doi: 10.1210/mend.15.9.0699.

Forester, N.D., Cruickshank, S.M., Scott, D.J.A. & Carding, S.R. (2006). Increased natural killer cell activity in patients with an abdominal aortic aneurysm. *The British Journal of Surgery*, 93(1): 46-54. doi: 10.1002/bjs.5215.

Frambach, Sanne J. C. M., de Haas, R., Smeitink, J.A.M., Rongen, G.A., Russel, F.G.M. & Schirris, T.J.J. (2020). Brothers in Arms: ABCA1- and ABCG1-Mediated Cholesterol Efflux as Promising Targets in Cardiovascular Disease Treatment. *Pharmacological Reviews*, 72(1): 152-190. doi: 10.1124/pr.119.017897.

Friedman, S.L., Neuschwander-Tetri, B.A., Rinella, M. & Sanyal, A.J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, 24(7): 908-922. doi: 10.1038/s41591-018-0104-9.

Fujimoto, M. & Naka, T. (2010). SOCS1, a Negative Regulator of Cytokine Signals and TLR Responses, in Human Liver Diseases. *Gastroenterology Research and Practice*, 2010 doi: 10.1155/2010/470468.

García-Monzón, C., Lo Iacono, O., Crespo, J., Romero-Gómez, M., García-Samaniego, J., Fernández-Bermejo, M., Domínguez-Díez, A., Rodríguez de Cía, J., Sáez, A., Porrero, J.L., Vargas-Castrillón, J., Chávez-Jiménez, E., Soto-Fernández, S., Díaz, A., Gallego-Durán, R., Madejón, A. & Miquilena-Colina, M.E. (2014). Increased soluble CD36 is linked to advanced steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 44(1): 65-73. doi: 10.1111/eci.12192.

Gavito, A.L., Cabello, R., Suarez, J., Serrano, A., Pavón, F.J., Vida, M., Romero, M., Pardo, V., Bautista, D., Arrabal, S., Decara, J., Cuesta, A.L., Valverde, A.M., Rodríguez de Fonseca, F. & Baixeras, E. (2016). Single administration of recombinant IL-6 restores the gene expression of lipogenic enzymes in liver of fasting IL-6-deficient mice. *British Journal of Pharmacology*, 173(6): 1070-1084. doi: 10.1111/bph.13423.

George, J., Pera, N., Phung, N., Leclercq, I., Yun Hou, J. & Farrell, G. (2003). Lipid peroxidation, stellate cell activation and hepatic fibrogenesis in a rat model of chronic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, 39(5): 756-764. doi: 10.1016/s0168-8278(03)00376-3.

Gerds, E. & Regitz-Zagrosek, V. (2019). Sex differences in cardiometabolic disorders. *Nature Medicine*, 25(11): 1657-1666. doi: 10.1038/s41591-019-0643-8.

Ghosh, A., Lu, G., Su, G., McEvoy, B., Sadiq, O., DiMusto, P.D., Laser, A., Futchko, J.S., Henke, P.K., Eliason, J.L. & Upchurch, G.R. (2014). Phosphorylation of AKT and Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *The American Journal of Pathology*, 184(1): 148-158. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.09.016.

Ghosh, A., Pechota, A., Coleman, D., Upchurch, G.R. & Eliason, J.L. (2015). Cigarette smoke-induced MMP2 and MMP9 secretion from aortic vascular smooth cells is mediated via the Jak/Stat pathway. *Human Pathology*, 46(2): 284-294. doi: 10.1016/j.humpath.2014.11.003.

Golledge, J., Moxon, J.V., Singh, T.P., Bown, M.J., Mani, K. & Wanhainen, A. (2020). Lack of an effective drug therapy for abdominal aortic aneurysm. *Journal of Internal Medicine*, 288(1): 6-22. doi: 10.1111/joim.12958.

Golledge, J. (2019). Abdominal aortic aneurysm: update on pathogenesis and medical treatments. *Nature Reviews. Cardiology*, 16(4): 225-242. doi: 10.1038/s41569-018-0114-9.

Grohmann, M., Wiede, F., Dodd, G.T., Gurzov, E.N., Ooi, G.J., Butt, T., Rasmiena, A.A., Kaur, S., Gulati, T., Goh, P.K., Treloar, A.E., Archer, S., Brown, W.A., Muller, M., Watt, M.J., Ohara, O., McLean, C.A. & Tiganis, T. (2018). Obesity Drives STAT-1-Dependent NASH and STAT-3-Dependent HCC. *Cell*, 175(5): 1289-1306.e20. doi: 10.1016/j.cell.2018.09.053.

Grothusen, C., Schuett, H., Hillmer, A., Lumpe, S., Grote, K., Ballmaier, M., Bleich, A., Glage, S., Tietge, U.J.F., Luchtefeld, M. & Schieffer, B. (2012). Role of suppressor of cytokine signaling-1 in murine atherosclerosis. *PLoS One*, 7(12): e51608. doi: 10.1371/journal.pone.0051608.

Gurzov, E.N., Stanley, W.J., Pappas, E.G., Thomas, H.E. & Gough, D.J. (2016a). The JAK/STAT pathway in obesity and diabetes. *The FEBS Journal*, 283(16): 3002-3015. doi: 10.1111/febs.13709.

Gurzov, E.N., Stanley, W.J., Pappas, E.G., Thomas, H.E. & Gough, D.J. (2016b). The JAK/STAT pathway in obesity and diabetes. *The FEBS Journal*, 283(16): 3002-3015. doi: 10.1111/febs.13709.

Guzik, B., Sagan, A., Ludew, D., Mrowiecki, W., Chwała, M., Bujak-Gizycka, B., Filip, G., Grudzien, G., Kapelak, B., Zmudka, K., Mrowiecki, T., Sadowski, J., Korbut, R. & Guzik, T.J. (2013). Mechanisms of oxidative stress in human aortic aneurysms--association with clinical risk factors for atherosclerosis and disease severity. *International Journal of Cardiology*, 168(3): 2389-2396. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.01.278.

Haller, S.J., Crawford, J.D., Courchaine, K.M., Bohannon, C.J., Landry, G.J., Moneta, G.L., Azarbal, A.F. & Rugonyi, S. (2018). Intraluminal thrombus is associated with early rupture of abdominal aortic aneurysm. *Journal of Vascular Surgery*, 67(4): 1051-1058.e1. doi: 10.1016/j.jvs.2017.08.069.

Hao, X., Cao, D., Hu, Y., Li, X., Liu, X., Xiao, J., Liao, D., Xiang, J. & Tang, C. (2009). IFN-gamma down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXRA in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner. *Atherosclerosis*, 203(2): 417-428. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.07.029.

Hardy, L.M., Frisdal, E. & Le Goff, W. (2017). Critical Role of the Human ATP-Binding Cassette G1 Transporter in Cardiometabolic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9) doi: 10.3390/ijms18091892.

Hardy, T., Oakley, F., Anstee, Q.M. & Day, C.P. (2016). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annual Review of Pathology*, 11: 451-496. doi: 10.1146/annurev-pathol-012615-044224.

Harrison, S.C., Smith, A.J.P., Jones, G.T., Swerdlow, D.I., Rampuri, R., Bown, M.J., Folkersen, L., Baas, A.F., de Borst, G.J., Blankensteijn, J.D., Price, J.F., van der Graaf, Y., McLachlan, S., Agu, O., Hofman, A., Uitterlinden, A.G., Franco-Cereceda, A., Ruigrok, Y.M., van't Hof, F.N., Powell, J.T., van Rij, A.M., Casas, J.P., Eriksson, P., Holmes, M.V., Asselbergs, F.W., Hingorani, A.D. & Humphries, S.E. (2013). Interleukin-6 receptor pathways in abdominal aortic aneurysm. *European Heart Journal*, 34(48): 3707-3716. doi: 10.1093/eurheartj/ehs354.

Hashimoto, R., Kakigi, R., Miyamoto, Y., Nakamura, K., Itoh, S., Daida, H., Okada, T. & Katoh, Y. (2020). JAK-STAT-dependent regulation of scavenger receptors in LPS-activated murine macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 871: 172940. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.172940.

He, G. & Karin, M. (2011). NF- $\kappa$ B and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Research*, 21(1): 159-168. doi: 10.1038/cr.2010.183.

Hellenthal, Femke A. M. V. I., Buurman, W.A., Wodzig, Will K. W. H. & Schurink, G.W.H. (2009). Biomarkers of abdominal aortic aneurysm progression. Part 2: inflammation. *Nature Reviews Cardiology*, 6(8): 543-552. doi: 10.1038/nrcardio.2009.102.

Hendy, K., Gunnarson, R. & Golledge, J. (2014). Growth rates of small abdominal aortic aneurysms assessed by computerised tomography--a systematic literature review. *Atherosclerosis*, 235(1): 182-188. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.021 [doi].

Heo, Y.J., Choi, S., Jeon, J.Y., Han, S.J., Kim, D.J., Kang, Y., Lee, K.W. & Kim, H.J. (2019). Visfatin Induces Inflammation and Insulin Resistance via the NF- $\kappa$ B and STAT3 Signaling Pathways in Hepatocytes. *Journal of Diabetes Research*, 2019: 4021623. doi: 10.1155/2019/4021623.

Hingorani, A., Ascher, E., Scheinman, M., Yorkovich, W., DePippo, P., Ladoulis, C.T. & Salles-Cunha, S. (1998). The effect of tumor necrosis factor binding protein and interleukin-1 receptor antagonist on the development of abdominal aortic aneurysms in a rat model. *Journal of Vascular Surgery*, 28(3): 522-526. doi: 10.1016/s0741-5214(98)70139-9.

Hliwa, A., Ramos-Molina, B., Laski, D., Mika, A. & Sledzinski, T. (2021). The Role of Fatty Acids in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Progression: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13) doi: 10.3390/ijms22136900.

Hou, L., Tang, S., Wu, B.J., Ong, K., Westerterp, M., Barter, P.J., Cochran, B.J., Tabet, F. & Rye, K. (2019). Apolipoprotein A-I improves pancreatic  $\beta$ -cell function independent of the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(7): 8479-8489. doi: 10.1096/fj.201802512RR.

Hovsepian, D.M., Ziporin, S.J., Sakurai, M.K., Lee, J.K., Curci, J.A. & Thompson, R.W. (2000). Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with abdominal aortic aneurysms: a circulating marker of degenerative aneurysm disease. *Journal of Vascular and Interventional Radiology: JVIR*, 11(10): 1345-1352. doi: 10.1016/s1051-0443(07)61315-3.



Ipsen, D.H., Lykkesfeldt, J. & Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 75(18): 3313-3327. doi: 10.1007/s00018-018-2860-6.

Ishibashi, M., Egashira, K., Zhao, Q., Hiasa, K., Ohtani, K., Ihara, Y., Charo, I.F., Kura, S., Tsuzuki, T., Takeshita, A. & Sunagawa, K. (2004). Bone Marrow–Derived Monocyte Chemoattractant Protein-1 Receptor CCR2 Is Critical in Angiotensin II–Induced Acceleration of Atherosclerosis and Aneurysm Formation in Hypercholesterolemic Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(11): e174-e178. doi: 10.1161/01.ATV.0000143384.69170.2d.

Itagaki, H., Shimizu, K., Morikawa, S., Ogawa, K. & Ezaki, T. (2013). Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 6(12): 2683-2696.

Jamieson, E., Chong, M.M.W., Steinberg, G.R., Jovanovska, V., Fam, B.C., Bullen, D.V.R., Chen, Y., Kemp, B.E., Proietto, J., Kay, T.W.H. & Andrikopoulos, S. (2005). Socs1 deficiency enhances hepatic insulin signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(36): 31516-31521. doi: 10.1074/jbc.M502163200.

Jeanmonod, D. (2021). Abdominal Aortic Aneurysm Rupture. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Johnston, W.F., Salmon, M., Su, G., Lu, G., Stone, M.L., Zhao, Y., Owens, G.K., Upchurch, G.R. & Ailawadi, G. (2013). Genetic and pharmacologic disruption of interleukin-1 $\beta$  signaling inhibits experimental aortic aneurysm formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(2): 294-304. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300432.

Joviliano, E.E., Ribeiro, M.S. & Tenorio, E.J.R. (2017). MicroRNAs and Current Concepts on the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, 32: 215-224. doi: 10.21470/1678-9741-2016-0050.

Ju, X., Ijaz, T., Sun, H., Ray, S., Lejeune, W., Lee, C., Recinos, A., Guo, D., Milewicz, D.M., Tilton, R.G. & Brasier, A.R. (2013). Interleukin-6-signal transducer and activator of transcription-3 signaling mediates aortic dissections induced by angiotensin II via the T-helper lymphocyte 17-interleukin 17 axis in C57BL/6 mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(7): 1612-1621. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.301049.

Juárez-Hernández, E., Chávez-Tapia, N.C., Uribe, M. & Barbero-Becerra, V.J. (2016). Role of bioactive fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition Journal*, 15(1): 72. doi: 10.1186/s12937-016-0191-8.

Jung, K.H., Yoo, W., Stevenson, H.L., Deshpande, D., Shen, H., Gagea, M., Yoo, S., Wang, J., Eckols, T.K., Bharadwaj, U., Tweardy, D.J. & Beretta, L. (2017a). Multifunctional Effects of a Small-Molecule STAT3 Inhibitor on NASH and Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Clinical Cancer*

*Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(18): 5537-5546. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2253.

Jung, K.H., Yoo, W., Stevenson, H.L., Deshpande, D., Shen, H., Gagea, M., Yoo, S., Wang, J., Eckols, T.K., Bharadwaj, U., Tweardy, D.J. & Beretta, L. (2017b). Multifunctional Effects of a Small-Molecule STAT3 Inhibitor on NASH and Hepatocellular Carcinoma in Mice. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(18): 5537-5546. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2253.

Kaltenecker, D., Themanns, M., Mueller, K.M., Spirk, K., Suske, T., Merkel, O., Kenner, L., Luis, A., Kozlov, A., Haybaeck, J., Müller, M., Han, X. & Moriggl, R. (2019). Hepatic growth hormone - JAK2 - STAT5 signalling: Metabolic function, non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma progression. *Cytokine (Philadelphia, Pa.)*, 124: 154569. doi: 10.1016/j.cyto.2018.10.010.

Kempinska-Podhorodecka, A., Wunsch, E., Milkiewicz, P., Stachowska, E. & Milkiewicz, M. (2019). The Association between SOCS1-1656G>A Polymorphism, Insulin Resistance and Obesity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Patients. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11) doi: 10.3390/jcm8111912.

Kershaw, N.J., Murphy, J.M., Lucet, I.S., Nicola, N.A. & Babon, J.J. (2013). Regulation of Janus kinases by SOCS proteins. *Biochemical Society Transactions*, 41(4): 1042-1047. doi: 10.1042/BST20130077.

Kim, H., Kim, Y. & Park, W. (2021). Berberine modulates hyper-inflammation in mouse macrophages stimulated with polyinosinic-polycytidylic acid via calcium-CHOP/STAT pathway. *Scientific Reports*, 11(1): 11298. doi: 10.1038/s41598-021-90752-z.

Kim, J.Y., Lee, S.H., Song, E.H., Park, Y.M., Lim, J., Kim, D.J., Choi, K., Park, S.I., Gao, B. & Kim, W. (2009). A critical role of STAT1 in streptozotocin-induced diabetic liver injury in mice: Controlled by ATF3. *Cellular Signalling*, 21(12): 1758-1767. doi: 10.1016/j.cellsig.2009.07.011.

Kinoshita, S., Ogawa, W., Okamoto, Y., Takashima, M., Inoue, H., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R. & Kasuga, M. (2008). Role of hepatic STAT3 in the regulation of lipid metabolism. *The Kobe Journal of Medical Sciences*, 54(4): 200.

Kirchmer, M.N., Franco, A., Albasanz-Puig, A., Murray, J., Yagi, M., Gao, L., Dong, Z.M. & Wijelath, E.S. (2014). Modulation of vascular smooth muscle cell phenotype by STAT-1 and STAT-3. *Atherosclerosis*, 234(1): 169-175. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.02.029.

Kirovski, G., Gäbele, E., Dorn, C., Moleda, L., Niessen, C., Weiss, T.S., Wobser, H., Schacherer, D., Buechler, C., Wasmuth, H.E. & Hellerbrand, C. (2010). Hepatic steatosis causes induction of the chemokine RANTES in the absence of significant hepatic inflammation. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 3(7): 675-680.

Kiu, H. & Nicholson, S.E. (2012). Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors (Chur, Switzerland)*, 30(2): 88-106. doi: 10.3109/08977194.2012.660936.

Kokje, V.B.C., Gäbel, G., Koole, D., Northoff, B.H., Holdt, L.M., Hamming, J.F. & Lindeman, J.H.N. (2016). IL-6: A Janus-like factor in abdominal aortic aneurysm disease. *Atherosclerosis*, 251: 139-146. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.021.

Koonen, D.P.Y., Jacobs, R.L., Febbraio, M., Young, M.E., Soltys, C.M., Ong, H., Vance, D.E. & Dyck, J.R.B. (2007). Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes*, 56(12): 2863-2871. doi: 10.2337/db07-0907.

La Manna, S., Lopez-Sanz, L., Leone, M., Brandi, P., Scognamiglio, P.L., Morelli, G., Novellino, E., Gomez-Guerrero, C. & Marasco, D. (2017). Structure-activity studies of peptidomimetics based on kinase-inhibitory region of suppressors of cytokine signaling 1. *Biopolymers* doi: 10.1002/bip.23082.

La Manna, S., Lopez-Sanz, L., Bernal, S., Jimenez-Castilla, L., Prieto, I., Morelli, G., Gomez-Guerrero, C. & Marasco, D. (2020a). Antioxidant Effects of PS5, a Peptidomimetic of Suppressor of Cytokine Signaling 1, in Experimental Atherosclerosis. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(8) doi: 10.3390/antiox9080754.

La Manna, S., Lopez-Sanz, L., Bernal, S., Jimenez-Castilla, L., Prieto, I., Morelli, G., Gomez-Guerrero, C. & Marasco, D. (2020b). Antioxidant Effects of PS5, a Peptidomimetic of Suppressor of Cytokine Signaling 1, in Experimental Atherosclerosis. *Antioxidants*, 9(8): 754. doi: 10.3390/antiox9080754.

La Manna, S., Lopez-Sanz, L., Bernal, S., Fortuna, S., Mercurio, F.A., Leone, M., Gomez-Guerrero, C. & Marasco, D. (2021). Cyclic mimetics of kinase-inhibitory region of Suppressors of Cytokine Signaling 1: Progress toward novel anti-inflammatory therapeutics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 221: 113547. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113547.

Lai, C., Wang, K., Lee, F., Tsai, H., Ma, C., Cheng, T., Chang, B., Yang, Y., Shi, G. & Wu, H. (2016). Toll-Like Receptor 4 Is Essential in the Development of Abdominal Aortic Aneurysm. *PLoS One*, 11(1): e0146565. doi: 10.1371/journal.pone.0146565.

Lambert, J.E., Ramos-Roman, M.A., Browning, J.D. & Parks, E.J. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 146(3): 726-735. doi: 10.1053/j.gastro.2013.11.049.

Lee, J., Cho, H. & Kwon, Y.H. (2010). Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 59(7): 927-934. doi: 10.1016/j.metabol.2009.10.012.

Leong, D.P., Joseph, P.G., McKee, M., Anand, S.S., Teo, K.K., Schwalm, J. & Yusuf, S. (2017). Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 2: Prevention and Treatment of

Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 121(6): 695-710. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311849.

Leoni, S., Tovoli, F., Napoli, L., Serio, I., Ferri, S. & Bolondi, L. (2018). Current guidelines for the management of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review with comparative analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 24(30): 3361-3373. doi: 10.3748/wjg.v24.i30.3361.

Li, H., Bai, S., Ao, Q., Wang, X., Tian, X., Li, X., Tong, H., Hou, W. & Fan, J. (2018a). Modulation of Immune-Inflammatory Responses in Abdominal Aortic Aneurysm: Emerging Molecular Targets. *Journal of Immunology Research*, 2018: e7213760. doi: 10.1155/2018/7213760.

Li, H., Bai, S., Ao, Q., Wang, X., Tian, X., Li, X., Tong, H., Hou, W. & Fan, J. (2018b). Modulation of Immune-Inflammatory Responses in Abdominal Aortic Aneurysm: Emerging Molecular Targets. *Journal of Immunology Research*, 2018: 7213760. doi: 10.1155/2018/7213760.

Li, H., Bai, S., Ao, Q., Wang, X., Tian, X., Li, X., Tong, H., Hou, W. & Fan, J. (2018c). Modulation of Immune-Inflammatory Responses in Abdominal Aortic Aneurysm: Emerging Molecular Targets. *Journal of Immunology Research*, 2018: 7213760. doi: 10.1155/2018/7213760.

Li, H., Yoo, W., Park, H., Lim, S., Shin, D., Kim, S., Park, H. & Jeong, T. (2019). Arazyme Suppresses Hepatic Steatosis and Steatohepatitis in Diet-Induced Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Like Mouse Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9) doi: 10.3390/ijms20092325.

Li, Z. & Kong, W. (2020). Cellular signaling in Abdominal Aortic Aneurysm. *Cellular Signalling*, 70: 109575. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109575.

Liang, W., Menke, A.L., Driessen, A., Koek, G.H., Lindeman, J.H., Stoop, R., Havekes, L.M., Kleemann, R. & van den Hoek, Anita M. (2014). Establishment of a general NAFLD scoring system for rodent models and comparison to human liver pathology. *PloS One*, 9(12): e115922. doi: 10.1371/journal.pone.0115922.

