



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

TESIS DOCTORAL

**“Influencia de los factores de riesgo cardiovascular en los niveles
locales de factores angiogénicos en el aneurisma de aorta abdominal”**

realizada por:

Jaume Félix, Dilmé Muñoz

DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL

Dr. Luís, Vila Navarro

Dr. Secundino, Llagostera Pujol

Prof. Xavier, Rius i Cornadó

Departament de Cirurgia

Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona, 2014

**“Influencia de los factores de riesgo cardiovascular en los niveles
locales de factores angiogénicos en el aneurisma de aorta abdominal”**

Jaume Félix, Dilmé Muñoz

“Dedico el fruto del trabajo de todos estos años a Luisa, el amor de mi vida, por acompañarme en este largo camino y a Martina y a Bruna por iluminarlo, a mis padres y a mi hermana por su apoyo incondicional y a mis amigos por estar siempre que los he necesitado”

ÍNDICE:

ÍNDICE:	7
FINANCIACIÓN	11
CONFLICTOS DE INTERÉS	11
AGRADECIMIENTOS	13
RESUMEN	15
RELACIÓN ABREVIATURAS:	17
INTRODUCCIÓN:	21
1. <i>DEFINICIÓN ANEURISMA AORTA ABDOMINAL:</i>	23
2. <i>CLASIFICACIÓN ANEURISMAS DE AORTA:</i>	27
3. <i>EPIDEMIOLOGÍA ANEURISMAS DE AORTA:</i>	31
4. <i>ETIOPATOGENIA DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL:</i>	35
5. <i>PROCESOS INFLAMATORIOS AORTA ABDOMINAL:</i>	41
6. <i>PAPEL DE LA VÍA DE LA PGE₂ EN EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL:</i>	51
6.1 <i>PROSTANOIDES:</i>	51
6.2 <i>VÍA DE LA COX EN LA PARED DE LOS VASOS SANGUÍNEOS</i>	55
6.3 <i>PGE₂ Y AAA:</i>	60
7. <i>RIESGO DE ROTURA DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL:</i>	65
8. <i>TRATAMIENTO ACTUAL DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL:</i>	69
8.1 <i>CIRUGÍA CLÁSICA DE REPARACIÓN AAA:</i>	70
8.2 <i>CIRUGÍA DE REPARACIÓN ENDOVASCULAR DEL AAA:</i>	81
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:	87
MATERIAL Y MÉTODOS:	89
RESULTADOS:	107
1. <i>EVALUACIÓN DE LA HIPERVASCULARIZACIÓN Y DE LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA DE LA PARED DE LA AORTA ANEURISMÁTICA:</i>	109
2. <i>INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA EXPRESIÓN LOCAL DE ELEMENTOS DE LA FAMILIA DEL VEGF EN LA PARED DE LA AORTA ANEURISMÁTICA:</i>	119
3. <i>INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA EXPRESIÓN LOCAL DE METALOPROTEINASAS EN LA PARED DE LA AORTA ANEURISMÁTICA:</i>	127
4. <i>INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO EN LA EXPRESIÓN LOCAL DE LOS ELEMENTOS DE LA VÍA DE LA PGE₂:</i>	143
EXPRESIÓN DE LOS ENZIMAS IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE PGE ₂ EN MUESTRAS DE PARED AÓRTICA:	144
LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LA COX-1, COX-2 Y mPGES-1 Y ESTUDIO DE LOS TIPOS CELULARES IMPLICADOS EN LA VÍA DE SÍNTESIS DE LA PGE ₂	146
ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE PGE ₂ :	153
LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES PGE ₂ Y ESTUDIO GRUPOS CELULARES IMPLICADOS:	155
INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE LOS ELEMENTOS DE LA VÍA DE LA PGE ₂ :	160

DISCUSIÓN	167
CONCLUSIONES:.....	181
ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON ESTA TESIS DOCTORAL:.....	185
BIBLIOGRAFÍA:	186
ANEXOS	207

FINANCIACIÓN

Esta Tesis Doctoral, ha sido parcialmente financiada por:

- Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica, Proyecto SAF2009-09598.
- Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica, Proyecto SAF2010-21392.
- Por las RETICs del Instituto Salud Carlos III, RECAVA: encargada de Factores de riesgo, evolución y tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y sus mecanismos (Exp RD06/0014/1005) y RIC: Red Investigación Cardiovascular (Exp RD12/0042/0051).

CONFLICTOS DE INTERÉS

El autor de esta tesis doctoral y sus directores, expresan que no ha existido ningún conflicto de interés directo o indirecto durante la realización de la misma.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis por ayudarme a completar y mejorar constantemente este trabajo y especialmente al Dr. Vila y a la Dra. Camacho por su dedicación y tesón para despertar en mi la curiosidad investigadora.

A mis compañeros del “Hospital de la Santa Creu i Sant Pau”, por todo el esfuerzo y paciencia que han tenido conmigo y con mi carácter a lo largo de los años, para enseñarme lo poco que sé del arte de la medicina.

No me gustaría olvidarme del “*mundo de la Cirugía Vascul*ar”, incluyendo a todos los jefes, cirujanos, residentes, enfermeras, auxiliares y personal administrativo con los que he coincidido durante mi carrera profesional y que me han ayudado a ser quien soy.

Agradecer también a toda la gente con la que he trabajado en quirófano por hacerme sentir como en casa y el gran esfuerzo de todo el personal del LABVI sin el que esta tesis doctoral no se habría podido realizar.

RESUMEN

Muchos pacientes con aneurisma de aorta abdominal (AAA) tienen enfermedades comunes y factores de riesgo cardiovascular asociados. El factor de riesgo cardiovascular modificable más importante y clave en el AAA es el tabaquismo. La pared aórtica en pacientes con AAA muestra hipervascularización local, degradación de la matriz extracelular, un gran infiltrado linfocitario con reacción inflamatoria local y una disminución en el número de células vasculares de músculo liso. Sin embargo, la relación entre los factores de riesgo cardiovascular y enfermedades de base con los cambios histológicos en la pared aórtica aneurismática no se han determinado con claridad.

Nuestro objetivo fue evaluar los cambios en la concentración de factores locales pro-angiogénicos que participan en la neovascularización, la interrupción de la matriz extracelular y la infiltración leucocitaria de la pared aneurismática en relación con los factores de riesgo cardiovascular, así como establecer los mecanismos implicados en la génesis y el desarrollo de AAA. En este trabajo se ha estudiado la hipervascularización de la pared aórtica en diferentes etapas de la enfermedad y se ha evaluado la influencia de los factores de riesgo cardiovascular y de las enfermedades de base en los niveles de factores locales pro-angiogénicos bien establecidos tales como la vía del VEGF y MMP predominantes (MMP-2 y MMP-9), y de la vía de la PGE₂.

Hemos observado que la infiltración leucocitaria en la pared de la aorta aneurismática era predominantemente perivascular y de tipo linfocítico. El nivel máximo de esta infiltración parecía ser posterior a la hipervascularización inicial de los AAA. El análisis

de los resultados mostró que el tabaquismo activo fue el único factor de riesgo cardiovascular clásico que influyó en la hipervascularización y que afectó los factores pro-angiogénicos estudiados.

Fumar modifica la expresión de MMP-2, mPGES-1/EP-4 y, en menor medida, VEGFR-2, principalmente en relación con el estado de las células vasculares (CMLV y MVEC). Estos hallazgos sugieren que el tabaquismo activo afecta al estado de las células vasculares, más que a la infiltración leucocitaria.

Estos resultados proporcionan una visión más amplia de los efectos negativos del consumo de tabaco en el desarrollo de la AAA y muestran la necesidad de un control más agresivo de los factores de riesgo cardiovascular, incluso en etapas muy tempranas de la enfermedad.

RELACIÓN ABREVIATURAS:

- AAA: aneurisma de aorta abdominal.
- AcA: “Arachidonic Acid” o ácido araquidónico.
- AINEs: Anti Inflamatorios No Esteroideos.
- bFGF: “basic Fibroblast Growth Factor” o factor de crecimiento fibroblastos básico.
- BSA: “Bovine Serum Albumin” o suero con albúmina bovina.
- BTL-1: “Leukotriene B4 Receptor 1” o receptor del leucotrieno B4.
- cAMP: “Cyclic Adenosine MonoPhosphate” o Adenosín monofosfato cíclico.
- CD45: “Cluster of Differentiation 45” o cúmulo de diferenciación 45.
- CD48: “Cluster of Differentiation 68” o cúmulo de diferenciación 68.
- CML: Células Musculares Lisas.
- COX-1: isoenzima 1 de la ciclooxigenasa (constitutiva).
- COX-2: isoenzima 2 de la ciclooxigenasa (inducible).
- COX: “Cyclooxygenase” o ciclo-oxigenasa, también llamada “prostaglandin-endoperoxide synthase (PTGS)”.
- cPGES: PGE-sintetasa citosólica.
- CS: “Current Smokers” o fumadores actuales.
- DLP: Dislipemia.
- DM: Diabetes Mellitus.
- DMEM: “Dulbecco's Modification of Eagle's Medium” o modificación simple del Medio Basal de Eagle (BME)
- EAP: Enfermedad Arterial Periférica.
- ECM: “Extra Cellular Matrix” o matriz extracelular.
- eGFR: “estimated Glomerular Filtration Rate” o filtrado glomerular estimado.
- Egr-1: “early growth response gene-1”.
- eNOS: “endotelial Nitric Oxide Synthase” o óxido nítrico sintetasa endotelial, también conocido como óxido nítrico sintetasa 3 (NOS3).
- EP-1: “E-Prostanoid receptor 1” o receptor de los prostanoides E-1.
- EP-2: “E-Prostanoid receptor 2” o receptor de los prostanoides E-2.
- EP-3: “E-Prostanoid receptor 3” o receptor de los prostanoides E-3.
- EP-4: “E-Prostanoid receptor 4” o receptor de los prostanoides E-4.
- EP: “E-Prostanoid receptor ” o receptor de prostanoides E.
- EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.
- FBS: “Fetal Bovine Serum” o suero bovino fetal.
- FGF: “Fibroblast Growth Factor” o factor de crecimiento de fibroblastos.
- FLAP: “Five-Lipoxygenase Activating Protein” o proteína activadora de la 5 lipoxigenasa.
- FRCV: Factores de Riesgo Cardio-Vascular
- GRO α : “Growth-Related Oncogene α ”
- HTA: Hipertensión Arterial.
- HUVEC: “Human Umbilical Vein Endothelial Cells” o células endoteliales aisladas de vena de cordón umbilical humano.
- IECAs: Inhibidores Enzima Conversora Angiotensina.
- IL-1 β : Interleucina 1 beta.
- IP: receptor de la PGI₂ o prostaciclina.

- IR: Insuficiencia Renal.
- IRC: Insuficiencia Renal Crónica.
- ITB: Índice Tobillo Brazo.
- LD: “Large Diameter” o diámetro grande, ≥ 70 mm.
- LDL: “Low Density Lipoproteins” o lipoproteínas de baja densidad.
- MCP-1: “Monocyte Chemotactic Protein-1” o proteína quimioatrayente de monocitos 1.
- MD: “Moderate Diameter” o diámetro moderado entre 55-69.9 mm.
- MMP-2: “Matriz metaloproteínase- 2” o Metaloproteínasa de matriz extracelular 2 también llamada gelatinasa A.
- MMP-9: “Matriz metaloproteínase- 9” o Metaloproteínasa de matriz extracelular 9 también llamada gelatinasa B.
- MMPs: “Matriz metaloproteínases” o Metaloproteínasas de matriz extracelular.
- mPGES₂: PGE-sintetasa microsomal.
- mRNA: “Messenger Ribonucleic Acid” o ácido ribonucleico mensajero.
- MVEC: “Microvascular Endothelial Cells” o células endoteliales de microvasculatura.
- NA: “Normal Aorta” o aortas normales.
- NAP-2: “Neutrophil Activating Peptide-2”.
- NCS: “No Current Smokers” o no fumadores actuales.
- NF- κ B: “Nuclear Factor Kappa-B o Factor nuclear kappa B”.
- PCR: “Polymerase Chain Reaction” o reacción en cadena de la polimerasa.
- PECAM-1: “platelet endothelial cell adhesion molecule 1” o molécula de adhesión celular 1 entre plaquetas y células endoteliales.
- PGD₂: Prostaglandina D₂.
- PGDS: Prostaglandina D Sintetasa.
- PGE₂: Prostaglandina E₂.
- PGES: Prostaglandina E Sintetasa.
- PGF₂ α : Prostaglandina F₂ α .
- PGH₂: Prostaglandina H₂.
- PGI₂: Prostaglandina I₂ o prostaciclina.
- PGIS: PGI-Sintetasa o Prostaciclina Sintetasa.
- PGs: Prostaglandinas.
- PIGF: “Placenta Growth Factor” o factor de crecimiento de placenta.
- PMN: leucocitos polimorfonucleares.
- PPAR: “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor” o receptor activado de proliferador de peroxisoma activados.
- SD: “Small Diameter” o diámetro pequeño, < 55 mm.
- SEM: “Standar Error Media”
- TGF β : “Transforming Growth Factor beta”
- TIE-1: Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 1.
- TIMP: “Tissue Inhibitors of Metallo-Proteinases” o inhibidores tisulares de las metaloproteínasas.
- TNF α : “Tumoral Necrosis Factor alfa” o factor necrosis tumoral alfa.
- TxA₂: Tromboxano A₂.
- TxAS: TxA-Sintetasa.
- TxB₂: Tromboxano B₂.

- Txs: Tromboxanos.
- VE-Cadherin: Cadherin 5, type 2 or VE-cadherin (vascular endothelial) también conocida como CD144.
- VEGF-A: “Vascular Endothelial Growth Factor A” o factor de crecimiento endotelial vascular A.
- VEGF: “Vascular Endothelial Growth Factor” o factor de crecimiento endotelial vascular.
- VEGFR-1: Receptor-1 del VEGF o “Vascular Endothelial Growth Factor” o factor de crecimiento endotelial vascular.
- VEGFR-2: Receptor-2 del VEGF o “Vascular Endothelial Growth Factor” o factor de crecimiento endotelial vascular.
- VSMC: “Vascular Smooth Muscle Cells” o células musculares músculo liso.
- vWF: “ von Willebrand factor” o factor de von Willebrand.

INTRODUCCIÓN:

1. DEFINICIÓN ANEURISMA AORTA ABDOMINAL.
2. CLASIFICACIÓN ANEURISMAS DE AORTA.
3. EPIDEMIOLOGÍA ANEURISMAS DE AORTA.
4. ETIOPATOGENIA DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL.
5. PROCESOS INFLAMATORIOS AORTA ABDOMINAL.
6. PAPEL DE LA VÍA DE LA PGE₂ EN EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL:
 - 6.1 PROSTANOIDES
 - 6.2 VÍA DE LA COX EN LA PARED DE LOS VASOS SANGUÍNEOS
 - 6.3 PGE₂ y AAA
7. RIESGO DE ROTURA DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL.
8. TRATAMIENTO ACTUAL DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL.
 - 8.1 CIRUGÍA CLÁSICA DE REPARACIÓN AAA.
 - 8.2 CIRUGÍA DE REPARACIÓN ENDOVASCULAR DEL AAA

1. DEFINICIÓN ANEURISMA AORTA ABDOMINAL:

La arteria aorta, es la arteria principal y de mayor calibre del organismo. Nace directamente del corazón en la base del ventrículo izquierdo donde se localiza la válvula aórtica, tiene una porción corta y cefálica (aorta ascendente) que posteriormente realiza una curva de 180 grados a modo de cayado (arco o cayado aórtico) y desciende (porción aorta descendente) por la cara posterior del tórax (aorta descendente torácica)¹ y del abdomen (aorta abdominal)² anterior a la columna vertebral para bifurcarse en las 2 arterias ilíacas comunes o primitivas a nivel de la de la IV vértebra lumbar. De la arteria aorta nacen todas las demás arterias del organismo a excepción de las arterias pulmonares, que nacen en el ventrículo derecho del corazón. De ella se originan como vasos principales, los troncos supraórticos (tronco braquiocefálico, arteria carótida común izquierda y subclavia izquierda) que irrigan cabeza y extremidades superiores, las arterias viscerales (tronco celíaco, arteria mesentérica inferior y superior y ambas arterias renales) que irrigan todos los órganos abdominales y las arterias ilíacas comunes que originan todas las arterias que irrigan a los miembros inferiores.

La arteria aorta abdominal que es la más afectada por la patología aneurismática como veremos más adelante, es una continuación directa de la arteria aorta torácica descendente. Se trata de una estructura retroperitoneal que ocupa una posición central en la cavidad abdominal, estando recubierta por la continuación centro-abdominal de las hojas anterior y posterior de la fascia renal o de Gerota. Se extiende desde el hiato aórtico, situado en el diafragma, a la altura de la duodécima vértebra torácica, hasta la cuarta vértebra lumbar, dónde se bifurca en las dos arterias ilíacas comunes. En su descenso por la cavidad abdominal se sitúa en posición anterolateral izquierda respecto

a los cuerpos vertebrales y es paralela a la vena cava inferior. En cuanto al diámetro, mide de media 1.9 cm en mujeres y 2.3 en varones a nivel infrarrenal, siendo un poco mayor en la zona suprarrenal y pudiendo estar disminuida en pacientes que presentan patología oclusiva aortoilíaca asociada³. La arteria aorta abdominal es responsable directa de la irrigación de todos los órganos de la cavidad abdominal, la pelvis y de ambas extremidades inferiores. Sus ramas principales son, de craneal a caudal, el tronco celiaco, la arteria mesentérica superior, las dos arterias renales y la arteria mesentérica inferior. Las arterias renales son pares y salen de las paredes laterales de la aorta, mientras que los otros tres troncos emergen de la pared anterior. Además, la arteria aorta abdominal da varias ramas menores, como las arterias frénicas inferiores (que irrigan el diafragma), las arterias lumbares que salen en número par en ambos laterales de la aorta y la arteria sacra media, que emerge caudalmente en la bifurcación aórtica.

La pared vascular de la arteria aorta como la de las otras arterias del cuerpo humano, está formada por tres capas, la capa íntima que es la más interna y delgada y está compuesta por células endoteliales y una capa subendotelial de tejido conjuntivo y una capa interna elástica, la túnica o capa media formada principalmente por células musculares lisas y matriz extracelular y una capa adventicia que es la más externa, formada fundamentalmente por tejido conectivo, que engloba los “vasa vasorum” y la innervación del vaso. Esta distribución es muy importante para conocer la implicación etiopatogénica en la aparición de dilataciones aneurismáticas.

La función de la aorta es principalmente la de transportar y distribuir sangre rica en oxígeno a todas esas arterias y a los territorios que de ellas dependen, sin embargo al ser un conducto con propiedades elásticas, ejerce una función activa, distendiéndose

durante la sístole cardíaca para almacenar parte del volumen de eyección y aprovechar su capacidad de retracción elástica durante la diástole impulsando el remanente lo que garantiza el mantenimiento del flujo a la periferia durante la diástole cardíaca.

Debido a su exposición continua a la presión pulsátil del corazón y a las fuerzas de cizallamiento que presenta por diversos anclajes anatómicos (istmo, diafragma...) está particularmente predispuesta a sufrir lesiones secundarias a trauma mecánico, siendo mayor el riesgo de ruptura y de aparición de dilataciones aneurismáticas que en otras localizaciones anatómicas.

El aneurisma de aorta abdominal (AAA) se define como aquella dilatación localizada, progresiva y permanente de la aorta subdiafragmática que sea en su diámetro transversal máximo, igual o superior al 50% de su diámetro normal⁴, es decir 1.5 veces mayor del diámetro aórtico esperado.

En pacientes mayores de 50 años, se consideran normales unos diámetros para arteria aorta abdominal, entre 14-21mm para las mujeres y 16-24mm para los varones, es por ello que se acepta también como definición de aneurisma aorta abdominal infrarrenal aquella dilatación que sea mayor de 3cm en diámetro transversal⁵.

La arteria aorta puede presentar dilataciones aneurismáticas en todo su recorrido, desde su porción ascendente, hasta su porción abdominal más distal, siendo en esta localización donde se dilata con mayor frecuencia, sobretodo en la arteria aorta abdominal infrarrenal, es decir por debajo de la salida de las arterias renales.

Estos aneurismas habitualmente presentan una morfología fusiforme y su crecimiento suele ser lento y progresivo a lo largo de los años. El término ectasia se reserva para definir dilataciones aórticas menores, es decir por debajo de los 3cm y el término arteriomegalia se utiliza habitualmente para describir una ectasia difusa de la aorta y de los vasos distales^{6,7}.

Los AAA representan una patología grave por diversos factores, por que la arteria afectada es la de mayor diámetro del organismo con las implicaciones que puede implicar su ruptura, históricamente relacionado con su tamaño, y por su presentación habitualmente silente. Es por ello que hoy en día una de las patologías vasculares mas importantes en las unidades de Angiología y cirugía Vascular, Anestesiología y Reanimación y las de Cuidados Intensivos Postquirúrgicos.

2. CLASIFICACIÓN ANEURISMAS DE AORTA:

Las clasificaciones de la patología aneurismática existentes, suelen ser genéricas, refiriéndose habitualmente a las posibles localizaciones de los aneurismas arteriales. En el sector aórtico, podemos clasificarlas además de por su localización, según su morfología, etiología y estructura.

Morfológicamente, los aneurismas puede ser fusiformes o saculares y lobulados. Los aneurismas fusiformes son mucho más comunes (90%) y la dilatación aneurismática afecta a toda la circunferencia del diámetro arterial a modo de huso, por el contrario la morfología sacular (10%) es mucho menos frecuente y el riesgo de rotura que presentan es mucho mayor debido a la afectación exclusiva de una porción de la pared arterial por lo que la tensión que soporta la pared del aneurisma es mayor que en los aneurismas fusiformes según la ley de Laplace: $T=PR$; donde “T” representa la tensión que sufre la pared, siendo directamente proporcional a la presión arterial “P” y al radio del vaso “R”. Los aneurismas lobulados pueden presentar múltiples protuberancias secundarias a la dilatación principal, lo que se considera un signo de alarma por crecimiento rápido y posible rotura inminente y debe descartarse la existencia de un proceso infeccioso local. Es importante no confundir los aneurismas saculares verdaderos, es decir con afectación y dilatación de las 3 capas arteriales con los falsos aneurismas o “pseudoaneurismas” que habitualmente son secundarios a roturas contenidas y en los que no está afectadas todas las capas sino que existe una disrupción local de algunas de las capas y el fluido sanguíneo se contiene habitualmente por la capa más externa o adventicia.

Si nos basamos en su localización, veremos que pueden afectar a distintos sectores, englobando a la aorta torácica (aorta ascendente, arco o aorta descendente), aorta abdominal (aorta visceral, suprarrenal, yuxtarenal o infrarenal) o formas mixtas por combinación de las anteriores lo que conocemos como aneurismas tóraco-abdominales que se dividen en 5 tipos, 4 definidos por el Dr. Crawford ampliado con un quinto por el Dr. H. Safi⁸.

Según su etiología, clásicamente los AAA más frecuentes han sido atribuidos a un proceso degenerativo de tipo arterioescleroso y en segundo lugar, los debidos a procesos infecciosos de la pared aórtica (micóticos). La infección puede desempeñar también un papel determinante en los falsos aneurismas protésicos. Otras formas etiológicas de tipo arterítico o colagenótico, son excepcionales en el sector aórtico, si bien se describen con cierta frecuencia en los aneurismas periféricos. Igualmente excepcional, es el origen traumático, con rotura parcial o total (contenida) de la pared de la aorta y posterior dilatación.

Una forma etiológica de difícil clasificación, es la que da lugar a los denominados aneurismas de aorta abdominal inflamatorios (AAAI) descritos por primera vez por Walker en 1972⁹. Se considera que representan un 4-5% de los AAA y son de etiología desconocida¹⁰⁻¹³, pero con características clínico-diagnósticas y enfoque terapéutico, distinto de los arterioesclerosos¹⁴. Se trata de aneurismas caracterizados por engrosamiento difuso de la pared arterial y extensa fibrosis que engloba a los tejidos adyacentes. Existen distintas hipótesis para explicar la patogenia de esta entidad diferenciada de los AAA degenerativos, tanto desde el punto de vista clínico, analítico como epidemiológico. Algunos autores postulan que los AAAI representan el extremo

del proceso inflamatorio presente en todos los AAA¹⁵ sin embargo otros autores relacionan esta entidad con procesos autoinmunes¹⁶ o con una respuesta exagerada a agentes infecciosos¹⁷ y, recientemente, se ha descrito una relación estrecha entre las inmunoglobulinas G4 (Ig G4) y los AAAI¹⁸.

Según su estructura debemos hablar de aneurisma verdadero o falso aneurisma (pseudoaneurisma), en función de que conserve o no la estructura completa o parcial, de la pared arterial. Hablamos de aneurisma verdadero cuando afecta a las tres capas arteriales; sin embargo cuando existe una lesión arterial con rotura de la capa íntima y/o media y hay una cavidad de sangre comunicada con la luz del vaso y contenida por la adventicia, tejidos adyacentes o hematoma local hablamos de falso aneurisma o pseudoaneurisma.

Este tipo de falso aneurisma se puede producir con relativa frecuencia en aortas que ya presenta un injerto de sustitución a nivel de las anastomosis, habitualmente por degeneración local o por rotura de la sutura anastomótica, sin que exista componente infeccioso.

Un concepto a mi entender erróneo es el de "Aneurisma disecante", que engloba 2 conceptos distintos: el aneurisma ateroscleroso clásico que presenta una complicación a nivel de la pared arterial localmente y que es mas frecuente en el sector torácico (úlceras aórticas, disección localizada,..) o una degeneración aneurismática de una disección arterial crónica habitualmente de tipo B en el que existe claramente una separación de las capas arteriales aórticas que debilita de modo crónico la estructura del vaso pudiendo aumentar su diámetro con más facilidad.

3. EPIDEMIOLOGÍA ANEURISMAS DE AORTA:

El AAA es trastorno relativamente común y de aparición tardía que afecta a un alto porcentaje de la población de los países industrializados cuya ruptura AAA tiene una alta mortalidad¹⁹.

La prevalencia real de los AAA es desconocida por sus propias peculiaridades nosológicas, como enfermedad asintomática en más del 60-70% de los casos, y crecimiento lento e imprevisible^{20, 21}, sin embargo la progresiva utilización y alta fiabilidad de los ultrasonidos en el diagnóstico de los AAA, ha aportado una gran información a su conocimiento epidemiológico²². De forma indirecta se estima la aparición de 30-40 nuevos casos por 100.000 habitantes/año²¹.

La causa más frecuente de mortalidad por AAA es por rotura, cuya tasase sitúa entre el 1-2% de la población adulta, en USA, Europa y Australia²³.

La extrapolación de los datos epidemiológicos a la población española en 2007 (45.2 millones de habitantes en enero), ofrecía las siguientes cifras aproximadas: Prevalencia global: 290.000 AAA; mortalidad por rotura aneurismática: 8.100-9.300 habitantes/año.

La prevalencia de los AAA se conoce mucho mejor por estudios autópsicos que muestran una tasa de prevalencia entre el 1-5%^{24, 25}, aumentando con la edad y siendo más frecuente en los varones añosos de raza blanca²⁶. Se considera aceptable en el momento actual, afirmar que entre el 3 y el 8.9% de la población adulta masculina

(mayores de 50 años), afectando en menor medida, (1-2.2%) a la población femenina adulta en estudios de población²⁷.

La incidencia aumenta como es de esperar en población añosa, presentando un aumento lineal y pudiendo representar una prevalencia del 7.7% en pacientes mayores de 60 años²⁸ que aumenta hasta el 10% en varones mayores de 75 años²⁹. Esta prevalencia tiende a igualarse entre ambos sexos a partir de la octava década de la vida.

Cuando estudiamos otros grupos de riesgo, encontramos los siguientes resultados: mayor prevalencia de patología aneurismática a nivel de la aorta abdominal en pacientes con síndrome coronario agudo y estenosis coronarias mayores del 50%, posiblemente porque a su vez se trate de un subgrupo de población añosa y con enfermedad aterosclerosa difusa³⁰.

Debido a que posiblemente se trate de una manifestación local de una enfermedad sistémica como es la aterosclerosis también encontramos doblada su incidencia (11.1%) en pacientes varones que han presentado algún tipo de evento neurológico isquémico a modo de accidente vascular cerebral (AVC) o de accidente isquémico transitorio (AIT)³¹ o en aquellos con afectación ateromatosa de los troncos supraórticos^{32, 33} o arteriopatía ocliterante de extremidades inferiores³⁴⁻³⁶.

Parece afectar en menor proporción a los individuos de raza negra³⁷, aunque pueden tener diámetros aórticos ligeramente más aumentados de base que los caucásicos³⁸.

En aquellos pacientes con enfermedad arterial periférica, sobretodo sintomáticos, también se aprecia una prevalencia aumentada de enfermedad aneurismática, presentando ectasias en aorta abdominal el 12% de las mujeres y el 20% de los hombres respecto a los grupos control (2%)³⁹. También se ha asociado un aumento de la prevalencia de aneurismas abdominales y de la enfermedad arterial periférica en pacientes con sobrepeso⁴⁰.

Pacientes con aneurismas en otras localizaciones (poplíteos, femorales, etc.) presentan una prevalencia de AAA del 20-40 %^{22, 29, 41}.

Existe una posible base genética del AAA, ya que el cribado de AAA en familiares en primer grado muestra un aumento de los mismos⁴², especialmente en hermanos, ha detectado una prevalencia muy aumentada, entre el 15-27%^{43, 44}.

Existen otros factores pueden favorecer la aparición de un AAA por encima de lo esperado entre la población normal, como el tabaco⁴⁵, la dislipemia⁴⁶, la hipertensión arterial⁴⁷ y la insuficiencia respiratoria⁴⁸, habiéndose encontrado elevada su prevalencia, entre los trasplantados de corazón^{49, 50}.

Los estudios de población, general o de riesgo, para detectar AAA se basan en la fiabilidad del estudio ecográfico, por lo que es importante no olvidar sus limitaciones, tanto por parte del paciente, como las del propio ecografista. A pesar de estas limitaciones observadas, la ecografía, es el método de elección para realizar el cribado o «screening» diagnóstico de los AAA detectando sin problemas diámetros superiores a los 3cm, pudiendo disminuir la incidencia de AAA rotos de manera notable al indicar

cirugía de reparación profiláctica antes de su rotura⁵¹. Estos programas de despistaje para el diagnóstico precoz de los AAA, están particularmente indicados en los subgrupos de riesgo como pueden ser los familiares de primer grado de pacientes portadores de AAA, pacientes portadores de arteriopatía ocluyente de los miembros, enfermedad coronaria, isquemia cerebro-vascular, hipertensión arterial y/o aneurismas arteriales de otras localizaciones.

Como se puede observar, uno de los problemas que se nos plantea, es el de encontrar un criterio cuantitativo común, ya que la prevalencia de AAA estará en función del diámetro aceptado como criterio diagnóstico. Así, la prevalencia es de 4.6% si se considera que el diámetro es >3 cm, bajando al 1.2% si se considera un diámetro >4 cm, y un 0.5% si el valor es >5 cm, tamaño éste que se considera como indicación de cirugía electiva.

4. ETIOPATOGENIA DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL:

El mecanismo fisiopatológico primario causante de la formación de los AAA no está definido claramente, sin embargo, existe una corriente de opinión mayoritaria que considera el AAA como una consecuencia directa o indirecta de la arteriosclerosis^{52, 53}, aunque queda claro que éste no es el único factor etiológico. De hecho, se desconoce el porqué la enfermedad arterioesclerótica evoluciona en unas ocasiones hacia la oclusión vascular y en otras hacia la dilatación o aneurisma.

Aunque en ambas patologías, existe una inflamación crónica de la pared del vaso, existen diferencias relevantes entre las lesiones ateroscleróticas y los AAA. Considerando que la placa aterosclerótica se caracteriza por la infiltración de leucocitos en el lumen y una hiperproliferación de células musculares lisas vasculares (VSMC, “vascular smooth muscle cells”) que provoca una hiperplasia de la capa media, sin embargo la infiltración de leucocitos de la túnica adventicia y el descenso de las VSMC de la capa media son características típicas del AAA⁵⁴.

Parece existir en los AAA una respuesta inflamatoria crónica en la que los macrófagos y los linfocitos T, juegan un papel predominante. Esta afectación también tiene lugar en la arteriosclerosis obliterante, aunque en el caso de los aneurismas las capas arteriales afectadas son la media y la adventicia, y en el caso de la patología estenosante se afectan, sobre todo, la íntima y la media arteriales. Podría considerarse, por tanto, que ambos procesos son una “respuesta al daño” que se desarrolla en dos direcciones distintas, la arteriosclerosis condiciona una reducción de la luz arterial mientras que en

los aneurismas se produce una expansión de ésta, atenuada en parte por el depósito de trombo mural.

Otra característica particularmente importante del AAA es la disminución de la resistencia de la pared vascular causada por una destrucción progresiva de las fibras elásticas por enzimas proteolíticas⁵⁵. La angiogénesis se considera como un proceso relevante que puede contribuir al desarrollo y la rotura de los aneurismas⁵⁶⁻⁵⁹.

Independientemente de la etiopatogenia definitiva en la formación y crecimiento de los AAA se ha observado una carga genética importante en los pacientes con aneurismas a lo largo de los años y actualmente se tiende a considerar al AAA como un proceso donde existe una interacción de factores genéticos y ambientales^{19, 55, 60, 61}.

Desde el punto de vista genético, el AAA es un proceso complejo al no seguir una herencia mendeliana simple y donde la suma de múltiples genes, cada uno de ellos interaccionando con factores ambientales, determinan en cada individuo el grado de susceptibilidad a padecer la enfermedad. En este contexto, desde 1977⁶² se conoce que una historia positiva en familiares de primer grado de los pacientes con AAA, aumenta el riesgo de padecerlo en 10 veces. En 1986, Johansen y Koepsell⁶³ compararon la historia familiar de 250 pacientes con AAA y 250 controles. Encontraron que 19.2% de los pacientes manifestaron tener un familiar de 1er grado con historia de AAA, mientras que sólo el 2.4 % de los controles lo tenían. Otros estudios han reportado una mayor prevalencia de AAA en hermanos de pacientes con AAA (4.4%) que en controles sanos (1.1%). Estos y otros estudios han demostrado la implicación de factores genéticos en

la aparición y progresión de esta patología. Recientemente, en un estudio en gemelos, se ha reportado que la heredabilidad del AAA es del 71%⁶¹.

De entre los factores ambientales, el tabaquismo es actualmente el factor de riesgo conocido más relevante en el AAA^{64, 65}. Así, la odds ratio (OR) de padecer un AAA en fumadores con respecto a no fumadores es de 5.57 (IC 95%, 4.24-7.31). Además, la asociación entre el hábito de fumar y el AAA aumenta significativamente con el número de años que se ha sido fumador, y disminuye proporcionalmente al número de años en que se ha abandonado este hábito. El tabaquismo⁶⁶, o la propia ateromatosis aórtica, se consideran contribuyentes a la génesis de los AAA, teniendo como factor común su participación en el debilitamiento de la pared de la aorta abdominal y su progresiva dilatación^{67, 68}.

Tradicionalmente se había considerado que la patogenia de los AAA estaba relacionada con la enfermedad cardiovascular: arteriosclerosis e isquemia coronaria⁶⁹. Estudios y revisiones sistemáticas posteriores constataron que la magnitud del riesgo relativo de padecer un AAA era aún mayor y que se asociaba de forma independiente con el tabaquismo, más que con la enfermedad cardiovascular⁶⁴. Recientemente se ha evidenciado un incremento significativo de algunos de los factores de la coagulación, entre otros, fibrinógeno, plasmina y dímero-D, y de la inflamación (IL-6) en plasma en pacientes con AAA y este incremento se puede asociar a su vez con un mayor riesgo de padecer un AAA, que con ser fumador o ser diagnosticado de una EPOC⁷⁰. Dichos resultados sugieren una posible patogenia “inflamatoria” del AAA independiente de la clásica, que postulaba una patogenia asociada a la de la enfermedad cardiovascular.

Esta posible patogenia inflamatoria, podría ser la causante de la relación de la patología aneurismática abdominal con la enfermedad obstructiva crónica (EPOC), ya que un número significativo de pacientes con AAA padecen una EPOC (49%)⁷¹, y viceversa (7%)⁷². Aunque la EPOC está ocasionada por el efecto tóxico directo que la inhalación del humo del tabaco sobre las vías respiratorias de algunas personas susceptibles de enfermar, en la actualidad también se la considera una enfermedad inflamatoria sistémica⁷³ y diversos estudios han constatado en las personas afectadas de EPOC, existe un incremento significativo de algunos mediadores de la inflamación inespecífica (PCR, fibrinógeno) o los relacionados con la activación de los neutrófilos (TNF- α , IL-8 e IL-6) en plasma⁷⁴. Otros estudios sugieren además una alteración de la angiogénesis del endotelio vascular pulmonar, incrementando la síntesis de VEGF, tanto en pacientes con EPOC como en fumadores con función pulmonar normal⁷⁵. En dicho sentido, se ha propuesto que la activación de la inflamación y de la homeostasis, en respuesta a una posible agresión externa en sujetos genéticamente susceptibles, podrían ser la causa, o formar parte de la misma, de ambas enfermedades ^{64, 69, 74}.

Debido a todas estas observaciones, se podría suponer que el AAA y la EPOC comparten una patogenia inflamatoria común, por la que el tabaquismo de algunas personas genéticamente susceptibles, actuaría como desencadenante de una anómala respuesta inflamatoria sistémica, que entre otros mecanismos, conllevaría una lesión del endotelio abdominal aórtico y del epitelio bronquial, causantes respectivamente, del AAA y de la EPOC.

Otros factores que pueden favorecer la aparición de un AAA son los procesos infecciosos de la pared aórtica. Tanaka y col.¹⁷ demostraron que en la pared de los aneurismas es

más frecuente encontrar ADN del virus del herpes simple o del citomegalovirus que en la pared de la aorta normal. Por otra parte, la infección por *Chlamydia pneumoniae* se ha asociado con varias manifestaciones de la arterioesclerosis, entre ellas el AAA⁷⁶.

Determinadas enfermedades renales como la poliquistosis renal, trastorno autosómico dominante, se han relacionado con los AAA^{77, 78} y existen factores mecánicos que aumentan la tensión sobre la pared arterial, como la hipertensión arterial que pueden acelerar su crecimiento y rotura. Es posible que sean los trastornos del tejido conectivo junto a la HTA los responsables de la asociación de AAA y enfermedad renal.

Por añadidura, algunos de estos factores de riesgo tienen su propia base genética e interaccionan entre ellos lo que complica mucho comprender la etiología de los AAA y su comportamiento evolutivo.

5. PROCESOS INFLAMATORIOS AORTA ABDOMINAL:

La evidencia actual muestra que la inflamación de la pared aórtica, la degradación proteolítica de las fibras elásticas, el agotamiento de las VSMC y la hipervascularización del tejido aórtico, son las características principales del AAA y que juegan un papel fundamental en la evolución y la progresión de la enfermedad.

Como hemos comentado, la observación de procesos inflamatorios en la pared en los AAA es muy frecuente⁷⁹ aunque presentan diferencias sustanciales respecto a la pared aórtica ateromatosa no aneurismática^{80, 81} como el predominio de linfocitos T en las aortas ateromatosas y de tipo T y B en las aneurismáticas, y la afectación constante de la adventicia en los AAA y sólo en fases muy avanzadas en la ateromatosis aórtica no aneurismática.

Existen fundamentalmente dos procesos bioquímicos y celulares implicados en la dilatación aneurismática y su posterior ruptura: la proteólisis de la matriz extracelular (ECM) en la pared vascular y la apoptosis de las VSMC⁸². En ambos procesos las proteasas juegan un papel central ya que causan la degradación de la ECM e inducen anoikis en las VSMC^{54, 55, 83}.

Los infiltrados inflamatorios y los neovasos infiltrantes producidos mediante angiogénesis, son una fuente relevante de MMPs en la pared del AAA y pueden contribuir de manera esencial a la inestabilidad de la pared aneurismática⁸⁴. Esto podría perpetuar un peligroso círculo vicioso, ya que a más MMPs, más degradación de la ECM que a su

vez podría favorecer estructuralmente la propia neovascularización facilitando la formación de nuevos agregados inflamatorios locales.

La proteólisis de la ECM es un hecho característico de los AAA con destrucción de las fibras elásticas de la capa media. Estas fibras elásticas son el principal componente estructural de las grandes arterias, por lo que es de suponer que si se afectan, debido a un efecto continuo del flujo sanguíneo especialmente en pacientes que presenten hiperaflujo por HTA, exista una pérdida de resistencia mecánica de la arteria que favorezca su expansión a modo de AAA, pudiendo llegar a la ruptura si se supera el índice de resistencia del tejido. Estas fibras elásticas se componen principalmente de elastina⁸⁵, es por ello que las elastasas, es decir las proteasas que pueden degradar la elastina, han sido ampliamente estudiadas en la formación de AAA. Algunos autores han reportado que en fases iniciales de la enfermedad hay una desaparición de elastina sin alteraciones del colágeno, mientras que en muestras de AAA rotos si que se aprecia una disminución del colágeno de la ECM⁸⁶.

De las distintas clases de elastasas, las metaloproteinasas de la ECM (MMPs) y sus inhibidores fisiológicos, los TIMP (Tissue Inhibitors of Metallo-Proteinases), constituyen una familia particularmente relevante. Estas metaloproteinasas, se expresan prominente en los aneurismas humanos y han sido el grupo más estudiado de proteinasas que degradan la matriz en la investigación del aneurisma^{87, 88}.

Para que la degradación de un tejido sea efectiva no es suficiente con que se afecte una sola proteína, sino que se deben afectar varias proteínas estructurales que en conjunto conducen a una debilidad de la ECM del propio tejido. Por ejemplo , la destrucción de

cartílago articular en la osteoartritis implica la degradación de colágeno agregano , tipo II , y otros componentes de la matriz por muchas enzimas diferentes producidos por una variedad de tipos de células⁸⁹. Este concepto se puede extender a la enfermedad vascular, informando de que la formación de aneurismas en ratones requiere la actividad de por lo menos dos metaloproteinasas de la matriz (MMPs) , gelatinasa A (MMP-2) y gelatinasa B (MMP-9)⁹⁰. Sin embargo no todas las MMPs están implicadas del mismo modo. Distintos modelos animales han mostrado evidencia que animales “knock-out” para algunas MMPs no desarrollan aneurismas, como por ejemplo animales sin MMP-9⁹⁰, que es un producto de las células inflamatorias, principalmente macrófagos⁹¹ pero si lo hacen los animales sin MMP-12⁹².

Distintas variantes genéticas de las metaloproteinasas de la ECM (MMP) se han relacionado con los AAA⁹³, y como hemos visto, particularmente la MMP-2 (Gelatinasa A) y MMP-9 (Gelatinasa B) juegan un papel fundamental en todos esos procesos^{58, 94, 95} y parecen especialmente importantes en el desarrollo del AAA humano^{87, 96}, aunque también se ha descrito la implicación de la MMP-1, 2, 3, 8, 10, 12 y 13.

Numerosas publicaciones han documentado el aumento de expresión de MMP asociadas a los AAA. En concreto las MMP-2 y MMP-9, son las MMPs más importantes⁹⁷⁻⁹⁹ y ambas tienen una actividad elastolítica y proteolítica similares. Se degradan colágenos desnaturalizados, gelatinas y un número de moléculas de ECM, incluyendo colágeno de tipo IV, V y XI, laminina y agregano proteína del núcleo⁹⁴.

La MMP-2 la producen células mesenquimales, mientras que la MMP-9 la secretan los neutrófilos, macrófagos y los osteoclastos derivados de los macrófagos que a su vez

participan en la respuesta inflamatoria. La excesiva degradación de elastina y posiblemente de otros componentes no colagenóticos de a ECM junto con la presencia de un infiltrado inflamatorio en la pared de los AAA, han hecho que se haya estudiado en profundidad la relación de MMPs en la enfermedad aneurismática⁹⁶. Algunos grupos incluso han postulado que para que se produzca un aneurisma deben actuar en conjunción MMP-2 y MMP-9⁹⁰.

Las MMPs se cree que son responsables de la degradación de las proteínas del tejido conectivo, una función claramente interpretada por varios miembros de la familia. Sin embargo, la degradación de la matriz no es la única función de estas enzimas⁹⁴. Varios informes de los últimos años han sugerido o demostrado que diversas MMP pueden activar una variedad de proteínas no de la matriz, incluyendo citocinas, quimiocinas, integrinas, y péptidos antimicrobianos¹⁰⁰. Por lo tanto, las MMP no deben considerarse únicamente como proteinasas de la ECM, sino más bien como enzimas de procesamiento extracelulares implicadas en la regulación de eventos de señalización célula-célula y célula- ECM^{101, 102}.

Además, una característica clave de los AAA es la hipervascularización del tejido aórtico. Se ha propuesto, que esta vascularización podría contribuir al desarrollo y la rotura de los aneurismas^{58, 103}, y podría desempeñar un papel causal en la génesis de los AAA⁹⁷.

Un número de evidencias experimentales han señalado el papel esencial de la MMP-2 y de la MMP-9 en el inicio de la angiogenesis^{95, 104}. Por lo tanto, los niveles locales de MMP-2 y MMP-9 en la pared aórtica, podrían ser utilizados como marcadores razonables del progreso de los AAA y de su riesgo de ruptura.

En las lesiones aneurismáticas también se ha observado la presencia de concentraciones elevadas de serina-proteasas, como la elastasa derivada de neutrófilos, así como cisteína-proteasas, implicadas en la degradación de la ECM y la anoikis de las CML^{90, 105-108}.

No sólo los leucocitos, sino que también las VSMC producen proteasas y representan la fuente principal de inhibidores de proteasas en la pared vascular. La interacción entre los leucocitos, fundamentalmente neutrófilos y macrófagos, y las células vasculares es crucial en estos procesos degradativos^{105, 109-111}.

La autoinmunidad parece jugar un papel en la patogenia de esta enfermedad¹¹² Este es un punto importante para posibles desarrollos terapéuticos futuros, pues abre un nuevo camino para la utilización de fármacos inmunomoduladores y antiinflamatorios, que podrían reducir el proceso inflamatorio y así detener el crecimiento de los aneurismas.

A su vez esta ECM parcialmente lisada, será menos densa y permitirá creación y desarrollo de nueva vascularización local y esta neovascularización es un fenómeno íntimamente relacionado con la ruptura de los AAA ^{56-58, 103}. La neovascularización está mediada por factores pro-angiogénicos que incluyen, además de las MMPs, quimiocinas y factores de crecimiento para las células endoteliales, tales como el VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), IL-8, MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) y los prostanoïdes entre otros.

El VEGF (VEGF-A) “Vascular Endothelial Growth Factor” o factor de crecimiento endotelial vascular, es un miembro de una familia de factores de crecimiento estrechamente relacionadas, que ahora incluye VEGFs B, C, D, E y el factor de crecimiento de placenta (PIGF)¹¹³⁻¹¹⁵. El VEGF, es miembro de una familia de proteínas relacionadas estructuralmente que actúan como ligandos de la familia de receptores del VEGF (VEGFR)¹¹⁶.

El VEGF es esencial para la diferenciación celular endotelial (vasculogénesis) y para el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes (angiogénesis)^{113, 117} y sobre la perpetuación de estos vasos sanguíneos inmaduros (mantenimiento vascular) al unirse y activar dos receptores de membrana tirosin-kinasa relacionados estructuralmente, el VEGFR-1 (conocida como Flt-1) y el VEGFR-2 (KDR/Flk-1), que comparten homología del 44% de sus aminoácidos^{114, 115} y que son expresados por las células endoteliales de la pared vascular. La unión del VEGF a estos receptores inicia una cascada de señales que finalmente estimula el crecimiento, la supervivencia y la proliferación de las células del endotelio vascular. Las células endoteliales, desempeñan funciones en procesos tan variados como la vasoconstricción/vasodilatación y la presentación de antígenos y son componentes esenciales de los vasos sanguíneos, ya sean capilares, venas o arterias. Por lo tanto, al estimular las células endoteliales, el VEGF desempeña un papel central en la angiogénesis^{118, 119}.

La expresión del VEGF es estimulada por múltiples factores proangiogénicos, incluidos el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento fibroblástico básico, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas y la interleuquina-1 alfa y beta¹²⁰. Los niveles de VEGF también están regulados directamente por condiciones ambientales

como el pH, la presión y los niveles de oxígeno^{121, 122}. El impacto global de estos diferentes factores es la estimulación, mediada por el VEGF, de la expresión de factores importantes para la angiogénesis, incluidas las proteínas anti-apoptóticas, las moléculas de adhesión celular y las metaloproteinasas de la matriz (MMP) que están íntimamente ligadas a la destrucción de la ECM en los AAA como veremos.

Los vasos sanguíneos inmaduros existen principalmente durante el desarrollo y en los adultos sólo en ciertas situaciones, por ejemplo en la cicatrización de heridas y en enfermedades que se caracterizan por una angiogénesis anómala como el cáncer o como veremos en esta tesis en los AAA. En ausencia de señales de crecimiento, las células endoteliales de estos vasos sanguíneos inmaduros están sujetas a una muerte celular programada (apoptosis). El VEGF contribuye a evitar la apoptosis de las células del endotelio vascular, manteniendo así su viabilidad¹²³. Por el contrario, los vasos sanguíneos maduros que forman el sistema vascular adulto ya no dependen del VEGF para la supervivencia y, de este modo, es improbable que resulten afectados por la inhibición del VEGF.

El VEGF también estimula la permeabilidad de los vasos sanguíneos pequeños. Esta aumentada permeabilidad causa la filtración de proteínas plasmáticas y la formación de un gel extravascular de fibrina. Este gel proporciona un ambiente adecuado para el crecimiento de las células endoteliales. Sin embargo si los niveles de VEGF son excesivos como puede suceder en algunos tumores, el sistema vascular se vuelve excesivamente permeable aumentando la presión intersticial local en la zona hiperestimulada, generando un suministro desigual de nutrientes y oxígeno con diferentes patrones proinflamatorios locales.

Actualmente es evidente que esta citocina regula múltiples funciones biológicas en las células endoteliales, entre los que se mejoran la producción de mediadores vasoactivos, aumento de la expresión de componentes de las vías trombolíticas y de la coagulación, la supresión de la hiperplasia de células de músculo liso neointimales (VMSC), la inhibición de la trombosis, la hipotensión y la vasorrelajación^{124, 125}. VEGF es también un factor pleiotrópica con efectos sobre diversos tipos de células y tejidos^{126, 127}.

Puede promover la formación de vasos linfáticos, tiene efectos sobre la función inmunitaria mediante la inhibición de la maduración de las células dendríticas y la estimulación de la quimiotaxis de los monocitos y contribuye a la supervivencia de las células madre hematopoyéticas y a su movilización hacia los sitios de angiogénesis en los adultos.

La complejidad de la biología de VEGF es paralela a la complejidad emergente de las interacciones entre ligandos de VEGF y sus receptores, y las vías de señalización que median. A pesar de que el conocimiento sobre el VEGF es cada vez mayor, sobretodo en lo que refiere a los mecanismos intracelulares que median la acción de VEGF en el endotelio, las áreas importantes de la señal de transducción del receptor de VEGF aún no se han dilucidado al igual que los mecanismos que median la regulación de la permeabilidad vascular VEGF que aún en gran parte están sin definir. También se deben estudiar mejor cuales son las señales que se transmiten desde los receptores de VEGF al núcleo, con el fin de generar la información necesaria para la diferenciación de células endoteliales, y los complejos cambios celulares implicados en la angiogénesis de ramificación. Estas respuestas probablemente implican la generación de señales de

largo alcance mediadas a través de un programa de la expresión génica. VEGF se ha demostrado que induce la expresión de varios factores de transcripción¹²⁸, pero si o cómo éstos están vinculados a los efectos de desarrollo o angiogénicos de VEGF no queda claro¹¹⁶.

6. PAPEL DE LA VÍA DE LA PGE₂ EN EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL:

6.1 PROSTANOIDES:

Los prostanoides, que incluyen prostaglandinas (PGs) y los tromboxanos (Txs) pertenecen a un notable grupo de compuestos llamados eicosanoides derivados de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos, siendo el más prominente el ácido araquidónico (AcA). El AcA se encuentra generalmente en fosfoglicéridos de las membranas celulares de los mamíferos y es liberado por las fosfolipasas. Los eicosanoides, están implicados en una variedad de procesos clínicamente importantes, tales como la inflamación, la fiebre, la trombosis, las respuestas alérgicas e inmunes y el cáncer entre otras.

La síntesis de prostanoides se inicia con la formación de peróxidos cíclicos a partir de ácidos grasos poli-insaturados que se llaman endoperóxidos. La PGH₂ es el endoperóxido intermedio común en la síntesis de prostanoides derivados del AcA (Figura 1). La conversión de AcA en PGH₂ es una reacción catalizada por la COX (también llamada PGH-sintetasa) en dos pasos. Después de su síntesis, la PGH₂ se convierte en los otros prostanoides. En general, este proceso es específico de tipo celular, es decir, diferentes células producen mayoritariamente sólo uno de los prostanoides. La PGE₂ y PGD₂ son isómeros de posición que están formados por simples reordenamientos no oxidantes (isomerizaciones) de PGH₂. Estas reacciones pueden ocurrir “in vitro” de forma espontánea, o enzimáticamente catalizada por sintetetasas específicas. La PGF_{2a} se forma a través de una reducción de la PGH₂ de dos electrones. Esta reacción es catalizada por sintetetasas específicas e “in vitro” se produce en presencia de agentes reductores suaves. La enzima que cataliza la conversión de PGH₂

en TxA_2 es TxA-sintetasa (TxAS). PGI_2 se forma a partir de PGH_2 por medio de PGI-sintetasa (PGIS, prostaciclina sintetasa)¹²⁹.

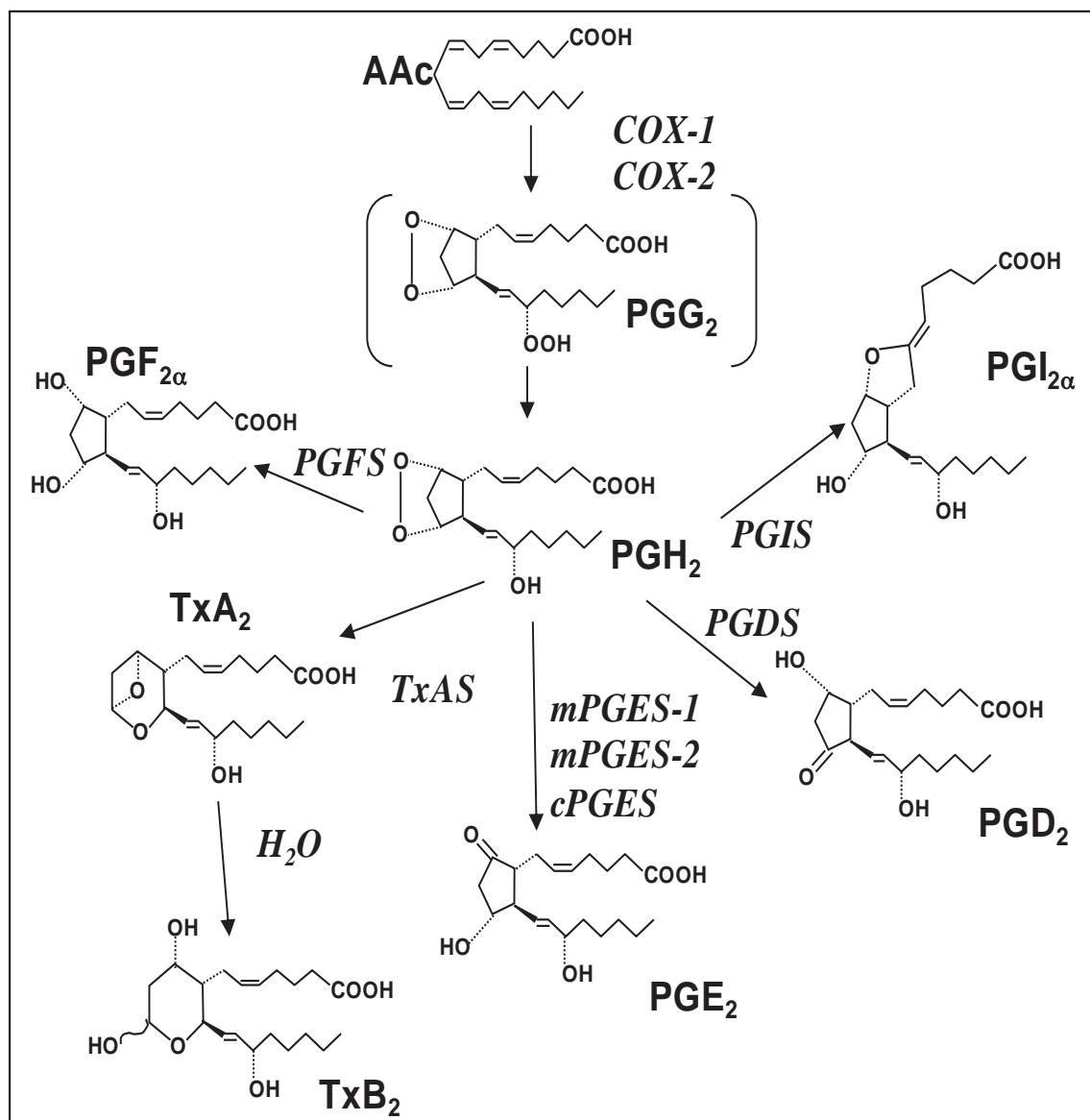


Figura 1: Vía de la síntesis de prostanoideos. COX, ciclooxigenasa; PGFS, PGDS, PGD-sintetasa; PGF-sintetasa; PGIS, PGI-sintetasa; TxAS, TxA-sintetasa; mPGES, PGE-sintetasa microsomal; cPGES, PGE-sintetasa citosólica.