Liang, Y., Xu, W., Peng, H., Pan, H. & Ye, D. (2014). SOCS signaling in autoimmune diseases: molecular mechanisms and therapeutic implications. *European Journal of Immunology*, 44(5): 1265-1275. doi: 10.1002/eji.201344369.

Liao, M., Xu, J., Clair, A.J., Ehrman, B., Graham, L.M. & Eagleton, M.J. (2012). Local and systemic alterations in signal transducers and activators of transcription (STAT) associated with human abdominal aortic aneurysms. *The Journal of Surgical Research*, 176(1): 321-328. doi: 10.1016/j.jss.2011.05.041.

Liao, X., Wang, N., Zhao, D., Zheng, D., Zheng, L., Xing, W., Ma, W., Bao, L., Dong, J. & Zhang, T. (2015). STAT3 Protein Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switch by Interaction with Myocardin. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(32): 19641-19652. doi: 10.1074/jbc.M114.630111.

- Lindeman, J.H. & Matsumura, J.S. (2019). Pharmacologic Management of Aneurysms. *Circulation Research*, 124(4): 631-646. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312439.
- Liu, J. & Khalil, R.A. (2017a). Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigational and Therapeutic Tools in Unrestrained Tissue Remodeling and Pathological Disorders. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 148: 355-420. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.04.003.
- Liu, J. & Khalil, R.A. (2017b). Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigational and Therapeutic Tools in Unrestrained Tissue Remodeling and Pathological Disorders. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 148: 355-420. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.04.003.
- Liu, X. (2019). ABC Family Transporters. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1141: 13-100. doi: 10.1007/978-981-13-7647-4\_2.
- Lockett, A.D., Wu, Y. & Gunst, S.J. (2018). Elastase alters contractility and promotes an inflammatory synthetic phenotype in airway smooth muscle tissues. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 314(4): L626-L634. doi: 10.1152/ajplung.00334.2017.
- Longo, G.M., Xiong, W., Greiner, T.C., Zhao, Y., Fiotti, N. & Baxter, B.T. (2002). Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(5): 625-632. doi: 10.1172/JCI15334.
- Loomba, R. & Sanyal, A.J. (2013). The global NAFLD epidemic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 10(11): 686-690. doi: 10.1038/nrgastro.2013.171.
- Lopez-Sanz, L., Bernal, S., Recio, C., Lazaro, I., Oguiza, A., Melgar, A., Jimenez-Castilla, L., Egado, J. & Gomez-Guerrero, C. (2018). SOCS1-targeted therapy ameliorates renal and vascular oxidative stress in diabetes via STAT1 and PI3K inhibition. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 98(10): 1276-1290. doi: 10.1038/s41374-018-0043-6.
- Lysgaard Poulsen, J., Stubbe, J. & Lindholt, J.S. (2016). Animal Models Used to Explore Abdominal Aortic Aneurysms: A Systematic Review. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery*, 52(4): 487-499. doi: 10.1016/j.ejvs.2016.07.004.
- Machado, M.V. & Cortez-Pinto, H. (2012). Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Hepatology*, 11(4): 440-449.
- Machado, M.V. & Cortez-Pinto, H. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease: what the clinician needs to know. *World Journal of Gastroenterology*, 20(36): 12956-12980. doi: 10.3748/wjg.v20.i36.12956.
- Machado, M.V., Michelotti, G.A., Xie, G., Almeida Pereira, T., de Almeida, T.P., Boursier, J., Bohnic, B., Guy, C.D. & Diehl, A.M. (2015). Mouse models of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis

reproduce the heterogeneity of the human disease. *PLoS One*, 10(5): e0127991. doi: 10.1371/journal.pone.0127991.

Madhur, M.S., Funt, S.A., Li, L., Vinh, A., Chen, W., Lob, H.E., Iwakura, Y., Blinder, Y., Rahman, A., Quyyumi, A.A. & Harrison, D.G. (2011). Role of interleukin 17 in inflammation, atherosclerosis, and vascular function in apolipoprotein e-deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(7): 1565-1572. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.227629.

Mafanda, E.K., Kandhi, R., Bobbala, D., Khan, M.G.M., Nandi, M., Menendez, A., Ramanathan, S. & Ilangumaran, S. (2019). Essential role of suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) in hepatocytes and macrophages in the regulation of liver fibrosis. *Cytokine*, 124: 154501. doi: 10.1016/j.cyto.2018.07.032.

Maguire, E.M., Pearce, S.W.A., Xiao, R., Oo, A.Y. & Xiao, Q. (2019a). Matrix Metalloproteinase in Abdominal Aortic Aneurysm and Aortic Dissection. *Pharmaceuticals*, 12(3) doi: 10.3390/ph12030118.

Maguire, E.M., Pearce, S.W.A., Xiao, R., Oo, A.Y. & Xiao, Q. (2019b). Matrix Metalloproteinase in Abdominal Aortic Aneurysm and Aortic Dissection. *Pharmaceuticals*, 12(3) doi: 10.3390/ph12030118.

Manea, A., Tanase, L.I., Raicu, M. & Simionescu, M. (2010). Jak/STAT signaling pathway regulates nox1 and nox4-based NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(1): 105-112. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.193896.

Marine, J.C., Topham, D.J., McKay, C., Wang, D., Parganas, E., Stravopodis, D., Yoshimura, A. & Ihle, J.N. (1999). SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell*, 98(5): 609-616. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80048-3.

Marrero, M.B. (2005). Introduction to JAK/STAT signaling and the vasculature. *Vascular Pharmacology*, 43(5): 307-309. doi: 10.1016/j.vph.2005.09.002.

Maurice, P., Blaise, S., Gayral, S., Debelle, L., Laffargue, M., Hornebeck, W. & Duca, L. (2013). Elastin fragmentation and atherosclerosis progression: the elastokine concept. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 23(6): 211-221. doi: 10.1016/j.tcm.2012.12.004.

Mäyränpää, M.I., Trosien, J.A., Fontaine, V., Folkesson, M., Kazi, M., Eriksson, P., Swedenborg, J. & Hedin, U. (2009). Mast cells associate with neovessels in the media and adventitia of abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery*, 50(2): 388-396. doi: 10.1016/j.jvs.2009.03.055.

Mazo, D.F., Malta, F.M., Stefano, J.T., Salles, A.P.M., Gomes-Gouvea, M.S., Nastri, A.C.S., Almeida, J.R., Pinho, J.R.R., Carrilho, F.J. & Oliveira, C.P. (2019). Validation of PNPLA3 polymorphisms as risk factor for NAFLD and liver fibrosis in an admixed population. *Annals of Hepatology*, 18(3): 466-471. doi: 10.1016/j.aohep.2018.10.004.

- McCormick, M.L., Gavrilu, D. & Weintraub, N.L. (2007). Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(3): 461-469. doi: 10.1161/01.ATV.0000257552.94483.14.
- Meares, G.P., Liu, Y., Rajbhandari, R., Qin, H., Nozell, S.E., Mobley, J.A., Corbett, J.A. & Benveniste, E.N. (2014). PERK-Dependent Activation of JAK1 and STAT3 Contributes to Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Inflammation. *Molecular and Cellular Biology*, 34(20): 3911-3925. doi: 10.1128/MCB.00980-14.
- Meex, R.C.R. & Watt, M.J. (2017). Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nature Reviews. Endocrinology*, 13(9): 509-520. doi: 10.1038/nrendo.2017.56.
- Meng, X., Yang, J., Dong, M., Zhang, K., Tu, E., Gao, Q., Chen, W., Zhang, C. & Zhang, Y. (2016). Regulatory T cells in cardiovascular diseases. *Nature Reviews. Cardiology*, 13(3): 167-179. doi: 10.1038/nrcardio.2015.169.
- Miller, F.J., Sharp, W.J., Fang, X., Oberley, L.W., Oberley, T.D. & Weintraub, N.L. (2002). Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(4): 560-565. doi: 10.1161/01.atv.0000013778.72404.30.
- Miquilena-Colina, M.E., Lima-Cabello, E., Sánchez-Campos, S., García-Mediavilla, M.V., Fernández-Bermejo, M., Lozano-Rodríguez, T., Vargas-Castrillón, J., Buqué, X., Ochoa, B., Aspichueta, P., González-Gallego, J. & García-Monzón, C. (2011). Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*, 60(10): 1394-1402. doi: 10.1136/gut.2010.222844.
- Mitsumoto, K., Watanabe, R., Nakao, K., Yonenaka, H., Hashimoto, T., Kato, N., Kumrungsee, T. & Yanaka, N. (2017). Time-course microarrays reveal early activation of the immune transcriptome in a choline-deficient mouse model of liver injury. *Life Sciences (1973)*, 184: 103-111. doi: 10.1016/j.lfs.2017.07.009.
- Mo, Z., Xiao, J., Liu, X., Hu, Y., Li, X., Yi, G., Wang, Z., Tang, Y., Liao, D. & Tang, C. (2011). AOPPs inhibits cholesterol efflux by down-regulating ABCA1 expression in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 18(9): 796-807. doi: 10.5551/jat.6569.
- Moran, C.S., Jose, R.J., Moxon, J.V., Roomberg, A., Norman, P.E., Rush, C., Körner, H. & Golledge, J. (2013). Everolimus limits aortic aneurysm in the apolipoprotein E-deficient mouse by downregulating C-C chemokine receptor 2 positive monocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(4): 814-821. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.301006.
- Mortezaee, K. (2018). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) and liver fibrosis: A review. *Cell Biochemistry and Function*, 36(6): 292-302. doi: 10.1002/cbf.3351.

Musso, G., Gambino, R. & Cassader, M. (2013). Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Progress in Lipid Research*, 52(1): 175-191. doi: 10.1016/j.plipres.2012.11.002.

Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3): 562-573. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.12.002.

Nakamura, A. & Terauchi, Y. (2013). Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(11): 21240-21257. doi: 10.3390/ijms141121240.

Navas-Madroñal, M., Rodriguez, C., Kassan, M., Fité, J., Escudero, J.R., Cañes, L., Martínez-González, J., Camacho, M. & Galán, M. (2019). Enhanced endoplasmic reticulum and mitochondrial stress in abdominal aortic aneurysm. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 133(13): 1421-1438. doi: 10.1042/CS20190399.

Nevzorova, Y.A., Boyer-Diaz, Z., Cubero, F.J. & Gracia-Sancho, J. (2020). Animal models for liver disease - A practical approach for translational research. *Journal of Hepatology*, 73(2): 423-440. doi: 10.1016/j.jhep.2020.04.011.

Novinec, M., Grass, R.N., Stark, W.J., Turk, V., Baici, A. & Lenarcic, B. (2007). Interaction between human cathepsins K, L, and S and elastins: mechanism of elastinolysis and inhibition by macromolecular inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(11): 7893-7902. doi: 10.1074/jbc.M610107200.

Ogata, H., Chinen, T., Yoshida, T., Kinjyo, I., Takaesu, G., Shiraishi, H., Iida, M., Kobayashi, T. & Yoshimura, A. (2006). Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF-beta1 production. *Oncogene*, 25(17): 2520-2530. doi: 10.1038/sj.onc.1209281.

Ohno, T., Aoki, H., Ohno, S., Nishihara, M., Furusho, A., Hiromatsu, S., Akashi, H., Fukumoto, Y. & Tanaka, H. (2018). Cytokine Profile of Human Abdominal Aortic Aneurysm: Involvement of JAK/STAT Pathway. *Annals of Vascular Diseases*, 11(1): 84-90. doi: 10.3400/avd.oa.17-00086.

Opazo-Ríos, L., Sanchez Matus, Y., Rodrigues-Díez, R.R., Carpio, D., Droguett, A., Egado, J., Gomez-Guerrero, C. & Mezzano, S. (2020). Anti-inflammatory, antioxidant and renoprotective effects of SOCS1 mimetic peptide in the BTBR ob/ob mouse model of type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 8(1) doi: 10.1136/bmjdr-2020-001242.

O'Reilly, M.E., Kajani, S., Ralston, J.C., Lenighan, Y.M., Roche, H.M. & McGillicuddy, F.C. (2019). Nutritionally Derived Metabolic Cues Typical of the Obese Microenvironment Increase Cholesterol Efflux Capacity of Adipose Tissue Macrophages. *Molecular Nutrition & Food Research*, 63(2): e1800713. doi: 10.1002/mnfr.201800713.

Ortiz-Muñoz, G., Martín-Ventura, J.L., Hernández-Vargas, P., Mallavia, B., López-Parra, V., López-Franco, O., Muñoz-García, B., Fernández-Vizcarra, P., Ortega, L., Egado, J. & Gomez-Guerrero, C. (2009). Suppressors of cytokine signaling modulate JAK/STAT-mediated cell responses during



atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(4): 525-531. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.173781.

Ortiz-Muñoz, G., Lopez-Parra, V., Lopez-Franco, O., Fernandez-Vizarrá, P., Mallavia, B., Flores, C., Sanz, A., Blanco, J., Mezzano, S., Ortiz, A., Egido, J. & Gomez-Guerrero, C. (2010). Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 21(5): 763-772. doi: 10.1681/ASN.2009060625.

Owen, K.L., Brockwell, N.K. & Parker, B.S. (2019). JAK-STAT Signaling: A Double-Edged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. *Cancers*, 11(12) doi: 10.3390/cancers11122002.

Pardo, V., González-Rodríguez, Á, Muntané, J., Kozma, S.C. & Valverde, ÁM. (2015). Role of hepatocyte S6K1 in palmitic acid-induced endoplasmic reticulum stress, lipotoxicity, insulin resistance and in oleic acid-induced protection. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 80: 298-309. doi: 10.1016/j.fct.2015.03.029.

Patelis, N., Moris, D., Schizas, D., Damaskos, C., Perrea, D., Bakoyiannis, C., Liakakos, T. & Georgopoulos, S. (2017). Animal models in the research of abdominal aortic aneurysms development. *Physiological Research*, 66(6): 899-915. doi: 10.33549/physiolres.933579.

Peng, C., Stewart, A.G., Woodman, O.L., Ritchie, R.H. & Qin, C.X. (2020). Non-Alcoholic Steatohepatitis: A Review of Its Mechanism, Models and Medical Treatments. *Frontiers in Pharmacology*, 11: 603926. doi: 10.3389/fphar.2020.603926.

Perumpail, B.J., Khan, M.A., Yoo, E.R., Cholankeril, G., Kim, D. & Ahmed, A. (2017). Clinical epidemiology and disease burden of nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*, 23(47): 8263-8276. doi: 10.3748/wjg.v23.i47.8263.

Pfaffenbach, K.T., Gentile, C.L., Nivala, A.M., Wang, D., Wei, Y. & Pagliassotti, M.J. (2010). Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298(5): 1027. doi: 10.1152/ajpendo.00642.2009.

Pierantonelli, I. & Svegliati-Baroni, G. (2019). Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Basic Pathogenetic Mechanisms in the Progression From NAFLD to NASH. *Transplantation*, 103(1): e1-e13. doi: 10.1097/TP.0000000000002480.

Plana, E., Oto, J., Medina, P., Fernández-Pardo, Á & Miralles, M. (2020). Novel contributions of neutrophils in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm, the role of neutrophil extracellular traps: A systematic review. *Thrombosis Research*, 194: 200-208. doi: 10.1016/j.thromres.2020.07.039.

Polyzos, S.A., Kang, E.S., Boutari, C., Rhee, E. & Mantzoros, C.S. (2020). Current and emerging pharmacological options for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 111S: 154203. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154203.

Pope, N.H., Salmon, M., Davis, J.P., Chatterjee, A., Su, G., Conte, M.S., Ailawadi, G. & Upchurch, G.R. (2016). D-series resolvins inhibit murine abdominal aortic aneurysm formation and increase M2 macrophage polarization. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30(12): 4192-4201. doi: 10.1096/fj.201600144RR.

Potula, H.S., Wang, D., Quyen, D.V., Singh, N.K., Kundumani-Sridharan, V., Karpurapu, M., Park, E.A., Glasgow, W.C. & Rao, G.N. (2009). Src-dependent STAT-3-mediated expression of monocyte chemoattractant protein-1 is required for 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid-induced vascular smooth muscle cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(45): 31142-31155. doi: 10.1074/jbc.M109.012526 [doi].

Puri, P., Mirshahi, F., Cheung, O., Natarajan, R., Maher, J.W., Kellum, J.M. & Sanyal, A.J. (2008). Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 134(2): 568-576. doi: 10.1053/j.gastro.2007.10.039.

Qin, L., Huang, Q., Zhang, H., Liu, R., Tellides, G., Min, W. & Yu, L. (2014). SOCS1 prevents graft arteriosclerosis by preserving endothelial cell function. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(1): 21-29. doi: 10.1016/j.jacc.2013.08.694.

Qin, Z. (2015). Soluble elastin peptides in cardiovascular homeostasis: Foe or ally. *Peptides*, 67: 64-73. doi: 10.1016/j.peptides.2015.03.006.

Qin, Z., Bagley, J., Sukhova, G., Baur, W.E., Park, H., Beasley, D., Libby, P., Zhang, Y. & Galper, J.B. (2015). Angiotensin II-induced TLR4 mediated abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E knockout mice is dependent on STAT3. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 87: 160-170. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.08.014.

Quintana, R.A. & Taylor, W.R. (2019). Cellular Mechanisms of Aortic Aneurysm Formation. *Circulation Research*, 124(4): 607-618. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313187.

Rabkin, S.W. (2016). The Effect of Nicotine and Tobacco on Aortic Matrix Metalloproteinases in the Production of Aortic Aneurysm. *Current Vascular Pharmacology*, 14(6): 514-522. doi: 10.2174/1570161114666160625091205.

Rabkin, S.W. (2017a). The Role Matrix Metalloproteinases in the Production of Aortic Aneurysm. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 147: 239-265. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.002.

Rabkin, S.W. (2017b). The Role Matrix Metalloproteinases in the Production of Aortic Aneurysm. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 147: 239-265. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.02.002.

Raffort, J., Lareyre, F., Clément, M., Hassen-Khodja, R., Chinetti, G. & Mallat, Z. (2017). Monocytes and macrophages in abdominal aortic aneurysm. *Nature Reviews. Cardiology*, 14(8): 457-471. doi: 10.1038/nrcardio.2017.52.

Raffort, J., Lareyre, F., Clément, M., Moratal, C., Jean-Baptiste, E., Hassen-Khodja, R., Burel-Vandenbos, F., Bruneval, P., Chinetti, G. & Mallat, Z. (2019). Transforming growth factor  $\beta$  neutralization finely tunes macrophage phenotype in elastase-induced abdominal aortic aneurysm and is associated with an increase of arginase 1 expression in the aorta. *Journal of Vascular Surgery*, 70(2): 588-598.e2. doi: 10.1016/j.jvs.2018.09.045.

Recio, C., Oguiza, A., Lazaro, I., Mallavia, B., Egido, J. & Gomez-Guerrero, C. (2014). Suppressor of cytokine signaling 1-derived peptide inhibits Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway and improves inflammation and atherosclerosis in diabetic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(9): 1953-1960. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304144 [doi].

Recio, C., Lazaro, I., Oguiza, A., Lopez-Sanz, L., Bernal, S., Blanco, J., Egido, J. & Gomez-Guerrero, C. (2017). Suppressor of Cytokine Signaling-1 Peptidomimetic Limits Progression of Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 28(2): 575-585. doi: 10.1681/ASN.2016020237 [doi].

Recio, C., Oguiza, A., Mallavia, B., Lazaro, I., Ortiz-Muñoz, G., Lopez-Franco, O., Egido, J. & Gomez-Guerrero, C. (2015). Gene delivery of suppressors of cytokine signaling (SOCS) inhibits inflammation and atherosclerosis development in mice. *Basic Research in Cardiology*, 110(2): 8. doi: 10.1007/s00395-014-0458-1.

Riches, K., Angelini, T.G., Mudhar, G.S., Kaye, J., Clark, E., Bailey, M.A., Sohrabi, S., Korossis, S., Walker, P.G., Scott, D.J.A. & Porter, K.E. (2013). Exploring smooth muscle phenotype and function in a bioreactor model of abdominal aortic aneurysm. *Journal of Translational Medicine*, 11: 208. doi: 10.1186/1479-5876-11-208.

Rizas, K.D., Ippagunta, N. & Tilson, M.D. (2009). Immune cells and molecular mediators in the pathogenesis of the abdominal aortic aneurysm. *Cardiology in Review*, 17(5): 201-210. doi: 10.1097/CRD.0b013e3181b04698.

Robertson, G., Leclercq, I. & Farrell, G.C. (2001). Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(5): 1135. doi: 10.1152/ajpgi.2001.281.5.G1135.

SAGAN, A., MIKOLAJCZYK, T., MROWIECKI, W., MACRITCHIE, N.A., DALY, K., MELDRUM, A., MIGLIARINO, S., URBANSKI, K., FILIP, G., KAPELAK, B., MAFFIA, P., TOUYZ, R.M. & GUZIK, T.J. (2019). *T cells are dominant population in human abdominal aortic aneurysms and their infiltration in the perivascular tissue correlates with disease severity*. *Frontiers Media*, ( Sep 4,) Available from: [https://explore.openaire.eu/search/publication?articleId=core\\_ac\\_uk\\_::c1c7873088d0cd2189c20215525a0ff6](https://explore.openaire.eu/search/publication?articleId=core_ac_uk_::c1c7873088d0cd2189c20215525a0ff6) [accessed: Mar 31, 2021].

Sakalihasan, N., Delvenne, P., Nusgens, B.V., Limet, R. & Lapière, C.M. (1996). Activated forms of MMP2 and MMP9 in abdominal aortic aneurysms. *Journal of Vascular Surgery*, 24(1): 127-133. doi: 10.1016/s0741-5214(96)70153-2.