Dos isoenzimas de la COX, denominadas COX-1 y COX-2, están codificados por genes separados, localizados en humanos en el cromosoma 9 y en el 1 respectivamente. En general la COX-1 se ha contemplado como una enzima constitutiva cuya expresión parece estar regulada por el grado de diferenciación celular. Los prostanoïdes formados a través de la acción de la COX-1 llamados “Ahousekeeping”, actúan en fenómenos tales como regulación de la función renal, el mantenimiento de la integridad de la mucosa gástrica y la hemostasia. Por el contrario, la COX-2 es una enzima inducible, que está normalmente ausente en las células y que se expresa transitoriamente en respuesta a hormonas, factores de crecimiento, citoquinas pro-inflamatorias, la endotoxina bacteriana y promotores tumorales^{130, 131}.

Los anti-inflamatorios no esteroïdeos (AINEs) que inhiben la actividad de la COX son notables agentes terapéuticos para el tratamiento del dolor y la inflamación¹³², los AINEs clásicos como la aspirina, ibuprofeno, flurbiprofeno y el naproxeno no son selectivos, inhibiendo la COX-1 y la COX-2. Sin embargo, se ha planteado la hipótesis de que la inhibición de la COX-1 en el sistema gastrointestinal es la causa de los efectos secundarios indeseables tales como erosiones en mucosas o úlceras gastro-duodenales observadas en el tratamiento con AINEs clásicos. El descubrimiento de la COX-2 inicialmente llevó a la hipótesis de que la COX-1 sólo está implicada en la homeostasis fisiológica y que la COX-2 está únicamente implicada en la inflamación y el dolor inflamatorio. Se pensaba que los medicamentos desarrollados recientemente diseñados para inhibir la COX-2, pero no la COX-1 tendrían propiedades anti-inflamatorias y evitarían los efectos secundarios tales como el daño gastrointestinal, la toxicidad renal o la hemorragia. Ahora sabemos que el paradigma que asumía que la COX-2 (inducible) estaba exclusivamente vinculada a la respuesta inflamatoria mientras que la COX-1

(constitutiva) lo estaba a la homeostasis era excesivamente simplista. Un hallazgo que contradice este paradigma es que la COX-2 se expresa en condiciones basales o en respuesta a una variedad de estímulos fisiológicos y que aparentemente también juega un papel relevante en la homeostasis¹³³⁻¹³⁷. Además, algunas pruebas, incluyendo la expresión de la COX-2 en los tejidos gástricos normales, apoya el concepto de que la gastroprotección es más compleja de lo previsto inicialmente, y que tanto la COX-1 y COX-2 pueden contribuir a la síntesis de PGs gastroprotectoras^{138, 139}.

La generación de determinados inhibidores específicos de la COX-2 en el sentido estricto, parece poco probable ya que los centros activos de la COX-1 y COX-2 son muy similares. Estudios sobre la estructura 3-D de la COX-1 y COX-2 han sido muy útiles para mostrar cómo trabajan los AINEs¹⁴⁰. El centro activo ciclooxigenasa de la COX está formado por un largo canal hidrofóbico abierto en la interfase de la membrana. Las pequeñas diferencias entre el centro activo ciclooxigenasa de la COX-1 y COX-2 han permitido generar inhibidores COX-2 selectivos. Una posición que es crucial para la inhibición selectiva de la COX-2 de diarilheterociclos que contienen sulfonamida o grupos metil-sulfona (por ejemplo celecoxib y rofecoxib) es la 523, que es Ile en la COX-1 y Val en la COX-2. Las diferentes familias de inhibidores de la COX y los mecanismos moleculares de la inhibición COX-2 selectiva se han revisado en las referencias¹⁴¹⁻¹⁴³.

6.2 VÍA DE LA COX EN LA PARED DE LOS VASOS SANGUÍNEOS

En los años setenta, la PGI_2 se caracterizó como el prostanoide principal producido por las paredes de las arterias y las venas de varias especies, incluyendo los seres humanos^{144, 145}. Como he mencionado, la PGI_2 se forma a partir de PGH_2 por la actividad de PGIS^{144} . Tanto la COX como la PGIS son hemoproteínas unidas a la membrana ubicadas en el retículo endoplásmico y en la membrana nuclear¹⁴⁶. La PGIS ha sido clasificada como un miembro de la familia CYP8 del citocromo P450 . La actividad de la PGIS exhibe una inactivación suicida por su sustrato PGH_2^{147} . El descubrimiento del TxA_2 y de la PGI_2 , que tienen actividades biológicas opuestas^{144, 145, 148-157}, provocó una hipótesis que explica muchas facetas de la enfermedad cardiovascular, sobre la base de perturbaciones en el equilibrio de estos dos compuestos en el contexto de las interacciones entre las plaquetas y la pared vascular¹⁵⁸.

Después de los primeros estudios realizados incubando fragmentos de pared vascular con AcA o endoperóxidos, se investigaron los productos de las células que poseían la actividad sintética de PGI_2 . Esta actividad se detectó principalmente en las células endoteliales humanas y bovinas en cultivo por incubación de las células con AcA^{159} y endoperóxidos marcados¹⁶⁰. Es de destacar que los datos notificados en el trabajo original de Weksler y colaboradores¹⁶¹ mostraron que la PGE_2 fue el otro prostanoide producido en abundancia por las células endoteliales humanas y bovinas cuando se incubaron con AcA marcado, también se detectó PGD_2 , PGF_{2a} y ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico. El grupo de Weksler también mostró que las células endoteliales liberan PGI_2 en respuesta a la trombina, tripsina y ionóforo de Ca^{2+} . Se han detectado diferencias entre macro y micro-vasculatura respecto a la síntesis de

prostanoides. Las células endoteliales cultivadas obtenidas de micro-vasculatura producen pequeñas cantidades de PGI_2 , siendo la PGE_2 y PGF_{2a} los prostanoides mayoritarios^{162,163}. Diferentes fenotipos de células endoteliales macro y micro-vasculares podrían explicar las diferencias entre macro-y micro-vasculatura, pero las diferencias en las condiciones de cultivo, particularmente en el número de subcultivos, también podrían contribuir a la variación en el perfil de los prostanoides detectados entre las células endoteliales de diferentes lugares.

Aunque las VSMC poseen la capacidad de sintetizar PGI_2 ¹⁶⁴, la idea de que el principal factor de liberación de PGI_2 por parte de la pared del vaso sea el endotelio, se ve reforzada por el hecho de que las células musculares lisas aórticas de la capa media o los fibroblastos de la adventicia incubadas con AcA fueron incapaces de inhibir la agregación plaquetaria¹⁶⁵. Una mayor capacidad para liberar PGI_2 por el endotelio de vasos con neointima y denudación muscular después de una lesión inducida iatrogénicamente por una angioplastia mecánica con balón, observó que se asocia con la tromborresistencia adquirida de la aorta¹⁶⁶.

PGE sintetasa (PGES) cataliza la conversión de PGH_2 a PGE_2 . La primera isoenzima de PGES identificada y caracterizada fue una proteína de 16 kDa con actividad glutatión dependiente, actualmente llamada mPGES-1. Esta enzima es inducible por citoquinas pro-inflamatorias. El acoplamiento funcional de la mPGES-1 con COX-2 fue reportada por primera vez¹⁶⁷, aunque esto ahora no puede ser generalizado¹⁶⁸. A la inversa, una PGES citosólica (cPGES) parece actuar funcionalmente junto con COX-1¹⁶⁹ aunque esto tampoco puede ser generalizado¹⁷⁰. Esta última enzima se expresa ubicuamente y es idéntica a p23, una proteína de alguna manera relacionada con la transducción de señal

mediada por el receptor de hormonas esteroides. Además, se ha caracterizado otro tipo de PGES microsomal llamada mPGES-2 que utiliza la PGH₂ generada por la actividad tanto de la COX-1 como de la COX-2^{167, 171}. Las tres isoenzimas PGEs se expresan en las VSMC pero sólo la mPGES-2 y la cPGES se expresan en células endoteliales de macrovasos^{168, 172, 173}. A pesar del hecho de que células endoteliales no expresen mPGES-1^{172, 174}, la PGH₂ no transformada se podría transferir desde células endoteliales a células tumorales¹⁷³, VSMC o leucocitos, que expresan mPGES-1, lo que resulta en la formación de PGE₂ transcelular. Nuestro grupo y otros, han observado que, a pesar del hecho de que las células endoteliales aisladas de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) expresan cPGES y mPGES-2, estas no son capaces de producir PGE₂ enzimáticamente en nuestras condiciones experimentales¹⁷²⁻¹⁷⁴. Se detectó tempranamente una actividad de la PGES glutatión dependiente en preparaciones de microvasos y de células endoteliales de microvasculatura en cultivo tanto de conejo como bovinas^{175, 176}, pero la enzima o enzimas implicadas en dicha actividad no se caracterizaron completamente en aquel momento. Nuestro grupo ha publicado recientemente que, al contrario de lo que sucede en las células endoteliales de los grandes vasos las células endoteliales de los microvasos sí expresan la mPGES-1¹⁷⁷. También se ha observado que las células mesangiales glomerulares y las VSMC expresan todas las isoenzimas PGEs, pero sólo la mPGES-1 parece transformar eficientemente PGH₂ a PGE₂^{168, 172, 178}. Las diferencias de las constantes cinéticas entre las isoformas de la PGES :V_m (PGE₂): 170, 3,3, 1,9 mol·min⁻¹·mg⁻¹, K_m (PGH₂): 160, 28, 14 nM para mPGES-1, mPGES-2 y cPGES respectivamente^{169, 179, 180} podrían explicar el hecho de que la mPGES-1 es la principal isoenzima implicada en la biosíntesis de PGE₂ bajo condiciones inflamatorias. Es de suponer que esto también se da en el contexto del AAA.

La regulación transcripcional de mPGES-1 todavía está bajo investigación. Forsberg et al, determinaron la estructura del gen humano de mPGES-1 en el año 2000¹⁸¹ y se localiza en el cromosoma 9q34.3 que abarca 18,3 kilobases y que contiene tres exones. La región promotora del gen se ha estudiado en un intento de encontrar similitudes con la COX-2, que se co-regula con la mPGES-1, pero no se ha podido detectar ninguno de los elementos de transcripción, como cajas TATA, presente en el gen de la COX-2 y en otros genes estimulables por citoquinas pro-inflamatorias¹⁸². Esto indica que mecanismos de transcripción divergentes están en funcionamiento para la regulación de la expresión inducible de la COX-2 y de la mPGES-1. Estudios adicionales indicaron que el papel de dos cajas GC en la inducción del gen por la IL-1 β y por el TNF α [54], así como el papel del “earlygrowth response gene-1” (Egr-1) en la expresión basal de mPGES-1¹⁸³. Además, la inducción de mPGES-1 mediada por Egr-1 ha demostrado ser sensible a ligandos del PPAR¹⁸⁴. Se ha demostrado que la actividad anti-inflamatoria de la 15-desoxi- Δ 12,14-PGJ2 esta mediada por PPAR y Egr-1¹⁸⁵. También regula la expresión de mPGES-1 al inhibir NF- κ B. También se ha demostrado que NF- κ B puede promover la síntesis de COX-2 y de mPGES-1 a través de una vía dependiente de Egr-1^{186, 187}, Kojima et al.¹⁸⁸ informaron de que inhibidores selectivos de la COX-2 podrían disminuir los niveles de mPGES-1 en fibroblastos sinoviales y los condrocitos de pacientes con artritis reumatoide, estimulados con IL-1 β , lo que sugiere la existencia de un bucle de realimentación positiva entre la COX-2 y mPGES-1.

El hecho de que PGs distintas de la PGI₂ podrían formarse de forma no enzimática en las células endoteliales de los grandes vasos, sugiere que la isomerización de PGH₂ puede ser producida parcialmente o incluso totalmente fuera de la célula. Se ha demostrado liberación de PGH₂ no transformada a partir de AcA exógeno y endógeno, midiendo la

síntesis de TxB_2 en incubaciones mixtas de células endoteliales y plaquetas con la COX inactivada (tratadas con ácido acético salicílico)^{172, 174, 189, 190}. Es de destacar que en VSMC no se observó la liberación de PGH_2 no transformada cuando mPGES-1 se indujo junto con la COX-2¹⁷². La liberación de PGH_2 por el endotelio vascular está aparentemente regulada por la relación entre la actividad de la COX y de la PGIS, ya que es particularmente relevante cuando la actividad de COX se aumenta mediante la inducción de COX-2 y/o la PGIS se inactiva.

6.3 PGE₂ y AAA:

Como hemos visto, la etiología de la AAA es compleja, con muchos factores ambientales y genéticos que contribuyen al riesgo^{54, 61, 191}. El AAA se caracteriza por signos de inflamación local crónica de la pared aórtica, acompañado por una disminución del número de VSMC en la capa media y la fragmentación de la matriz extracelular en el sitio del aneurisma⁵⁴.

Muchos artículos han proporcionado evidencia sobre la participación de células y mediadores inflamatorios en la formación de AAA y en su progresión. Los leucocitos polimorfonucleares (PMN), los macrófagos y las células T se han visto implicados en la formación AAA en distintos modelos animales y también están presentes en la infiltración presente en los AAA humanos¹⁰⁵.

La mayoría de los AAA se producen en el contexto de un estado de aterosclerosis, a pesar del hecho de que la prevalencia de la aterosclerosis aórtica abdominal excede en gran medida a la del AAA. La aterosclerosis en sí probablemente no causa directamente el AAA pero puede proporcionar el sustrato subyacente para el desarrollo del mismo. Ambos trastornos son de naturaleza inflamatoria y tienen factores de riesgo comunes, aunque algunos son específicos, aunque no están bien definidos los elementos que pueden formar parte en esas patologías.

En términos generales, podemos asumir que la PGI₂, PGE₂, PGH₂ y el TxA₂ son los prostanoideos más relevantes que intervienen en la patología vascular. Las plaquetas y los monocitos/macrófagos producen TxA₂ abundantemente. La vasoconstricción y la

agregación de las plaquetas son las actividades clásicas de TxA_2 . PGH_2 exhibe los mismos efectos agonistas que TxA_2 , actuando a través de un receptor común^{150, 151, 192}. El TxA_2 y la PGH_2 también tienen efectos pro-inflamatorios y pro-aterogénicos, puesto que la estimulación de su receptor induce la mitogénesis de las VSMC^{150, 192} y la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales¹⁵². El bloqueo del receptor $\text{TxA}_2/\text{PGH}_2$ suprime la liberación de MCP-1 estimulada en células endoteliales¹⁴⁷, y su activación también está implicada en la migración de células endoteliales y en la angiogénesis¹⁹³. Recientemente, se ha informado de que el TxA_2 también podría estar implicado en la rotura AAA¹⁹⁴. Creemos que esto se puede extender a la PGH_2 , ya que aunque las células vasculares producen bajas cantidades de TxA_2 , pueden liberar cantidades muy elevadas de PGH_2 bajo condiciones inflamatorias. Hemos observado que varios tipos de células, incluyendo las células vasculares, podrían liberar PGH_2 sin transformar cuando la COX-2 se sobreexpresa^{174, 178, 189, 195}.

La PGI_2 se produce principalmente en las células vasculares y en general, contrarresta los efectos biológicos del TxA_2 y de la PGH_2 ¹⁷¹. Se ha observado que la presión arterial y la frecuencia cardíaca basal en ratones deficientes para el receptor de la PGI_2 , (IP), no difieren de las de los animales de control. Sin embargo, la supresión de receptor IP resultó en un aumento de la sensibilidad a los estímulos trombóticos¹⁹⁶. Esto sugiere que la PGI_2 no controla la circulación sistémica, y trabaja posiblemente a demanda, en respuesta a los estímulos locales. Colectivamente las acciones de PGI_2 pueden ser consideradas anti-aterogénicas. No existe información sobre el papel de PGI_2 en la patogenia de los AAA.

En términos generales, la PGE₂ es el prostanoide principal, producido por muchos tejidos y tipos de células incluyendo los leucocitos y las VSMC y es el prostanoide más importante en la respuesta inflamatoria. Los niveles elevados de PGE₂ median algunas de las características cardinales de la inflamación, incluyendo el dolor, el edema y la fiebre¹⁹⁷. Por lo que sabemos PGE₂ es también el prostanoide más relevante en el desarrollo y evolución del AAA. Entre otras actividades la PGE₂ induce la expresión de MMPs¹⁹⁸ y también inhibe la producción de macromoléculas de la matriz extracelular, tales como fibronectina y colágeno tipo I y tipo III¹⁹⁹. Además, la PGE₂ no sólo es una molécula de señalización que regula la angiogénesis en respuesta a factores proangiogénicos tales como el VEGF y el bFGF²⁰⁰ sino que también induce la liberación de VEGF, MCP-1 o GRO α constituyendo un bucle positivo^{201, 202}.

Sin embargo, un aspecto que podría contrarrestar el efecto de PGE₂ promoviendo la anoikis, por medio de la destrucción de la matriz extracelular, es el efecto de pro-supervivencia de la PGE₂, que ha sido ampliamente estudiado en el contexto de la génesis tumoral²⁰³. Un aumento de la producción de PGE₂ la encontramos en situaciones de inflamación y es ampliamente aceptado que es debido al tándem COX-2/mPGES-1. La COX-2 está presente después de un daño vascular y está altamente expresada en las lesiones ateroscleróticas y en los AAA²⁰⁴. La PGE₂ derivada de la COX-2 está implicada en la patogénesis de modelos humanos y animales de AAA²⁰⁵⁻²⁰⁸. La expresión de la COX-2 en las VSMC contribuye a AAA en ratones²⁰⁹ y la COX-2 de los macrófagos se ha asociado de hecho con la hipervascularización observada en el AAA humano²¹⁰. La PGE₂ induce también angiogenesis por activación de la forma latente del TGF β ²¹¹ o por la activación del receptor del FGF²¹².

Por otro lado, en tipos de células tales como las VSMC, que expresan mPGES-1 y PGIS, existe una competición entre ambas enzimas por la PGH_2 . Esto hace que la supresión de la actividad de uno de ellos aumenta la biosíntesis del producto cuya formación está catalizada por el otro enzima. Se ha observado que la supresión de mPGES-1 aumenta la biosíntesis de PGI_2 en VSMC, cuando la actividad COX no es el paso limitante¹⁶⁸. Se podría esperar que ocurriera lo contrario cuando la actividad de PGIS es suprimida por la acción del estrés oxidante y/o la pérdida de expresión de la proteína. No es descabellada la hipótesis de que esta situación se da en el AAA.

A pesar del hecho de que la inhibición de la COX-2 reduce los AAA experimentales²⁰⁸, se ha observado en más de seis ensayos clínicos que la inhibición farmacológica de la COX-2 implica un riesgo cardiovascular²¹³. Aunque la causa exacta por la que la inhibición de la COX-2 aumenta eventos cardiovasculares no está en la actualidad totalmente establecida, parece en parte debido al hecho de que hay una fracción de COX-2 que es también constitutiva y regula la producción de PGI_2 , el grupo Garret FitzGerald ha demostrado que los inhibidores COX-2 selectivos reducen los niveles circulantes de PGI_2 sin alterar los de TxA_2 , lo que indica que la COX-2 está implicada en la producción sistémica de PGI_2 ²¹⁴. Esto podría estar relacionado con los efectos secundarios de los inhibidores COX-2 selectivos a nivel cardiovascular²¹⁴. La inhibición específica de mPGES-1 podría ser una alternativa a los inhibidores COX-2. Nuestro grupo ha aportado datos que apoyan que mPGES-1 podría ser una diana farmacológica de interés cardiovascular^{168, 172, 215}. Un hallazgo relevante relacionado ha sido aportado por el grupo de FitzGerald, han observado que la supresión de mPGES-1 atenúa los AAA experimentales en ratones²¹⁶. Estos autores estudiaron el desarrollo del AAA después

de la administración angiotensina II en ratones que carecen del receptor de LDL sometidos a una dieta hiperlipídica.

La PGE₂ ejerce sus efectos celulares mediante su unión a cuatro receptores diferentes de la PGE (EP1-4) que pertenecen a la familia de siete proteínas G acopladas a receptores tipo rodopsina. Cada receptor tiene efectos biológicos diferentes y en ocasiones opuestos. EP2 y EP4 son receptores acoplados a G_s y aumentan los niveles intracelulares de cAMP, mientras que el EP3 normalmente ejerce una acción opuesta por acoplamiento con proteínas G_i²¹⁷. La PGE₂ que actúa a través de receptores EP2 y EP4 incrementa los niveles de cAMP que sobrerregula la expresión de mPGES-1, que es inhibida por los inhibidores selectivos de la COX-2. Se postuló por lo tanto, que esa auto-regulación de la expresión mPGES-1 por su propio producto PGE₂, podría ser uno de los responsables del círculo vicioso de la inflamación²¹⁸. Algunos informes recientes muestran resultados contradictorios sobre el papel de la EP-4 en el desarrollo del AAA en modelos animales, ya que muestran tanto un papel protector²¹⁹ como perjudicial²²⁰,

221.

7. RIESGO DE ROTURA DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL:

La ruptura del AAA, es una de las principales causas de muerte en el mundo siendo un fenómeno muy complejo que usualmente ocurre de forma repentina^{222, 223}. Se ha considerado históricamente un proceso puramente físico, que se produce cuando el estrés de la pared aórtica producido por la circulación, supera la resistencia a la tracción de la propia pared aórtica, sin embargo ahora se reconoce que la ruptura de AAA, es un proceso biológico múltiple mucho más complejo de lo que a priori pueda parecer y que involucra procesos celulares y la proteólisis en adición a los factores biomecánicos anteriormente comentados.

Una práctica clínica aceptada, es que la ruptura del AAA, se pronostica monitorizando su diámetro máximo y/o su tasa de crecimiento semestral o anual, aconsejándose la intervención quirúrgica cuando el aneurisma alcanza 5.5 cm de diámetro transversal máximo y/o crece >0.5 cm/año²²⁴.

El riesgo estimado de ruptura anual de los AAA, varía en función de su diámetro, siendo muy infrecuente en aortas por debajo de los 4cm y aumentando posteriormente de modo exponencial, desde una tasa de ruptura del 1% anual para AAA entre 4-5, hasta una tasa del 30-50% de ruptura anual para aortas mayores de 8cm de diámetro transversal máximo²²⁴.

La principal limitación a esta práctica es que estos criterios, aunque tienen una base empírica significativa, pueden ser considerados insuficientes porque no parecen tener una base teórica suficientemente fundamentada. Este planteamiento no debe parecer

sorprendente, ya que aproximadamente el 10-15% de los aneurismas por debajo de valor umbral se rompen²²⁵. Es por todo esto que el diámetro máximo y el riesgo de rotura, no son variables estrictamente relacionadas, pues la composición de la pared y la morfología del aneurisma no son uniformes, al igual que los puntos de mayor tensión entre distintos AAA a igualdad de diámetro máximo.

La biomecánica de la aorta presenta modificaciones importantes en relación con sus cambios estructurales y de la geometría arterial a dicho nivel. Aunque la ley de Laplace, comentada anteriormente, se ha utilizado para explicar la relación entre presión tangencial, radio y presión arterial, de cara a establecer un riesgo de rotura, este modelo es sólo aplicable para estructuras cilíndricas, mientras que en los AAA, el crecimiento hace adoptar una conformación esférica o fusiforme en la mayoría de los casos. Este cambio de morfología de la pared aórtica, reduce la tensión máxima en la pared respecto a la obtenible a partir de dicha ley para una estructura cilíndrica como una aorta infrarrenal sana¹⁰⁷.

La hipótesis biomecánica para estimar el riesgo de ruptura en AAA, sigue los principios de la falla material, o sea, un aneurisma se rompe cuando las tensiones que actúan sobre la pared arterial superan su resistencia máxima, reflejando la interacción existente entre el remodelado estructural de la pared arterial y la acción que sobre ésta ejerce el flujo sanguíneo. Esta hipótesis ha incentivado la búsqueda de factores biomecánicos predictores de rotura de AAA^{226, 227}.

Otro concepto controvertido, es el efecto protector del trombo mural, presente en la mayoría de los AAA, en cuanto a la probabilidad de ruptura, ya que algunos grupos

defienden su efecto protector en el grado de stress de la pared aórtica al amortiguar el flujo²²⁸, mientras otros relacionan su grosor con fenómenos locales de isquemia en la pared subyacente²²⁹ que pueden debilitarla y favorecer su ruptura.

Otro de los factores implicados con la ruptura de los AAA en la bibliografía, es la neovascularización que presentan los AAA^{56-58, 103}.

Es por la limitación de los predictores de rotura clásicos de los AAA, utilizados hasta ahora como el diámetro transversal máximo, que se está investigando para encontrar modelos predictores de ruptura de los AAA como puede ser la utilización de medidores de stress de pared mediante la utilización de herramientas de simulación computacional, basadas en distintos modelos matemáticos como el de los elementos finitos²³⁰.

8. TRATAMIENTO ACTUAL DE LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL:

A pesar de los esfuerzos realizados para establecer el mecanismo de desarrollo del AAA, en el momento presente no existe un tratamiento farmacológico y la única aproximación efectiva para prevenir la ruptura es la reparación quirúrgica por cirugía convencional o endovascular²³¹⁻²³³.

El tratamiento de los AAA se realiza en una fase demasiado tardía de la enfermedad, ya que el fundamento racional de la reparación quirúrgica del AAA es principalmente profiláctico, pues no tenemos ningún tratamiento en la actualidad que impida su formación o su expansión una vez diagnosticados. La mayoría de los AAA se intervienen de manera electiva en fase asintomática para evitar las consecuencias de su rotura. Sin embargo también pueden intervenir de manera urgente en caso de que se hayan diagnosticado debido a su rotura o hayan provocado algún tipo de síntoma o molestia como podría ser una embolización distal a modo de “trashfoot”, trombosis arteriales locales, expansiones dolorosas habitualmente coincidiendo con crisis hipertensivas (premonitorias de rotura)...

Existen principalmente dos tipos de intervenciones sobre los AAA, la cirugía clásica o abierta que consiste en la exéresis del aneurisma a través de un abordaje quirúrgico abdominal más o menos extenso con su posterior substitución con una prótesis sintética y la cirugía endovascular en la que no se realiza una exéresis del aneurisma y éste se excluyen a través de dispositivos estancos modulares que se colocan a través de las arterias femorales en las ingles evitando la apertura de la cavidad abdominal.

8.1 CIRUGÍA CLÁSICA DE REPARACIÓN AAA:

La cirugía clásica o abierta convencional de los AAA, ha demostrado ser una técnica quirúrgica fiable, segura y duradera siendo aún en la actualidad, a la espera de estudios prospectivos a largo plazo comparándolo con otras técnicas más novedosas como la terapia endovascular o la laparoscopia, el tratamiento de elección.

El abordaje quirúrgico del espacio retroperitoneal en el que se encuentra la aorta puede ser o bien transperitoneal mediante una laparotomía media o bien directamente retroperitoneal a través de un abordaje del flanco izquierdo del paciente a nivel subcostal.

Cada uno de ellos presenta ventajas y desventajas que los hacen de elección en pacientes concretos, dependiendo en última instancia de la elección del cirujano responsable.

El abordaje transperitoneal, se realiza mediante una incisión en la línea media abdominal (xifo-pubiana) más o menos extensa, con posterior evisceración del contenido intestinal. En nuestro centro, utilizamos sistemáticamente el retractor automático Omnitrack®. Esta incisión, nos permite un abordaje cómodo de la aorta infrarrenal tras incidir el peritoneo parietal posterior en la raíz del mesenterio, llegando hasta el ligamento de Treitz. La sección y ligadura de la vena mesentérica inferior se precisa ocasionalmente en aneurismas de gran tamaño, con cuello yuxtarenal para poder controlar el mismo y en el caso de lesiones iatrogénicas durante la disección. Una vez disecado y controlado el cuello aórtico proximal, se procede a hacer lo propio con

ambos ejes ilíacos. Dependiendo del tamaño y estado de los mismos, se decidirá si se utilizará un injerto recto o una prótesis bifurcada ilíacas de (<2.5cm). En caso de decantarnos, por este último injerto se pueden realizar las anastomosis distales a nivel ilíaco desde la misma cavidad abdominal (aorto-biilíaco) o a nivel inguinal (aorto-bifemoral), controlando ambos trípodas femorales, mediante dos incisiones complementarias inguinales, sobre los triángulos de Scarpa y realizando la tunelización retoperitoneal oportuna, con especial atención de no lesionar los uréteres o las venas ilíacas.

Una vez controlado el cuello aneurismático y ambos ejes ilíacos, se puede transfixiar con material irreabsorbible la arteria mesentérica inferior, para minimizar el sangrado al incidir sobre el aneurisma. Previo al clampaje, se realiza una heparinización sistémica a razón de 1mg de heparina sódica por Kg peso en forma de bolus intravenoso. Posteriormente se procede a la apertura del saco aneurismático, retirando todo el trombo existente (se guarda para poder realizar estudios de secretoma del mismo) y controlando la hemorragia que se produce a través del reflujo de las arterias lumbares permeables, con transfixión y por la arteria mesentérica inferior, sino se ha controlado previamente. A continuación se emplaza el injerto escogido (habitualmente de Dacron® aunque puede ser de politetrafluoruro expandido-PTFE/Gore-Tex®), dependiendo del diámetro de la aorta nativa, ya sea recto o bifurcado, con sutura infrarrenal endoaórtica termino-terminal (T-T) con monofilamento de 3/0. Tras realizar esta anastomosis, se comprueba con suero fisiológico, la ausencia de fugas y dependiendo de las preferencias del cirujano o en caso de clampajes proximales que puedan comprometer alguna de las arterias renales, se substituye el clamp aórtico proximal, por un clamp aórtico protegido o atraumático a nivel del cuerpo de la prótesis. Posteriormente, se realiza la

sutura T-T a nivel prebifurcación ilíaca, también endoaórtica con monofilamento de 3/0 o bien T-T a nivel de las arterias ilíacas primitivas (monofilamento de 4/0) o término-lateral con monofilamento de 5/0 a nivel de las arterias femorales.

El desclampaje debe ser lento, progresivo y cuidadoso a fin de evitar hipotensiones bruscas, coincidiendo con la precarga de volumen necesaria administrada por el equipo anestésico. En caso de injertos bifurcados primero se revasculariza una extremidad y se pone en marcha y posteriormente la siguiente, desclampándola tras el purgado oportuno de aire y detritus al finalizar la última anastomosis, por lo que los cambios hemodinámicos suelen ser menos bruscos que en el caso de injertos rectos, en los que es habitual el reclampaje parcial manual, para ayudar a remontar hemodinámicamente al paciente. De todos modos, es fundamental una relación fluida entre el equipo quirúrgico y el anestésico para disponer de la máxima información en cada instante del estado hemodinámico del enfermo.

Una vez comprobado el funcionamiento correcto del injerto y la estanqueidad de todas las anastomosis, se procede a realizar una hemostasia cuidadosa del lecho quirúrgico y se revierte la heparinización con sulfato de protamina habitualmente en una proporción de 1/1 que se puede incrementar ligeramente en caso de ausencia de formación de coágulo (sobre todo en caso de anastomosis realizadas en <40 minutos).

El saco aneurismático, se cierra sobre el cuerpo de la prótesis y de forma similar el retroperitoneo, ambos con material trenzado reabsorbible del 2/0. Se debe ser cuidadoso en este momento a fin de evitar en la mayor medida posible, la aparición de

úlceras o erosiones por decúbito a nivel intestinal (3-4ª porción duodenal) por existir un contacto con el cuerpo protésico, demasiado íntimo.

Es precisamente en esta última fase de la cirugía en donde se puede extraer una porción longitudinal de arteria aorta infrarrenal aneurismática de la “cáscara aneurismática” para realizar todos los estudios y determinaciones tisulares que se realizan en esta tesis doctoral. La biopsia aórtica se obtiene de la aorta abdominal infrarrenal a la altura de la salida de la arteria mesentérica inferior en su porción anterior de manera sistemática, para que pueda ser comparable entre diferentes individuos con AAA y con las muestras de individuos sanos fallecidos con aortas normales, obtenidas durante la extracción de órganos como veremos posteriormente. Cabe comentar que en caso que se intervengan pacientes con aortas por debajo del rango quirúrgico (<5.5cm) por presentar patología aneurismática ilíaca tributaria de reparación quirúrgica concomitante o por presentar un crecimiento-expansión rápido, es decir >0.5cm/6 meses ó >1cm/12 meses las biopsias aórticas siempre se obtienen de la misma localización aórtica.

En nuestro centro, no se dejan drenajes en la cavidad abdominal, en los abordajes transperitoneales y el cierre se suele realizar por planos, con sutura continua peritoneo anterior infraumbilical con sutura reabsorbible del nº2 y con puntos sueltos o sutura continua de sutura reabsorbible nº1 ó nº2 de la fascia muscular a nivel de la laparotomía, dependiendo de las presencias del cirujano. Dependiendo del espesor de la grasa subcutánea se completa el cierre con sutura reabsorbible de 2/0 y la piel se sutura con grapas metálicas.

En aquellos casos en los que se ha emplazado un injerto aorto-bifemoral, siempre se ha dejado a contrarreflujo (ligadura proximal e la arteria ilíaca primitiva y perfusión retrógrada del eje a través de la anastomosis en la arteria femoral) un eje ilíaco, preferentemente el eje ilíaco izquierdo, para garantizar la perfusión del colon descendente y del sigma a través de la arteria hipogástrica y sus conexiones con la arteria hemorroidal superior que a su vez presenta anastomosis más o menos variables con la arteria mesentérica inferior. Un detalle diferenciador de otros grupos de trabajo, es que en el HSCSP no se realizan habitualmente reimplantes sobre el cuerpo protésico de la arteria mesentérica inferior, ni de las arterias hipogástricas en las ramas protésicas, sin observar una incidencia mayor que en otras series de isquemia intestinal.

En una revisión realizada por Ernst²³¹, se recogieron los resultados sobre mortalidad operatoria de varias series que totalizan 6.488 aneurismas no rotos. El rango de mortalidad varió de 1.4 a 6.5%, y el promedio fue del 4% (mediana del 3.66%). En el mismo trabajo se recoge la mortalidad de 1731 aneurismas rotos, que fue del 23 al 69%, siendo el promedio del 49% (mediana del 45%).

En algunos casos seleccionados (intervenciones previas, sospecha de aneurismas inflamatorios, obesidad importante, enfermedad pulmonar severa, aneurismas yuxta o suprarrenales, etc.) se puede optar por un abordaje retroperitoneal. Para la realización del mismo, se realiza una incisión de Leriche izquierda ampliada, desde la porción pararectal umbilical hasta la onceava costilla, con o sin resección parcial de la misma, lo que permite abordar el retroperitoneo, previo rechazo medial de todo el peritoneo parietal posterior y del riñón izquierdo con luxación anterior del mismo. De este modo, podemos tener un control de toda la arteria aorta intrabdominal, desde el hiato

diafragmático, hasta su bifurcación. Si seccionamos el pilar diafragmático izquierdo, podemos realizar un clampaje supracelíaco fácilmente. Dos de los hándicaps de este abordaje es el control de los troncos viscerales más allá de sus centímetros iniciales (arteria renal derecha, mesentérica superior y tronco celíaco) y que en el caso de precisar injertos aorto-bifemorales, la tunelización de los mismos en el lado derecho, puede resultar más dificultosa. En este tipo de abordajes puede emplazarse un drenaje testigo de sangrado de látex en el lecho quirúrgico retroperitoneal, pues en caso de sangrado quirúrgico puede ser muy copioso (2-3 litros) hasta que da clínica por las características anatómicas del retroperitoneo. El cierre de la herida, se realiza por planos según la técnica habitual, con un plano de monofilamento continuo nº2 abarcando al músculo transverso y al oblicuo menor y otro con puntos sueltos de material trenzado reabsorbible nº2 del oblicuo mayor.

Darling y cols²³⁴ realizaron un estudio prospectivo randomizado comparando el abordaje transperitoneal con el retroperitoneal apreciando una diferencia significativa en las pérdidas sanguíneas, la necesidad de transfusión y la mayor rapidez en inicio de la ingesta oral postcirugía a favor de la vía retroperitoneal mostrándose esta segura y eficiente en comparación con el abordaje transperitoneal clásico. Su grupo presenta una experiencia en el tratamiento del AAA empleando el abordaje retroperitoneal. En 1.109 pacientes se realizó cirugía electiva, siendo la mortalidad del 2.4%; 103 pacientes presentaban un aneurisma sintomático, en los que la mortalidad fue del 12.6%, mientras que en los pacientes que presentaban una ruptura de aneurisma la mortalidad fue del 29%. Las complicaciones precoces en los pacientes sometidos a cirugía electiva fueron: cardiopatía isquémica e insuficiencia cardíaca congestiva (15%), insuficiencia pulmonar (8%), lesiones renales (6%), hemorragias (4%), tromboembolismo distal

(3%) e infección de la herida (2%). Las complicaciones tardías incluyen la infección del injerto, fístulas aorto-entéricas, oclusión del injerto y aneurisma de las anastomosis. Estas complicaciones suelen aparecer entre los 2 y 5 años de la reconstrucción, e incrementan en un 2% la tasa de mortalidad²³⁵.

Sin ser una técnica quirúrgica completamente nueva para la reparación de los AAA la reparación mediante minilaparotomía representa una evolución, un paso más allá en el objetivo de ofrecer a nuestros pacientes la mejor solución a sus patologías.

La posición quirúrgica del paciente se mantiene en decúbito supino y la diferencia inicial de esta técnica respecto a la terapéutica convencional, radica como su nombre indica en el tamaño de la incisión que utilizamos para trabajar. Se pasa de los más de 30 cm de la laparotomía xifopubiana clásica a menos de 15 cm en los casos con mini-incisiones que pueden llegar a ser incluso de sólo 10cm de longitud.

La localización de la incisión es paraumbilical, se establece en nuestro caso por palpación abdominal de la masa pulsátil subyacente, indicándonos en que situación aproximada se encuentra el AAA. Es importante realizar esta maniobra, con el paciente anestesiado y la pared abdominal completamente relajada para evitar los errores al máximo. Habitualmente en los AAA puros, la incisión se sitúa por encima del ombligo abarcándolo, sin embargo cuando el AAA afecta a las arterias ilíacas la incisión paraumbilical, se puede extender ligeramente por encima del ombligo y extenderse caudalmente hacia el pubis. Existen otros grupos de trabajo que se apoyan en la imagen ecográfica abdominal captada en la misma mesa operatoria para poder determinar la posición exacta del AAA y marcarla antes de incidir la piel ²³⁶, sin embargo en nuestra

experiencia hemos observado que esto no es estrictamente necesario pudiendo prescindir de este soporte sino se dispone de él. Cabe mencionar que la ayuda ecográfica se mostraría muy eficaz en aquellos pacientes con una gran cavidad abdominal cuya palpación sería difícil.

Una vez incidida la piel y el tejido graso subcutáneo es importante abrir correctamente la fascia a través de la línea alba, si prolongamos cranealmente y caudalmente la apertura de la fascia más allá de la apertura de la piel, ganaremos una exposición de campo quirúrgico extra, este paso no se debe exagerar ya que después puede resultar complicado cerrar correctamente la fascia al finalizar la intervención.

Una vez realizada la minilaparotomía se colocan dos valvas de separación del retractor automático Omnitrack® para poder introducir la mano en la cavidad abdominal y explorar la misma. La siguiente operación, es rechazar el intestino delgado hacia el lado derecho de la cavidad abdominal sin evisceración de los mismos para poder acceder cómodamente al retroperitoneo y mantener de manera más adecuada la temperatura corporal. Para mantener retraídos los intestinos en la situación deseada se utilizan tallas quirúrgicas empapadas en suero fisiológico caliente contenidas por las distintas partes del separador automático. Esta maniobra se inicia con retracción hacia el hipocondrio izquierdo, bajando posteriormente en sentido contrario a las agujas del reloj hasta la fosa ilíaca derecha y fondo de saco de Douglas. Este momento es el más crucial de la intervención para poder tener un campo de trabajo adecuado con visibilidad óptima del cuello aórtico y de la bifurcación ilíaca, por lo que es aconsejable perder unos minutos y recolocar las tallas y los separadores las veces que sean necesarias hasta obtener la visión deseada.

Al tener el retroperitoneo expuesto sin nada delante que nos estorbe, se puede incidir mediante tijeras o electrocauterio igual como se haría en la cirugía convencional, para proceder a la disección del cuello aórtico y la bifurcación ilíaca. También es el momento de realizar los túneles retroperitoneales en caso de tener previsto la realización de un bypass aorto-bifemoral. Otro de los aspectos diferenciales de la cirugía mediante minilaparotomía, es la colocación de los clamps aórticos, pudiéndose realizar con clamps especiales articulados tanto para el clampaje aórtico como para el clampaje de ambas arterias ilíacas, aunque estas últimas pueden clamparse percutáneamente a través de microincisiones cutáneas accesorias de 0.5-1cm Este último punto se debe adaptar a cada caso particular, para que los clamps dificulten lo menos posible el acceso al ya de por sí limitado campo quirúrgico.

Existen algunos grupos de trabajo, que se apoyan en la movilidad de la mesa quirúrgica (hiperextensión arqueada en decúbito supino para el cuello aórtico y en la contraria con el cuerpo y las extremidades ligeramente elevadas para el control caudal) para poder realizar incisiones de menor tamaño (7-8cm)²³⁶, sin embargo la creencia de nuestro equipo es que la ventaja de esta técnica, radica principalmente en el hecho de no eviscerar el contenido de la cavidad abdominal evitando así el enfriamiento excesivo del paciente y las pérdidas no sensibles de fluidos, más que en el propio tamaño de la incisión. Se debe remarcar que el estudio comentado, engloba a la población japonesa, que es una raza relativamente pequeña con poca tendencia a la obesidad.

Tras administrar heparina sódica endovenosa a razón de 1mg/kg peso, se procede al clampaje aórtico y de ambas arterias ilíacas. A partir de aquí el procedimiento es

exactamente igual que en la cirugía convencional, realizando una apertura del saco aneurismático con transfixión de las arterias lumbares refluyentes existentes con sutura irreabsorbible de 3/0 y confección de las anastomosis endoaórticas término-terminales (T-T) con sutura continua de monofilamento tipo polipropileno de 3/0 y las anastomosis femorales en caso de ser necesarias con sutura continua de monofilamento irreabsorbible tipo polipropileno de 5/0.

Una vez purgado y con el bypass funcionando, se procede a revertir la heparina sódica con sulfato de protamina endovenosa (a razón de 1/1) y se realiza la hemostasia adecuada. Posteriormente se puede extraer una porción longitudinal sobrante de “cáscara aneurismática” que es la utilizada en esta tesis doctoral para realizar las determinaciones tisulares y posteriormente se puede cerrar la pared del aneurisma encima de la prótesis con sutura de material trenzado reabsorbible del 3/0 y se cierra el peritoneo posterior encima con material trenzado reabsorbible de 3/0 para evitar posibles decúbitos intestinales futuros con la prótesis colocada.

Ha llegado el momento de liberar los intestinos y valorar la coloración, movilidad y posibles zonas contusionadas de los mismos. Si todo está correcto, especialmente la hemostasia de la zona intrabdominal del trayecto de los clamps arteriales, se procede a cerrar por planos la minilaparotomía con sutura continua o puntos sueltos de sutura reabsorbible trenzada o monofilamento de nº1 ó nº2, dependiendo de las preferencias del cirujano. Es importante prestar atención a la zona craneal y caudal de la incisión, para evitar posibles hernias o eventraciones futuras. La piel se aproxima mediante grapas metálicas, tanto en la minilaparotomía, como en los orificios de entrada de los clamps arteriales.

De todo lo expuesto podríamos decir que la mortalidad global relacionada con el procedimiento en pacientes asintomáticos sometidos a tratamiento quirúrgico electivo sería de un 6%. Un 4% en los primeros 30 días, más un 2% relacionado con las complicaciones tardías. Esta cifra se compara muy favorablemente con la probabilidad de muerte por ruptura en aneurismas de riesgo no tratados. La probabilidad de ruptura a 5 años en estos casos sería del 25 al 40%, con una mortalidad global que se situaría entre el 40% de los casos operados y el 90% de mortalidad global de los AAA rotos. El incremento mínimo en 12 veces de la mortalidad quirúrgica entre los AAA rotos con respecto a los AAA no rotos sugiere claramente que se debe poner mayor énfasis en identificar y reparar las lesiones asintomáticas, con alta probabilidad de ruptura.

La cirugía de reconstrucción aórtica la mayoría de los pacientes se realiza bypass a vasos con calibre superior a 6 mm, lo que se considera una reconstrucción de alto flujo y baja resistencia y no está indicado el tratamiento con heparina sódica con excepción de pobre salida del injerto o por indicación del cirujano debido a complicaciones o hallazgos intraoperatorios. Está indicada heparina de bajo peso molecular a dosis habituales de profilaxis de trombosis venosa profunda²³⁷.

8.2 CIRUGÍA DE REPARACIÓN ENDOVASCULAR DEL AAA:

La reparación endovascular, es decir a través de un acceso arterial remoto, de los aneurismas de aorta abdominal o EVAR (Endo Vascular Aortic Repair) se inició en 1988 por Volodos²³⁸, aunque el mayor reconocimiento fue posterior para el Dr. Parodi²³⁹. Dicha técnica consiste en la colocación de dispositivos modulares estancos confeccionados a modo de stents con malla metálica, recubiertos de un tejido impermeable tipo poliéster llamados endoprótesis, que se introducen en el territorio aórtico e ilíaco proximal a través de ambas arterias femorales comunes en la región inguinal (incisión longitudinal o transversal) a modo de bypass intraluminal para evitar la presurización directa y en consecuencia el riesgo de rotura del saco aneurismático. Se utilizan guías de trabajo y soporte endovascular 0.035” para colocar los dispositivos que son de tipo coaxial, por lo que se debe visualizar todo el procedimiento bajo fluoroscopia directa con RX, siendo imprescindible el uso de contraste yodado, lo que limita la utilización de esta técnica en pacientes con insuficiencia renal²⁴⁰.

Aunque inicialmente se realizaron exclusiones mediante endoprótesis rectas de AAA, en la actualidad la mayoría de dispositivos presentan una configuración aorto-biilíaca²⁴¹, reservando las configuraciones tubulares para aquellos aneurismas de tipo sacular que presentan una aorta de anclaje proximal y distal al mismo adecuada obteniendo en estos casos buenos resultados²⁴².

Se trata de un abordaje menos agresivo y más conservador del AAA que conlleva menos complicaciones mayores inmediatas intra y postoperatorias en los primeros 30 días respecto a la cirugía convencional, lo que permite tratar a pacientes más añosos y con

mayor comorbilidad que no podrían ser sometidos a cirugía abierta clásica por su elevado riesgo operatorio²⁴³. También permite tratar pacientes con abdómenes hostiles que dificulten la cirugía convencional: múltiples cirugías abdominales previas, presencia de estomas, catéteres de nefrostomía, diálisis peritoneal...

Sin embargo, no todos los pacientes son candidatos a este tipo de reparación y el factor más limitante es la propia anatomía del sector aorto-ilíaco (calcificaciones muy extensas, trombo mural muy abundante sobretodo en zonas de anclaje...) y de sus rutas de acceso, es decir las arterias femorales comunes e ilíacas externas, ya que estenosis severas, oclusiones o tortuosidades muy marcadas pueden dificultar mucho el implante del dispositivo. El factor más limitante para el EVAR es la presencia de una zona de aorta infrarrenal llamada “cuello aórtico” lo suficientemente largo y sano sin excesivo calcio, angulación²⁴⁴ o trombo intraluminal, como para anclar nuestro dispositivo, ya que la mayoría de dispositivos existentes en el mercado, se fijan debido a la fuerza radial de la propia endoprótesis que se sobredimensiona un cierto porcentaje (10-15%), respecto al tamaño valorado mediante un angio-TC con contraste que sirve de planificación del caso²⁴⁵. Con la evolución técnica de los dispositivos actuales y la presencia de fijaciones suprarrenales sin tela o “freeflow” se ha conseguido acortar mucho la zona de “cuello aórtico” necesario y ampliar las indicaciones de EVAR²⁴⁶.

La planificación del caso se debe realizar mediante una angio-TC con contraste y cortes cada milímetro, ya que es imprescindible para valorar los diámetros de anclaje tanto proximal en aorta como distal en ilíacas ya sean comunes o bien externas lo que requiere un cubrimiento de las arterias hipogástricas directa o una embolización previa y también nos sirve para valorar las distancias necesarias de vaso nativo que deberemos

cubrir. Con estos datos podemos plantear los diámetros y longitudes de los distintos módulos de nuestro dispositivo, que como mínimo serán dos un cuerpo aórtico que contiene el módulo aórtico una extensión ilíaca y un muñón corto en donde encajará por dentro del mismo el segundo módulo o extensión ilíaca contralateral. Dependiendo de la longitud y morfología del aneurisma a tratar pueden ser necesarias extensiones ilíacas uni o bilaterales y una extensión aórtica proximal llamada “cuff aórtico proximal”²⁴⁷.

Una variante de esta configuración aorto-biilíaca clásica de los EVAR utilizada cuando tenemos un trombo muy importante dentro del AAA que no deja una luz real lo suficientemente grande como para que entren las dos patas o ramas de la endoprótesis aorto-biilíaca o en aquellos casos en los que existe un eje ilíaco con enfermedad aterosclerosa severa a modo de estenosis u oclusión, es la configuración aorto-uniilíaca que precisa un bypass extranatómico fémoro-femoral habitualmente realizado con PTFE para mantener viable la circulación arterial de la pierna que no tiene endoprótesis en su eje ilíaco, dejando este a contrarreflujo para mantener la arteria hipogástrica permeable y evitar claudicaciones glúteas o isquemias colónicas siempre que sea posible. Si el eje ilíaco nativo de la pierna receptora del bypass extranatómico fémoro-femoral está total o parcialmente permeable, será imprescindible ocluirlo proximalmente con un ocluidor que se coloca también de modo endovascular en la ilíaca común²⁴⁸.

A diferencia de la cirugía aórtica convencional, los EVAR requieren de un control más exhaustivo que los aneurismas tratados de modo convencional con prótesis de Dacron o de PTFE suturadas directamente en aorta, pues su gran problema son las fugas arteriales²⁴⁹ en el dispositivo debido a migraciones, desconexiones modulares,

porosidad del dispositivo usado, presencia de arterias lumbares y/o arteria mesentérica inferior permeables, etc., ya que estas fugas siguen presurizando el saco aneurismático sin excluirlo de la circulación arterial sistémica, lo que implica un crecimiento del aneurisma sin evitar una posible rotura, ya que la presión en un saco aneurismático con fuga puede ser incluso superior a la que tenía el AAA antes de tratarse²⁵⁰. Es por ello que es imprescindible un protocolo de seguimiento muy riguroso, tanto clínico como mediante pruebas de imagen: ecografía-doppler abdominal y/o angio-TC seriados lo que implica a lo largo de la vida del paciente una radiación acumulada no despreciable por sus efectos adversos a modo principalmente de neoplasias y en caso de detectarse fugas plantear una reparación preferente de las mismas²⁵¹.

Los resultados del EVAR respecto a la cirugía convencional en cuanto permeabilidad son equiparables, sin embargo en el EVAR son mejores en cuanto a morbimortalidad quirúrgica inmediata (30 primeros días) pero este beneficio se iguala y se pierde con el tiempo. También se debe remarcar la necesidad de muchas más cirugías coadyuvantes al tratamiento inicial en los pacientes tratados con EVAR²⁵², la mayoría también de tipo endovascular aunque existen casos en que se precisa una reparación o reconversión a cirugía abierta. Esto junto con la necesidad de múltiples controles con radiación ionizante posteriores para detectar y tratar presencia de fugas, nos debe hacer plantear individualmente cada paciente para decidir cual es la mejor terapéutica en cada caso y optimizar los protocolos de seguimiento²⁵³.

Lo que queda claro en la actualidad que el tratamiento que podemos ofrecer de los AAA ya sea con cirugía convencional o mediante técnicas endovasculares, es un tratamiento tardío y simplemente profiláctico, únicamente enfocado a evitar la muerte o las

complicaciones derivadas de la rotura del mismo. Por ello es importante conocer la evolución natural de la enfermedad y los factores biológicos implicados en su aparición y desarrollo para que podamos ofrecer terapéuticas profilácticas efectivas en aquellos individuos sensibles genéticamente para desarrollar una degeneración aneurismática, tratamientos médicos efectivos de cara a enlentecer o incluso frenar su desarrollo en aquellos pacientes que consigamos diagnosticar de modo precoz y aportar datos que permitan modificar aquellos factores medioambientales, enfermedades de base o pautas de conducta implicados en la evolución de los AAA.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS:

HIPÓTESIS:

Los distintos FRCV y enfermedades asociadas, están implicados en la expresión de mediadores relacionados con la hipervascularización del AAA como la vía del VEGF, las metaloproteinasas y la vía de la PGE₂.

OBJETIVOS:

OBJETIVO PRINCIPAL:

Evaluar la influencia de los FRCV en los niveles locales de factores pro-angiogénicos bien establecidos: vía del VEGF, MMPs y la vía de la PGE₂.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

- 1) Evaluación de la hipervascularización y de la infiltración leucocitaria de la pared de la aorta aneurismática.
- 2) Influencia de los factores de riesgo cardiovascular en la expresión local de los elementos de la familia del VEGF en la pared de la aorta aneurismática.

- 3) Influencia de los factores de riesgo cardiovascular en la expresión local de metaloproteinasas mayoritarias en la pared de la aorta aneurismática.

- 4) Influencia de los factores de riesgo en la expresión local de los elementos de la vía de la PGE₂.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Previa aprobación del comité de ética del “Hospital de la Santa Creu i Sant Pau” y con el consentimiento informado de los pacientes se obtuvieron 89 muestras de pared de aorta abdominal infrarrenal aneurismática, de pacientes sometidos a reparación quirúrgica abierta de AAA.

Las muestras o biopsias aórticas, se obtuvieron del excedente de pared aórtica infrarrenal en la última fase de la cirugía, tras realizar la exclusión del AAA y su sustitución protésica, siempre que hubiera suficiente “cáscara” o pared aneurismática remanente, para realizar una biopsia segura y poder cubrir la prótesis quirúrgica adecuadamente con la intención de prevenir posibles complicaciones quirúrgicas tardías (infecciones, fístulas o erosiones entérico-protésicas, etc.). Se obtuvieron porciones longitudinales de arteria aorta infrarrenal aneurismática a la altura de la salida de la arteria mesentérica inferior en su porción anterior de manera sistemática, para que las muestras pudieran ser comparables entre diferentes individuos con AAA y con las muestras de individuos sanos fallecidos con aortas normales, obtenidas durante la extracción de órganos como veremos posteriormente.

Todos los pacientes presentaban aneurismas de aorta abdominal de tipo ateroscleroso, descartando del estudio aquellos pacientes con aneurismas de etiología infecciosa o características que pudieran sugerir un aneurisma de tipo inflamatorio. Tampoco se utilizaron para el estudio aquellos pacientes en los que no se pudo conseguir una biopsia aórtica adecuada. Estas muestras fueron obtenidas entre los años 2007-2012.

De los 89 pacientes, 69 tenían afectación de la aorta abdominal infrarrenal, 15 de la porción yuxtarenal y 5 de la aorta abdominal suprarrenal. La media del diámetro transversal máximo del aneurisma fue 66 ± 12.7 mm.