Sakalihasan, N., Michel, J., Katsargyris, A., Kuivaniemi, H., Defraigne, J., Nchimi, A., Powell, J.T., Yoshimura, K. & Hultgren, R. (2018). Abdominal aortic aneurysms. *Nature Reviews. Disease Primers*, 4(1): 34. doi: 10.1038/s41572-018-0030-7.

Salas, A., Hernandez-Rocha, C., Duijvestein, M., Faubion, W., McGovern, D., Vermeire, S., Vetrano, S. & Vande Casteele, N. (2020). JAK-STAT pathway targeting for the treatment of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 17(6): 323-337. doi: 10.1038/s41575-020-0273-0.

Salmon, M., Johnston, W.F., Woo, A., Pope, N.H., Su, G., Upchurch, G.R., Owens, G.K. & Ailawadi, G. (2013). KLF4 regulates abdominal aortic aneurysm morphology and deletion attenuates aneurysm formation. *Circulation*, 128(11 Suppl 1): 163. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000238.

Salmon, M., Schaheen, B., Spinosa, M., Montgomery, W., Pope, N.H., Davis, J.P., Johnston, W.F., Sharma, A.K., Owens, G.K., Merchant, J.L., Zehner, Z.E., Upchurch, G.R. & Ailawadi, G. (2019). ZFP148 (Zinc-Finger Protein 148) Binds Cooperatively With NF-1 (Neurofibromin 1) to Inhibit Smooth Muscle Marker Gene Expression During Abdominal Aortic Aneurysm Formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(1): 73-88. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311136.

Sanchez, C.L., Sims, S.G., Nowery, J.D. & Meares, G.P. (2019). Endoplasmic reticulum stress differentially modulates the IL-6 family of cytokines in murine astrocytes and macrophages. *Scientific Reports*, 9(1): 1-12. doi: 10.1038/s41598-019-51481-6.

Sanyal, A.J., Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W.B., Contos, M.J., Sterling, R.K., Luketic, V.A., Shiffman, M.L. & Clore, J.N. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, 120(5): 1183-1192. doi: 10.1053/gast.2001.23256.

Schierwagen, R., Maybüchen, L., Zimmer, S., Hittatiya, K., Bäck, C., Klein, S., Uschner, F.E., Reul, W., Boor, P., Nickenig, G., Strassburg, C.P., Trautwein, C., Plat, J., Lütjohann, D., Sauerbruch, T., Tacke, F. & Trebicka, J. (2015). Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Scientific Reports*, 5: 12931. doi: 10.1038/srep12931.

Schönbeck, U., Sukhova, G.K., Gerdes, N. & Libby, P. (2002). TH2 Predominant Immune Responses Prevail in Human Abdominal Aortic Aneurysm. *The American Journal of Pathology*, 161(2): 499-506.

Schuster, S., Cabrera, D., Arrese, M. & Feldstein, A.E. (2018). Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 15(6): 349-364. doi: 10.1038/s41575-018-0009-6.

Schwartz, D.M., Kanno, Y., Villarino, A., Ward, M., Gadina, M. & O'Shea, J.J. (2017). JAK inhibition as a therapeutic strategy for immune and inflammatory diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 16(12): 843-862. doi: 10.1038/nrd.2017.201.

Sénémaud, J., Caligiuri, G., Etienne, H., Delbosc, S., Michel, J. & Coscas, R. (2017). Translational Relevance and Recent Advances of Animal Models of Abdominal Aortic Aneurysm. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(3): 401-410. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308534.

Serviddio, G., Giudetti, A.M., Bellanti, F., Priore, P., Rollo, T., Tamborra, R., Siculella, L., Vendemiale, G., Altomare, E. & Gnoni, G.V. (2011). Oxidation of hepatic carnitine palmitoyl transferase-I (CPT-I) impairs fatty acid beta-oxidation in rats fed a methionine-choline deficient diet. *PLoS One*, 6(9): e24084. doi: 10.1371/journal.pone.0024084.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T. & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9): 6425-6440. doi: 10.1002/jcp.26429.

Shi, S.Y., Martin, R.G., Duncan, R.E., Choi, D., Lu, S., Schroer, S.A., Cai, E.P., Luk, C.T., Hopperton, K.E., Domenichiello, A.F., Tang, C., Naples, M., Dekker, M.J., Giacca, A., Adeli, K., Wagner, K., Bazinet, R.P. & Woo, M. (2012). Hepatocyte-specific deletion of Janus kinase 2 (JAK2) protects against diet-induced steatohepatitis and glucose intolerance. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(13): 10277-10288. doi: 10.1074/jbc.M111.317453.

Shimizu, K., Shichiri, M., Libby, P., Lee, R.T. & Mitchell, R.N. (2004). Th2-predominant inflammation and blockade of IFN-gamma signaling induce aneurysms in allografted aortas. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(2): 300-308. doi: 10.1172/JCI19855.

Shiraya, S., Miwa, K., Aoki, M., Miyake, T., Oishi, M., Kataoka, K., Ohgi, S., Ogihara, T., Kaneda, Y. & Morishita, R. (2006). Hypertension accelerated experimental abdominal aortic aneurysm through upregulation of nuclear factor kappaB and Ets. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 48(4): 628-636. doi: 10.1161/01.HYP.0000240266.26185.57.

Shuai, K. & Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 3(11): 900-911. doi: 10.1038/nri1226.

Siu, K.L., Li, Q., Zhang, Y., Guo, J., Youn, J.Y., Du, J. & Cai, H. (2017). NOX isoforms in the development of abdominal aortic aneurysm. *Redox Biology*, 11: 118-125. doi: 10.1016/j.redox.2016.11.002.

Son, B., Sawaki, D., Tomida, S., Fujita, D., Aizawa, K., Aoki, H., Akishita, M., Manabe, I., Komuro, I., Friedman, S.L., Nagai, R. & Suzuki, T. (2015). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is required for aortic dissection/intramural haematoma. *Nature Communications*, 6: 6994. doi: 10.1038/ncomms7994.

Sookoian, S., Castañó, G., Gianotti, T.F., Gemma, C., Rosselli, M.S. & Pirola, C.J. (2008). Genetic variants in STAT3 are associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Cytokine*, 44(1): 201-206. doi: 10.1016/j.cyto.2008.08.001.

Stephenson, K., Kennedy, L., Hargrove, L., Demieville, J., Thomson, J., Alpini, G. & Francis, H. (2018). Updates on Dietary Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Current Studies and Insights. *Gene Expression*, 18(1): 5-17. doi: 10.3727/105221617X15093707969658.

Suchy, D., Łabuzek, K., Machnik, G., Kozłowski, M. & Okopień, B. (2013). SOCS and diabetes--ups and downs of a turbulent relationship. *Cell Biochemistry and Function*, 31(3): 181-195. doi: 10.1002/cbf.2940.

Sun, J., Sukhova, G.K., Yang, M., Wolters, P.J., MacFarlane, L.A., Libby, P., Sun, C., Zhang, Y., Liu, J., Ennis, T.L., Knispel, R., Xiong, W., Thompson, R.W., Baxter, B.T. & Shi, G. (2007). Mast cells modulate the pathogenesis of elastase-induced abdominal aortic aneurysms in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(11): 3359-3368. doi: 10.1172/JCI31311.

Sweeting, M.J., Thompson, S.G., Brown, L.C. & Powell, J.T. (2012). Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *The British Journal of Surgery*, 99(5): 655-665. doi: 10.1002/bjs.8707.

T Virtanen, A., Haikarainen, T., Raivola, J. & Silvennoinen, O. (2019). Selective JAKinibs: Prospects in Inflammatory and Autoimmune Diseases. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 33(1): 15-32. doi: 10.1007/s40259-019-00333-w.

Tacke, F. (2018). Cenicriviroc for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis and liver fibrosis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 27(3): 301-311. doi: 10.1080/13543784.2018.1442436.

Takahashi, Y., Soejima, Y. & Fukusato, T. (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 18(19): 2300-2308. doi: 10.3748/wjg.v18.i19.2300.

Tang, M., Chen, Y., Li, B., Sugimoto, H., Yang, S., Yang, C., LeBleu, V.S., McAndrews, K.M. & Kalluri, R. (2021). Therapeutic targeting of STAT3 with small interference RNAs and antisense oligonucleotides embedded exosomes in liver fibrosis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(5): e21557. doi: 10.1096/fj.202002777RR.

Theocharis, A.D., Skandalis, S.S., Gialeli, C. & Karamanos, N.K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97: 4-27. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001.

Toriguchi, K., Hatano, E., Tanabe, K., Takemoto, K., Nakamura, K., Koyama, Y., Seo, S., Taura, K. & Uemoto, S. (2014). Attenuation of steatohepatitis, fibrosis, and carcinogenesis in mice fed a methionine-choline deficient diet by CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein deficiency. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 29(5): 1109-1118. doi: 10.1111/jgh.12481.

Trengove, M.C. & Ward, A.C. (2013). SOCS proteins in development and disease. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*, 2(1): 1-29.

Ueki, K., Kadowaki, T. & Kahn, C.R. (2005). Role of suppressors of cytokine signaling SOCS-1 and SOCS-3 in hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 33(2): 185-192. doi: 10.1016/j.hepres.2005.09.032.

van den Borne, P., Quax, P.H.A., Hoefler, I.E. & Pasterkamp, G. (2014). The Multifaceted Functions of CXCL10 in Cardiovascular Disease. *BioMed Research International*, 2014: e893106. doi: 10.1155/2014/893106.

Vega de Céniga, M., Gómez, R., Estallo, L., de la Fuente, N., Vivien, B. & Barba, A. (2008). Analysis of Expansion Patterns in 4-4.9 cm Abdominal Aortic Aneurysms. *Annals of Vascular Surgery*, 22(1): 37-44. doi: 10.1016/j.avsg.2007.07.036.

Velázquez, K.T., Enos, R.T., Bader, J.E., Sougiannis, A.T., Carson, M.S., Chatzistamou, I., Carson, J.A., Nagarkatti, P.S., Nagarkatti, M. & Murphy, E.A. (2019). Prolonged high-fat-diet feeding promotes non-alcoholic fatty liver disease and alters gut microbiota in mice. *World Journal of Hepatology*, 11(8): 619-637. doi: 10.4254/wjh.v11.i8.619.

Villarino, A.V., Kanno, Y., Ferdinand, J.R. & O'Shea, J.J. (2015). Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 194(1): 21-27. doi: 10.4049/jimmunol.1401867.

Visse, R. & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*, 92(8): 827-839. doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.

Wang, H., Feng, X., Han, P., Lei, Y., Xia, Y., Tian, D. & Yan, W. (2019). The JAK inhibitor tofacitinib ameliorates immune-mediated liver injury in mice. *Molecular Medicine Reports*, 20(6): 4883-4892. doi: 10.3892/mmr.2019.10750.

Wang, N., Liang, H. & Zen, K. (2014). Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. *Frontiers in Immunology*, 5 doi: 10.3389/fimmu.2014.00614.

Wang, X. & Khalil, R.A. (2018). Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 81: 241-330. doi: 10.1016/bs.apha.2017.08.002.

Wang, Y., Liu, Z., Ren, J. & Xiang, M. (2018). Pharmacological Therapy of Abdominal Aortic Aneurysm: An Update. *Current Vascular Pharmacology*, 16(2): 114-124. doi: 10.2174/1570161115666170413145705.

Wang, Y., Cui, X., Chuang, Y. & Chen, S. (2017). Janus Kinase 3, a Novel Regulator for Smooth Muscle Proliferation and Vascular Remodeling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(7): 1352-1360. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308895.

Wanhainen, A., Verzini, F., van Herzelee, I., Allaire, E., Bown, M., Cohnert, T., Dick, F., van Herwaarden, J., Karkos, C., Koelemay, M., Kölbel, T., Loftus, I., Mani, K., Melissano, G., Powell, J., Szeberin, Z., ESVS Guidelines Committee, de Borst, G.J., Chakfe, N., Debus, S., Hinchliffe, R., Kakkos, S., Koncar, I., Kolh, P., Lindholdt, J., de Vega, M., Vermassen, F., Document reviewers, Björck, M., Cheng, S., Dalman, R., Davidovic, L., Donas, K., Earnshaw, J., Eckstein, H., Golledge, J., Haulon, S., Mastracci, T., Naylor, R., Ricco, J. & Verhagen, H. (2019). European Society for Vascular Surgery (ESVS) 2019 Clinical Practice Guidelines on the Management of Abdominal Aorto-iliac Artery Aneurysms. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, 57(1): 8-93.

Wei, Z., Wang, Y., Zhang, K., Liao, Y., Ye, P., Wu, J., Wang, Y., Li, F., Yao, Y., Zhou, Y. & Liu, J. (2014). Inhibiting the Th17/IL-17A-related inflammatory responses with digoxin confers protection against experimental abdominal aortic aneurysm. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(11): 2429-2438. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304435.

Whyte, C.S., Bishop, E.T., Rückerl, D., Gaspar-Pereira, S., Barker, R.N., Allen, J.E., Rees, A.J. & Wilson, H.M. (2011). Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(5): 845-854. doi: 10.1189/jlb.1110644.

Williams, K.H., Shackel, N.A., Gorrell, M.D., McLennan, S.V. & Twigg, S.M. (2013). Diabetes and nonalcoholic Fatty liver disease: a pathogenic duo. *Endocrine Reviews*, 34(1): 84-129. doi: 10.1210/er.2012-1009.

Wilson, C.G., Tran, J.L., Erion, D.M., Vera, N.B., Febbraio, M. & Weiss, E.J. (2016). Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice. *Endocrinology*, 157(2): 570-585. doi: 10.1210/en.2015-1866.

Wilson, H.M. (2014). SOCS Proteins in Macrophage Polarization and Function. *Frontiers in Immunology*, 5: 357. doi: 10.3389/fimmu.2014.00357.

Wilson, W.R.W., Anderton, M., Choke, E.C., Dawson, J., Loftus, I.M. & Thompson, M.M. (2008). Elevated plasma MMP1 and MMP9 are associated with abdominal aortic aneurysm rupture. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery*, 35(5): 580-584. doi: 10.1016/j.ejvs.2007.12.004.

Wu, Q., Cheng, Z., Zhou, Y., Zhao, Y., Li, J., Zhou, X., Peng, H., Zhang, G., Liao, X. & Fu, X. (2020). A novel STAT3 inhibitor attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm progression in mice through modulating vascular inflammation and autophagy. *Cell Death & Disease*, 11(2): 131. doi: 10.1038/s41419-020-2326-2.

Wunderlich, C.M., Hövelmeyer, N. & Wunderlich, F.T. (2013a). Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *Jak-Stat*, 2(2): e23878. doi: 10.4161/jkst.23878.

Wunderlich, C.M., Hövelmeyer, N. & Wunderlich, F.T. (2013b). Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *Jak-Stat*, 2(2): e23878. doi: 10.4161/jkst.23878.



- Xiao, J., Wei, Z., Chen, X., Chen, W., Zhang, H., Yang, C., Shang, Y. & Liu, J. (2020). Experimental abdominal aortic aneurysm growth is inhibited by blocking the JAK2/STAT3 pathway. *International Journal of Cardiology*, 312: 100-106. doi: 10.1016/j.ijcard.2020.03.072.
- Xin, P., Xu, X., Deng, C., Liu, S., Wang, Y., Zhou, X., Ma, H., Wei, D. & Sun, S. (2020). The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *International Immunopharmacology*, 80: 106210. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106210.
- Yan, D., Ma, H., Shi, W., Luo, P., Liu, T., Guo, J., Zhai, M., Tao, J., Huo, S., Li, C., Lin, J., Li, S., Lv, J., Zhang, C. & Lin, L. (2020). Bazedoxifene Attenuates Abdominal Aortic Aneurysm Formation via Downregulation of Interleukin-6/Glycoprotein 130/Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Signaling Pathway in Apolipoprotein E-Knockout Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 11: 392. doi: 10.3389/fphar.2020.00392.
- YANG, J., LIAO, X., AGARWAL, M.K., BARNES, L., AURON, P.E. & STARK, G.R. (2007). *Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFκB*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, ( Jun 1,) Available from: [https://explore.openaire.eu/search/publication?articleId=od\\_267::ea640d32d43d40c584d9f892d2ec2c2d](https://explore.openaire.eu/search/publication?articleId=od_267::ea640d32d43d40c584d9f892d2ec2c2d) doi: 10.1101/gad.1553707.
- Yang, J. & Stark, G.R. (2008). Roles of unphosphorylated STATs in signaling. *Cell Research*, 18(4): 443-451. doi: 10.1038/cr.2008.41.
- Yang, Y., Jiang, Y., Wang, Y. & An, W. (2010). Suppression of ABCA1 by unsaturated fatty acids leads to lipid accumulation in HepG2 cells. *Biochimie*, 92(8): 958-963. doi: 10.1016/j.biochi.2010.04.002.
- Yin, K., Liao, D. & Tang, C. (2010). ATP-Binding Membrane Cassette Transporter A1 (ABCA1): A Possible Link between Inflammation and Reverse Cholesterol Transport. *Molecular Medicine*, 16(9-10): 438-449. doi: 10.2119/molmed.2010.00004.
- Yoshida, T., Ogata, H., Kamio, M., Joo, A., Shiraishi, H., Tokunaga, Y., Sata, M., Nagai, H. & Yoshimura, A. (2004). SOCS1 is a suppressor of liver fibrosis and hepatitis-induced carcinogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(12): 1701-1707. doi: 10.1084/jem.20031675.
- Yoshimura, A., Naka, T. & Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Reviews. Immunology*, 7(6): 454-465. doi: 10.1038/nri2093.
- Yoshimura, K., Morikage, N., Nishino-Fujimoto, S., Furutani, A., Shirasawa, B. & Hamano, K. (2018). Current Status and Perspectives on Pharmacologic Therapy for Abdominal Aortic Aneurysm. *Current Drug Targets*, 19(11): 1265-1275. doi: 10.2174/1389450119666171227223331.
- Younossi, Z.M. (2019). Non-alcoholic fatty liver disease - A global public health perspective. *Journal of Hepatology*, 70(3): 531-544. doi: 10.1016/j.jhep.2018.10.033.

- Yu, Y., Li, X., Mi, J., Qu, L., Yang, D., Guo, J. & Qiu, L. (2018). Resveratrol Suppresses Matrix Metalloproteinase-2 Activation Induced by Lipopolysaccharide in Mouse Osteoblasts via Interactions with AMP-Activated Protein Kinase and Suppressor of Cytokine Signaling 1. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(9) doi: 10.3390/molecules23092327.
- Yunna, C., Mengru, H., Lei, W. & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, 877: 173090. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173090.
- Zambrano, B.A., Gharahi, H., Lim, C., Jaber, F.A., Choi, J., Lee, W. & Baek, S. (2016). Association of Intraluminal Thrombus, Hemodynamic Forces, and Abdominal Aortic Aneurysm Expansion Using Longitudinal CT Images. *Annals of Biomedical Engineering*, 44(5): 1502-1514. doi: 10.1007/s10439-015-1461-x.
- Zeng, X., Zhu, M., Liu, X., Chen, X., Yuan, Y., Li, L., Liu, J., Lu, Y., Cheng, J. & Chen, Y. (2020). Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. *Nutrition & Metabolism*, 17: 11. doi: 10.1186/s12986-020-0434-8.
- Zhang, H., Watanabe, R., Berry, G.J., Tian, L., Goronzy, J.J. & Weyand, C.M. (2018). Inhibition of JAK-STAT Signaling Suppresses Pathogenic Immune Responses in Medium and Large Vessel Vasculitis. *Circulation*, 137(18): 1934-1948. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030423.
- Zhang, J., Chen, H., Liu, L., Sun, J., Shi, M.A., Sukhova, G.K. & Shi, G. (2012). Chemokine (C-C motif) receptor 2 mediates mast cell migration to abdominal aortic aneurysm lesions in mice. *Cardiovascular Research*, 96(3): 543-551. doi: 10.1093/cvr/cvs262.
- Zhang, L. & Wang, Y. (2015). B lymphocytes in abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*, 242(1): 311-317. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.036.
- Zhang, Q., Lenardo, M.J. & Baltimore, D. (2017). 30 Years of NF- $\kappa$ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*, 168(1-2): 37-57. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.012.
- Zhang, Q., Guo, Y., Dong, R., Dai, R. & Zhou, M. (2015). Suppressor of cytokine signaling 1-modulated metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase in pulmonary fibrosis. *Molecular Medicine Reports*, 12(3): 3855-3861. doi: 10.3892/mmr.2015.3810.
- Zhang, Y., Murugesan, P., Huang, K. & Cai, H. (2020). NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. *Nature Reviews. Cardiology*, 17(3): 170-194. doi: 10.1038/s41569-019-0260-8.
- Zhao, J., Qi, Y. & Yu, Y. (2020). STAT3: A key regulator in liver fibrosis. *Annals of Hepatology*, 21: 100224. doi: 10.1016/j.aohep.2020.06.010.
- Zhao, L., Zhang, C., Luo, X., Wang, P., Zhou, W., Zhong, S., Xie, Y., Jiang, Y., Yang, P., Tang, R., Pan, Q., Hall, A.R., Luong, T.V., Fan, J., Varghese, Z., Moorhead, J.F., Pinzani, M., Chen, Y. & Ruan, X.Z. (2018). CD36 palmitoylation disrupts free fatty acid metabolism and promotes tissue

inflammation in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Hepatology*, 69(3): 705-717. doi: 10.1016/j.jhep.2018.04.006.