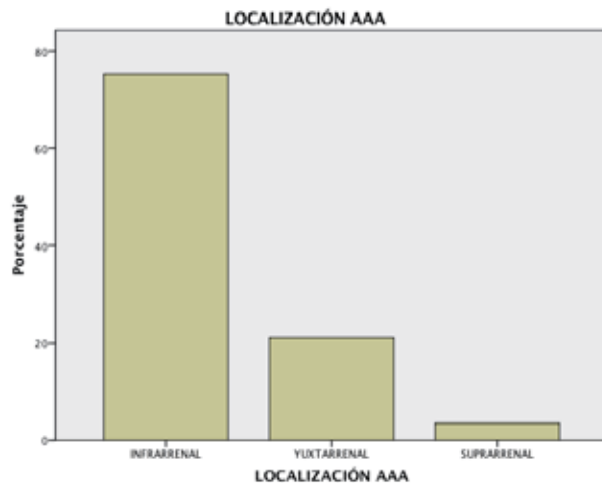


Figura 1: porcentajes de localización del AAA en relación con las arterias renales.

En 86 de los casos la reparación quirúrgica del aneurisma fue electiva, 1 de los pacientes se intervino de modo preferente por sintomatología aguda a modo de dolor abdominal y 2 de los pacientes se tuvieron que intervenir de urgencia por presentar rotura aórtica a nivel abdominal.

La vía de abordaje principal para la reparación de los aneurismas fue la vía retroperitoneal que se utilizó en 61 de los casos, en los 28 pacientes restantes se utilizó una laparotomía media.

En todos los pacientes se utilizaron prótesis de Dacron® para la reparación de los aneurismas: en 62 casos se realizó una exclusión del AAA con bypass aorto-aórtico, en 13 bypass aorto-bifemoral, en 9 bypass aorto-bi-ilio-femoral y en 5 casos aorto-biilíaco.

La afectación aneurismática de otros territorios fue la siguiente: 35 pacientes tenían afectación simultánea de las ilíacas comunes, 8 presentaban afectación aneurismática de las arterias ilíacas internas o hipogástricas y en ningún paciente se observó una afectación simultánea de las ilíacas externas. Sólo 1 paciente presentaba aneurismas femorales y en 5 casos se apreció afectación aneurismática del sector poplíteo.

Figura 2: pacientes con afectación aneurismática concomitante en un territorio distinto del aórtico.

Obtención de las muestras de tejido: como hemos descrito, las biopsias de AAA, se obtienen durante el procedimiento quirúrgico. El tejido aórtico corresponde a la cara anterior de la pared aórtica, aproximadamente en la porción media de la aorta infrarrenal a la altura de la salida de la arteria mesentérica inferior. El trombo luminal si está presente se descarta y el tejido se lava dos veces con tampón PBS 7.4.

Inmediatamente tras la obtención del tejido, este es procesado como se describirá en los siguientes apartados, para la obtención de ARN, secretoma y para inmunohistoquímica.

Las muestras de aorta sana para los controles, se obtuvieron de donantes multiorgánicos y también fueron obtenidas de la porción media de la aorta abdominal infrarrenal a nivel de la salida de la arteria mesentérica inferior, en el momento de la extracción de los órganos de la cavidad abdominal.

Para los análisis plasmáticos se obtuvo una muestra de 10 ml de sangre periférica de todos los pacientes intervenidos quirúrgicamente de AAA . Las muestras sanguíneas se obtuvieron antes de la inducción de la anestesia en la sala de operaciones. Se utilizaron tubos heparinizados, la sangre se centrifugó inmediatamente, se separó el plasma y se realizaron alícuotas que se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Las muestras de donantes sanos se obtuvieron del Banco de Sangre en nuestro centro, de donantes de sangre también anticoagulada con heparina y se procesaron de forma idéntica.

Determinación del diámetro aorta: se ha usado el diámetro transversal máximo del aneurisma medido en milímetros (mm). Para determinar el diámetro transversal máximo se ha utilizado en todos los casos angio-TC milimetrado con contraste endovenoso. Usamos el diámetro transversal máximo a la luz del vaso, realizando un “center line” a nivel infrarrenal. Para ello se han usado las estaciones de trabajo: AGFA IMPAX[®] versión 6.4.4.4010 y la OsiriX MD[®], versión FDA Cleared/CE IIA para diagnóstico primario.

Los pacientes se estratificaron según el tamaño del AAA, se distribuyeron en 3 grupos del siguiente modo:

- Small Diameter (SD), AAA < 55mm: 13 pacientes.
- Moderate Diameter (MD), AAA entre 55.1-69.9mm: 43 pacientes.
- Large Diameter (LD), AAA \geq 70mm: 33 pacientes.

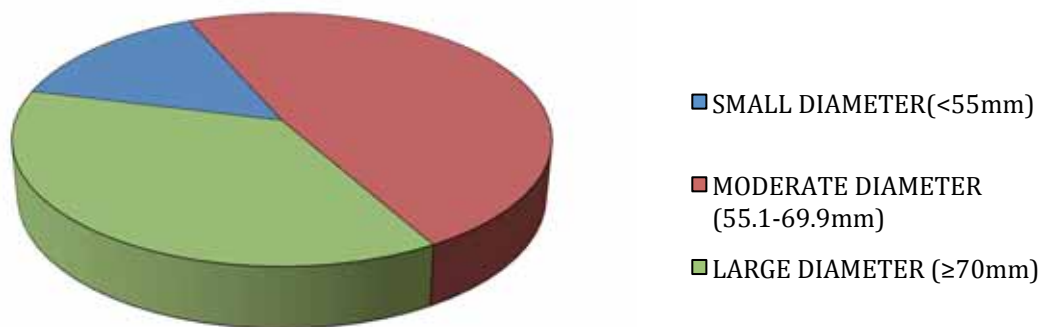


Figura 3: Estratificación de las muestras de AAA en función de su diámetro.

Para esta clasificación se tuvieron en cuenta referencias previas con estratificaciones similares y de este modo podemos comparar nuestros resultados con los de otros grupos^{98, 99, 254}.

En el estudio, existen pacientes con aortas por debajo del rango quirúrgico (<5.5cm) Esto es debido a que aunque no solemos indicar una reparación quirúrgica del AAA a no ser que el diámetro haya superado los 55mm de diámetro transversal máximo, existen pacientes intervenidos por crecimiento aórtico rápido (>0.5cm/6 meses ó >1cm/12 meses) o aortas <55mm reparadas por coexistencia de patología aneurismática ilíaca en

rango quirúrgico. Las muestras arteriales obtenidas en caso de afectación ilíaca concomitante fueron siempre aórticas y la biopsia fue de la misma porción arterial que en caso de aneurismas aórticos puros para homogenizar al máximo las muestras de AAA.

Las características clínicas de los pacientes con AAA y de los donantes, tanto de aorta sana (NA) como de plasma utilizados para el estudio se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Características clínicas, demográficas y factores de riesgo, de los individuos con AAA y NA incluidos en el estudio.

Medidas Características	Niveles mRNA		Niveles TNF α plasma	
	AAA	NA	AAA	Controles
Número	89	25	79	39
Diámetro aórtico (mm) ^a	66 \pm 12.7	-	64.3 \pm 11.6	-
SD (<55 mm)	13 (14.6%)	-	14 (17.7%)	-
MD (55-69.9 mm)	43 (48.3%)	-	40 (50.6%)	-
LD (\geq 70 mm)	33 (37.1%)	-	25 (31.6%)	-
Edad (años)	71.1 \pm 6.5	56.3 \pm 16.0	72.4 \pm 6.8	62.9 \pm 3.0
Hombres	87 (97.8%)	16 (64%)	75 (94.9%)	34 (87.2%)
Diabetes mellitus	19 (21.3%)	2 (8%) ^b	21 (26.6%)	1 (2.6%)
Hipertensión	63 (70.8%)	2 (8%) ^b	60 (75.9%)	14 (35.9%)
Dislipemia	54 (60.7%)	2 (8%) ^b	51 (64.6%)	1 (2.6%)
Hábito tabáquico				
No fumadores	7 (7.9%)	21 (84%) ^b	8 (10.1%)	30 (76.9%)
Fumadores activos	26 (29.2%)	3 (12%) ^b	19 (24.1%)	6 (15.4%)
Ex fumadores ^c	56 (62.9%)	1 (4%) ^b	52 (65.8%)	3 (7.7%)
Cardiopatía isquémica	20 (22.4%)	0 ^b	22 (27.9%)	0
Angina de pecho	2 (2.2%)	0 ^b	4 (5.1%)	0
Infarto de miocardio	6 (6.7%)	0 ^b	6 (7.6%)	0
Cirugía revascularización coronaria ^d	12 (13.5%)	0 ^b	12 (15.2%)	0
Insuficiencia renal crónica ^e	34 (38.2%)	0 ^b	23 (29.1%)	0
Diálisis	0	0 ^b	0	0
Enfermedad arterial periférica	48 (53.9%)	0 ^b	45 (57%)	0
Ausencia de pulsos	31 (34.8%)	0 ^b	30 (38%)	0
Claudicación intermitente	17 (19.1%)	0 ^b	15 (19%)	0
Enfermedad cerebrovascular	7 (7.9%)	1 (4%) ^b	7 (8.8%)	0
Accidente vascular cerebral	4 (4.5%)	1 (4%) ^b	5 (6.3%)	0
Ataque isquémico transitorio	3 (3.4%)	0 ^b	2 (2.5%)	0
EPOC ^f	26 (29.2%)	0 ^b	17 (21.5%)	0
Tratamiento con antiagregantes	47 (53.4%)	1 (4%) ^b	48 (61.5%)	0
Tratamiento con estatinas	57 (64%)	0 ^b	58 (73.4%)	7 (17.9%)
Tratamiento con IECAs ^g	23 (20.7%)	0 ^b	24 (30.8%)	6 (15.4%)
Tratamiento con AINEs ^h	6 (6.7%)	0 ^b	3 (3.8%)	0
Tratamiento con corticoides	6 (6.7%)	0 ^b	4 (5.1%)	0
Tratamiento con inmunosupresores	4 (3.5%)	0 ^b	2 (2.5%)	0

Las variables nominales se presentan como números y porcentajes (%) y las variables continuas como mediana \pm DE.

(a) Diámetro transversal máximo medido en mm: SD “Small Diameter”, MD “Moderate Diameter” y LD “Large Diameter”.

(b) En algunos casos y debido a la naturaleza de las muestras de aorta sana, algunas de las características clínicas pueden no estar recogidas y existe riesgo de infravaloración de las mismas..

(c) Ex fumadores: abandono del Tabaco de >1 año.

(d) Mediante cirugía convencional o tratamiento endovascular.

(e) Filtrado glomerular estimado (eGFR) <60 mL/min/1.73 m².

(f) Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

(g) IECAs: Inhibidores Enzima Conversora Angiotensina.

(h) AINEs: Anti Inflamatorios No Esteroides.

Definimos como diabéticos (DM) a aquellos pacientes con Hb glicosilada $>5'8\%$ ($HbA1c >5'8\%$) o que estén diagnosticados previamente y en tratamiento con antidiabéticos orales y/o insulina. En nuestra serie todos los pacientes diabéticos fueron pacientes con "Diabetes Mellitus tipo 2" en tratamiento con dieta oral y control glicémico mediante antidiabéticos orales, y en ningún caso tuvimos pacientes insulinizados o con "Diabetes mellitus tipo 1".

Definimos hipertensión arterial (HTA) como presión sistólica basal sostenida por encima de 139mmHg o una presión diastólica sostenida mayor de 89mmHg sin tratamiento médico. Consideramos pacientes hipertensos a aquellos pacientes que cumplan estos factores o que estén diagnosticados previamente como tales y estén en tratamiento farmacológico aunque se mantengan normotensos. Todos los pacientes considerados hipertensos en nuestra serie, estaban tratados como mínimo con un fármaco hipotensor además de una dieta hiposódica.

Definimos Dislipemia (DLP) como aquellas situaciones clínicas en las que existen concentraciones anormales de colesterol total ($CT >6'2\text{mmol/L}$), colesterol de alta densidad ($C\text{-HDL} >1'70\text{mmol/L}$), colesterol de baja densidad ($C\text{-LDL} <1'81\text{mmol/L}$) y/o triglicéridos ($TG >1'65\text{mmol/L}$). Consideramos pacientes dislipémicos a aquellos pacientes que cumplan estos factores o que estén diagnosticados previamente como tales y estén en tratamiento farmacológico aunque mantenga lípidos séricos en sangre en niveles normales. En cuanto a la DLP, en nuestra serie, está presente en 54 pacientes que representan el 60.7% de la muestra de pacientes con AAA. Destaca que hay más pacientes tratados con estatinas ($n=57$ (64%)) que pacientes diagnosticados de dislipemia y esto es debido a que en ocasiones se da tratamiento hipolipemiante a pesar

de cifras de lípidos séricos en sangre correctos por los efectos pleiotrópicos de las moléculas hipolipemiantes actuales, sobretudo estatinas de última generación como la atorvastatina, la rosuvastatina o la pitavastatina.

Especialmente importante para la discusión posterior, es la clasificación de los pacientes con hábito tabáquico. Hemos considerado como pacientes no fumadores aquellos que nunca han fumado en ninguna de sus modalidades (cigarrillos, puros, pipa o tabaco de liar) y como pacientes ex-fumadores, a aquellos pacientes que llevaban más de 12 meses sin fumar en el momento de la intervención quirúrgica y como fumadores activos a aquellos pacientes que fumaban en el momento de la intervención quirúrgica o que no llevaban más de 12 meses sin consumir tabaco.

La afectación coronaria simultánea en pacientes con AAA, es bien conocida y en nuestra serie no es nada despreciable: 2 pacientes a modo de angina de pecho sin revascularizar (2.2%), 6 pacientes a modo de infarto de miocardio sin revascularizar (6.7%) y 12 pacientes (13.5%), habían tenido afectación del territorio coronario que había precisado revascularización o bien mediante terapias endovasculares o bien mediante cirugía clásica de derivación coronaria.

La insuficiencia renal (IR) se definió como un filtrado glomerular estimado o “estimated glomerular filtration rate” (eGFR) $<60\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$. Ninguno de los pacientes intervenidos con AAA estaba en hemodiálisis.

Definimos como enfermedad arterial periférica (EAP), aquellos pacientes con índice tobillo brazo <0.9 , ausencia de pulsos distales a la exploración física o que presenten

clínica isquémica a modo de lesiones tróficas o de claudicación intermitente. Destaca en nuestra serie la presencia de EAP en fase silente en grado I de la clasificación de Leriche-Fontaine (34.8%), siendo la enfermedad arterial sintomática mucho menos presente (19.1%) afectando a pacientes con claudicación intermitente más o menos relevante (grado II de Leriche-Fontaine). En ningún caso tuvimos pacientes afectos de isquemia crítica (grados III y IV de Leriche-Fontaine). El aumento de enfermedad arterial asintomática en nuestra serie, posiblemente sea debido a la longevidad de los individuos, ya que por el centro hospitalario en el que trabajamos, tenemos un área de influencia muy envejecida.

La afectación del territorio cerebral incluye pacientes con antecedente de accidente vascular cerebral o AVC de más de 24h de duración y pacientes con accidente isquémico transitorio o AIT de menos de 24h de duración.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se definió como la relación $FEV1/FVC < 0,7$ ($< 70\%$)²⁵⁵. En España se han realizado varios estudios epidemiológicos con base poblacional, obteniendo una prevalencia global de 9,1% (el 14.3% en hombres y el 3.9% en mujeres)^{256, 257}.

En cuanto al tratamiento que recibían los pacientes en el momento de la intervención quirúrgica, la gran mayoría estaban antiagregados e hipolipemiados con estatinas, lo cual es lógico viendo los factores de riesgo que presentan y los territorios arteriales afectados simultáneamente, tanto el coronario como el cerebral. Una cuarta parte de los pacientes estaban en tratamiento crónico con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAS), y un porcentaje relativamente pequeño de los pacientes tomaban

fármacos antiinflamatorios no esteroides o AINEs, tratamiento corticoideo o tratamiento inmunosupresor (ver Tabla 1).

Como vemos las características clínicas de los pacientes con AAA y los pacientes control, es decir los pacientes sanos donantes multiorgánicos son muy diferentes al igual que su tratamiento médico. Este factor es causante de un sesgo en el estudio pero por razones evidentes no es fácil obtener biopsias de pacientes con las mismas características clínicas que la muestra de AAA a no ser que se hagan a modo de necropsias.

Los análisis de plasma (n=79), corresponden a un subgrupo de pacientes intervenidos de AAA (n=89), en los que las muestras hemáticas se pudieron procesar de modo adecuado tras su extracción.

Análisis de los niveles de transcritos en los tejidos y células de cultivo: Una parte del tejido se estabilizó mediante inclusión en RNAlater (QiagenGmbH, Hilden, Alemania) inmediatamente después de la obtención de la biopsia, y se almacenó a -80 ° C hasta su procesamiento. Los tejidos fueron homogeneizados utilizando los tubos “Lising Matrix D” en el homogeneizador “FastPrep-24” (MP Biomedicals, Solon, OH) en 1 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La extracción del RNA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Para células de cultivo el RNA total fue extraído usando Ultraspec (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, TX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La transcripción inversa se realizó a partir de 1µg de RNA con el kit “High-CapacitycDNA Archive Kit” con hexámeros aleatorios (AppliedBiosystems, Foster City, CA). La expresión mRNA de los genes seleccionados se estudió mediante PCR a tiempo real en un ABI Prism 7900HT utilizando ensayos prediseñados validados (TaqMan

ensayos de expresión génica; AppliedBiosystems, Foster City,CA) y parámetros de amplificación universales. La expresión relativa de cada transcrito se expresó como el cociente de transcrito del gen/ transcrito β -actina.

TABLA 2: Transcritos determinados (mRNA)

MARCADORES CELULARES Y CITOCINAS	VÍA PGE ₂	METALOPROTEINASAS
VE-Cadherin	COX-1	MMP-2
TIE-1	COX-2	MMP-9
vWF	mPGES-1	
eNOS	EP-1	
VEGFR-2	EP-2	
CD45	EP-3	
CD68	EP-4	
FLAP		
BTL-1		
NAP-2		
VEGF-A		
VEGFR-1		
VEGFR-2		
α -Actina		

Determinación de los niveles de prostanoïdes en plasma y liberados por muestras de tejido de aorta NA y AAA en cultivo: inmediatamente después de la cirugía, 100-200mg de tejido se cortaron en pequeños fragmentos con un bisturí quirúrgico (≈ 1 mm) y se utilizaron para la obtención de secretomas. Los fragmentos de tejido se incubaron durante 48 horas a 37°C en el incubador de CO₂ en 1ml de DMEM (Biological Industries, KibbutzBeitHaemek, Israel). Transcurrido este periodo de tiempo, el medio de cultivo se recuperó y se almacenó a -80°C hasta la determinación de los prostanoïdes. Tanto los niveles plasmáticos como los medios de cultivo se analizaron mediante inmunoensayos enzimáticos²⁵⁸ específicos, todos suministrados por Cayman Chemical, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inmunohistoquímica: Inmediatamente tras la cirugía una porción del tejido se sumergió en una solución de formaldehído al 4% durante 24 horas. Seguidamente se incluyó en parafina. Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron en secciones de tejido de 3 micrómetros. Los anticuerpos utilizados y las diluciones realizadas, se especifican en la tabla 3. Para la tinción específica de los elementos de la vía de la PGE₂ se utilizaron: un anticuerpo monoclonal de ratón anti-COX-2 (ref. 160112 clon CX229, diluido 1:50), anticuerpos policlonales de conejo contra la EP-2 (ref. 101750, diluido 1:1000), EP-3 (ref. 101760, se diluyó 1:400) y EP-4 (ref. 101775, diluido 1:100) todos de Cayman Chemical, y un anticuerpo policlonal de conejo contra la mPGES-1 (ref. HPA045064 diluido 1:50) de Sigma-Aldrich. Los blancos se realizaron usando los péptidos bloqueantes correspondientes de Cayman. Para la tinción inmunohistoquímica del factor von Willebrand (vWF, marcador de células endoteliales), CD45 (marcador pan-leucocitario) y CD60 (marcador de macrófagos), se utilizaron anticuerpos monoclonales (ref. M0616, diluido 1:35; ref. IR751 y ref. IR613 sin dilución, respectivamente) de Dako. Para realizar la tinción inmunohistoquímica de la MMP-2 se usó un anticuerpo monoclonal de ratón de Abcam (ref. ab1818, dilución 1:15) y para la MMP-9 un anticuerpo policlonal de conejo de Dako (ref. A0150, dilución 1:15). Para la microscopía óptica, las secciones de tejido se procesaron en un equipo Dako Autostainer 48, utilizando el Dako Envision Kit Flex. Se usó diaminobenzidina como cromógeno.

Inmunofluorescencia: Para los estudios de co-localización, se realizó inmunotinción doble fluorescente utilizando un método secuencial. Después de la desparafinación y desenmascaramiento de los antígenos, se bloqueó a 4^oC durante toda la noche para evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos. A continuación los anticuerpos se

aplicaron secuencialmente incubándose cada uno de ellos durante 1 hora a temperatura ambiente, realizándose lavados con PBS después de cada incubación. Los tejidos se incubaron primero con anticuerpos anti-MMP-2 o anti-MMP-9, seguido de la incubación con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugado con Alexa Flúor 488 (diluido 1/200; Life Technologies, Carlsbad, CA). Las preparaciones que se incubaron con anti-MMP-2, se incubaron con anticuerpos anti-alfa actina del músculo liso, y las que habían sido incubadas con anti-MMP-9, con anti-CD45 o anti-CD68. Finalmente las preparaciones se incubaron con anticuerpos de burro anti IgG de conejo conjugados con Alexa Flúor 555 (diluido 1/200; Life Technologies). Como control negativo, se realizaron portas en los cuales se omitieron los anticuerpos primarios. Para el montaje de los cubreobjetos se utilizó el reactivo Prolong Gold antifade con DAPI (Molecular Probes, Life Technologies Co, Eugene, OR). Para el estudio de microscopía láser confocal utilizamos el microscopio confocal Leica SP5. Para la tinción de inmunofluorescencia de la mPGES-1 y EP-4 de células de endotelio microvascular en cultivo, las células se sembraron en MillicellEZslide (MilliporeCorporation, Billerica, MA) y cuando alcanzaron un 80% de confluencia se fijaron con metanol: acetona 1:1 a -20°C durante 20 minutos. Las preparaciones se lavaron con PBS y se bloqueó con albúmina al 1% durante una hora. Las células se incubaron anti-mPGES-1 (anticuerpo monoclonal de ratón, ref 10004350 diluido 1:100) y anti-EP4 (anticuerpo policlonal de conejo, ref 101775, diluido 1:100, ambos de Cayman) diluidos en PBS y BSA al 1% simultáneamente durante 60 minutos. La preparaciones se lavaron con PBS 2 veces y se incubaron con los anticuerpos secundarios marcados fluorescentes: cabra anti-IgG de ratón marcado con Alexa Flúor 488 y burro anti-IgG de conejo marcado con Alexa Flúor 555 (ambos de Invitrogen) durante una hora. Tras dos lavados, los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 (Sigma) 1µg/ml en PBS durante 10 minutos. Las preparaciones se montaron con

“Prolong Gold Antifade Reagent” (Invitrogen) y se fotografiaron con un microscopio Olympus BX50.

Tabla 3: anticuerpos y diluciones utilizados

Antígeno reconocido	Tipo	Dilución	Proveedor	Técnica de análisis
COX-2	Policlonal de conejo	1/50	Cayman	ABC-POD
EP2	Policlonal de conejo	1/1000	Cayman	ABC-POD
EP3	Policlonal de conejo	1/400	Cayman	ABC-POD
EP4	Policlonal de conejo	1/100	Cayman	ABC-POD
mPGES-1	Policlonal de conejo	1/50	Sigma	ABC-POD
vWF	Monoclonal de ratón	1/35	Dako	ABC-POD
CD45	Monoclonal de ratón	-	Dako	ABC-POD Fluorescencia
CD68	Monoclonal de ratón	-	Dako	ABC-POD Fluorescencia
MMP-2	Monoclonal de ratón	1/15	Abcam	ABC-POD Fluorescencia
MMP-9	Policlonal de conejo	1/15	Abcam	ABC-POD Fluorescencia
α -actina	Policlonal de conejo	1/200	Abcam	Fluorescencia

ABC-POD: Avidina biotin

Cultivo de células vasculares: las células musculares lisas vasculares humanas (VSMC) fueron aisladas por el método de explante a partir de biopsias de aorta de donantes multiorgánicos^{168, 172}. La arteria se seccionó longitudinalmente y el endotelio se eliminó de manera mecánica mediante un raspado suave. El tejido se troceó y se los trozos se distribuyeron en un frasco de cultivo. Los explantes se dejaron 2 horas en la cámara de cultivo sin medio para que las piezas de tejido se adhiriesen a la superficie del frasco. A continuación se añadió el volumen de medio DMEM conteniendo un 10% de suero bobino fetal (FBS, Biological Industries) necesario para cubrir los explantes. Los cultivos se observaron regularmente al microscopio y una vez que las VSMC migraron de los

explantes y alcanzaron la confluencia, se tripsinizaron. Las VSMC se caracterizaron por tinción positiva de la α -actina.

Las células endoteliales de microvasculatura (MVEC, microvascular endothelial cells) se aislaron a partir de prepucios humanos adultos de pacientes tributarios a postectomía^{177, 259}. Los prepucios tras la cirugía se recogieron en tampón fosfato (PBS) suplementado con penicilina 200 unidades/mL, estreptomicina 200 μ g/mL y amfotericina B 0'5 μ g/mL (Biological Industries). Los prepucios se cortaron en cuadraditos de 3mm que se incubaron a 37°C durante 30 minutos en una solución de tripsina al 0'3%, EDTA 1%. Posteriormente los trocitos de prepucio se lavan con PBS y se depositan en una placa de Petri en M199 conteniendo un 10% de SBF. Los fragmentos se comprimen individualmente con la parte plana de un bisturí para extraer los microvasos. El medio que contiene las células, se filtra a través de un filtro de 150 μ m de poro y se centrifuga a 300xg durante 15 minutos. Las MVEC se sembraron en un frasco de cultivo recubierto de gelatina y se cultivaron en medio MCDB 131 con un 20% de SBF; L-glutamina 2mmol/L, penicilina 200 unidades/mL, estreptomicina 200 μ g/mL, EGF 20ng/mL y bFGF 5ng/mL (todo de Biological Industries). Cuando las células alcanzan confluencia, se purifican con Dynabeads CD31 (Dynabeads, Invitrogen Dynal ASA, Oslo, Norway), siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de la población celular se caracterizó por citometría de flujo y tinción positiva de CD31, también denominado molécula de adhesión de plaquetas a células endoteliales (platelet endothelial cell adhesion molecule, PECAM-1).

Cultivo de las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC):

los cordones de una longitud de entre 15-20cm se conservan a 4°C hasta su

procesamiento en la cámara de flujo laminar. La vena del cordón se canula por un extremo, se introduce una solución de colagenasa al 0.08% (Roche) y se incuba 10-15 minutos a 37°C. Se recuperan las células endoteliales y se procede al cultivo primario. La suspensión celular se centrifuga a 250xg durante 10 minutos. El botón celular se suspende en medio de crecimiento (medio base M-199 conteniendo L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1mM, penicilina/estreptomicina (100u/100µg)/ml, FBS 20%, heparina a 10U/ml y ECGF 30µg/mL) y se siembran en frascos de cultivo previamente acondicionados con gelatina al 1%. Las células se mantienen rutinariamente con medio de crecimiento que se recambia cada 48 horas. Cuando el cultivo alcanza la confluencia se subcultiva, se incuba con tripsina-EDTA (tripsina 0.25% y EDTA al 0.025%) hasta que se desprenden las células. Los experimentos se realizan con células en primer pase.

El análisis estadístico: Se han utilizado los softwares Sigma-Plot y SPSS Statistics 21.0, para realizar el análisis estadístico de esta tesis.

Todos los datos relativos a los niveles de transcripción se expresan con relación a la β -actina $\times 1000$. Todos los datos cuantitativos de este estudio que no tienen una distribución normal se expresan como mediana (percentiles 25^o-75^o).