Zhao, Q., Zhou, D., You, H., Lou, B., Zhang, Y., Tian, Y., Guo, N., Chen, X., Liu, Y., Wu, Y., Yuan, Z. & Zhou, J. (2017). IFN- $\gamma$  aggravates neointimal hyperplasia by inducing endoplasmic reticulum stress and apoptosis in macrophages by promoting ubiquitin-dependent liver X receptor- $\alpha$  degradation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 31(12): 5321-5331. doi: 10.1096/fj.201700327R.

Zhou, D., Chen, L., Yang, K., Jiang, H., Xu, W. & Luan, J. (2017). SOCS molecules: the growing players in macrophage polarization and function. *Oncotarget*, 8(36): 60710-60722. doi: 10.18632/oncotarget.19940.

## **IX. Anexo**

## RESEARCH PAPER

# Protective effect of suppressor of cytokine signalling 1-based therapy in experimental abdominal aortic aneurysm

Susana Bernal<sup>1,2</sup> | Laura Lopez-Sanz<sup>1,2</sup> | Luna Jimenez-Castilla<sup>1,2</sup> |  
 Ignacio Prieto<sup>1,2</sup> | Ana Melgar<sup>1</sup> | Sara La Manna<sup>1</sup> | Jose Luis Martin-Ventura<sup>1,3</sup> |  
 Luis Miguel Blanco-Colio<sup>1,3</sup> | Jesus Egido<sup>1,2</sup> | Carmen Gomez-Guerrero<sup>1,2</sup> 

<sup>1</sup>Renal, Vascular and Diabetes Research Laboratory, IIS-Fundacion Jimenez Diaz (IIS-FJD), Autonoma University of Madrid (UAM), Madrid, Spain

<sup>2</sup>Spanish Biomedical Research Centre in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Madrid, Spain

<sup>3</sup>Spanish Biomedical Research Centre in Cardiovascular Diseases (CIBERCV), Madrid, Spain

## Correspondence

Carmen Gomez-Guerrero, Renal, Vascular and Diabetes Research Laboratory, IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Autonoma University of Madrid, Avda. Reyes Catolicos, 2. 28040 Madrid, Spain.

Email: cgomez@fjd.es; c.gomez@uam.es

## Funding information

Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO-FEDER), Grant/Award Number: SAF2015-63696-R; Ministry of Science and Innovation (MICINN-FEDER), Grant/Award Number: RTI2018-098788-B-I00; Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-FIS-FEDER), Grant/Award Numbers: DTS-2017/00203, PI17/01495, PI19/00128; Comunidad de Madrid: Complemento II-CM S2017/BMD-3673; La Caixa Foundation, Grant/Award Number: HR17-00247; Spanish Society of Arteriosclerosis

**Background and Purpose:** Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a multifactorial disease characterized by chronic inflammation, oxidative stress and proteolytic activity in the aortic wall. Targeting JAK/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathway is a promising strategy for chronic inflammatory diseases. We investigated the vasculo-protective role of suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS1), the negative JAK/STAT regulator, in experimental AAA.

**Experimental Approach:** A synthetic, cell permeable peptide (S1) mimic of SOCS1 kinase inhibitory domain to suppress STAT activation was evaluated in the well-established mouse model of elastase-induced AAA by monitoring changes in aortic diameter, cellular composition and gene expression in abdominal aorta. S1 function was further evaluated in cultured vascular smooth muscle cells (VSMC) and macrophages exposed to elastase or elastin-derived peptides.

**Key Results:** S1 peptide prevented AAA development, evidenced by reduced incidence of AAA, aortic dilation and elastin degradation, partial restoration of medial VSMC and decreased inflammatory cells and oxidative stress in AAA tissue. Mechanistically, S1 suppressed STAT1/3 activation in aorta, down-regulated cytokines, metalloproteinases and altered the expression of cell differentiation markers by favouring anti-inflammatory M2 macrophage and contractile VSMC phenotypes. *In vitro*, S1 suppressed the expression of inflammatory and oxidative genes, reduced cell migration and reversed the phenotypic switch of macrophages and VSMC. By contrast, SOCS1 silencing promoted inflammatory response.

**Conclusion and Implications:** This preclinical study demonstrates the therapeutic potential of SOCS1-derived peptide to halt AAA progression by suppressing JAK/STAT-mediated inflammation and aortic dilation. S1 peptide may therefore be a valuable option for the treatment of AAA.

**Abbreviations:** AAA, abdominal aortic aneurysm; ACTA2, actin  $\alpha$  2; Acta2, actin- $\alpha$ 2; Arg, arginase; CD206, macrophage mannose receptor 1 gene; CCL, C-C motif chemokine ligand; CXCL, C-X-C motif chemokine ligand; EDP, elastin-derived peptide; iNOS, inducible NO synthase; KIR, kinase inhibitory region; MMP, metalloproteinase; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide tetrazolium; SM22 $\alpha$ , smooth muscle protein 22- $\alpha$ ; SOCS, suppressor of cytokine signalling; S1, SOCS1 mimetic peptide; STAT, signal transducer and activator of transcription; VSMC, vascular smooth muscle cells; 8OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine.

Susana Bernal and Laura Lopez-Sanz contributed equally to this work.

**KEYWORDS**

abdominal aortic aneurysm, inflammation, JAK/STAT signalling, oxidative stress, peptidomimetic, SOCS1, vascular biology

**1 | INTRODUCTION**

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a chronic vascular disorder characterized by transmural aortic wall degeneration between the diaphragm and iliac bifurcation, leading to progressive dilation and weakening of the abdominal aorta. Although generally asymptomatic, AAA progression over time increases the risk of rupture causing acute haemorrhage and high mortality when surgical treatment is unsuitable (Quintana & Taylor, 2019). Therapeutic strategy for patients with AAA is limited to open or endovascular surgical therapy of large AAA (>5.5 cm in diameter) which is not applicable for small AAA (Chaikof et al., 2018). The current lack of effective pharmacotherapies for AAA (Yoshimura et al., 2018) underlies the huge need for translational, mechanism-driven research aimed at therapeutic targets to halt the growth and rupture of AAA or to delay surgical repair.

Pathological mechanisms of AAA development include protease-mediated degradation of extracellular matrix components (e.g. collagen and elastin fibres), dysfunction of vascular smooth muscle cells (VSMC), enhanced leukocyte infiltration, mechanical stress and ROS production in the vessel wall (Quintana & Taylor, 2019; Wiernicki et al., 2019). Chronic inflammation is an important feature of AAA, with the presence of T and B lymphocytes, neutrophils and monocytes/macrophages in the wall of aneurysmal tissue (Raffort et al., 2017). During vascular remodelling, inflammatory cells secrete extracellular matrix degrading enzymes such as **MMP 2, 3 and 9** that results in progressive destruction of structural proteins and eventual rupture of the vessel (Longo et al., 2002). The secretion of proinflammatory cytokines (e.g. **IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$** , TNF-like weak inducer of apoptosis and **IFN- $\gamma$** ) and chemokines (e.g. C-C motif chemokine ligand [CCL] 2 and 5) from infiltrating or resident cells also contributes to vascular inflammation and aortic damage (Ijaz, Tilton, & Brasier, 2016; Tarin et al., 2014; Wiernicki et al., 2019).

Several researchers have investigated the gene expression profile of human and experimental AAA and identified multiple genes and pathways involved in the pathogenesis of AAA (Ohno et al., 2018). Among them, cytokine-cytokine receptor interaction has been shown to induce a complex network of inflammatory signalling pathways, including NF- $\kappa$ B, MAPK and the **JAK/STAT** (Luo, Zhao, Li, & Zhang, 2013). Overactivation of these pathways in aneurysmal tissue promotes phenotypic changes of T lymphocytes, macrophages and VSMC and up-regulates the expression of genes involved in extracellular matrix degradation, oxidative stress and cell migration, further exacerbating inflammation and tissue injury (Ohno et al., 2018; Prucha et al., 2019).

Cytokine signalling depending on the JAK/STAT pathway regulates the expression of many genes involved in activation, differentiation, migration, apoptosis and proliferation and is a major contributor

**What is already known**

- There is no established pharmacotherapy preventing abdominal aortic aneurysm (AAA) progression and delaying surgical intervention.
- JAK/STAT participates in vascular inflammation; hence, targeting this pathway could have implications for AAA treatment.

**What this study adds**

- S1, a peptide derived from SOCS1 regulatory protein, exerts significant vasculo-protective effects in experimental AAA.
- S1 treatment prevents aortic dilation in mice by reducing inflammation, oxidative stress and cell differentiation.

**What is the clinical significance**

- This preclinical study indicates that JAK/STAT inhibition hinders the development and progression of AAA.
- SOCS1-derived peptide may offer therapeutic intervention opportunities to be explored in human AAA.

to chronic inflammatory diseases (Kiu & Nicholson, 2012). Four kinases (JAK1–3 and TYK2) and seven transcription factors (STAT1–4, 5A, 5B and 6) compose the JAK/STAT family, which are controlled in a classical negative-feedback loop by the suppressors of cytokine signalling (SOCS) family (SOCS1–7 and CIS) (Morris, Kershaw, & Babon, 2018). JAK/STAT pathway is a critical regulator of inflammatory processes in various cells of the cardiovascular system, including endothelial cells, VSMC and inflammatory cells (Luo, Zhao, Li, & Zhang, 2013; Ortiz-Munoz et al., 2009). Moreover, clinical and experimental evidence implicates enhanced expression/activation of JAK/STAT members and regulated genes in AAA (Eagleton et al., 2010; Harrison et al., 2013; Ijaz, Tilton, & Brasier, 2016; Ohno et al., 2018; L. Qin et al., 2014). Because JAK/STAT/SOCS axis may offer therapeutic intervention opportunities to be explored in cardiovascular diseases (Liang et al., 2013), this work investigates whether a SOCS1-based therapy limits AAA development. To that end, the effects of a cell-permeable peptide spanning the kinase inhibitory region (KIR) of SOCS1 protein to disrupt JAK/STAT activation were analysed in elastase perfusion-induced AAA in mice, an experimental

model with multiple similarities to human aneurysm including medial elastin degradation and adventitial inflammatory cell infiltration (Sénémaud et al., 2017). *In vivo* studies are complemented by mechanistic studies in VSMC and macrophages stimulated with elastase and elastin fragments.

## 2 | METHODS

### 2.1 | Experimental model of abdominal aortic aneurysm (AAA)

All the procedures carried out in this study were performed under the principle for replacement, refinement, or reduction (the 3Rs) and in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of IIS-Fundacion Jimenez Diaz and Comunidad de Madrid (PROEX 116/16 and 217/19). C57BL/6J mice (*Mus musculus*, males, 10–12 weeks old, 23–28 g body weight; Charles River Laboratories, France) were housed in ventilated cages (two to four mice per cage) with usual bedding material and environmental enrichment in a conventional temperature-controlled room (20–22°C) with 12 h light/dark cycle and free access to water and standard food. Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al., 2020) and with the recommendations made by the *British Journal of Pharmacology* (Lilley et al., 2020).

In these studies, we developed the murine elastase model of AAA, which is a well-established and useful approach for characterizing the early events in AAA formation (Sénémaud et al., 2017; Yoshimura et al., 2018). AAA was induced in the infrarenal abdominal aorta of mice by intra-aortic perfusion of porcine pancreatic **elastase type I** (specific activity 7 U·mg<sup>-1</sup> protein; E1250; Sigma Chemical Co), as described previously (Fernandez-Garcia et al., 2017; Tarin et al., 2014). Briefly, mice were anaesthetized by 2% isoflurane (Piramal Healthcare) inhalational anaesthesia and a horizontal laparotomy was performed. Using a surgical stereomicroscope, the abdominal aorta was separated from the level of the left renal vein to the bifurcation and temporarily ligated between the renal and iliac arteries. An aortotomy was created with a 30-gauge needle and the aorta was exsanguinated. A PE-26 polyethylene tube (World Precision Instruments) was introduced through the aortotomy and the aorta was infused for 5 min at 100 mmHg with saline or elastase solution. Aortotomy was then repaired and ligation was eliminated, restoration of blood flow was visually confirmed. After suturing, mice received postoperative thermal support and then housed under standard conditions.

Mice were randomly distributed into three groups: (1) Sham operation (saline perfusion); (2) AAA control (elastase perfusion and vehicle administration, 0.1% DMSO) and (3) AAA plus S1 peptide treatment (elastase perfusion and SOCS1-derived peptide administration, 4 mg·kg<sup>-1</sup> body weight, intraperitoneal, 3 days·week<sup>-1</sup>). S1 peptide derived from mouse SOCS1 KIR domain (53-DTHFRTRFSHSDYRRI-68) (Recio et al., 2014; Recio et al., 2017) was synthesized, palmitoylated at N-terminal and labelled with rhodamine

(ProteoGenix), then dissolved in 1% DMSO in saline solution, filter-sterilized and stored at –80°C before use. Treatments were started 1 day before the operation. On Day 14 post-surgery, mice were anaesthetized with ketamine 100 mg·kg<sup>-1</sup> (Pfizer) and xylazine 10 mg·kg<sup>-1</sup> (Bayer), killed and blood and tissue samples were then collected. The type and number of aortic samples processed were: for histology (abdominal aorta: sham, *n* = 10; control, *n* = 12; S1, *n* = 12), for mRNA expression (abdominal aorta: sham, *n* = 9; abdominal and thoracic aorta: control, *n* = 10; S1, *n* = 9) and for protein expression (abdominal aorta: control, *n* = 6; S1, *n* = 6).

For biodistribution experiments, on Day 7 after elastase perfusion, mice received a single intraperitoneal injection of rhodamine-labelled SOCS1 peptide or vehicle (*n* = 3). At 3, 6, 18 and 24 h post-injection, mice were anaesthetized with isoflurane and observed at room temperature by an *in vivo* imaging system (IVIS-Lumina; Calliper Life Sciences Inc., Hopkinton, MA) coupled with Living Image software (Xenogen Corporation, Alameda, CA). A heating pad was used to prevent hypothermia during recovery. At the end of the study, mice were euthanized by overdose of ketamine:xylazine and the organs (liver, spleen, kidney, heart and aorta) were dissected and immediately recorded for *ex vivo* imaging analysis.

### 2.2 | Histological and immunohistochemical analysis

At the time of harvest, aortic samples were fixed in 10% buffered formalin and processed using routine paraffin embedding. Aortic tissue cross-sections (3–4 μm) were deparaffinized, rehydrated and stained with Masson's trichrome (Bio Optica) and Verhoeff-van Gieson (Sigma-Aldrich). Changes in aortic diameter were calculated as percentage of dilation over baseline at day 14. For immunohistochemistry, aortic tissue sections were deparaffinized and rehydrated through graded xylene and ethanol. After antigen retrieval (0.01 M citrate buffer pH 6 for 20 min) and blockade of endogenous peroxidase (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 30 min) and nonspecific binding (8% host serum for 30 min), slides were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against phosphorylated STAT1 (p-STAT1; Thermo Fisher Scientific Cat# 44-376G, RRID:AB\_2533642), p-STAT3 (Cell Signaling Technology Cat# 9134, RRID:AB\_331589), calponin (Abcam Cat# ab46794, RRID:AB\_2291941), F4/80 (Bio-Rad Cat# MCA497R, RRID:AB\_323279), CD68 (Abcam Cat# ab53444, RRID:AB\_869007), Ly6G (BioLegend Cat# 108402, RRID:AB\_313367), CD3 (Agilent Cat# A0452, RRID:AB\_2335677), CD45R (BD Biosciences Cat# 550286, RRID:AB\_393581) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG; Abcam Cat# ab10802, RRID:AB\_297482). After rinsing in PBS, samples were incubated with biotinylated secondary antibodies, followed by avidin-biotin complex reagent (Vector Laboratories). Immunoreactive cells were then visualized by the addition of peroxidase substrates (3,3-diaminobenzidine or 3-amino-9-ethylcarbazole; DAKO) and counterstained with haematoxylin. VSMC content was also analysed by direct immunofluorescence with α-smooth muscle actin (α-SMA) antibody (Agilent Cat# M0851, RRID:AB\_2223500).

Intracellular superoxide anion was assessed by microscopy using the sensitive fluorescent dye dihydroethidium (DHE; 2–5  $\mu\text{M}$  Molecular Probes) (Lopez-Sanz et al., 2018). All the histological evaluations were conducted in a blinded fashion. Elastin fragmentation and VSMC content in the media were graded (score 0–4) as previously described (Fernandez-Garcia et al., 2017; Tarin et al., 2014). Positive staining was quantified in at least two sections per mice using Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Bethesda, MD) and expressed as percentage or number of positive cells per lesion area.

## 2.3 | Cell cultures

Primary VSMC were isolated from mouse aorta by enzymatic digestion with collagenase type II (C6885, Sigma-Aldrich), cultured in DMEM (D6546, Sigma-Aldrich) containing 10% FBS, 100  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$  penicillin, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  streptomycin and 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich) and used between second to eighth passages as previously reported (Ortiz-Munoz et al., 2009; Recio et al., 2015). Mouse VSMC line MOVAS-1 (ATCC Cat# CRL-2797, RRID:CVCL\_0F08) was maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, antibiotics, L-glutamine and 0.2  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  G-418 disulfate salt solution (Sigma-Aldrich). Mouse macrophage cell line RAW 264.7 (ATCC Cat# TIB-71, RRID:CVCL\_0493) was maintained in DMEM with 10% FBS. Murine bone marrow-derived macrophages (BMDM) were obtained after 7 days in DMEM containing 10% FBS and 20% L929 cell-conditioned medium as a source of macrophage colony stimulating factor (Mallavia et al., 2013). Cells were made quiescent by 24 h incubation in medium with 0.5% FBS, then treated with S1 peptide (150  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) for 90 min before stimulation with elastase (0.7–5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), elastin-derived hexapeptide VGVAPG or scramble control peptide VVGPGA (0.1–10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; Proteogenix) for additional 6–24 h. Cell viability was performed in 96-well plates (7.5–10 $\times$ 10<sup>3</sup> cells/well) by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide tetrazolium (MTT, Sigma-Aldrich) assay using medium with 10% FBS as positive control. Quadruplicate absorbance values at 570 nm were used to calculate the percentage of cell viability versus basal conditions.

For gene silencing experiments, VSMC at 60–80% confluency in 6-well plates were transfected in Opti-MEM medium (Gibco) with 20–30 nmol of SOCS1 Silencer Select siRNA (siRNA) (Thermo Fisher Scientific Cat# s63995) or Silencer Select Negative Control siRNA (Thermo Fisher Scientific Cat#4390843) using 4  $\mu\text{l}$ /well of Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific Cat#13778075). Twenty-four hours after transfection, cells were incubated with elastase for additional 24 h and then processed for western blot and real-time PCR analysis.

## 2.4 | Real time PCR analysis

Total mRNA from mouse aorta and cultured cells were extracted using TRI Reagent (Molecular Research Center). cDNA was produced via reverse transcription using High Capacity cDNA Reverse Transcription

Kit (Applied Biosystems). The gene expression of mouse *Socs1*, *Socs3*, *Stat1*, *Stat3*, *Ccl2*, *Ccl5*, *Ifn $\gamma$* , *Tnfa*, *Il-10*, *Il-17*, intercellular adhesion molecule-1 (*Icam1*), arginase 1 (*Arg1*) and 2 (*Arg2*), **iNOS**, macrophage mannose receptor-1 (*Cd206*), Krueppel-like factor-4 (*Klf4*), actin- $\alpha$ 2 (*Acta2*), smooth muscle protein 22- $\alpha$  (*Sm22 $\alpha$* ), *Mmp2*, *Mmp9*, **tissue inhibitor of metalloproteinase 1** (*Timp1*) and 2 (*Timp2*), **C-X-C motif chemokine ligand 10** (*Cxcl10*) and NADPH oxidase subunits (*Nox1* and *Nox2*) was determined in duplicate by quantitative real-time PCR using commercial primers (Thermo Fisher) and Premix Ex Taq (Takara). The results for each sample were normalized to the 18S housekeeping expression and data are expressed in arbitrary units (*in vivo* studies) or converted to fold increases versus basal conditions (*in vitro* studies). The online database STRING (<http://string-db.org>) was used to construct the protein–protein interaction network for the genes analysed.

## 2.5 | Protein expression analysis

Cells were lysed in 10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl containing 1% Triton X-100, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM NaF, 0.2 mM PMSF and protease inhibitor cocktail. Total proteins (20  $\mu\text{g}$ ) were electrophoresed and immunoblotted for p-STAT1 (Innovative Research Cat# 33–3,400, RRID:AB\_87095), p-STAT3 (Cell Signaling Technology Cat# 9134, RRID:AB\_331589), STAT1 (Cell Signaling Technology Cat# 9172, RRID:AB\_2198300), STAT3 (Cell Signaling Technology Cat# 9139, RRID:AB\_331757) and  $\beta$ -tubulin (Sigma-Aldrich Cat# T5168, RRID:AB\_477579). Densitometric data were normalized to loading control and expressed in arbitrary units (*in vivo* studies) or converted to fold increases versus basal conditions (*in vitro* studies). CCL2 chemokine levels in cell supernatants were determined in duplicate by ELISA (DuoSet kit R&D Systems).