La significación estadística entre más de dos grupos cuando los datos se ajustan a una distribución normal se ha evaluado mediante un test de ANOVA de una vía y la prueba de Student-Newman-Keuls; para comparar dos grupos se usó la prueba “t de Student” . Cuando no existió una distribución normal de los datos se ha usado “Mann-Whitney Rank Sum Test” para comparar dos grupos y “Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks” para comparaciones múltiples (método de Dunn).

Para evaluar el grado de asociación entre dos variables se ha utilizado “Pearson Product Moment Correlation Test”. En el caso de distribuciones no-normales de datos se ha aplicado el mismo test después de la transformación logarítmica de los datos para normalizarlos.

Los datos también se analizaron utilizando un modelo de regresión lineal múltiple, incluyendo el efecto de los factores de riesgo identificados y de los eventuales factores de confusión, la previa transformación logarítmica se aplicó a los resultados sin una distribución normal.

Un valor de "p" inferior a 0.05 ha sido considerado como significativo.

RESULTADOS:

1. EVALUACIÓN DE LA HIPERVASCULARIZACIÓN Y DE LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA DE LA PARED DE LA AORTA ANEURISMÁTICA.
2. INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA EXPRESIÓN LOCAL DE ELEMENTOS DE LA FAMILIA DEL VEGF EN LA PARED DE LA AORTA ANEURISMÁTICA.
3. INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA EXPRESIÓN LOCAL DE METALOPROTEINASAS EN LA PARED DE LA AORTA ANEURISMÁTICA.
4. INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO EN LA EXPRESION LOCAL DE LOS ELEMENTOS DE LA VIA DE LA PGE₂
 - EXPRESIÓN DE LOS ENZIMAS IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE PGE₂ EN MUESTRAS DE PARED AÓRTICA.
 - LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LA COX-1, COX-2 Y mPGES-1 Y ESTUDIO DE LOS TIPOS CELULARES IMPLICADOS EN LA VIA DE SINTESIS DE LA PGE₂.
 - ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE PGE₂.
 - LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES PGE₂ Y ESTUDIO GRUPOS CELULARES IMPLICADOS.
 - INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE LOS ELEMENTOS DE LA VIA DE LA PGE₂

1. EVALUACIÓN DE LA HIPERVASCULARIZACIÓN Y DE LA INFILTRACIÓN LEUCOCITARIA DE LA PARED DE LA AORTA ANEURISMÁTICA:

Una de las diferencias entre la pared de la aorta normal respecto a la que ha presentado una degeneración aneurismática, es la diferente vascularización que presenta en las capas media y adventicia.

Esta hipervascularización producida mediante angiogénesis podría ser determinante del establecimiento de los infiltrados leucocitarios presentes en los AAA, y podría contribuir a una debilidad estructural de la matriz de los AAA. Tanto las células vasculares como el infiltrado leucocitario contribuyen mediante la secreción de citoquinas al estado inflamatorio de la pared aneurismática que contribuye a su crecimiento, dilatación y ruptura.

No se ha establecido la relación entre los factores de riesgo cardiovasculares clásicos o de las enfermedades de base de los pacientes que presentan aneurismas de aorta abdominal con el grado de vascularización y la infiltración leucocitaria de la capa media de la aorta por lo que intentaremos determinar si existe algún factor de riesgo o enfermedad de base que pueda estar relacionado con las modificaciones estructurales que sufre la pared aórtica.

Para determinar la distribución de los microvasos en la pared aórtica de nuestras muestras, utilizamos inmunohistoquímica mediante tinción del vWF típicamente expresado en el endotelio vascular. Las aortas normales (NA) se caracterizaban por una distribución regular de los microvasos en la capa media que cruzan desde la adventicia, atravesando la capa media hasta la capa sub-intimal terminando muchos de ellos a

modo de bifurcación, es decir distribuidos de modo radial a la dirección del flujo sanguíneo del vaso (Figura 1.1). Hubo escasa presencia de micro-vasos longitudinales en la capa de media en las muestras de NA (Figura 1.2).



Figura 1.1: Imagen inmunohistoquímica con anti-vWF en donde se aprecia la distribución radial de los vasos sanguíneos en la capa media en un corte transversal de aorta sana desde la adventicia hasta la íntima.



Figura 1.2: Inmunohistoquímica con anti-vWF en donde se aprecia un detalle inusual de un vaso con distribución transversal en la capa media, en un corte transversal de aorta sana.

En contraste, en las muestras de pacientes con AAA, había abundantes microvasos en la capa media y en la capa adventicia y muchas veces había desaparecido la capa íntima (Figura 1.3). Además de los vasos radiales observados en las NA, se apreciaron abundantes vasos longitudinales a lo largo de la pared del vaso, transversales a los microvasos radiales y paralelos a las fibras de las células musculares lisas (Figura 1.4 y 1.5). Esto es importante ya que como veremos posteriormente, la mayor parte de los infiltrados leucocitarios de la pared de los AAA se dan en las áreas perivasculares a estos vasos.

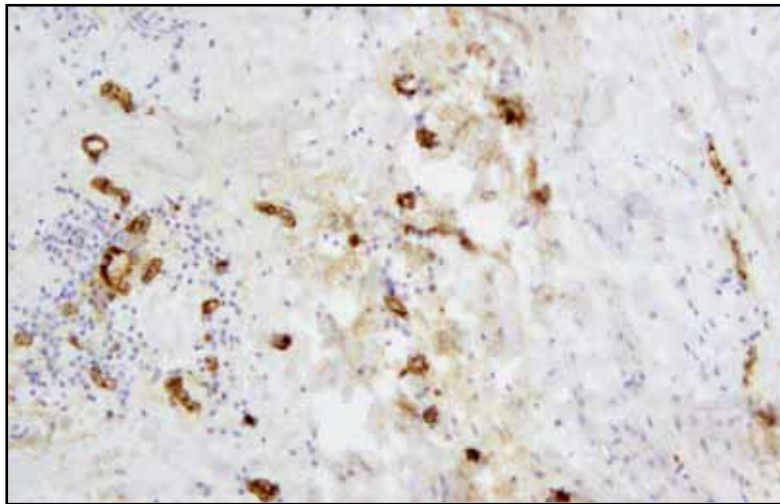


Figura 1.3: Inmunohistoquímica con anti-vWF, distribución vasos sanguíneos en un corte transversal capa media pared aorta aneurismática.

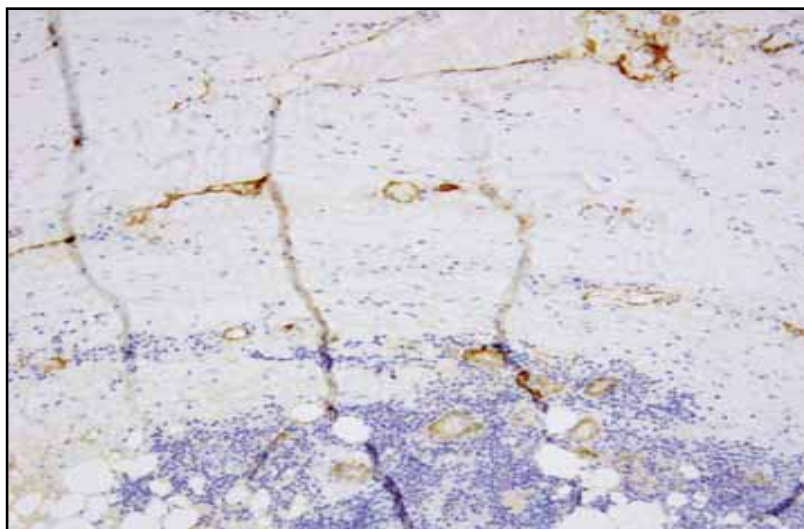


Figura 1.4: Inmunohistoquímica con anti-vWF, abundancia de vasos transversales a los vasos longitudinales radiales normales en la capa media y adventicia de pared de aorta aneurismática.

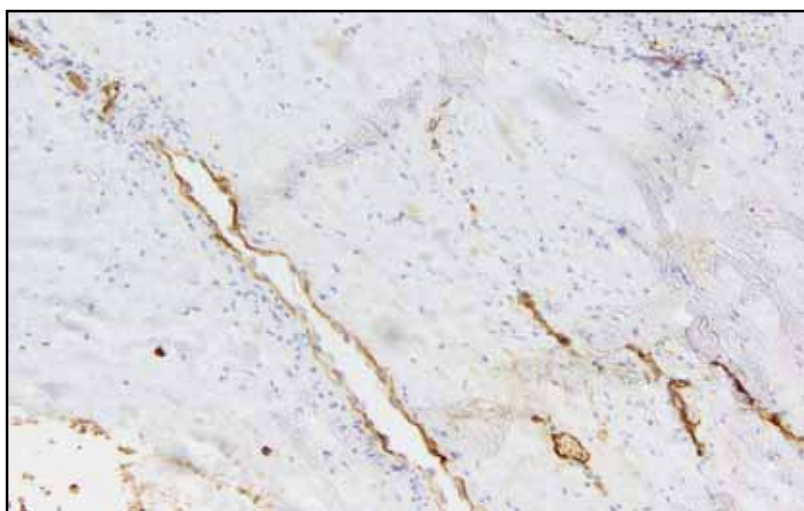
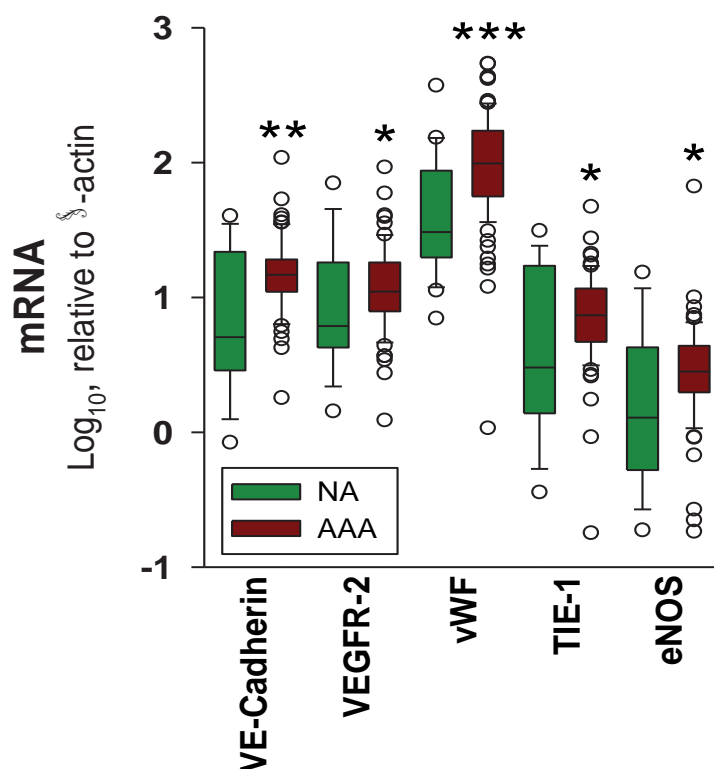


Figura 1.5: Inmunohistoquímica con anti-vWF, detalle neovascularización capa media corte transversal pared aórtica aneurismática.

Para poder estimar el grado de vascularización de las muestras de pared aórtica, se realizó una estimación de la misma en el tejido. Para ello, se determinaron los niveles de expresión del mRNA de 4 marcadores de células endoteliales VE-Cadherin, TIE-1, vWF y la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) como índice de vascularización. También se analizaron los niveles de expresión del receptor-2 del VEGF (VESFR2) un gen muy expresado en las células endoteliales.

La expresión de estos genes no siguió una distribución normal y como se puede observar en la figura 1.6, los niveles de expresión de mRNA de los 5 marcadores están significativamente aumentados en las muestras de AAA.



Para evaluar el grado de hipervascularización en distintas las fases de la enfermedad aneurismática y asumiendo que el diámetro transversal máximo de la aorta infrarrenal es un indicador evolutivo de la enfermedad, se determinaron los niveles de expresión estratificando las muestras de AAA en función del diámetro máximo transversal aórtico. Se estratificaron 3 grupos como hemos comentado anteriormente en la sección de Métodos; “Small Diameter” (SM<55mm), “Medium Diameter” (MD=55-69.9mm) y “Large Diameter” (LD>70mm).

La figura 1.7, muestra el promedio de los niveles de transcritos de los marcadores de células endoteliales para cada grupo, normalizados al valor de la mediana más alto, en función de la estratificación por diámetro. Se aprecia que la expresión de los 5 marcadores fue máxima ya en el grupo de aortas pequeñas (SD), alcanzándose un plató sin evidenciarse diferencias significativas entre ellos, siendo a su vez el promedio de los marcadores de los 5 grupos, significativamente mayor que el del grupo de NA.

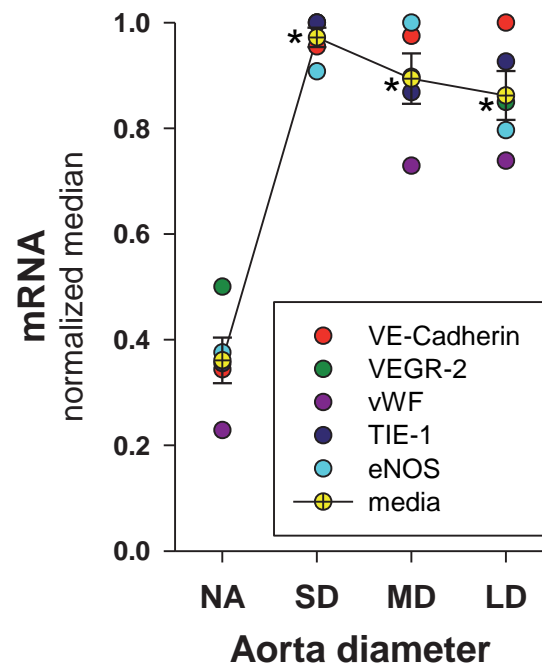


Figura 1.7: Niveles expresión marcadores endoteliales, estratificados según diámetro en muestras aneurismáticas (AAA) comparadas con aortas normales (NA). Los puntos amarillos corresponden a la media \pm SEM (Standar Error Media) de los 5 marcadores y * $p < 0.05$ respecto al grupo de aortas sanas (NA).

Una vez que nuestros resultados mostraron que sí existía un aumento de la vascularización en las muestras de AAA, debíamos conocer si realmente también existía un aumento de la población leucocitaria y en que parte de la pared aneurismática se producía y si esta coincidía con la presencia de microvasos.

Para determinar la distribución de los leucocitos en la pared aórtica aneurismática de nuestras muestras, utilizamos inmunohistoquímica mediante tinción de vWF para localizar los vasos (Figura 1.8), CD45 (marcador pan-leucocitario) para los leucocitos (Figura 1.9) y CD68 para localizar a los macrófagos (Figura 1.10).

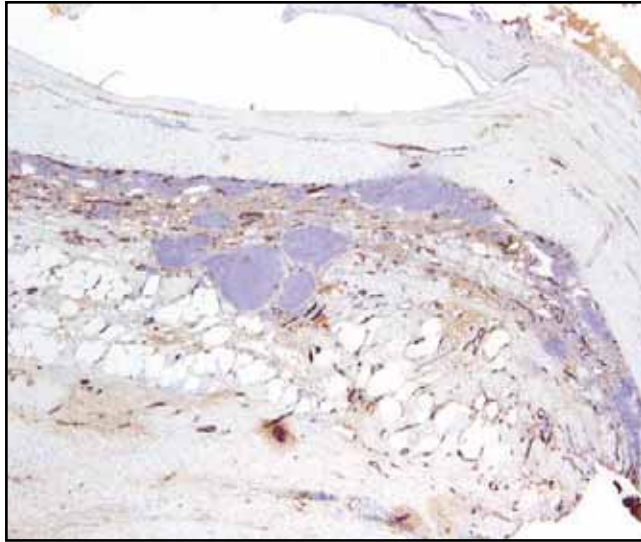


Figura 1.8: Ejemplo representativo de inmuno histoquímica con anti-vWF de la capa media de una muestra de AAA.

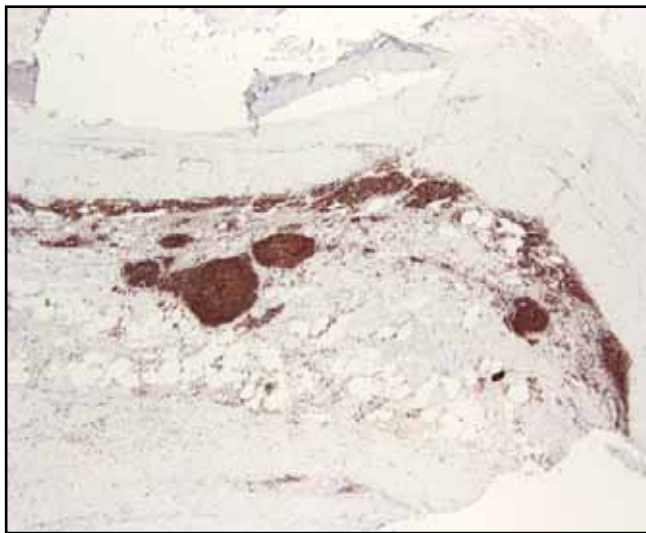


Figura 1.9: Corte seguido del de la figura 1.8 inmuno-teñido con anti-CD45, en donde se aprecian abundantes agregados leucocitarios en la zona perivascular que posiblemente correspondan a agregados linfocitarios.

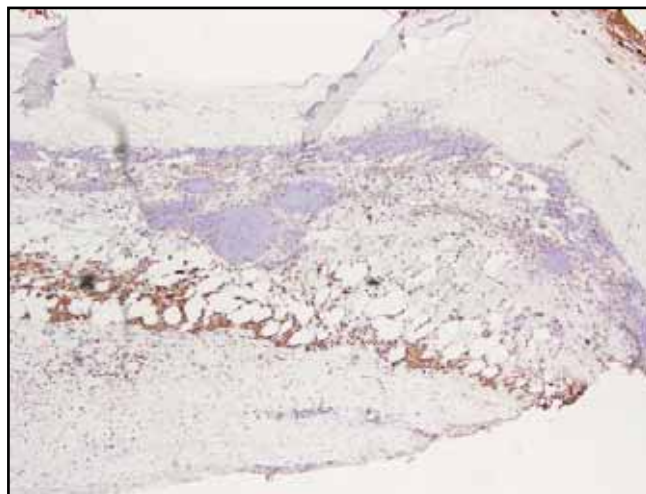


Figura 1.10: Corte seguido del de la figura 1.9 inmuno-teñido con anti-CD68, se aprecian la distribución de los macrófagos en la capa media.

En los cortes histológicos de las muestras de AAA, se aprecian abundantes infiltrados leucocitarios que se repiten en todas las muestras de AAA y se distribuyen en las capas media y adventicia. Esta infiltración leucocitaria es prácticamente inexistente en las muestras de NA.

En la evaluación histológica de los cortes transversales seriados utilizando inmunotinción de CD45 (marcador panleucocitario) se aprecian abundantes infiltrados celulares que se distribuyen perivascularmente y que posiblemente corresponden a agregados linfocitarios (Figura 1.9) ya que al realizar la inmunotinción de CD68 se aprecian que los agregados comentados no corresponden a macrófagos (Figura 1.10).

También estudiamos los niveles de expresión de marcadores leucocitarios (indetectables en los cultivos de células vasculares, datos no presentados): CD45 (marcador panleucocitario), CD68 (marcador de macrófagos), FLAP (five-lipoxygenase activating protein), BTL-1 (leukotriene B4 receptor 1) y NAP-2 (Neutrophil Activating Peptide-2). La expresión de estos genes no sigue una distribución normal y como se puede observar en la figura 1.11, los niveles de expresión de mRNA de dichos genes están significativamente aumentados en los AAA.

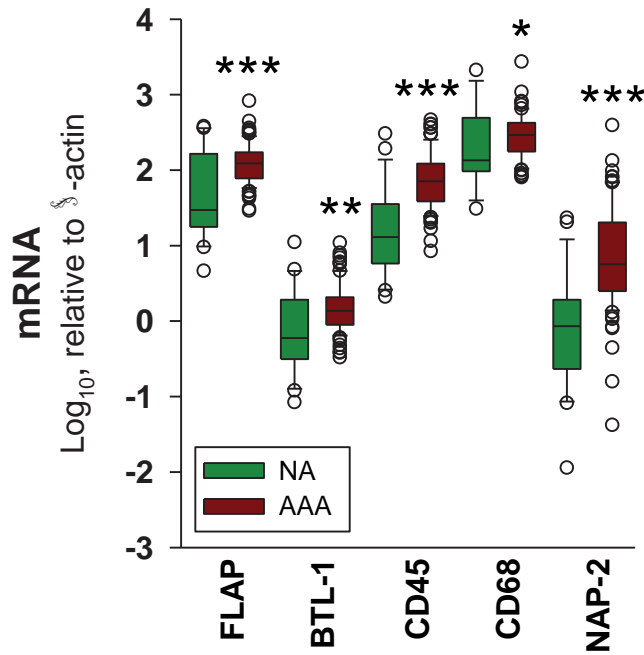


Figura 1.11: Niveles de expresión marcadores leucocitarios en muestras de aorta normal (NA) y en muestras de aorta aneurismática (AAA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ cuando comparamos con el grupo de NA.

La figura 1.12, muestra el promedio de los niveles de transcripción de los marcadores leucocitarios para cada grupo, normalizados al valor de la mediana más alta en función de la estratificación por diámetro. Se aprecia que la expresión máxima de los marcadores leucocitarios, fue en el grupo MD, que muestra claramente un pico respecto del grupo de aortas pequeñas o grandes. Estas diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas del grupo moderado respecto a los otros dos (SD y LD), siendo a su vez la transcripción mayor en todos los grupos respecto al grupo control de aortas sanas, con significación estadística.

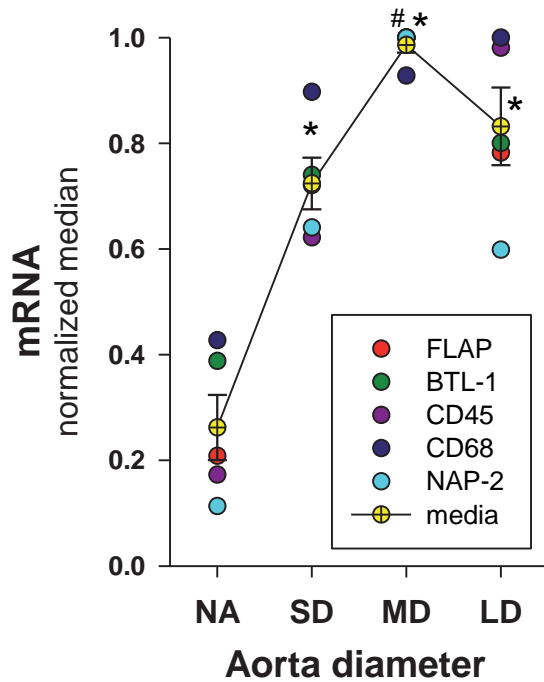


Figura 1.12: Niveles de transcripción marcadores leucocitarios estratificados por diámetro en aortas aneurismáticas (AAA) comparado con aortas normales (NA). Los puntos amarillos corresponden a la media±SEM (Standar Error Media) de los 5 marcadores, * $p < 0.05$ respecto al control con NA, # $p < 0.05$ respecto a los otros grupos de estratificación.

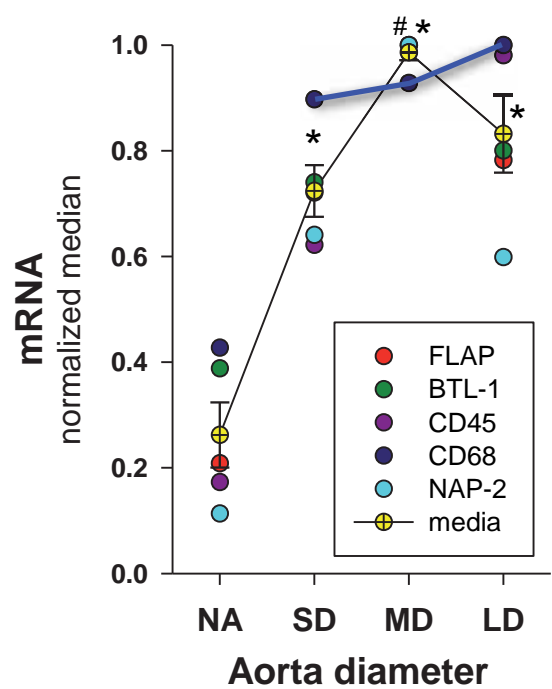


Figura 1.13: detalle del plató de CD68 en los tres grupos de estratificación por diámetros.

Un detalle interesante, es que si nos fijamos exclusivamente en el CD68, vemos que sigue una distribución lineal en los tres grupos estratificados por diámetro y que parece que los macrófagos están presentes desde los estadios iniciales de la enfermedad (Figura 1.13) sin presentar un pico en el grupo de aortas de tamaño medio.

2. INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA EXPRESIÓN LOCAL DE ELEMENTOS DE LA FAMILIA DEL VEGF EN LA PARED DE LA AORTA ANEURISMÁTICA:

Los leucocitos y las células vasculares son fuente de múltiples factores presuntamente involucrados en la progresión del AAA y la hipervascularización. Entre los factores más importantes en la neovascularización está el VEGF. En este apartado, estudiamos la contribución de los factores de riesgo cardiovascular en los niveles locales de elementos de la familia del VEGF. En primer lugar valoramos la expresión de VEGF-A o factor de crecimiento endotelial vascular A y 2 de sus 3 receptores el 1 (VEGFR-1) y el 2 (VEGFR-2) siendo este último el más importante, en muestras de NA y AAA. El VEGF-A es una citocina que actúa específicamente en las células endoteliales y tiene varios efectos, incrementando la permeabilidad vascular, induciendo angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes), la vasculogénesis (formación de novo del sistema circulatorio embrionario) y el crecimiento de células endoteliales, promoviendo la migración celular e inhibiendo la apoptosis.

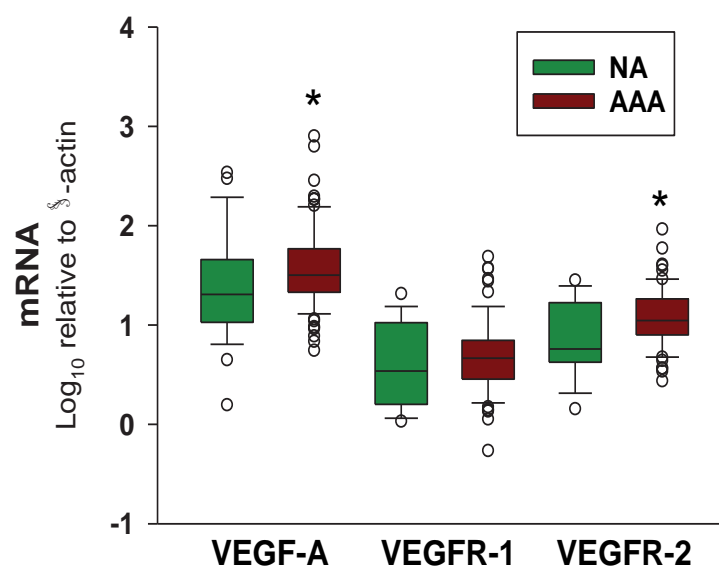


Figura 2.1: Niveles de transcritos de VEGF-A y de sus receptores 1 y 2. *p<0.05 cuando comparamos muestras NA y

La figura 2.1. muestra que existe un aumento estadísticamente significativo de la expresión de VEGF-A y de su receptor más importante, el VEGFR-2, sin apreciarse diferencias estadísticamente significativas en el VEGFR-1.

Las características clínicas, demográficas y los factores de riesgo de los pacientes utilizados para el estudio se muestran en la tabla 1 (Material y métodos).

Hemos realizado el estudio para observar si factores de riesgo cardiovasculares clásicos como el tabaquismo, la HTA, la DM y la DLP y algún antecedente médico relevante como la EPOC o la IR tienen alguna relación con la expresión local de VEGF-A de sus receptores en muestras de AAA (Tabla 2.1).

Tabla 2.1: Niveles de transcrito de VEGF-A y de sus receptores en muestras de AAA estratificadas según los factores de riesgo cardiovasculares y enfermedades de base. El número de pacientes de cada grupo se ha indicado previamente en la tabla 1 y los datos se expresan relativos a β -actina x1000.

	Mediana	Percentil 25°-75°	Valor p vs ausencia ^a
VEGF-A			
No fumadores	31.8	21.9-48.7	
Fumadores	38.3	20.6-74.8	0.446
No insuficiencia renal	32.4	22.1-50.2	
Insuficiencia renal	31.8	19.7-65.6	0.910
No hipertensión	30.1	22.6-60.4	
Hipertensión	32.9	19.7-58.6	0.925
No diabetes mellitus	34.4	22.1-52.6	
Diabetes mellitus	28.0	17.0-117.7	0.806
No Dislipemia	32.9	19.7-58.6	
Dislipemia	31.8	22.7-60.7	0.740
No EPOC ^b	28.4	20.9-54.6	
EPOC	41.9	21.6-71.6	0.202
VEGFR-1			
No fumadores	4.55	2.75-7.11	
Fumadores	5.04	3.27-7.61	0.361
No insuficiencia renal	4.89	3.08-9.49	
Insuficiencia renal	4.05	2.67-6.56	0.239
No hipertensión	4.99	2.91-6.90	
Hipertensión	4.56	2.72-8.62	0.810
No diabetes mellitus	4.79	3.73-7.11	
Diabetes mellitus	3.00	1.75-8.19	0.037
No Dislipemia	4.77	2.82-7.33	
Dislipemia	4.62	2.88-6.90	0.788
No EPOC ^b	4.65	2.88-6.47	
EPOC	4.56	2.79-8.62	0.988
VEGFR-2			
No fumadores	10.4	6.29-18.6	
Fumadores	13.9	9.78-20.3	0.032 ^c
No insuficiencia renal	10.9	7.23-16.7	
Insuficiencia renal	13.6	7.89-27.1	0.208
No hipertensión	9.91	7.89-12.9	
Hipertensión	12.2	7.88-22.9	0.183
No diabetes mellitus	12.2	8.37-19.1	
Diabetes mellitus	8.75	5.09-14.3	0.095 ^d
No Dislipemia	13.4	9.01-24.2	
Dislipemia	10.9	7.88-14.9	0.253
No EPOC ^b	11.0	8.01-18.0	
EPOC	14.4	7.64-28.2	0.657

^(a) Mann-Whitney Rank Sum Test.

^(b) EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

^(c) Se encontró $p=0.06$ aplicando Mann-Whitney Rank Sum Test; tras transformación logarítmica se obtuvo una distribución normal y se encontró $p=0.032$ aplicando t-Student.

^(d) Tras transformación logarítmica se obtuvo una distribución normal y se encontró $p=0.233$ aplicando t-Student.

No se observó diferencias entre pacientes con ningún factor de riesgo en el caso de los niveles de VEGF-A (Tabla 2.1). Apreciamos que sólo los pacientes diabéticos (DM) tienen disminuida la expresión del VEGFR-1 de modo estadísticamente significativo frente a los no diabéticos. En el caso del VEGFR-2 tampoco se observaron diferencias entre los pacientes con y sin el factor de riesgo al aplicar un test no paramétrico. Sin embargo, al realizar una transformación logarítmica para conseguir una distribución normal y poder aplicar un test paramétrico, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los fumadores activos y los no activos con un valor superior en los fumadores activos (ver tabla 1.2). Ya que el caso de la DM se obtuvo una “p” casi significativa (0.095) se aplicó el mismo procedimiento a los datos de la DM. Sin embargo, la significación estadística aun fue peor ($p=0.233$) que con el test no paramétrico, con lo cual concluimos que no hay diferencias en cuanto a los niveles de VEGFR-2 entre diabéticos y no diabéticos en los pacientes de AAA.

Debido a la posibilidad de que pudiera haber asociación entre los distintos factores de riesgo cardiovascular se aplicó el test de χ^2 a los mismos. Como se muestra en la Tabla 2.2 observamos que RI-HTA, RI-EPOC y CS-EPOC eran variables asociadas, y CS-HTA eran sospechosas de serlo ($p=0.066$). Por tanto, no observamos ningún factor asociado con la DM y podemos concluir que los pacientes de AAA diabéticos presentan una menor expresión de VEGFR-1 que los no diabéticos. En el caso del tabaquismo hemos de considerar que tanto la EPOC como HTA podrían ser variables confusoras. Entonces aplicamos a los valores de VEGF-2 Log10-transformados el test de regresión lineal múltiple considerando además de ser fumador activo, EPOC y HTA. El resultado fue estadísticamente significativo para el caso de los fumadores activos vs no-activos

($p=0.024$). Concluimos pues que los fumadores activos presentan mayor expresión local de VEGFR-2 que los no-fumadores activos.

Tabla 2.2: χ^2 Análisis de los factores de riesgo y enfermedades asociadas .

Variables	EPOC	Fumadores activos	Diabetes Mellitus	Dislipemia	Insuficiencia Renal
HTA	$\chi^2=1.494$ $p=.222$	$\chi^2=3.371$ $p=.066$	$\chi^2=1.801$ $p=.180$	$\chi^2=.0318$ $p=.859$	$\chi^2=4.448$ $p=.035$
EPOC		$\chi^2=8.464$ $p=.004$	$\chi^2=.0006$ $p=.981$	$\chi^2=.082$ $p=.775$	$\chi^2=9.952$ $p=.002$
Fumadores activos			$\chi^2=.0326$ $p=.857$	$\chi^2=.0009$ $p=.976$	$\chi^2=1.223$ $p=.269$
Diabetes mellitus				$\chi^2=2.55$ $p=.110$	$\chi^2=.04$ $p=.842$
Dislipemia					$\chi^2=.003$ $p=.957$

HTA: Hipertensión arterial
EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

Realizamos un estudio para determinar la asociación entre la expresión los 2 receptores del VEGF-A, VEGFR-1 y VEGFR-2 con marcadores de las diferentes estirpes celulares tanto células vasculares como leucocitarias y encontramos una relación estadística moderada entre los niveles de transcrito de VEGFR-1 tanto con el marcador de las células endoteliales (vWF) como con el de las células musculares lisas (α -Actina), siendo esta correlación muy significativa con ambos marcadores cuando analizamos el VEGFR-2 (Figura 2.2).

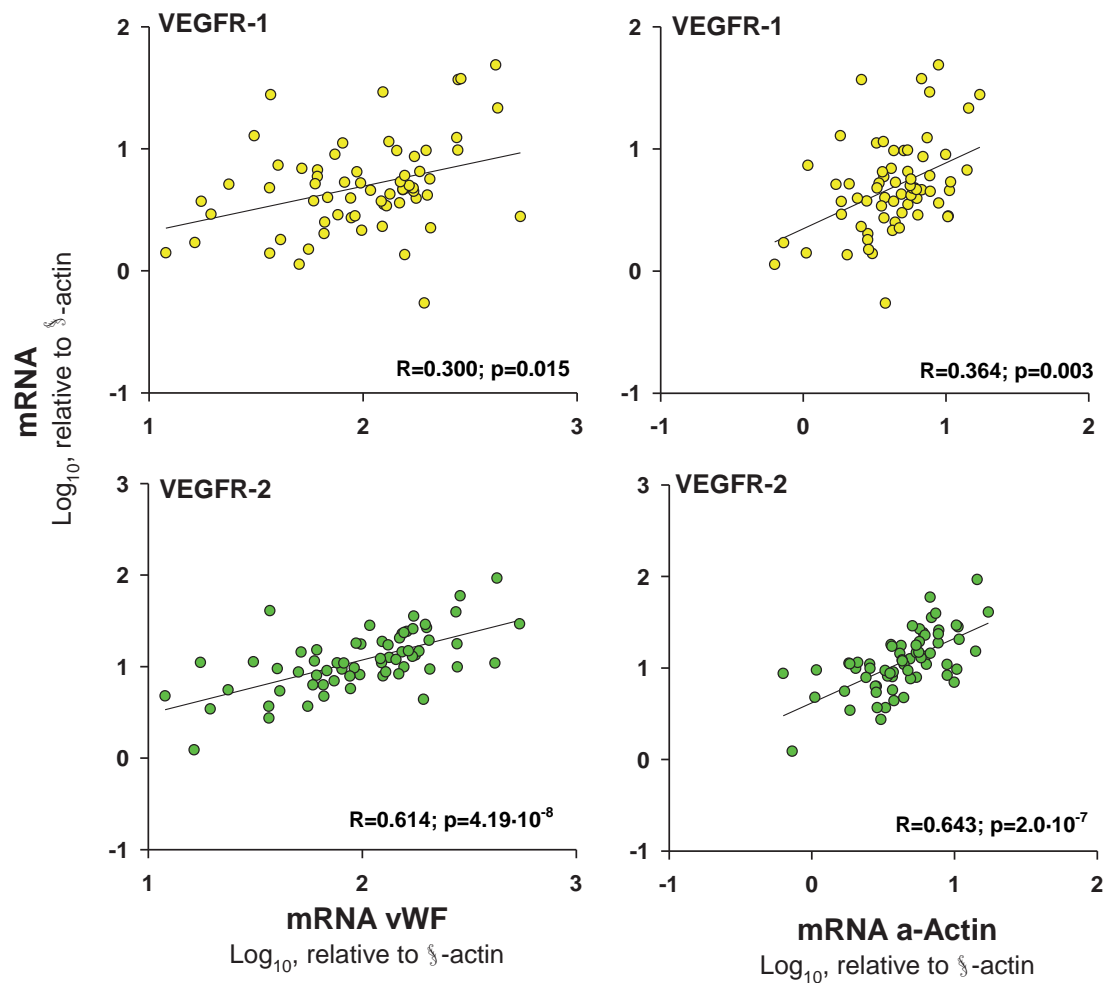


Figura 2.2: Correlación entre VEGFR-1 y VEGFR-2 con marcadores de células vasculares, tanto endoteliales (vWF) como musculares lisas (α -actina).

No observamos una correlación significativa entre CD45 y VEGFR-1, siendo débil entre CD68 (marcador de macrófagos) y VEGFR-1. Sin embargo, cuando valoramos la relación de la expresión de VEGFR-2, se aprecia una correlación significativa tanto con CD68 (marcador de macrófagos) como con CD45 (marcador panleucocitario) (Figura 2.3). Sin embargo estas correlaciones fueron menores que con los marcadores de células vasculares. Estos resultados sugieren que la variación en los niveles de VEGFR-2 esta asociada mayoritariamente a las células vasculares.

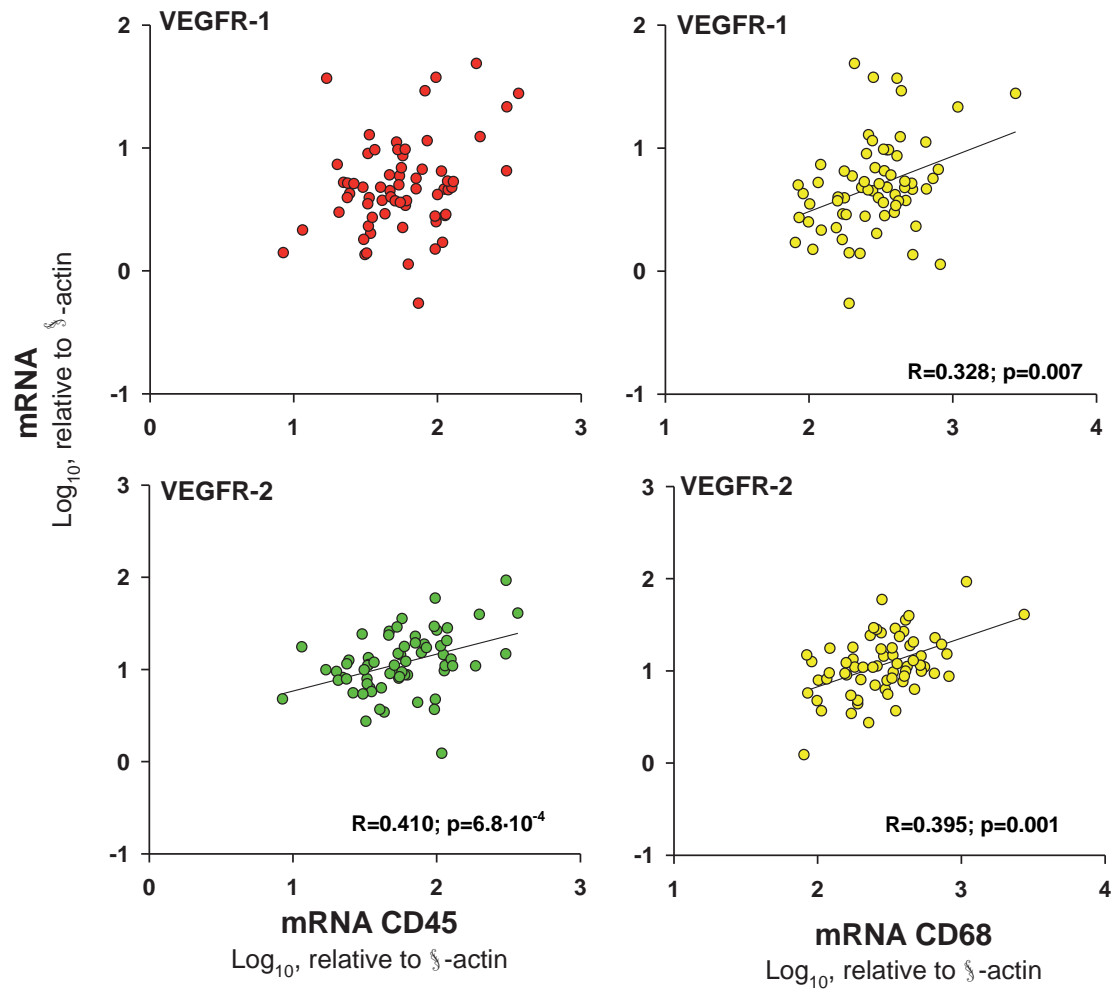


Figura 2.3: Correlación entre VEGFR-1 y VEGFR-2 con marcadores leucocitarios.

3. INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN LA EXPRESIÓN LOCAL DE METALOPROTEINASAS EN LA PARED DE LA AORTA ANEURISMÁTICA:

Como hemos comentado anteriormente, a pesar del hecho de que la aterosclerosis y los AAA son enfermedades inflamatorias, los factores de riesgo cardiovascular establecidos, no parecen tener el mismo grado de influencia en ambas. Como también hemos comentado los principales factores de riesgo de los AAA incluyen la edad, los antecedentes familiares, el sexo masculino, la hiperlipemia, la HTA y el tabaquismo²⁶⁰. La DM ha demostrado tener un efecto protector para la AAA²⁶¹ y la EPOC también se ha asociado con AAA²⁶².

Tanto los leucocitos como las células vasculares son fuente de múltiples factores presuntamente involucrados en la progresión del AAA. Entre los factores que se conoce que juegan un papel relevante están las MMPs. Como se ha comentado en la introducción la degradación de la matriz extracelular es esencial no sólo para el debilitamiento mecánico de la pared aórtica sino también para el proceso de angiogénesis.

Actualmente no existe información acerca de la influencia de los factores de riesgo cardiovascular en los niveles locales de MMP en AAA, por lo que el presente apartado se han focalizado en evaluar la influencia de los principales factores de riesgo cardiovascular y enfermedades asociadas de los pacientes, en los niveles de expresión local de MMP-2 y MMP-9 en el tejido aneurismático procedente de pacientes intervenidos quirúrgicamente. Las características de los pacientes se muestran en la tabla 1, del apartado de material y métodos.

Para determinar la expresión de MMP-2 y MMP-9, se determinaron los niveles de transcritos de ambas MMPs en muestras de AAA y NA. La distribución de los datos no se ajustaron a una distribución normal, con lo cual a efectos comparativos se utilizó una prueba no paramétrica.

Observamos que los niveles de expresión tanto de MMP-2 como de MMP-9, estaban significativamente aumentados en las muestras de aorta patológica (AAA) respecto a las muestras de aorta sana (NA), (Figura 3.1).

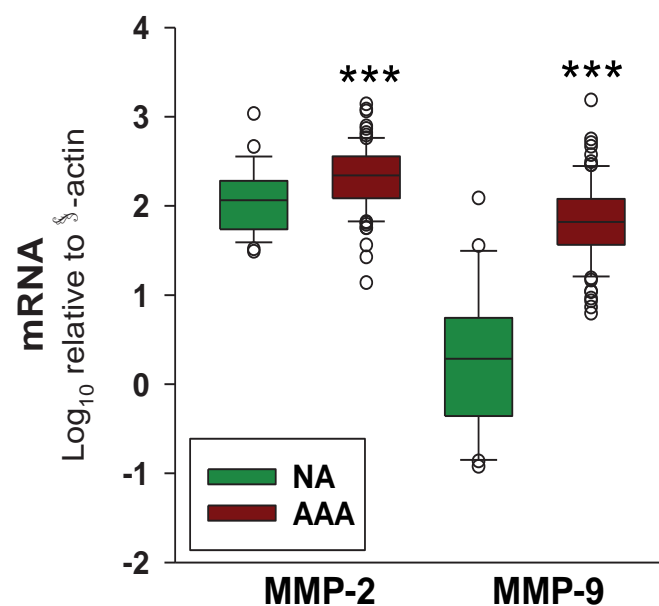


Figura 3.1: expresión de MMP-2 y MMP-9 en muestras de aorta sana (NA) y de pacientes con aneurisma aorta abdominal (AAA). Los datos se expresan en relación con β -actina x 1000; *** $p < 0.001$ cuando comparamos con el

Para evaluar los niveles de MMP en las diferentes etapas de desarrollo de la enfermedad aneurismática, se examinaron muestras de AAA, estratificadas en función del diámetro máximo en tres grupos como ya hemos comentado anteriormente. Hemos observado que la expresión de MMP-2 fue estadísticamente similar en los tres grupos de pacientes,

mientras que los niveles de mRNA de la MMP-9 fueron máximos en el grupo MD (Figura 3.2).

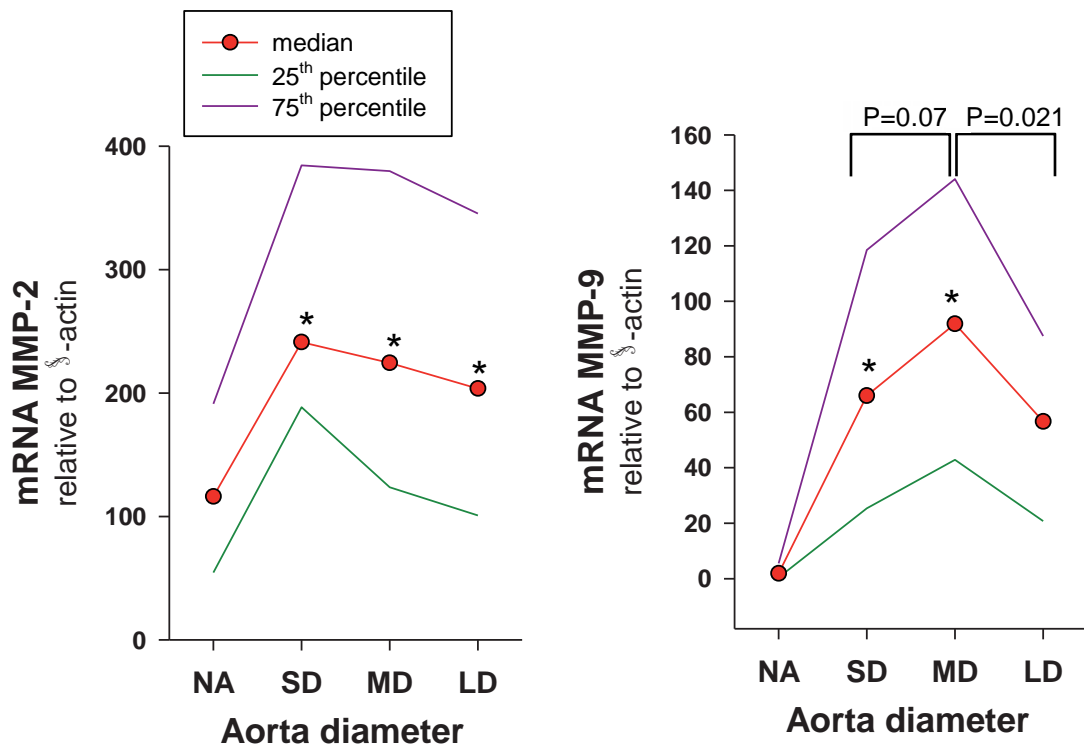


Figura 3.2: Expresión de MMP-2 y MMP-9 en muestras de aorta normal y en pacientes con AAA, estratificados según el diámetro máximo. Los datos se expresan en relación a la β -actina x 1000; * $p < 0.05$ cuando comparamos con el grupo de NA.

El distinto patrón de expresión entre MMP-2 y MMP-9 nos indujo a determinar la localización de ambas proteínas en el tejido aórtico mediante inmunohistoquímica.

Observamos que la MMP-2 se expresa débilmente y de forma ubicua en las células vasculares de las muestras de NA tanto en las VSMC (Figura 3.3) como en las células endoteliales (Figura 3.4).

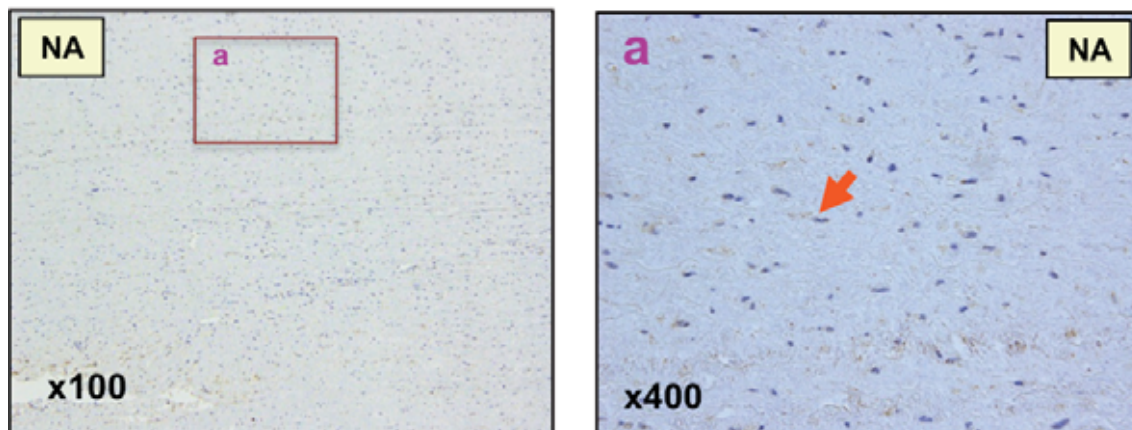


Figura 3.3: Ejemplo representativo de la inmunohistoquímica de la MMP-2 en muestras aorta normal.

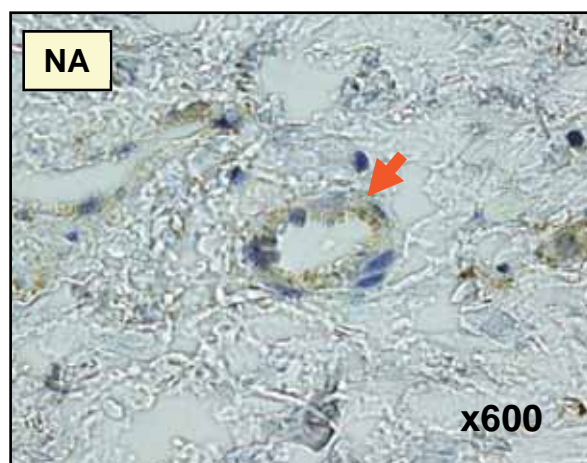


Figura 3.4: Detalle inmunotinción para MMP-2 en células endoteliales de muestras de aorta sana.

En las muestras de AAA, el patrón de la expresión de MMP-2 fue cualitativamente similar a la observada en las aortas normales con respecto a las células vasculares, pero la inmunotinción se incrementó notablemente. En la Figura 3.5 se muestra un ejemplo de la inmunotinción de MMP-2 en las VSMC de la capa media de una muestra de AAA y en la Figura 3.6 se muestra la expresión de MMP-2 en los microvasos aunque las tinciones no eran concluyentes en cuanto a una tinción en las células endoteliales. Además encontramos algunas células positivas a la inmunotinción de MMP-2 en las áreas de infiltración de leucocitos (Figura 3.6).

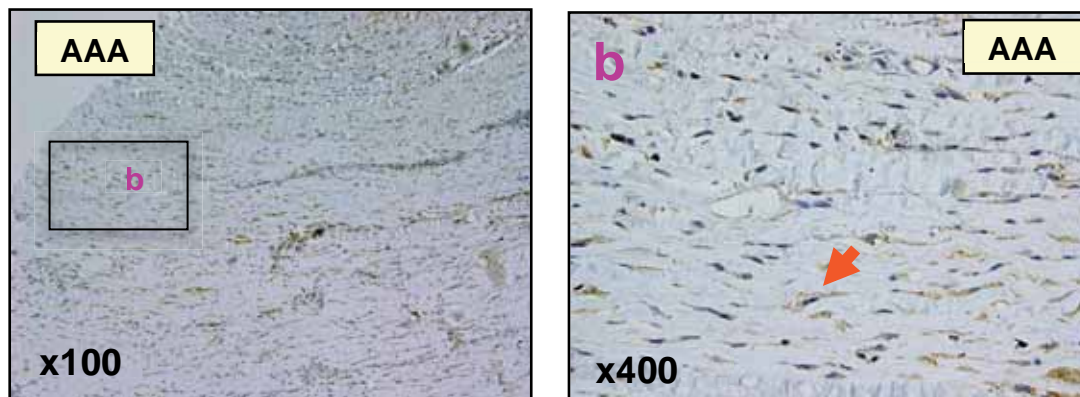


Figura 3.5: Detalle inmunotinción para MMP-2 en VSMC capa media de muestras de AAA.

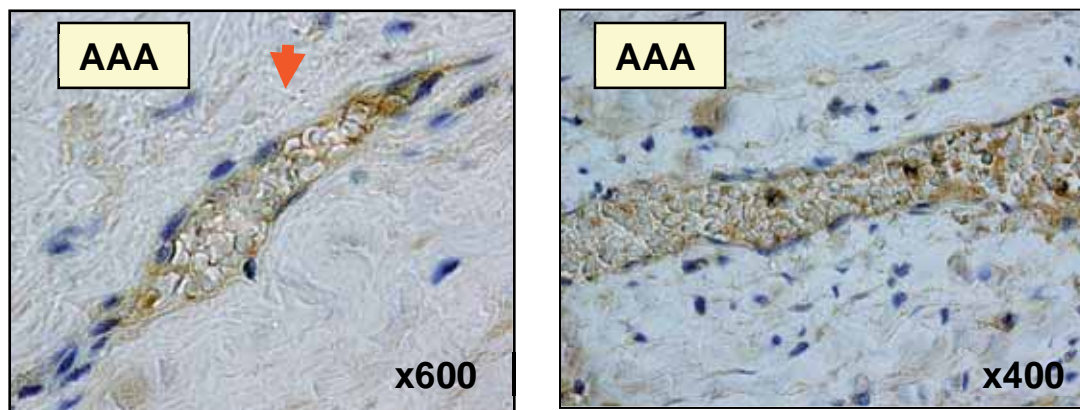


Figura 3.6: Detalle inmunotinción para MMP-2 en los microvasos.

También se determinó la asociación entre los niveles de expresión de MMP-2 con marcadores de tipo celular, tanto con las VSMC y células endoteliales como con los marcadores leucocitarios. Los Resultados (Figura 3.7), muestran una fuerte correlación de MMP-2 con la α -actina (marcador de VSMC) y con vWF (marcador células endoteliales), mientras que la correlación con CD45 (marcador panleucocitario) y con CD68 (marcador específico de macrófagos), fue débil. Estos resultados fueron coherentes con las observaciones de inmunohistoquímica que mostraron que la MMP-2

está fundamentalmente ligada a las células vasculares más que a los leucocitos infiltrantes.