## 2.6 | Gelatin zymography for metalloproteinases

The metalloproteinase detection in mouse sera and cell supernatants was assessed by gel-based gelatin zymography. The cell culture supernatants were collected, centrifuged for removing debris and concentrated four to six times with a 10 kDa microcon ultrafiltration device (Millipore). Equal amounts of either mouse serum samples or cell supernatants were mixed with sample buffer and electrophoresed onto 10% SDS-PAGE gels containing 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  gelatin (Novex Zymogram Plus Gels, ThermoFisher Scientific). After electrophoresis, the gels were rinsed three times for 30 min with washing buffer containing 2.5% Triton X-100, 30 min with  $\text{H}_2\text{O}$  and then incubated at 37°C overnight in 50 mM Tris–HCl pH 7.5 containing 200 mM NaCl and 100 mM  $\text{CaCl}_2$ . The gels were stained with 0.5% Coomassie brilliant blue R-250 solution containing 10% acetic acid and 20% methanol for 30 min. Areas of gelatinase activity were visualized as clear bands against a blue background. Densitometry values of active metalloproteinase bands were converted to fold changes versus sham group (*in vivo* studies) or basal conditions (*in vitro* studies) for representation.



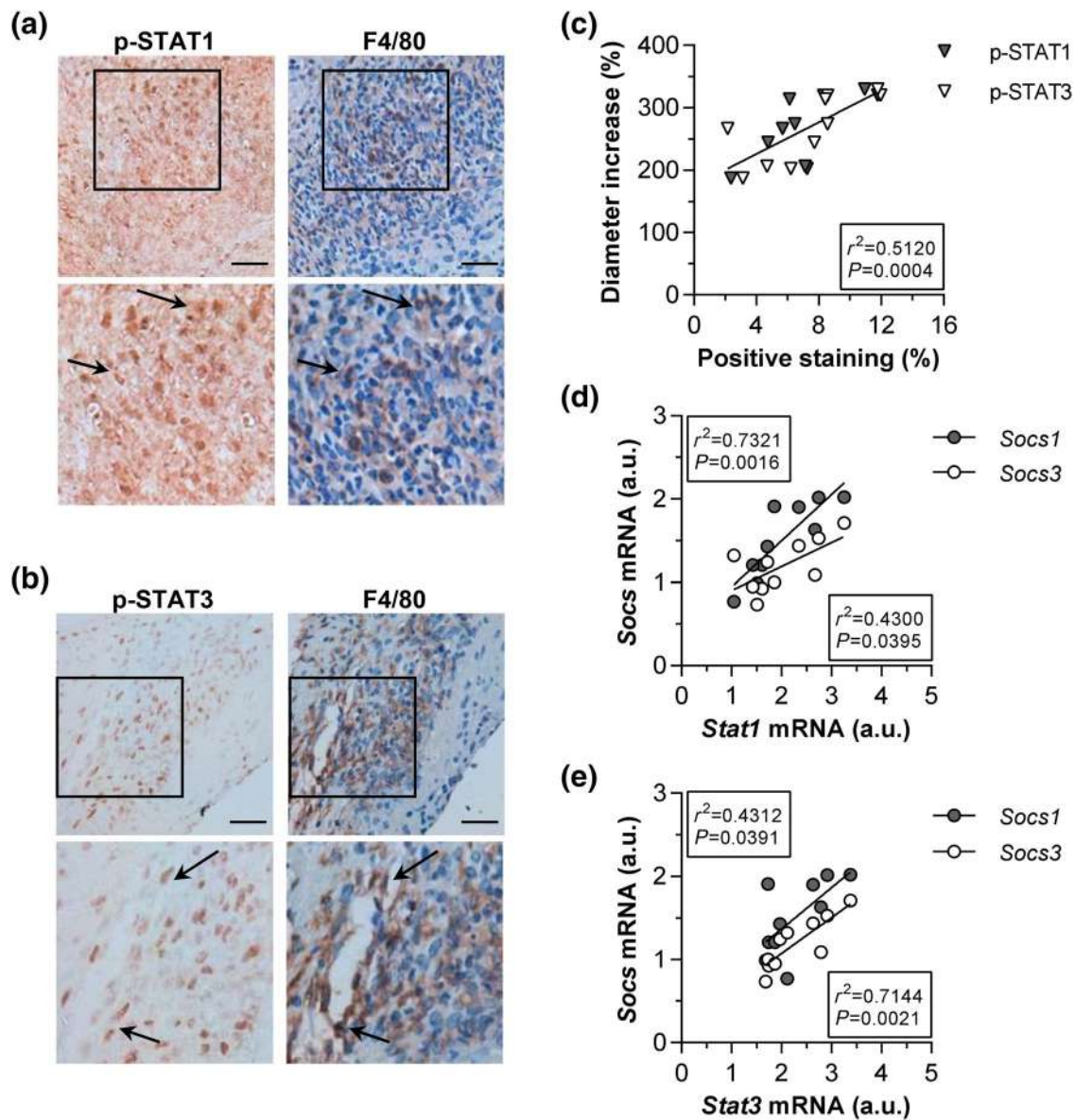
## 2.7 | *In vitro* wound healing assay

VSMC migration was measured by the wound healing assay as previously described (Recio et al., 2014). Briefly, cell monolayers of MOVAS-1 cell line on 12-well multiplates were cultured until 90–95% confluence and then scratches were applied using a sterile 200- $\mu$ l pipette tip. After washing in PBS, the initial wounds were examined under phase contrast microscope (Nikon). Then, cells were incubated for 0–30 h in medium containing elastase in the presence or absence of S1 peptide and images were collected during the healing period.

Wound closure areas were measured in quadruplicate and expressed as percentages relative to time 0 values.

## 2.8 | Data and statistical analysis

The data and statistical analysis comply with the recommendations of the British Journal of Pharmacology on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2018). Results are presented as individual data and mean  $\pm$  SEM from separate animals and cell



**FIGURE 1** JAK/STAT pathway activation in experimental AAA. (a, b) Immunohistochemical detection of p-STAT1 (a) and p-STAT3 (b) and colocalization with macrophages (F4/80) in aortic sections from the elastase-induced AAA mouse model. Shown are representative images (scale bars, 50  $\mu$ m) and expanded views of the rectangular areas. Arrows indicate positive cells. (c) Pearson's correlation analysis of p-STAT1 and p-STAT3 positive immunostaining (expressed as percentage of total area) with the aortic diameter increment in AAA lesions. Positive correlation of *Socs1/3* expression levels with *Stat1* (d) and *Stat3* (e) in aortic tissue from AAA model ( $n = 10$  mice). Real-time PCR values normalized to 18S rRNA are expressed as arbitrary units (a.u.). Pearson's  $r$  and  $P$  values for the correlations are given within the figures

experiments. In all the analysis, technical replicates were averaged to provide a single value per each biological replicate. Statistical analyses were performed using GraphPad v.5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Sample sizes subjected to statistical analysis included at least 5 animals per group or independent *in vitro* experiments ( $n = 5$ ), where  $n$  = number of independent values. Data passed the D'Agostino and Pearson omnibus normality test and were tested for homogeneity of variance with the Bartlett test. Pearson's correlation analysis was performed for normally distributed parameters. The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$  using two-tailed *t*-test, one-way ANOVA with Bonferroni pairwise comparison test or two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. The post hoc tests were conducted only if *F* in ANOVA achieved  $P < 0.05$  and there was no significant variance in homogeneity. Results expressed as fold changes versus sham or basal conditions to avoid unwanted sources of variation were subjected to non-parametric Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test with by Dunn's multiple comparisons test.

## 2.9 | Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY <http://www.guidetopharmacology.org> and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2019/20 (Alexander et al., 2019).

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Activation of JAK/STAT/SOCS axis in experimental (abdominal aortic aneurysm) AAA correlates with aneurysm size

To investigate a direct interaction between JAK/STAT pathway and experimental AAA formation, we performed immunohistochemical analysis and quantitative real-time PCR in abdominal aortic samples from elastase-induced AAA mouse model. The results showed a strong activation/phosphorylation of STAT1 (p-STAT1; Figure 1a) and p-STAT3 (Figure 1b) in AAA lesions colocalizing with F4/80<sup>+</sup> macrophages. There was a positive linear correlation of p-STAT1/3 levels with aneurysm diameter increase (Figure 1c). In addition, and compared with sham operated animals, we found an increased mRNA expression of STAT1 (3.2-fold), STAT3 (5.3-fold), SOCS1 (3.1-fold) and SOCS3 (2.5-fold) in abdominal aorta from elastase-perfused mice and a significant positive correlation between STATs and SOCSs expression levels (Figure 1d,e). Pearson's correlation analyses further confirmed that the levels of STAT expression and activation are closely related to different measured parameters in AAA lesion, such as inflammatory cell and VSMC content, oxidative stress markers and gene expression of chemokines, along with cytokines and metalloproteinases (Table 1).

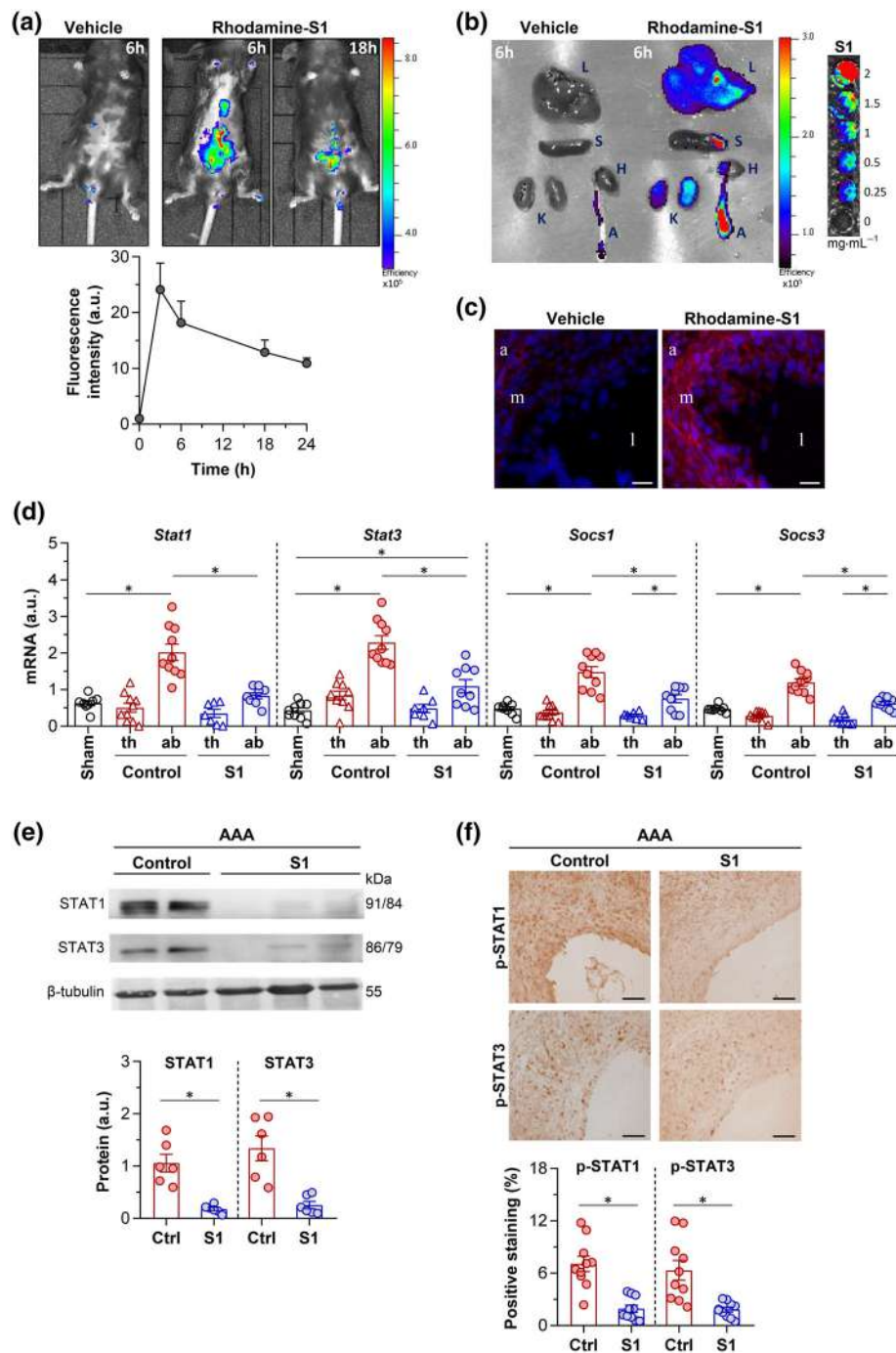
**TABLE 1** Correlations of STAT phosphorylation and mRNA expression levels with histological markers and gene expression in abdominal aortic aneurysm (AAA) tissue

1. Histological analysis		
Marker	p-STAT1 staining	p-STAT3 staining
α-SMA content	0.5886 ( $P = 0.0063$ )	0.6449 ( $P = 0.0021$ )
Elastin degradation	0.3518 (ns)	0.3571 (ns)
CD68 <sup>+</sup> macrophages	0.5758 ( $P = 0.0079$ )	0.6648 ( $P = 0.0014$ )
Ly6G <sup>+</sup> neutrophils	0.7054 ( $P = 0.0005$ )	0.6552 ( $P = 0.0017$ )
CD3 <sup>+</sup> T-lymphocytes	0.6851 ( $P = 0.0034$ )	0.6966 ( $P = 0.0027$ )
CD45R <sup>+</sup> B-cells	0.8385 ( $P < 0.0001$ )	0.8467 ( $P < 0.0001$ )
DHE	0.6527 ( $P = 0.0061$ )	0.7073 ( $P = 0.0022$ )
8OHdG	0.6932 ( $P = 0.0029$ )	0.6964 ( $P = 0.0027$ )
2. Real-time PCR analysis		
Gene	Stat1	Stat3
<i>Ccl2</i>	0.6180 ( $P = 0.0048$ )	0.7891 ( $P < 0.0001$ )
<i>Ccl5</i>	0.5425 ( $P = 0.0164$ )	0.5441 ( $P = 0.016$ )
<i>Ifnγ</i>	0.5728 ( $P = 0.0104$ )	0.6454 ( $P = 0.0028$ )
<i>Tnfa</i>	0.6902 ( $P = 0.0011$ )	0.4376 (ns)
<i>Mmp2</i>	0.5001 ( $P = 0.0292$ )	0.6503 ( $P = 0.0026$ )
<i>Mmp9</i>	0.6178 ( $P = 0.0048$ )	0.6593 ( $P = 0.0021$ )
<i>Il-10</i>	-0.382 (ns)	-0.2997 (ns)
<i>Il-17</i>	0.4762 ( $P = 0.0393$ )	0.6005 ( $P = 0.0066$ )
<i>Icam1</i>	0.5976 ( $P = 0.0069$ )	0.613 ( $P = 0.0053$ )

Note: Pearson's correlation coefficient *r* (and *P* values) in the elastase-induced mouse model ( $n = 10$  animals). ns, non-significant.

### 3.2 | SOCS1-derived peptide inhibits JAK/STAT and protects mice from elastase-induced AAA formation

We next examined the therapeutic effect of S1 peptide, when administered to elastase-injured mice. This synthetic, cell-penetrating peptide derives from the KIR domain of SOCS1 that specifically binds to JAK autophosphorylation site and inhibits JAK1/2 and TYK2 kinase activity (Jager et al., 2011). In previous studies, we have determined the structure, pharmacokinetic parameters and effectiveness of S1 in different models (Opazo-Rios et al., 2020; Recio et al., 2014; Recio et al., 2017). The macroscopic biodistribution of fluorescent S1 peptide in elastase-infused mice was evaluated by both *in vivo* and *ex vivo* imaging system. Results show effective fluorescence accumulation in mouse tissues in addition to the injury site of the abdominal aorta, whereas no signal was observed in mice receiving vehicle (Figure 2a-c). At the end of the treatment period, the increments in the mRNA expression of STAT1/3 and SOCS1/3 (Figure 2d) observed in the abdominal aorta, compared with the thoracic aorta of elastase-perfused mice, were all significantly decreased by S1 peptide treatment. Furthermore, significant reductions in STAT1/3 protein expression (Figure 2e) and phosphorylation (Figure 2f) were detected in AAA lesions from mice receiving S1 peptide compared to vehicle control group.

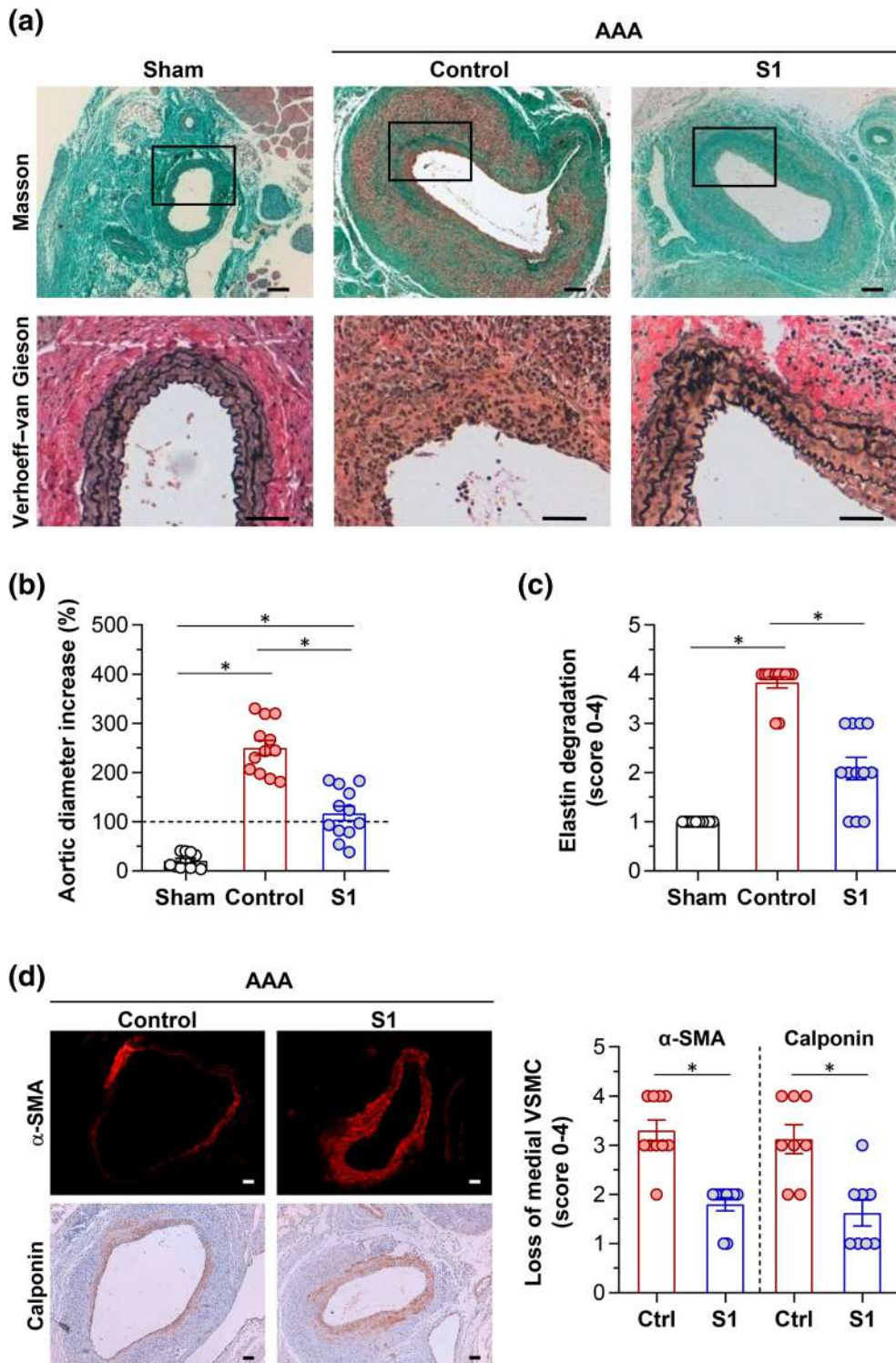


**FIGURE 2** *In vivo* targeting of JAK/STAT pathway in experimental AAA. (a–c) Biodistribution of S1 peptide in the AAA mouse model. Seven days after elastase perfusion, rhodamine labelled S1 peptide was injected intraperitoneally and allowed to target for 3, 6, 18 and 24 h. (a) Representative *in vivo* IVIS images of whole mouse after S1 injection (6 and 18 h) and summary of relative fluorescence intensities along the time ( $n = 3$  animals). Statistical analysis was not performed on these data. (b) *ex vivo* imaging of mouse tissues at 6 h of S1 injection and *in vitro* fluorescence signal of serial dilutions of peptide in 96-well plates. (c) Representative confocal images (scale bar, 25  $\mu\text{m}$ ) showing distribution of fluorescent S1 peptide in abdominal aortic sections at 6 h post-injection. The orientation of aorta is described by l, lumen; m, media; a, adventitia. (d) Quantitative real-time PCR analysis of STAT1/3 and SOCS1/3 mRNA expression in thoracic (th) and abdominal (ab) aortic tissue from elastase-perfused mice (Control,  $n = 10$ ; S1,  $n = 9$ ), using abdominal aorta from saline-perfused mice (sham,  $n = 8$ ) as reference group. PCR values normalized to 18S rRNA are expressed as arbitrary units (a.u.). (e) Western blot analysis of STAT1/3 proteins and  $\beta$ -tubulin (loading control) in mouse abdominal aorta from elastase-perfused mice after 14 days of treatment with either vehicle (control; Ctrl,  $n = 6$ ) or SOCS1-derived peptide (S1,  $n = 6$ ). Representative blots and summary of normalized quantification expressed in arbitrary units (a.u.) are shown. (f) Immunodetection of p-STAT1/3 proteins in AAA tissue sections from control (Ctrl,  $n = 10$ ) and SOCS1-treated mice (S1,  $n = 10$ ). Shown are representative images (scale bar, 50  $\mu\text{m}$ ) and the quantification of positive staining. Results in d–f are presented as individual data points and mean  $\pm$  SEM of total number of animals per group. \* $P < 0.05$  according to one-way ANOVA plus Bonferroni (d) and two-tailed Student's *t*-test (e and f). Abbreviations: A, aorta; K, kidney; H, heart; L, liver; S, spleen



Fourteen days after elastase perfusion, histological examination of mouse abdominal segments revealed severe dilation in the aortic lumen compared with sham operated animals (Figure 3a). Remarkably, the incidence of AAA (defined as an increase of 100% over the initial aortic diameter) was substantially reduced in mice treated with S1 peptide compared with control AAA mice receiving vehicle (incidence rate: control (12/12) 100%; S1 (6/12) 50%). S1 treatment also significantly decreased the maximal aortic dilation (diameter increase, %

versus control:  $47 \pm 6$ ; Figure 3b). Aneurysm rupture was not observed in the experimental groups (control and S1). In addition, Verhoeff-van Gieson staining showed that the elastin fibres were less disrupted in the S1-treated mice compared with the control group (Figure 3a,c). Moreover, AAA lesions from S1-treated mice exhibited improved preservation of medial VSMC content, as evidenced by immunodetection of contractile proteins  $\alpha$ -SMA and calponin in aortic sections (Figure 3d).

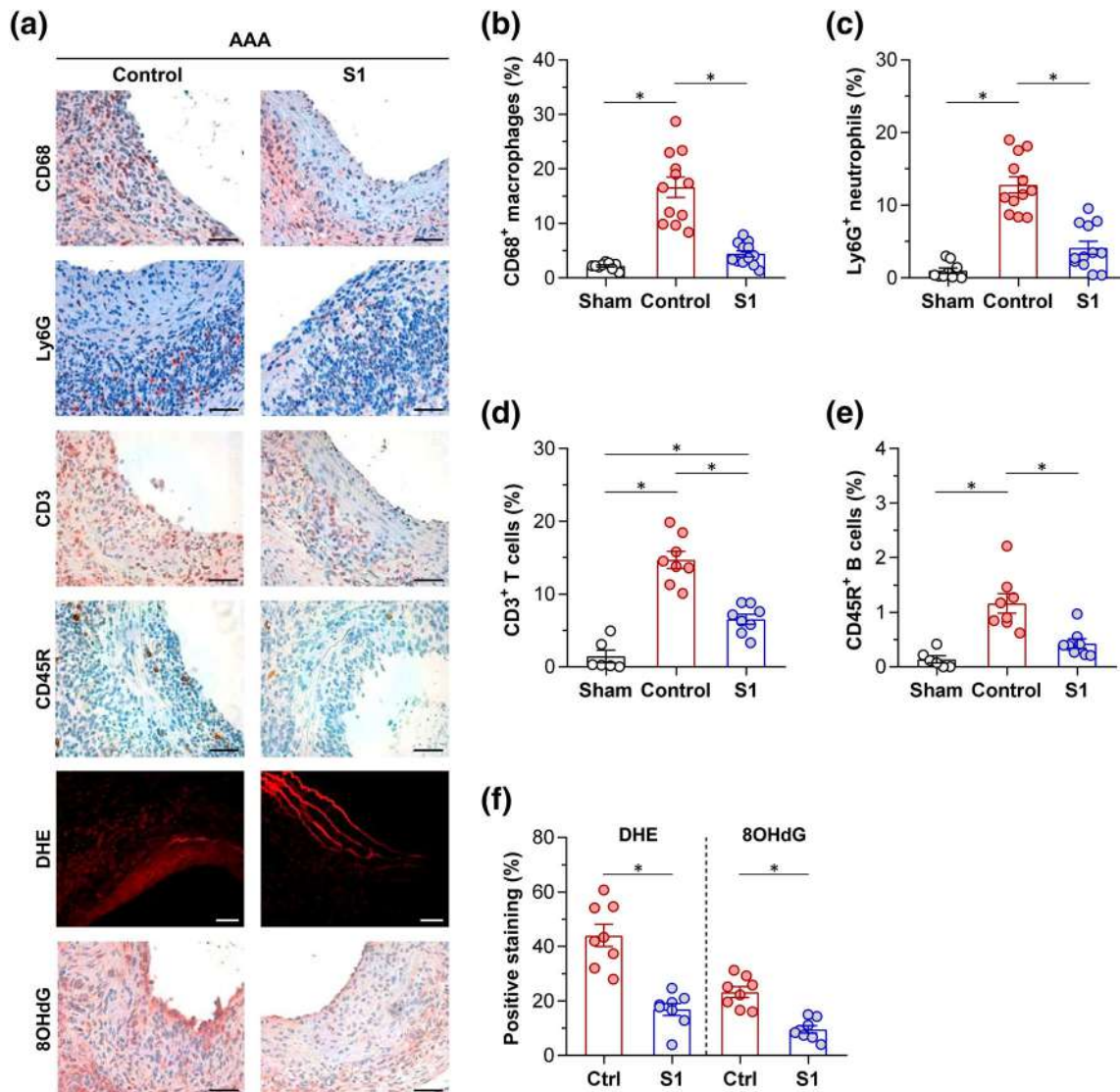


**FIGURE 3** S1 peptide administration reduces elastase-induced AAA formation in mice. (a) Representative images (scale bars, 100  $\mu$ m) of Masson's trichrome staining and Verhoeff-van Gieson (high-magnification fields of rectangular areas) in aortic sections from sham ( $n = 10$ ), control ( $n = 12$ ) and S1 ( $n = 12$ ) mice at 14 days postperfusion. (b) Quantification of the aortic diameter increase in Masson's trichrome stained lesions. (c) Grading of medial elastin degradation (score 0-4). (d) Representative immunohistochemical staining (scale bars, 100  $\mu$ m) and grading of VSMC contractile proteins (score 0-4) in aortic sections from elastase-perfused mice ( $\alpha$ -SMA,  $n = 10$  per group; Calponin,  $n = 8$  per group). Results are presented as individual data points and mean  $\pm$  SEM of the mouse groups. \* $P < 0.05$  according to one-way ANOVA plus Bonferroni test

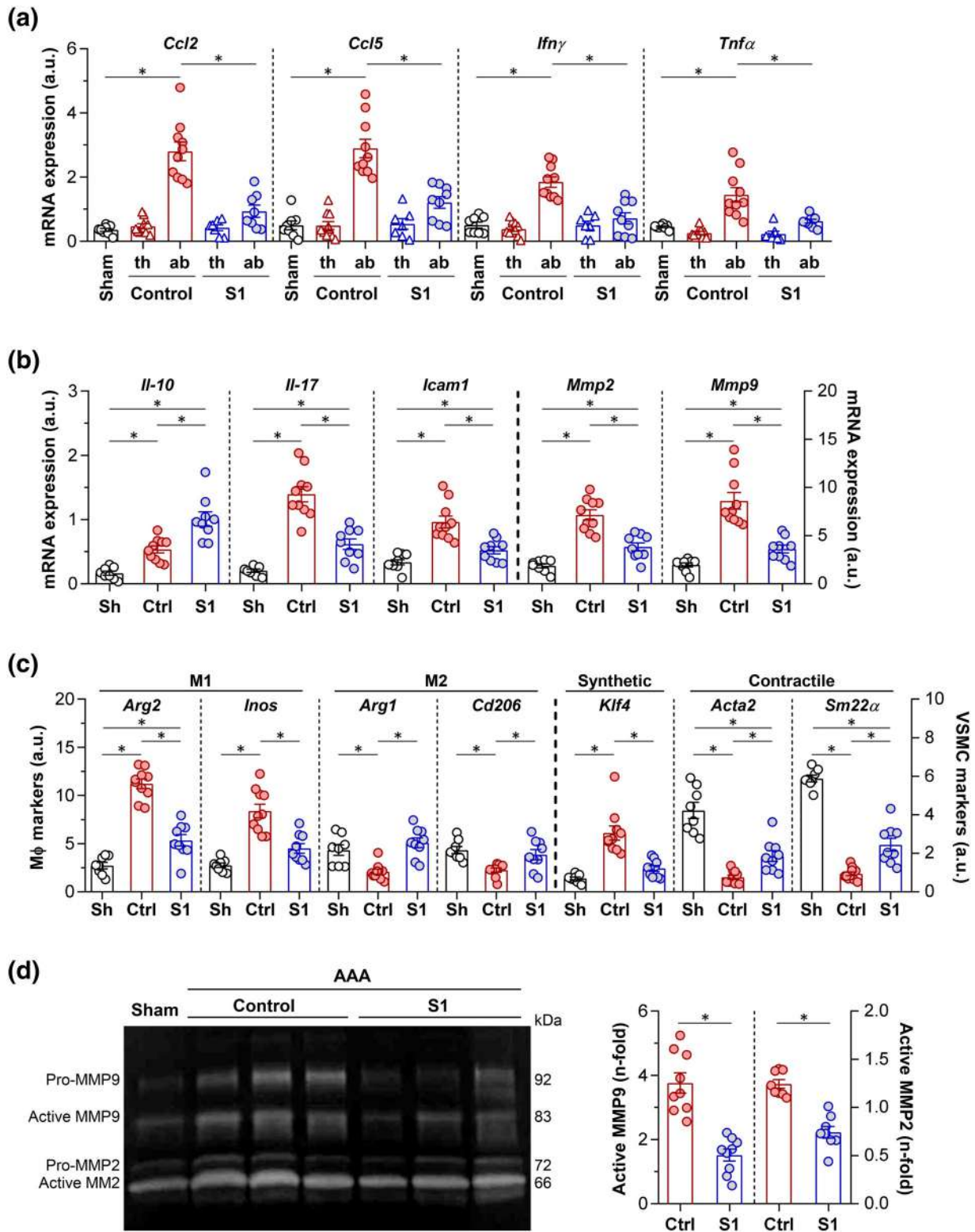
### 3.3 | SOCS1-derived peptide reduces inflammation and oxidative stress in AAA lesions

To evaluate whether S1 peptide affects local inflammatory and oxidative stress responses in experimental AAA, aortic samples were analysed for infiltrating leukocytes and ROS content. In comparison with the vehicle control group, treating mice with S1 peptide significantly decreased the accumulation of CD68<sup>+</sup> macrophages, Ly6G<sup>+</sup> neutrophils, CD3<sup>+</sup> T-cells and CD45R<sup>+</sup> B-cells in AAA lesions (Figure 4a–e). Moreover, aortic levels of superoxide anion and

oxidative DNA damage marker 8OHdG (Figure 4a) were significantly reduced in S1-treated group (% versus control: 38 ± 9 and 41 ± 6, respectively; Figure 4f). Concomitantly, a reduced gene expression of chemokines (*Ccl2* and *Ccl5*) and cytokines (*Ifn $\gamma$* , *Tnf $\alpha$* ) was observed in abdominal aorta of S1-treated mice (Figure 5a), whereas no significant changes were observed in thoracic aorta. S1 therapy also down-regulated inflammatory genes (*Il-17* and *Icam1*) and M1 macrophage markers (*Arg2* and *Inos*), along with up-regulation of anti-inflammatory cytokine (*Il-10*) and M2 markers (*Arg1* and *Cd206*) (Figure 5b,c). Real-time PCR analysis also revealed a decline in the expression levels of



**FIGURE 4** Reduced inflammatory cells and oxidative stress markers in AAA lesions from S1-treated mice. (a) Representative images (scale bars, 50  $\mu$ m) of leukocytes (CD68, Ly6G, CD3 and CD45R immunoperoxidase), superoxide anion (DHE fluorescence) and DNA oxidative stress marker (8OHdG immunoperoxidase) in AAA lesions from control and S1 treated mice after 14 days of elastase perfusion. (b) Quantitative analysis of macrophages as % CD68<sup>+</sup> cells per lesion area (sham,  $n = 9$ ; Control,  $n = 12$ ; S1,  $n = 12$ ). (c) Quantitative analysis of neutrophils as % Ly6G<sup>+</sup> cells per lesion area (sham,  $n = 9$ ; control,  $n = 12$ ; S1,  $n = 12$ ). (d) Quantitative analysis of T lymphocytes as % CD3<sup>+</sup> cells per lesion area (sham,  $n = 6$ ; control,  $n = 8$ ; S1,  $n = 8$ ). (e) Quantitative analysis of B cells as % CD45R<sup>+</sup> cells per lesion area (sham,  $n = 8$ ; control,  $n = 8$ ; S1,  $n = 8$ ). (f) Quantification of DHE and 8OHdG positive staining per lesion area (sham,  $n = 8$ ; control,  $n = 8$ ; S1,  $n = 8$ ). Results are presented as individual data points and mean  $\pm$  SEM of total number of animals per group. \* $P < 0.05$  according to one-way ANOVA plus Bonferroni (b–e) and two-tailed Student's  $t$ -test (f)



**FIGURE 5** S1 peptide favourably alters the inflammatory milieu in experimental AAA. (a) Quantitative real-time PCR analysis of chemokines and cytokines in abdominal aortic tissue from saline-perfused mice (sham) and from thoracic (th) and abdominal (ab) aorta from elastase-perfused mice after 14 days of treatment with either vehicle (control) or S1 peptide (S1). (b) Expression of pro- and anti-inflammatory genes and metalloproteinases (MMPs) in abdominal aorta. (c) Expression levels of phenotypic markers for macrophages (M1 and M2) and VSMC (synthetic and contractile) in aortic tissue. PCR values normalized to 18S rRNA are expressed as arbitrary units (a.u.). (d) Gelatin zymography analysis of MMPs in mouse serum samples. Shown are representative gels and densitometric analysis of active MMP9 and MMP2 relative to sham group (arbitrarily set to 1). Results are presented as individual data points and mean  $\pm$  SEM of the mouse groups (sham,  $n = 8$ ; control,  $n = 9-10$ ; S1  $n = 8-9$ ). \* $P < 0.05$  according to one-way ANOVA plus Bonferroni (a-c) and non-parametric Mann-Whitney (d) test



proliferative, synthetic VSMC phenotype marker (*Klf4*), whereas the expression of contractile VSMC genes (*Acta2* and *Sm22 $\alpha$* ) was increased (Figure 5c). Lower gene expression of elastolytic enzymes (*Mmp2* and *Mmp9*) was detected in AAA tissue from S1-treated mice compared with controls (Figure 5b). Furthermore, gelatin zymography revealed a decreased intensity of active MMP9 and MMP2 bands in serum samples from S1 treated mice (Figure 5d).

### 3.4 | SOCS1 modulates cell responses to elastase and elastin-derived peptide

In an attempt to establish an *in vitro* AAA micro-environment, cultured VSMC and macrophages were exposed to either elastase (2.5 and 0.7  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectively) or elastin degradation products, named elastin-derived peptides (EDP, 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) for different time periods. These chosen doses were based on previous reports (Ghosh et al., 2014; Salmon et al., 2013) and the MTT assays demonstrated no cytotoxic effects on cells (Figure 6a). In VSMC and RAW264.7 macrophages, we observed that elastase increased the protein phosphorylation (Figure 6b) and mRNA expression (Figure 6c,d) of STAT1 and STAT3 compared with basal conditions; and this effect was significantly decreased in the presence of S1 peptide. Real-time PCR analysis also revealed that S1 down-regulated the expression of inflammatory genes (*Ccl2*, *Ccl5*, *Cxcl10* and *Tnfa*) and superoxide-generating enzyme NADPH oxidase subunits (*Nox1* and/or *Nox2*) induced by elastase (Figures 6c,d) and also suppressed **CCL2** chemokine release to the cell culture medium (Figure 6e). A similar effect on gene expression profile was observed in primary mouse bone marrow-derived macrophages pretreated with S1 peptide before elastase stimulation (Figure 6f). Moreover, S1 peptide altered the metalloproteinase expression patterns in elastase-stimulated VSMC and RAW264.7 cells, as evidenced by decreased gene expression of *Mmp2*, *Mmp9* and *Timp1* (but not *Timp2*) (Figure 7a) and lower MMP2/9 gelatinolytic activity in cell conditioned media (Figure 7b).

In separate experiments, we demonstrate the protective effect of S1 peptide in cells exposed to elastin-derived peptides, which is a more physiological stimulus involved in initiation and progression of AAA (Le Page et al., 2019). Real time PCR analysis in VSMC and bone marrow-derived macrophages revealed that elastin-derived peptides, but not the scramble control, increased the gene expression of cytokines and metalloproteinases in a dose- and time-dependent manner (Figure 7c,d). Moreover, all these genes were significantly down-regulated by S1 peptide.

We further examined the regulatory role of S1 peptide on cell migration and differentiation. In VSMC, S1 prominently mitigated the migration and proliferation capacity of elastase-treated cells, as evidenced by lower percentage of cell-covered area in the wound-healing assay (Figure 8a). Moreover, S1 peptide significantly reduced the expression levels of synthetic phenotype marker (*Klf4*) but did not modify contractile marker (*Acta2* and *Sm22*) (Figure 8b). In RAW264.7 macrophages, S1 reduced the expression of M1 associated markers (*Arg2* and *Inos*), while up-regulating anti-inflammatory M2 phenotype

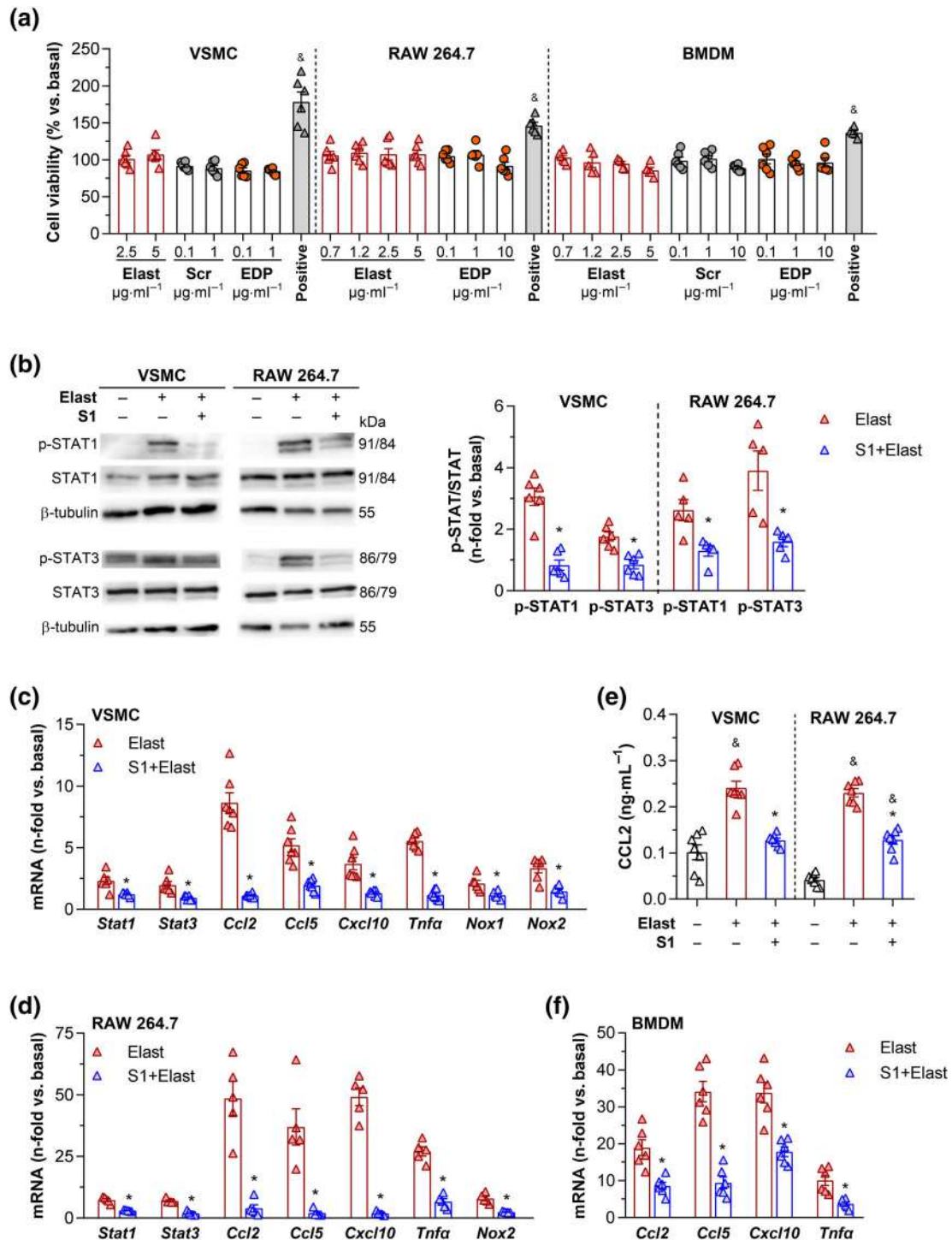
genes (*Arg1* and *Cd206*), thus resulting in lower M1/M2 ratio (Figure 8b).

To further explore the direct effect of SOCS1 on cell responses, gene silencing experiments were performed in VSMC using specific siRNA for SOCS1 or control siRNA. Down-regulation of SOCS1 gene in siRNA transfected VSMC (Figure 8c) resulted in enhanced expression of chemokines, cytokines and metalloproteinases in response to elastase (Figure 8d), thus confirming the protective role of SOCS1 from detrimental inflammation. These *in vitro* results suggest that both SOCS1 protein and SOCS1 mimetic peptide may be key modulators of cell responses during aneurysm formation. Finally, a schematic protein-protein interactions prediction was delineated using the STRING database (Figure 8e), demonstrating the relation of STAT1/3 and the genes analysed in this study.

## 4 | DISCUSSION

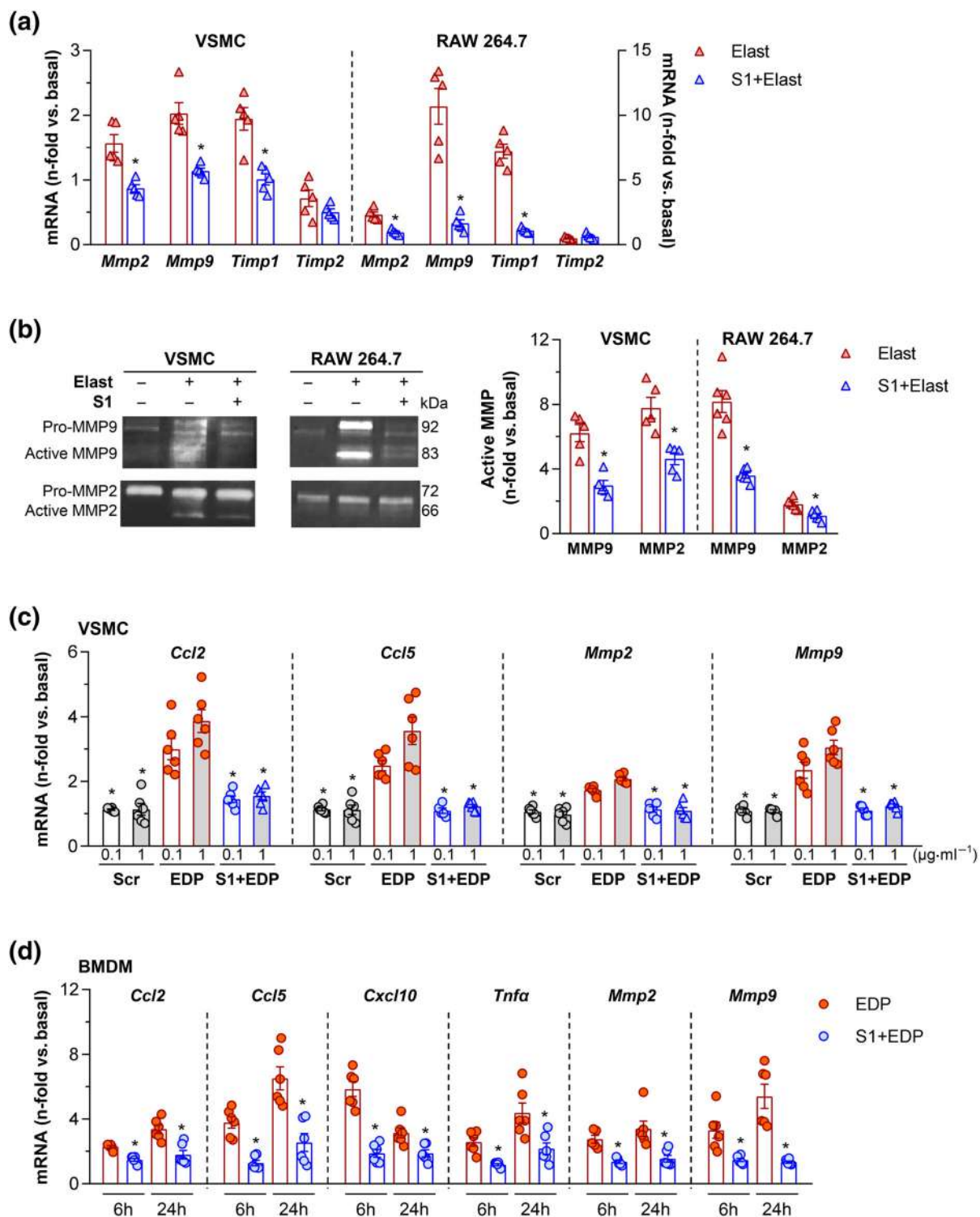
Nowadays, a successful non-surgical approach, particularly pharmacotherapy, is lacking to reduce the risk of abdominal aortic aneurysm (AAA) progression and eventual rupture in patients. Although inflammation and oxidative stress have long been recognized as key pathological events in AAA, the underlying mechanisms remain incompletely understood (Yoshimura et al., 2018). The present study demonstrates that, (a) JAK/STAT signalling pathway is activated in a mouse AAA model with similarities to human AAA lesions, (b) SOCS1-based peptide therapy inhibits JAK/STAT and hinders the development of AAA, as evidenced by limited aortic expansion and elastin degradation, preservation of VSMC in the media and reduced leukocyte infiltration and (c) these effects are mediated by changes in cytokines, redox enzymes and metalloproteinase expression, as well as phenotypic switching of VSMC and macrophages.

JAK/STAT is one of the functionally relevant signalling pathways in cardiovascular diseases, mediating most of the vascular inflammatory responses in atherogenesis and AAA formation. Elevated levels of JAK2, STAT1/3 and SOCS1/3 were detected in human AAA compared to non-aneurysm controls (Eagleton et al., 2010; Harrison et al., 2013; M. Liao et al., 2012; Ohno et al., 2018) and associated with increased pro-inflammatory cytokines (Kokje et al., 2016). Moreover, incubation of human AAA tissue with a pan-JAK inhibitor suppressed STAT3 phosphorylation and cytokine secretion (Ohno et al., 2018). In mouse models of elastase or angiotensin II infusion, STAT3 inhibition or delayed neutralization of IL-6 attenuated AAA growth (Fernandez-Garcia et al., 2017; Ju et al., 2013; Kokje et al., 2016; Z. Qin et al., 2015; Wu et al., 2020), while paradoxically, STAT1 gene loss resulted in larger aneurysms (Eagleton et al., 2010), an effect mediated by IL-6/STAT3 activation (Walters et al., 2005). In the present work, STAT1/3 levels correlated with aneurysm size and inflammation, thus suggesting a pathogenic role of JAK/STAT in AAA. Remarkably, the observed SOCS1/3 up-regulation might reflect a compensatory, but not sufficient, feedback mechanism to alleviate the detrimental effects of cytokine overproduction in aneurysm. The

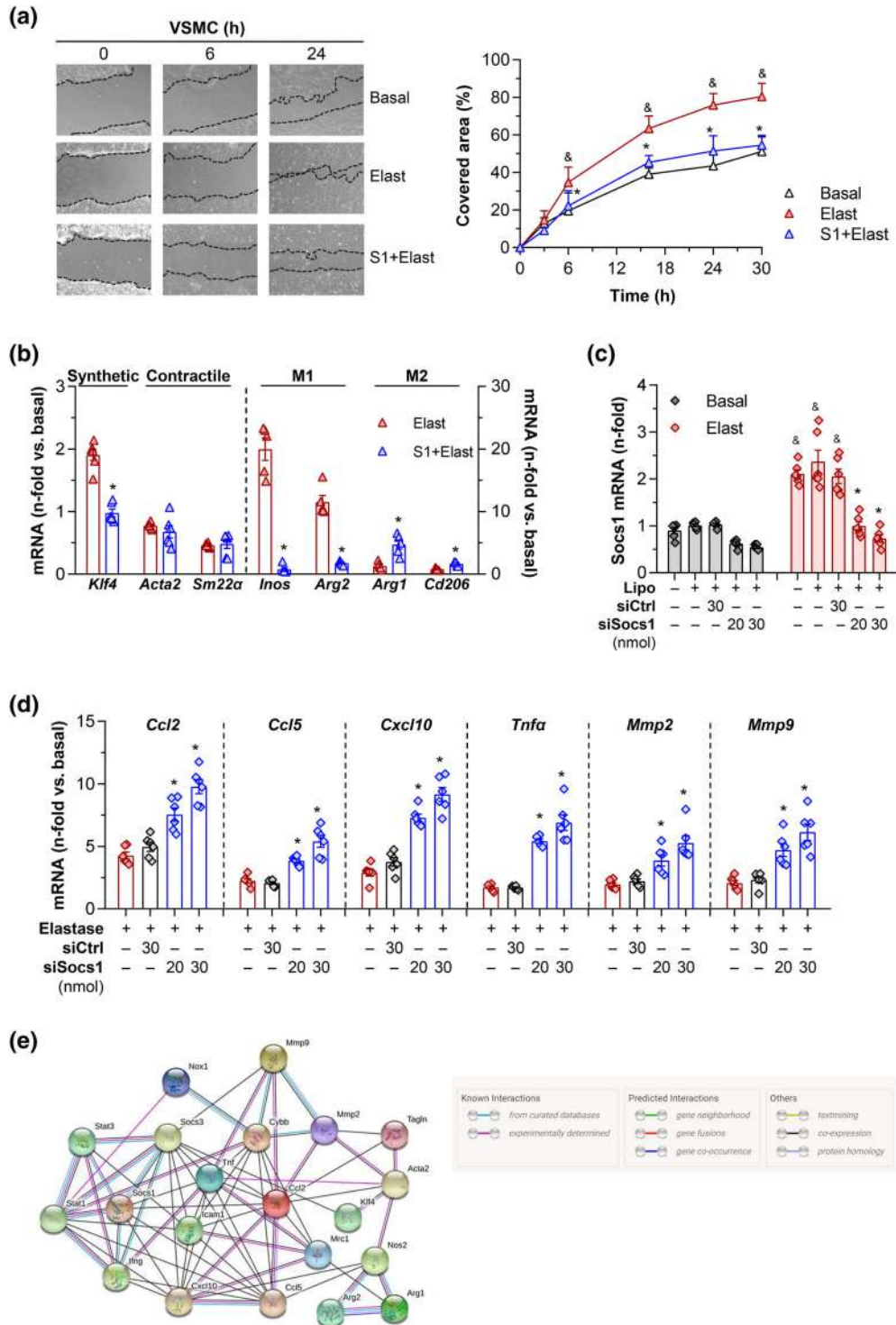


**FIGURE 6** S1 peptide inhibits JAK/STAT signalling and inflammatory gene expression *in vitro*. (a) MTT cell viability assay in mouse VSMC, RAW 264.7 macrophages and bone marrow-derived macrophages (BMDM) after 24 h of incubation with different doses of elastase (Elast), scramble peptide (Scr) and elastin-derived peptide (EDP), using 10% FBS as positive control. Cell viability is expressed as percentage versus basal conditions ( $n = 6$ ). (b) VSMC and RAW 264.7 macrophages were stimulated with elastase (2.5 and 0.7  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectively) in the absence or presence of S1 peptide (150  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Western blot analysis of phosphorylated and total STAT1/3 proteins ( $\beta$ -tubulin as loading control) in total cell extracts at 2 h (VSMC,  $n = 6$ ) and 6 h (RAW 264.7,  $n = 5$ ) of elastase stimulation. Representative blots and summary of normalized quantification are shown. (c, d) Gene expression of STATs, chemokines, cytokines and Nox subunits in VSMC (24 h,  $n = 6$ –7; c) and macrophages (6 h,  $n = 5$ ; d) incubated with elastase and S1 peptide. Real-time PCR values normalized by 18S endogenous control are expressed as fold increases over basal conditions (arbitrarily set to 1). (e) CCL2 concentrations in cell conditioned media measured by ELISA in duplicate ( $n = 7$ ). (f) Gene expression analysis in primary BMDM exposed to elastase (0.7  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 24 h) in the presence or absence of S1 peptide ( $n = 6$ ). Results are presented as individual data points and mean  $\pm$  SEM of the total number of individual experiments analysed in duplicate.  $\&P < 0.05$  versus basal and  $*P < 0.05$  versus elastase according to one-way ANOVA plus Bonferroni (a and e) and non-parametric Mann-Whitney (b–d and f) test





**FIGURE 7** S1 peptide prevents cell responses to elastase and elastin-derived peptides. (a) Gene expression analysis of extracellular matrix (ECM) degrading enzymes and their inhibitors in VSMC and RAW 264.7 macrophages incubated with elastase (Elast; 2.5 and 0.7  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , respectively) and 150  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  S1 peptide ( $n = 5$ ). Real-time PCR values normalized by 18S endogenous control are expressed as fold increases over basal conditions (arbitrarily set to 1). (b) Gelatin zymography assay of metalloproteinases (MMPs) in cell supernatants. Shown are representative gels and summary of densitometric analysis ( $n = 5$ ). (c) Gene expression analysis in VSMC after 24 h of incubation with two doses (0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , white bars; 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , grey bars) of scramble (Scr) and elastin-derived peptides (EDP) in the presence or absence of S1 peptide ( $n = 6$ ). (d) Inhibitory effect of S1 peptide on the time-dependent induction of chemokines, cytokines and MMPs in bone marrow-derived macrophages (BMDM) stimulated with 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  EDP ( $n = 6$ ). Results are presented as individual data points and mean  $\pm$  SEM of the total number of individual experiments analysed in duplicate. \* $P < 0.05$  versus stimulus according to Mann-Whitney (a, b and d) and Kruskal-Wallis plus Dunn's (c) test



**FIGURE 8** Regulatory role of SOCS1 in cell migration, polarization and inflammation. (a) Scratch-wound-healing assay in mouse VSMC line MOVAS-1 incubated under basal conditions or elastase ( $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) with/without S1 peptide. Shown are representative phase-contrast images of cells migrating into the wounded area and the quantification of covered healing areas over time, expressed as percentage versus time 0 ( $n = 6$ ). (b) Real time PCR analysis of synthetic and contractile VSMC markers ( $n = 6$ ) and M1 and M2 macrophage markers ( $n = 5$ ) at 24 h of stimulation with elastase. (c, d) VSMC were transfected with SOCS1 siRNA (siSocs1), using lipofectamine alone (Lipo) and control siRNA (siCtrl) as controls and then incubated for 24 h without (basal) or with elastase (Elast). Gene expression levels of SOCS1 (c) and inflammatory genes (d) in SOCS1-silenced cells ( $n = 5-6$ ). Real time PCR values normalized by 18S endogenous control are expressed as fold increases over basal conditions (arbitrarily set to 1).  $^{\&}$  $P < 0.05$  versus basal and  $^*$  $P < 0.05$  versus elastase according to two-way ANOVA plus Tukey's (a), Mann-Whitney (b) and Kruskal-Wallis plus Dunn's (c and d) test. (e) STRING (<https://string-db.org/>) diagrams of protein-protein interactions (*Mus musculus*) of STAT1/3 and downstream genes analysed in this study. Colours of connecting lines represent different types of interactions between proteins. Cybb = Nox1, Mrc1 = Cd206, Nos2 = iNos, Tagln = Sm22 $\alpha$

latter is supported by the positive impact of SOCS1-based therapy on AAA formation.

There is compelling evidence for the efficacy of JAK/STAT inhibitors in vascular diseases. The small-molecule JAK1–3 inhibitor **tofacitinib** suppresses chronic inflammation in experimental vasculitis (H. Zhang et al., 2018), and **baricitinib** and **upadacitinib** inhibiting JAK1/2 are currently under clinical evaluation in arteritis (ClinicalTrials.gov identifiers: NCT03026504 and NCT03725202). However, none of them have been studied in AAA. Several groups, including ours, have outlined the functional significance of SOCS proteins in cardiovascular diseases. In experimental models, SOCS1/3 knockdown aggravated graft arteriosclerosis and atherogenesis (Grothusen et al., 2012; Ortiz-Munoz et al., 2009; L. Qin et al., 2014; Schuett et al., 2019), while SOCS1 forced expression protected against vascular inflammation (Lopez-Sanz et al., 2018; L. Qin et al., 2014; Recio et al., 2015). This work reveals first preclinical evidence of a safe and efficacious SOCS1-based approach to treat AAA. S1 peptide mimics of the unique SOCS1 KIR domain, is conjugated to a hydrophobic sequence and effectively enters into the cells to suppress JAK kinase activity and STAT activation (Jager et al., 2011; Recio et al., 2014). So far, the *in vivo* anti-inflammatory effects of different SOCS1 derived sequences have been investigated in preclinical models of inflammatory diseases (Ahmed, Larkin, & Johnson, 2015; Jager et al., 2011; La Manna et al., 2020; Madonna et al., 2013) and diabetic complications (Lopez-Sanz et al., 2018; Opazo-Rios et al., 2020; Recio et al., 2014; Recio et al., 2017). Herein, we demonstrate that S1 therapy suppresses STAT1/3 and downstream target genes in aorta and prevents elastase-induced AAA formation. These findings contrast with a previous study where defective STAT3 signaling by transgenic SOCS3 overexpression in T-lymphocytes, but not in vessel wall and macrophages, increased aneurysm severity in **angiotensin II**-induced AAA (Romain et al., 2013). These contradictory results perhaps reflect the pattern of cytokine expression in the different experimental models studied.

Elastin degradation is an important hallmark of human AAA leading to production of different elastin-derived peptides, which participate in formation, progression and rupture of AAA lesions via the induction of inflammation (Dale et al., 2016; Le Page et al., 2019; Salmon et al., 2013). Moreover, persistent inflammation and oxidative stress alter the balance between matrix degrading enzymes and their inhibitors during pathological remodelling of the arterial wall, leading to aneurysmal degeneration (Quintana & Taylor, 2019; Wiernicki et al., 2019). Cellular elements involved in vascular inflammation such as macrophages and VSMC can produce and/or activate specific proteinases, particularly metalloproteinase 2/9 (Longo et al., 2002). In addition, activation of JAK2/STAT1/3 axis has been linked with increased metalloproteinase 2/9 secretion in the aorta, thereby promoting AAA (Ghosh, Pechota, Coleman, Upchurch, & Eliason, 2015). In the current study, S1 peptide therapy prevented elastin degradation and aortic wall destruction in AAA lesions in association with reduced expression and enzymatic activity of metalloproteinase 2/9. Moreover, the *in vitro* study revealed that S1 suppressed the expression of cytokines and

metalloproteinase 2/9 in VSMC and macrophages exposed to either elastase or elastin-derived peptides. Our results in vascular cells are consistent with previous research demonstrating that SOCS1 up-regulation reduces metalloproteinases in other cell types (Yu et al., 2018; Q. Zhang, Guo, Dong, Dai, & Zhou, 2015).

The positive impact of SOCS1-based therapy on experimental AAA is accompanied by restoration of contractile markers of VSMC in the media and decreased infiltration of macrophages, neutrophils and lymphocytes in AAA lesions. Lower aortic levels of inflammatory markers, superoxide anion and DNA oxidative marker further indicate a decline in overall inflammation and oxidative stress in S1 treated mice. During AAA, macrophages are recruited to the media and adventitia, where they polarize into different specific phenotypes with pathogenic and/or reparative functions. Proinflammatory M1 macrophages classically activated by cytokines such as **TNF $\alpha$**  and **IFN $\gamma$**  can amplify local inflammation by releasing cytokines, chemokines, ROS and metalloproteinases, thus leading to matrix degradation, VSMC apoptosis, tissue weakening and aortic enlargement (Dale et al., 2016; N. Wang, Liang, & Zen, 2014). Conversely, M2 polarization facilitates inflammation resolution and reparative processes such as extracellular matrix deposition through the release of anti-inflammatory cytokines such as **IL-10** (Pope et al., 2016; Raffort et al., 2019). The balance between STAT1 and STAT3/6 activation tightly regulates macrophage polarization (N. Wang, Liang, & Zen, 2014). Moreover, a high SOCS1 to SOCS3 ratio particularly associated with M2 macrophages (Whyte et al., 2011), while SOCS1 down-regulation causes proinflammatory M1 polarization (Grothusen et al., 2012). In experimental AAA, STAT3 inhibition decreases the ratio of M1/M2 macrophages and mitigates aortic dilation (Z. Qin et al., 2015). In agreement, the present study shows that S1 peptide suppresses aortic expression of M1 markers (iNOS and Arg2) and proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , CCL2, **CCL5** and IL-17), while promoting anti-inflammatory M2-associated markers (Arg1, CD206, and IL-10). *In vitro* experiments also confirmed down-regulation of proinflammatory cytokines and lower M1/M2 marker ratio by S1 peptide in elastase-stimulated macrophages. Given the role of M2 macrophages in healing, we can conclude that SOCS1-based therapy contributes to AAA improvement by skewing macrophages towards an M2 phenotype in an attempt to repair damaged tissue. This is in line with the previously reported effect of SOCS1 gene induction in atherosclerosis by suppressing JAK2/STAT1-mediated M1 polarization and reciprocally promoting M2 phenotype (Grothusen et al., 2012; Raffort et al., 2019; Recio et al., 2015; Ye et al., 2016).

Development, progression and eventual rupture of AAA involve a dynamic interplay between infiltrating inflammatory cells and vascular resident cells (Ijaz, Tilton, & Brasier, 2016; Raffort et al., 2017). Most VSMC in the vessel wall display a contractile phenotype that enables them to maintain vascular tone. During AAA formation, injured VSMC switch from a differentiated, quiescent to a synthetic phenotype characterized by a marked loss of contractile protein expression, increased production of metalloproteinases, cytokines and chemokines and higher proliferation and migration rate, thus

leading to vascular remodelling, leukocyte recruitment and exacerbated inflammation (Ailawadi et al., 2009). Studies indicate that JAK/STAT signalling regulates differentiation, migration and proliferation of VSMC (Moshapa, Riches-Suman, & Palmer, 2019; Y. C. Wang, Cui, Chuang, & Chen, 2017). Activation of STAT1/3 by JAK1/2 particularly has been found to suppress the expression of VSMC-specific contractile genes (Kirchmer et al., 2014; X. H. Liao et al., 2015). In agreement, we reveal a new regulatory role of SOCS in the VSMC phenotypic switch during vascular injury. The improvement of aortic dilation and elastin integrity by S1 therapy associated with a higher expression of contractile proteins ( $\alpha$ -SMA and calponin) and marker genes for actin alpha 2 (ACTA2) and smooth muscle protein 22 $\alpha$  (SM22 $\alpha$ ). This was accompanied by a reduced expression of KLF4, an important regulator of synthetic VSMC phenotype during aneurysm formation that progressively increases in elastase-perfused mice and elastase-stimulated cells (Salmon et al., 2013). Our *in vivo* findings were corroborated *in vitro*, where S1 peptide inhibited cell migration, inflammatory and synthetic VSMC genes. Conversely, SOCS1 silencing in VSMC boosted elastase-induced expression of cytokines, chemokines and metalloproteinases, thus supporting the relevant protective role of SOCS1 protein in vascular inflammatory diseases.

In conclusion, the present study demonstrates that JAK/STAT inhibition through S1 peptide administration halts AAA progression in mice by reducing aortic enlargement, inflammation, oxidative stress, metalloproteinases and phenotypic switch. Our preclinical observations provide insight of the vasculo-protective value of SOCS1 peptidomimetic as a promising approach for further development in human AAA, a chronic and serious condition for which no medical treatment currently exists.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors greatly acknowledge Dr. Diego Martinez-Lopez and Dr. Sandra Perez-Rial (IIS-Fundacion Jimenez Diaz, Madrid) for helpful advice during elastase perfusion and IVIS imaging, respectively. This research is funded by Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO-FEDER grant SAF2015-63696-R), Ministry of Science and Innovation (MICINN-FEDER grant RTI2018-098788-B-I00), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-FIS-FEDER grants DTS-2017/00203, PI17/01495 and PI19/00128), Comunidad de Madrid (Complemento II-CM, S2017/BMD-3673), La Caixa Foundation (HR17-00247) and Spanish Society of Arteriosclerosis. S.B. and L.L.S. are supported by MINECO and FIS predoctoral fellowships, respectively. Dedicated to the memory of J.A. Gomez and R. Guerrero.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.B. designed experiments, researched, analysed data and wrote the manuscript. L.L.S. researched and analysed data and revised the manuscript. L.J.C., I.P., A.M. and S.L.M. performed *in vivo* studies and revised the manuscript. J.L.M.V. and L.M.B.C. designed experiments and critically revised the manuscript. J.E. critically revised the manuscript for important intellectual content. C.G.G. designed the study and experiments, analysed data and wrote the manuscript.

#### CONFLICT OF INTEREST

C.G.G, J.E., S.B., and L.L.S are inventors on a patent application regarding peptide. The other authors declare no conflict of interest.

#### DECLARATION OF TRANSPARENCY AND SCIENTIFIC RIGOUR

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the *BJP* guidelines for [Design & Analysis](#) and [Animal Experimentation](#) and as recommended by funding agencies, publishers and other organizations engaged with supporting research.

#### DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Some data may not be made available because of privacy or ethical restrictions.

#### ORCID

Carmen Gomez-Guerrero  <https://orcid.org/0000-0001-9001-5414>

#### REFERENCES

- Ahmed, C. M., Larkin, J. III, & Johnson, H. M. (2015). SOCS1 mimetics and antagonists: A complementary approach to positive and negative regulation of immune function. *Frontiers in Immunology*, 6, 1–8, 183.
- Ailawadi, G., Moehle, C. W., Pei, H., Walton, S. P., Yang, Z., Kron, I. L., ... Owens, G. K. (2009). Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 138(6), 1392–1399. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2009.07.075>
- Alexander, S. P. H., Kelly, E., Mathie, A., Peters, J. A., Veale, E. L., Armstrong, J. F., ... Davies, J. A. (2019). The concise guide to pharmacology 2019/20: Introduction and other protein targets. *British Journal of Pharmacology*, 176 Suppl 1, (Suppl 1), S1–s20. <https://doi.org/10.1111/bph.14747>
- Chaikof, E. L., Dalman, R. L., Eskandari, M. K., Jackson, B. M., Lee, W. A., Mansour, M. A., ... Starnes, B. W. (2018). The society for vascular surgery practice guidelines on the care of patients with an abdominal aortic aneurysm. *Journal of Vascular Surgery*, 67(1), 2–77e72. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2017.10.044>
- Curtis, M. J., Alexander, S., Cirino, G., Docherty, J. R., George, C. H., Giembycz, M. A., ... Ahluwalia, A. (2018). Experimental design and analysis and their reporting II: Updated and simplified guidance for authors and peer reviewers. *British Journal of Pharmacology*, 175(7), 987–993. <https://doi.org/10.1111/bph.14153>
- Dale, M. A., Xiong, W., Carson, J. S., Suh, M. K., Karpisek, A. D., Meisinger, T. M., ... Baxter, B. T. (2016). Elastin-derived peptides promote abdominal aortic aneurysm formation by modulating M1/M2 macrophage polarization. *Journal of Immunology*, 196(11), 4536–4543. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502454>
- Eagleton, M. J., Xu, J., Liao, M., Parine, B., Chisolm, G. M., & Graham, L. M. (2010). Loss of STAT1 is associated with increased aortic rupture in an experimental model of aortic dissection and aneurysm formation. *Journal of Vascular Surgery*, 51(4), 951–961discussion 961. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2009.11.075>
- Fernandez-Garcia, C. E., Tarin, C., Roldan-Montero, R., Martinez-Lopez, D., Torres-Fonseca, M., Lindhot, J. S., ... Martin-Ventura, J. L. (2017). Increased galectin-3 levels are associated with abdominal aortic aneurysm progression and inhibition of galectin-3 decreases elastase-induced AAA development. *Clinical Science (London, England)*, 131(22), 2707–2719. <https://doi.org/10.1042/cs20171142>



- Ghosh, A., Lu, G., Su, G., McEvoy, B., Sadiq, O., DiMusto, P. D., ... Upchurch, G. R. Jr. (2014). Phosphorylation of AKT and abdominal aortic aneurysm formation. *The American Journal of Pathology*, 184(1), 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.09.016>
- Ghosh, A., Pechota, A., Coleman, D., Upchurch, G. R. Jr., & Eliason, J. L. (2015). Cigarette smoke-induced MMP2 and MMP9 secretion from aortic vascular smooth cells is mediated via the Jak/Stat pathway. *Human Pathology*, 46(2), 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.11.003>
- Grothusen, C., Schuett, H., Hillmer, A., Lumpe, S., Grote, K., Ballmaier, M., ... Schieffer, B. (2012). Role of suppressor of cytokine signaling-1 in murine atherosclerosis. *PLoS ONE*, 7(12), e51608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051608>
- Harrison, S. C., Smith, A. J., Jones, G. T., Swerdlow, D. I., Rampuri, R., Bown, M. J., ... Humphries, S. E. (2013). Interleukin-6 receptor pathways in abdominal aortic aneurysm. *European Heart Journal*, 34(48), 3707–3716. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs354>
- Ijaz, T., Tilton, R. G., & Brasier, A. R. (2016). Cytokine amplification and macrophage effector functions in aortic inflammation and abdominal aortic aneurysm formation. *Journal of Thoracic Disease*, 8(8), E746–E754. <https://doi.org/10.21037/jtd.2016.06.37>
- Jager, L. D., Dabelic, R., Waiboci, L. W., Lau, K., Haider, M. S., Ahmed, C. M., & Johnson, H. M. (2011). The kinase inhibitory region of SOCS-1 is sufficient to inhibit T-helper 17 and other immune functions in experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 232(1–2), 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.10.018>
- Ju, X., Ijaz, T., Sun, H., Ray, S., Lejeune, W., Lee, C., ... Brasier, A. R. (2013). Interleukin-6-signal transducer and activator of transcription-3 signaling mediates aortic dissections induced by angiotensin II via the T-helper lymphocyte 17-interleukin 17 axis in C57BL/6 mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(7), 1612–1621. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.112.301049>
- Kirchmer, M. N., Franco, A., Albasanz-Puig, A., Murray, J., Yagi, M., Gao, L., ... Wijelath, E. S. (2014). Modulation of vascular smooth muscle cell phenotype by STAT-1 and STAT-3. *Atherosclerosis*, 234(1), 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.02.029>
- Kiu, H., & Nicholson, S. E. (2012). Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors*, 30(2), 88–106. <https://doi.org/10.3109/08977194.2012.660936>
- Kokje, V. B. C., Gabel, G., Koole, D., Northoff, B. H., Holdt, L. M., Hamming, J. F., & Lindeman, J. H. N. (2016). IL-6: A Janus-like factor in abdominal aortic aneurysm disease. *Atherosclerosis*, 251, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.021>
- La Manna, S., Lopez-Sanz, L., Bernal, S., Jimenez-Castilla, L., Prieto, I., Morelli, G., ... Marasco, D. (2020). Antioxidant effects of P55, a peptidomimetic of suppressor of cytokine signaling 1, in experimental atherosclerosis. *Antioxidants (Basel)*, 9(8), 1–14, 754. <https://doi.org/10.3390/antiox9080754>
- Le Page, A., Khalil, A., Vermette, P., Frost, E. H., Larbi, A., Witkowski, J. M., & Fulop, T. (2019). The role of elastin-derived peptides in human physiology and diseases. *Matrix Biology*, 84, 81–96. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.07.004>
- Liang, X., He, M., Chen, T., Liu, Y., Tian, Y. L., Wu, Y. L., ... Yuan, Z. Y. (2013). Multiple roles of SOCS proteins: Differential expression of SOCS1 and SOCS3 in atherosclerosis. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(5), 1066–1074. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2013.1323>
- Liao, M., Xu, J., Clair, A. J., Ehrman, B., Graham, L. M., & Eagleton, M. J. (2012). Local and systemic alterations in signal transducers and activators of transcription (STAT) associated with human abdominal aortic aneurysms. *The Journal of Surgical Research*, 176(1), 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.05.041>
- Liao, X. H., Wang, N., Zhao, D. W., Zheng, D. L., Zheng, L., Xing, W. J., ... Zhang, T. C. (2015). STAT3 protein regulates vascular smooth muscle cell phenotypic switch by interaction with myocardin. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(32), 19641–19652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.630111>
- Lilley, E., Stanford, S. C., Kendall, D. E., Alexander, S. P., Cirino, G., Docherty, J. R., ... Ahluwalia, A. (2020). ARRIVE 2.0 and the British Journal of Pharmacology: Updated guidance for 2020. *British Journal of Pharmacology*, 177(16), 3611–3616. <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bph.15178>
- Longo, G. M., Xiong, W., Greiner, T. C., Zhao, Y., Fiotti, N., & Baxter, B. T. (2002). Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(5), 625–632. <https://doi.org/10.1172/jci15334>
- Lopez-Sanz, L., Bernal, S., Recio, C., Lazaro, I., Oguiza, A., Melgar, A., ... Gomez-Guerrero, C. (2018). SOCS1-targeted therapy ameliorates renal and vascular oxidative stress in diabetes via STAT1 and PI3K inhibition. *Laboratory Investigation*, 98(10), 1276–1290. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0043-6>
- Luo, Y. W., Zhao, Z., Li, F. N., & Zhang, J. (2013). The effect pathways analysis in the abdominal aortic aneurysms. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 17(9), 1245–1251.
- Madonna, S., Scarponi, C., Doti, N., Carbone, T., Cavani, A., Scognamiglio, P. L., ... Albanesi, C. (2013). Therapeutic potential of a peptide mimicking the SOCS1 kinase inhibitory region in skin immune responses. *European Journal of Immunology*, 43(7), 1883–1895. <https://doi.org/10.1002/eji.201343370>
- Mallavia, B., Oguiza, A., Lopez-Franco, O., Recio, C., Ortiz-Munoz, G., Lazaro, I., ... Gomez-Guerrero, C. (2013). Gene deficiency in activating fcgamma receptors influences the macrophage phenotypic balance and reduces atherosclerosis in mice. *PLoS ONE*, 8(6), e66754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066754>
- Morris, R., Kershaw, N. J., & Babon, J. J. (2018). The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Science*, 27(12), 1984–2009. <https://doi.org/10.1002/pro.3519>
- Moshapa, F. T., Riches-Suman, K., & Palmer, T. M. (2019). Therapeutic targeting of the proinflammatory IL-6-JAK/STAT signalling pathways responsible for vascular restenosis in type 2 diabetes mellitus. *Cardiology Research and Practice*, 2019, 9846312. <https://doi.org/10.1155/2019/9846312>
- Ohno, T., Aoki, H., Ohno, S., Nishihara, M., Furusho, A., Hiromatsu, S., ... Tanaka, H. (2018). Cytokine profile of human abdominal aortic aneurysm: Involvement of JAK/STAT pathway. *Annals of Vascular Diseases*, 11(1), 84–90. <https://doi.org/10.3400/avd.17-00086>
- Opazo-Ríos, L., Sanchez Matus, Y., Rodrigues-Diez, R. R., Carpio, D., Droguett, A., Egido, J., ... Mezzano, S. (2020). Anti-inflammatory, antioxidant and renoprotective effects of SOCS1 mimetic peptide in the BTBR ob/ob mouse model of type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 8(1), 1–13, e001242. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2020-001242>
- Ortiz-Munoz, G., Martin-Ventura, J. L., Hernandez-Vargas, P., Mallavia, B., Lopez-Parra, V., Lopez-Franco, O., ... Gomez-Guerrero, C. (2009). Suppressors of cytokine signaling modulate JAK/STAT-mediated cell responses during atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. O Biologica*, 29(4), 525–531.
- Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M.T., Baker, M., ... Würbel, H. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 18(7), 1–65, e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- Pope, N. H., Salmon, M., Davis, J. P., Chatterjee, A., Su, G., Conte, M. S., ... Upchurch, G. R. Jr. (2016). D-series resolvins inhibit murine abdominal aortic aneurysm formation and increase M2 macrophage polarization. *The FASEB Journal*, 30(12), 4192–4201. <https://doi.org/10.1096/fj.201600144RR>
- Prucha, M., Sedivy, P., Stadler, P., Zdrahal, P., Matoska, V., & Strnad, H. (2019). Gene expression in patients with abdominal aortic aneurysm—More than immunological mechanisms involved.

- Physiological Research*, 68(3), 385–394. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933905>
- Qin, L., Huang, Q., Zhang, H., Liu, R., Tellides, G., Min, W., & Yu, L. (2014). SOCS1 prevents graft arteriosclerosis by preserving endothelial cell function. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(1), 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.08.694>
- Qin, Z., Bagley, J., Sukhova, G., Baur, W. E., Park, H. J., Beasley, D., ... Galper, J. B. (2015). Angiotensin II-induced TLR4 mediated abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E knockout mice is dependent on STAT3. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 87, 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.08.014>
- Quintana, R. A., & Taylor, W. R. (2019). Cellular mechanisms of aortic aneurysm formation. *Circulation Research*, 124(4), 607–618. <https://doi.org/10.1161/circresaha.118.313187>
- Raffort, J., Lareyre, F., Clement, M., Hassen-Khodja, R., Chinetti, G., & Mallat, Z. (2017). Monocytes and macrophages in abdominal aortic aneurysm. *Nature Reviews. Cardiology*, 14(8), 457–471. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.52>
- Raffort, J., Lareyre, F., Clement, M., Moratal, C., Jean-Baptiste, E., Hassen-Khodja, R., ... Mallat, Z. (2019). Transforming growth factor beta neutralization finely tunes macrophage phenotype in elastase-induced abdominal aortic aneurysm and is associated with an increase of arginase 1 expression in the aorta. *Journal of Vascular Surgery*, 70(2), 588–598. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2018.09.045>
- Recio, C., Lazaro, I., Oguiza, A., Lopez-Sanz, L., Bernal, S., Blanco, J., ... Gomez-Guerrero, C. (2017). Suppressor of cytokine signaling-1 peptidomimetic limits progression of diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(2), 575–585. <https://doi.org/10.1681/ASN.2016020237>
- Recio, C., Oguiza, A., Lazaro, I., Mallavia, B., Egido, J., & Gomez-Guerrero, C. (2014). Suppressor of cytokine signaling 1-derived peptide inhibits Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway and improves inflammation and atherosclerosis in diabetic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(9), 1953–1960.
- Recio, C., Oguiza, A., Mallavia, B., Lazaro, I., Ortiz-Munoz, G., Lopez-Franco, O., ... Gomez-Guerrero, C. (2015). Gene delivery of suppressors of cytokine signaling (SOCS) inhibits inflammation and atherosclerosis development in mice. *Basic Research in Cardiology*, 110(2), 1–11, 8. <https://doi.org/10.1007/s00395-014-0458-1>
- Romain, M., Taleb, S., Daloz, M., Ponnuswamy, P., Esposito, B., Perez, N., ... Mallat, Z. (2013). Overexpression of SOCS3 in T lymphocytes leads to impaired interleukin-17 production and severe aortic aneurysm formation in mice—Brief report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(3), 581–584. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.112.300516>
- Salmon, M., Johnston, W. F., Woo, A., Pope, N. H., Su, G., Upchurch, G. R. Jr., ... Ailawadi, G. (2013). KLF4 regulates abdominal aortic aneurysm morphology and deletion attenuates aneurysm formation. *Circulation*, 128(11 Suppl 1), S163–S174. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.112.000238>
- Schuetz, J., Kreutz, J., Grote, K., Vlacil, A. K., Schuetz, H., Oberoi, R., ... Ruhle, F. (2019). Suppressor of cytokine signaling 1 is involved in gene regulation which controls the survival of Ly6C(low) monocytes in mice. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 52(2), 336–353. <https://doi.org/10.33594/000000024>
- Sénémaud, J., Caligiuri, G., Etienne, H., Delbosc, S., Michel, J. B., & Coscas, R. (2017). Translational relevance and recent advances of animal models of abdominal aortic aneurysm. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(3), 401–410. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.116.308534>
- Tarin, C., Fernandez-Laso, V., Sastre, C., Madrigal-Matute, J., Gomez, M., Zaragoza, C., ... Blanco-Colio, L. M. (2014). Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis or Fn14 deficiency reduce elastase perfusion-induced aortic abdominal aneurysm in mice. *Journal of the American Heart Association*, 3(4), 1–14, e000723. <https://doi.org/10.1161/jaha.113.000723>
- Walters, D. M., Antao-Menezes, A., Ingram, J. L., Rice, A. B., Nyska, A., Tani, Y., ... Bonner, J. C. (2005). Susceptibility of signal transducer and activator of transcription-1-deficient mice to pulmonary fibrogenesis. *The American Journal of Pathology*, 167(5), 1221–1229. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)61210-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)61210-2)
- Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Frontiers in Immunology*, 5, 1–9, 614. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614>
- Wang, Y. C., Cui, X. B., Chuang, Y. H., & Chen, S. Y. (2017). Janus kinase 3, a novel regulator for smooth muscle proliferation and vascular remodeling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(7), 1352–1360. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.116.308895>
- Whyte, C. S., Bishop, E. T., Ruckerl, D., Gaspar-Pereira, S., Barker, R. N., Allen, J. E., ... Wilson, H. M. (2011). Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(5), 845–854. <https://doi.org/10.1189/jlb.1110644>
- Wiernicki, I., Parafiniuk, M., Kolasa-Woloski, A., Gutowska, I., Kazmierczak, A., Clark, J., ... Gutowski, P. (2019). Relationship between aortic wall oxidative stress/proteolytic enzyme expression and intraluminal thrombus thickness indicates a novel pathomechanism in the progression of human abdominal aortic aneurysm. *The FASEB Journal*, 33(1), 885–895. <https://doi.org/10.1096/fj.201800633R>
- Wu, Q. Y., Cheng, Z., Zhou, Y. Z., Zhao, Y., Li, J. M., Zhou, X. M., ... Fu, X. M. (2020). A novel STAT3 inhibitor attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm progression in mice through modulating vascular inflammation and autophagy. *Cell Death & Disease*, 11(2), 1–65, 131. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2326-2>
- Ye, J., Guo, R., Shi, Y., Qi, F., Guo, C., & Yang, L. (2016). miR-155 regulated inflammation response by the SOCS1-STAT3-PDCD4 axis in atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1–14, 8060182. <https://doi.org/10.1155/2016/8060182>
- Yoshimura, K., Morikage, N., Nishino-Fujimoto, S., Furutani, A., Shirasawa, B., & Hamano, K. (2018). Current status and perspectives on pharmacologic therapy for abdominal aortic aneurysm. *Current Drug Targets*, 19(11), 1265–1275. <https://doi.org/10.2174/1389450119666171227223331>
- Yu, Y., Li, X., Mi, J., Qu, L., Yang, D., Guo, J., & Qiu, L. (2018). Resveratrol suppresses matrix metalloproteinase-2 activation induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via interactions with AMP-activated protein kinase and suppressor of cytokine signaling 1. *Molecules*, 23(9), 1–12, 2327. <https://doi.org/10.3390/molecules23092327>
- Zhang, H., Watanabe, R., Berry, G. J., Tian, L., Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2018). Inhibition of JAK-STAT signaling suppresses pathogenic immune responses in medium and large vessel vasculitis. *Circulation*, 137(18), 1934–1948. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.117.030423>
- Zhang, Q., Guo, Y., Dong, R., Dai, R., & Zhou, M. (2015). Suppressor of cytokine signaling 1-modulated metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase in pulmonary fibrosis. *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 3855–3861. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3810>

**How to cite this article:** Bernal S, Lopez-Sanz L, Jimenez-Castilla L, et al. Protective effect of suppressor of cytokine signalling 1-based therapy in experimental abdominal aortic aneurysm. *Br J Pharmacol*. 2020;1–18. <https://doi.org/10.1111/bph.15330>