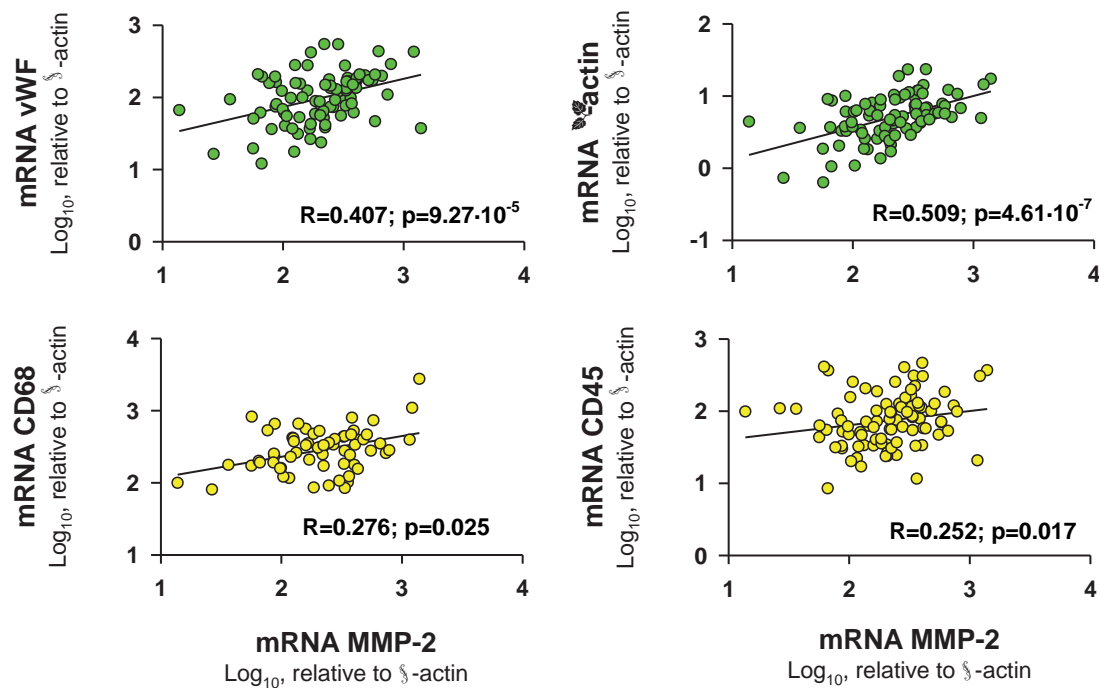


Figura 3.7: Correlación de los niveles de transcrito de MMP-2 con marcadores de células endoteliales (vWF), VSMC (α -actina), panleucocitario (CD45) y macrófagos (CD68).

Para identificar mejor la localización de la MMP-2 se realizaron tinciones dobles por inmunofluorescencia. En concreto, se realizaron tinciones simultáneas de MMP-2 y α -actina (marcador de VSMC). La Figura 3.8 muestra un ejemplo representativo de tinción en un área de microvasos.

Cuando nos fijamos en la coexpresión de MMP-2 y de α -actina, evidenciamos la expresión de MMP-2 por las células musculares de los microvasos de mayor tamaño, sin apreciar apenas reacción en las células endoteliales, mientras que en los vasos de menor tamaño no se observa apenas tinción de la MMP-2 (Figura 3.8). Estas observaciones se aprecian claramente en el panel de mezcla de todas las tinciones donde no se aprecia

color amarillo en la parte central del vaso mientras si que se aprecia coexpresión en la parte periférica del vaso.

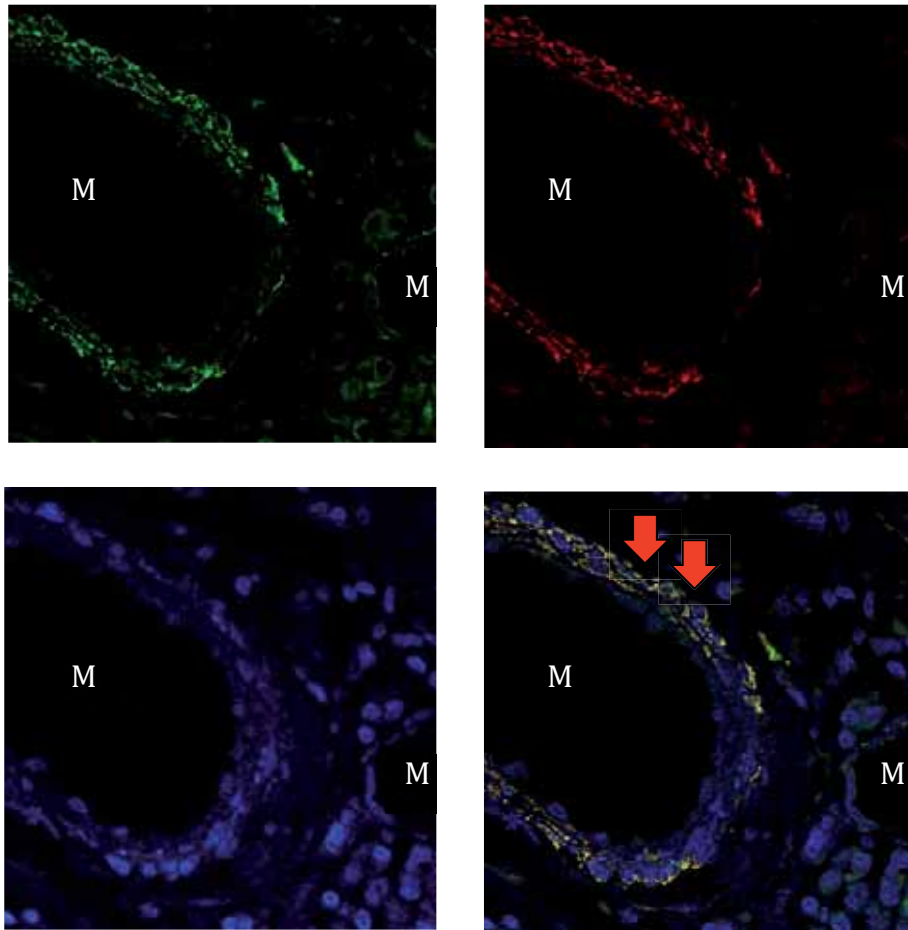


Figura 3.8: Detalle inmunofluorescencia en zonas de microvasos en muestras de AAA con doble tinción de MMP-2 en verde y α -actina (marcador de VSMC) en rojo. La flechas indican algunas células con coexpresión de ambas proteínas. La M indica el centro de los microvasos. Los núcleos están teñidos en azul.

Esta expresión de MMP-2 por parte de las células musculares, se evidenció claramente al realizar la doble tinción por inmunofluorescencia de las células de la capa media de los AAA. Como podemos apreciar en la Figura 3.9, se observó una clara co-expresión de MMP-2 y α -actina en las células de la capa media.

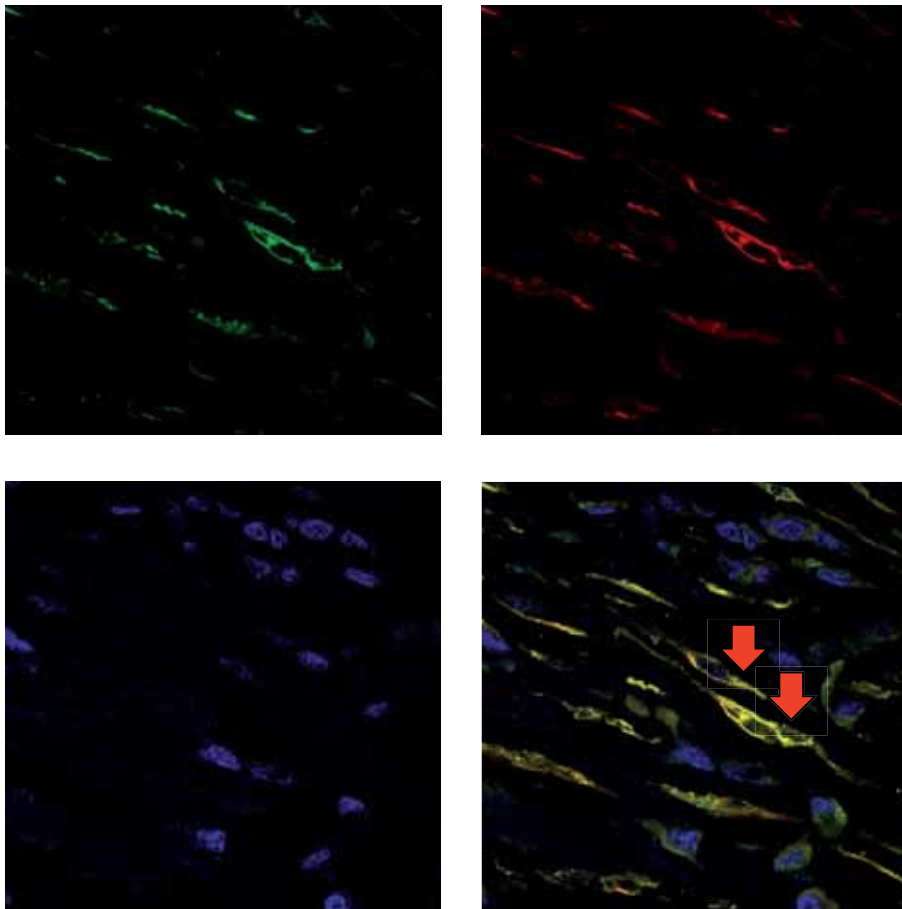


Figura 3.9: Detalle inmunofluorescencia en la capa media en muestras de AAA con doble tinción de MMP-2 en verde y α -actina (marcador de VSMC) en rojo. La flechas indican algunas células con coexpresión de ambas proteínas. Los núcleos están teñidos en azul.

Cuando se realizó la localización de la MMP-9 por inmunohistoquímica no se detectó inmunotinción para MMP-9, en las muestras de NA (resultados no mostrados) y en las muestras de AAA se asoció principalmente a la infiltración leucocitaria (Figura 3.10).

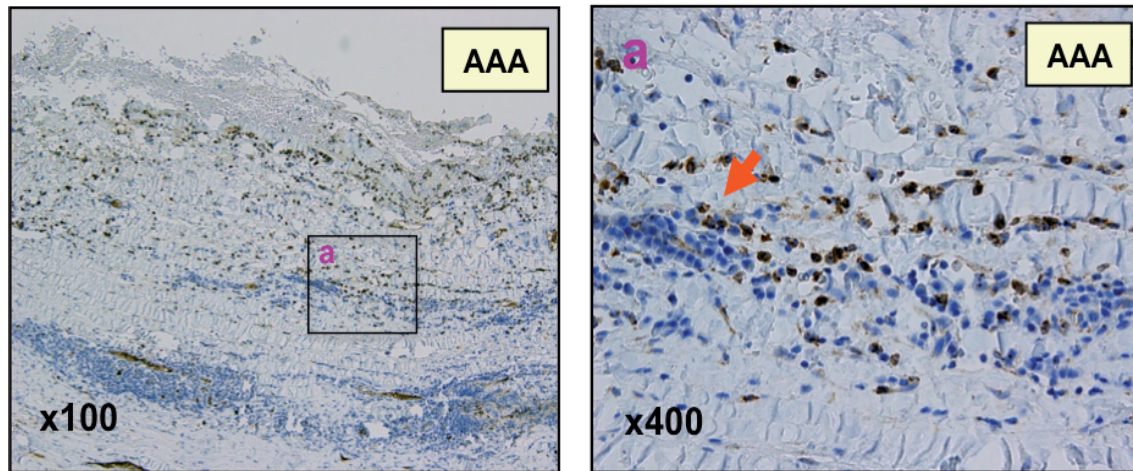


Figura 3.10: Detalle inmunotinción para MMP-9 capa media, en muestras de AAA.

Cuando estudiamos la asociación entre la variación en la expresión de transcrito de MMP-9 con los marcadores celulares observamos lo contrario que en el caso de la MMP-2. No se encontró correlación entre MMP-9 ni con el vWF ni con α -actina, mientras que las correlaciones con marcadores leucocitarios fueron estadísticamente significativas, particularmente con los niveles de CD68 (Figura 3.11).

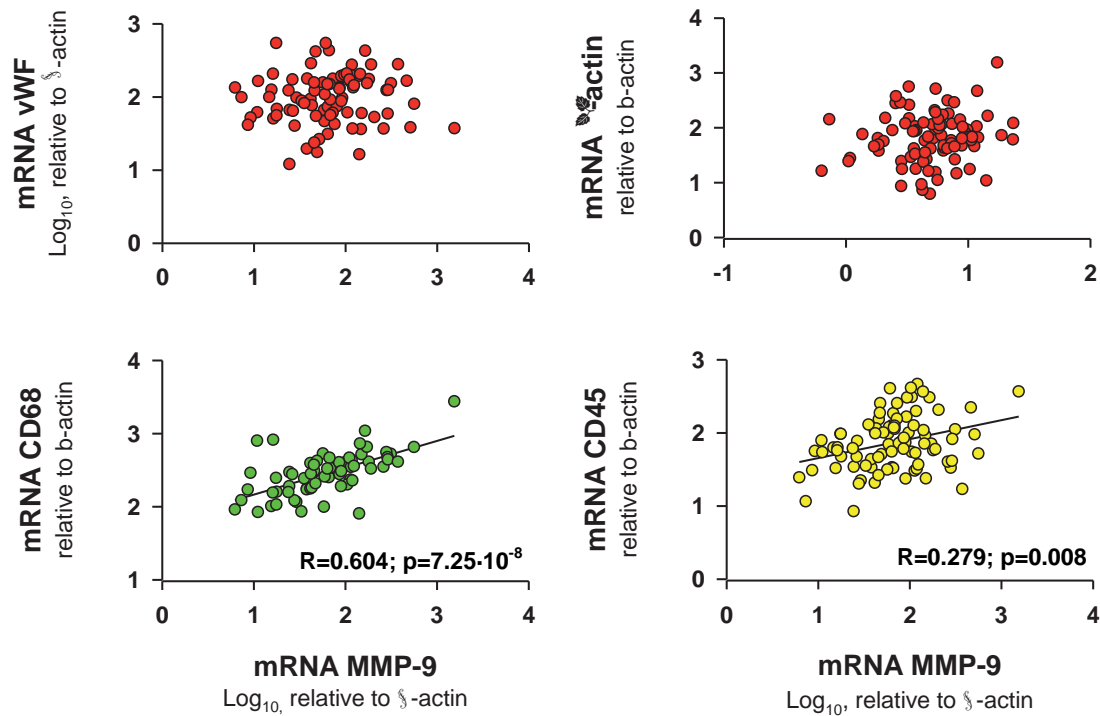


Figura 3.11: Correlación de los niveles de transcrito de MMP-9 con marcadores de células endoteliales (vWF), VSMC (α -actina), panleucocitario (CD45) y macrófagos (CD68).

Además, se determinaron los niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 en HUVEC y VSMC en cultivo. La MMP-2 se expresó en ambas células vasculares, mientras que la MMP-9 no se detectó en ninguna de ellas por PCR en tiempo real (resultados no mostrados).

Realizamos el estudio de doble tinción MMP-9/CD45 y MMP-9/CD68 mediante inmunofluorescencia en las zonas de infiltración leucocitaria. Los resultados de la doble tinción de MMP-9 y CD45 (marcador panleucocitario) mostraron que efectivamente existía co-expresión de ambas proteínas en algunos leucocitos (Figura 3.12).

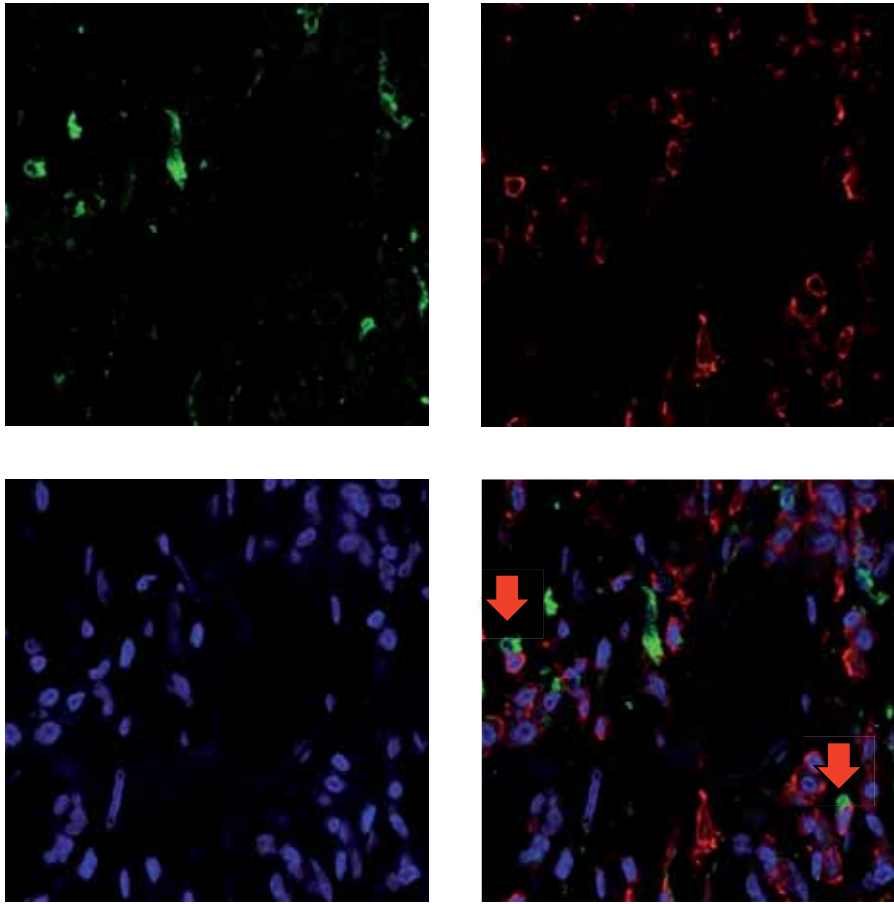


Figura 3.12: Detalle inmunofluorescencia en un área de infiltración leucocitaria de muestras de AAA para marcar MMP-9 en verde y CD45 (marcador panleucocitario) en rojo. Las flechas indican algunas células con coexpresión de ambas proteínas. Los núcleos están teñidos en azul.

Al realizar inmunofluorescencia para MMP-9 y CD68 (marcador de macrófagos) (Figuras 3.13) se aprecia una clara expresión de MMP-9 en el área de infiltración y abundantes células donde se observa coexpresión de ambas proteínas. Estos resultados reafirman la expresión de esta metaloproteinasa fundamentalmente en los macrófagos infiltrantes de las aortas con degeneración aneurismática.

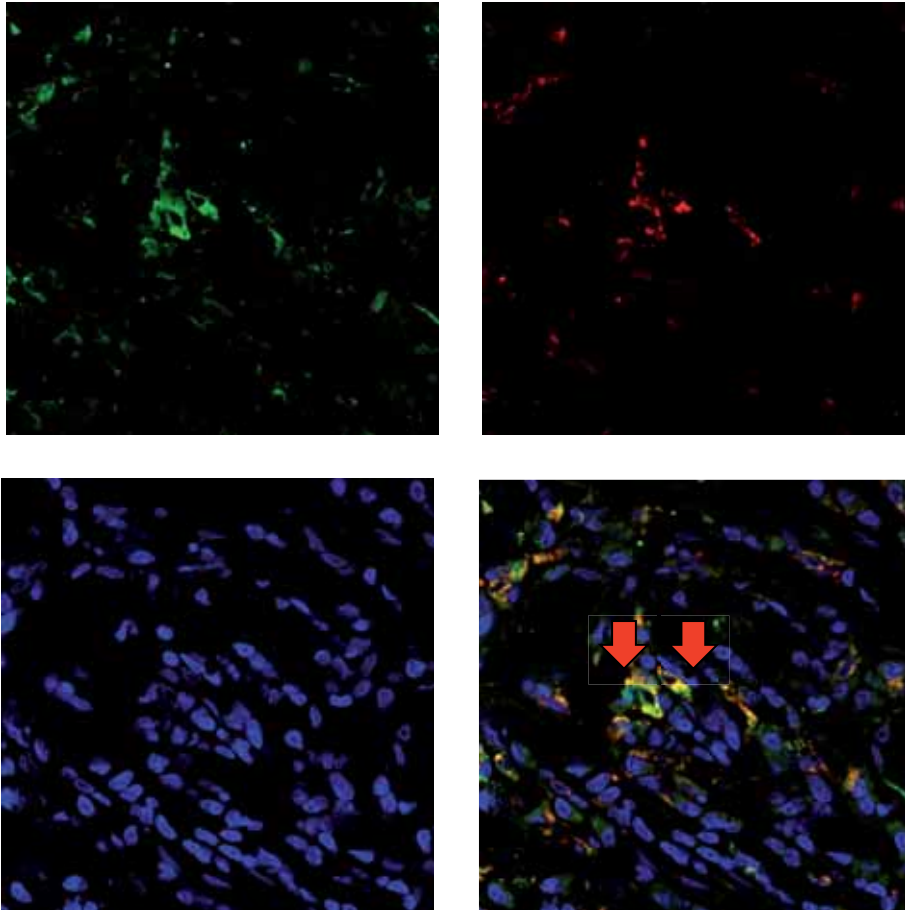


Figura 3.13: Detalle inmunofluorescencia en un área de infiltración leucocitaria en muestras de AAA para marcar MMP-9 en verde y CD68 (marcador de macrófagos) en rojo. Las flechas indican algunas células con coexpresión de ambas proteínas. Los núcleos están teñidos en azul.

Resumiendo, estos resultados muestran claramente que la MMP-2 está fundamentalmente asociada a las células vasculares, especialmente VSMC mientras que la MMP-9 lo está a los leucocitos del infiltrado inflamatorio local, particularmente macrófagos.

INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO EN LOS NIVELES LOCALES DE MMP-2 Y MMP-9:

Una vez comprobado que la expresión de MMP-2 y MMP-9, está significativamente más aumentada en las muestras de aorta patológica respecto a las muestras de aorta sana como cabía esperar, hemos estudiado la influencia de los factores de riesgo cardiovascular clásicos como el tabaquismo, la HTA, la DM y la DLP y algún antecedente médico relevante como la EPOC o la IR tienen alguna relación con la expresión de estas enzimas.

Las características clínicas, demográficas y los factores de riesgo de los pacientes utilizados para realizar el estudio, se han mostrado previamente en la tabla 1 (Material y Métodos).

Con respecto a los niveles de transcrito de MMP-2 y MMP-9, encontramos que todos los grupos de pacientes estratificados por los factores de riesgo fueron estadísticamente diferentes (mayores) del grupo de donantes con aorta normal. Además, el grupo de fumadores activos o “Current Smokers” (CS) presentaban niveles significativamente mayores de expresión de MMP-2 que los no fumadores o “No Current Smokers” (NCS) (Tabla 3.1). Del mismo modo, los pacientes con insuficiencia renal o “Renal Insufficiency” (RI) también tienen mayor expresión de MMP-2 que los pacientes con filtrado glomerular normal. Ninguno de los otros factores de riesgo estudiados, han mostrado diferencias significativas en los niveles de MMP-2 entre las muestras de AAA. Sin embargo no observamos diferencias estadísticamente significativas cuando se

evaluó la expresión local de MMP-9 en los pacientes estratificados por los factores de riesgo.

Tabla 3.1: Niveles de transcritos de MMP-2 y de MMP-9 en muestras de aorta aneurismática (AAA) estratificadas en función de los factores de riesgo cardiovasculares. El número de pacientes de cada grupo se ha mostrado previamente en la Tabla 1. Los datos se expresan relativos a β -actina x1000.

	Median	25 th -75 th percentile	p value vs no-factor ^a
MMP-2			
No fumadores	184.4	100.0-320.5	
Fumadores	349.5	219.5-408.4	<0.001
No insuficiencia renal	177.3	99.3-326.9	
Insuficiencia renal	286.8	189.6-410.8	0.004
No hipertensión	232.7	170.2-335.8	
Hipertensión	216.2	109.5-394.8	0.818
No diabetes mellitus	217.0	132.6-351.4	
Diabetes mellitus	224.3	86.5-394.1	0.908
No Dislipemia	219.5	104.7-347.3	
Dislipemia	221.0	132.6-363.4	0.734
No EPOC ^b	207.0	109.5-334.9	
EPOC	232.4	170.0-404.3	0.107
MMP-9			
No fumadores	67.2	38.8-122.5	
Fumadores	61.7	35.4-110.1	0.573
No insuficiencia renal	64.9	38.1-119.1	
Insuficiencia renal	75.8	29.1-120.2	0.997
No hipertensión	65.6	37.8-110.1	
Hipertensión	66.0	34.3-123.0	0.662
No diabetes mellitus	67.7	38.1-119.1	
Diabetes mellitus	60.9	31.3-120.2	0.678
No Dislipemia	72.8	41.6-143.3	
Dislipemia	62.2	26.6-115.0	0.231
No EPOC ^b	64.1	39.0-135.6	
EPOC	67.1	26.6-105.3	0.617

^(a) Mann-Whitney Rank Sum Test.

^(b) EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

Como se ha mostrado en el apartado anterior, después del análisis con χ^2 , identificamos la HTA y la EPOC como variables probablemente relacionadas con el ser fumador activo o con la insuficiencia renal, que podrían actuar como factores de confusión (ver tabla 1.3). Se aplicó una transformación logarítmica de los resultados de MMP-2 y del filtrado glomerular estimado ya que no se ajustaban a una distribución normal, previo la

análisis de regresión lineal múltiple. A pesar de los datos observados el análisis estadístico simple, el análisis de regresión lineal múltiple, descartó una relación entre la insuficiencia renal y la expresión de MMP-2 al introducir los factores de confusión en el modelo ($p=0.126$). Por otro lado, la relación entre los fumadores activos y la expresión de MMP-2 se ha mantenido estable, a pesar de la presencia de los factores de confusión en la estadística ($p=0.019$). Cuando valoramos las diferencias entre los fumadores y los no fumadores activos, analizadas en todos los grupos de pacientes estratificados por el diámetro máximo de la aorta transversal, los fumadores (CS) presentan mayores niveles de MMP-2 que los no fumadores. Sin embargo, sólo las diferencias del grupo de mayor diámetro (LD) fueron estadísticamente significativas. Probablemente esto podría ser debido al bajo número de fumadores activos en cada grupo, particularmente en el grupo de aortas pequeñas (SD) ya que la muestra fue relativamente pequeña. Por el contrario, a pesar del hecho de que todos los grupos de pacientes estratificados por factores de riesgo muestran mayor expresión de MMP-9 que los de NA, ninguno de los factores de riesgo provocó diferencias significativas entre los pacientes con AAA (Tabla 3.1) .

Influencia del consumo de tabaco actual en los niveles plasmáticos de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α). Se ha encontrado que los niveles plasmáticos de TNF α utilizado como marcador global del estado inflamatorio, aumentó significativamente en pacientes con AAA [Controles: 7.88 (5.91-11.05)pg/ml; AAA: 13.36 (10.63-16.7) pg /mL, $p <0.001$; datos son mediana (percentil 25-75)]. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas entre los no fumadores (No-CS) y los fumadores activos (CS) después de la estratificación de los pacientes por este factor de riesgo [No-CS: 13.36 (10.85-16.39) pg/ml; CS: 12.87 (9.75-18.5) pg/ml, $p=0.827$].

4. INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO EN LA EXPRESION LOCAL DE LOS ELEMENTOS DE LA VIA DE LA PGE₂:

Como hemos comentado en la introducción, la prostaglandina E₂ (PGE₂) es el prostanoides más abundante producido por muchos tejidos y en términos generales es el prostanoides más importante en la respuesta inflamatoria¹⁹⁷.

Por ello, intentaremos examinar los elementos que intervienen en la vía de la PGE₂ en los AAA humanos a partir de muestras de tejido aórtico, de donantes con aortas sanas (NA) y de pacientes con AAA, tanto a nivel de la ruta biosintética como a nivel de sus receptores celulares. También estudiaremos los tipos celulares implicados en la vía de la PGE₂.

Dada la relevancia de la PGE₂ en el desarrollo del AAA, particularmente en la angiogénesis, el objetivo último del presente apartado es observar influencia de los factores de riesgo cardiovasculares clásicos y enfermedades de base en la vía de la PGE₂

EXPRESIÓN DE LOS ENZIMAS IMPLICADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE PGE₂ EN MUESTRAS DE PARED AÓRTICA:

Para estudiar la síntesis de PGE₂, determinamos la expresión de los isoenzimas de la COX, la COX-1 y la COX-2 y de la mPGES-1, tanto en muestras de NA como en muestras de AAA.

Como en los apartados anteriores, los datos obtenidos no seguían una distribución normal por lo que se utilizaron pruebas no-paramétricas para observar diferencias entre los diferentes grupos. Apreciamos que los niveles de expresión de las iso-enzimas COX, tanto de COX-1 como COX-2 y de la mPGES-1, están significativamente aumentados en las muestras de aorta patológica respecto a las muestras de aorta sana. (Figura 3.1).

Esta es la primera vez que se describe la expresión de la mPGES-1 en el AAA humano.

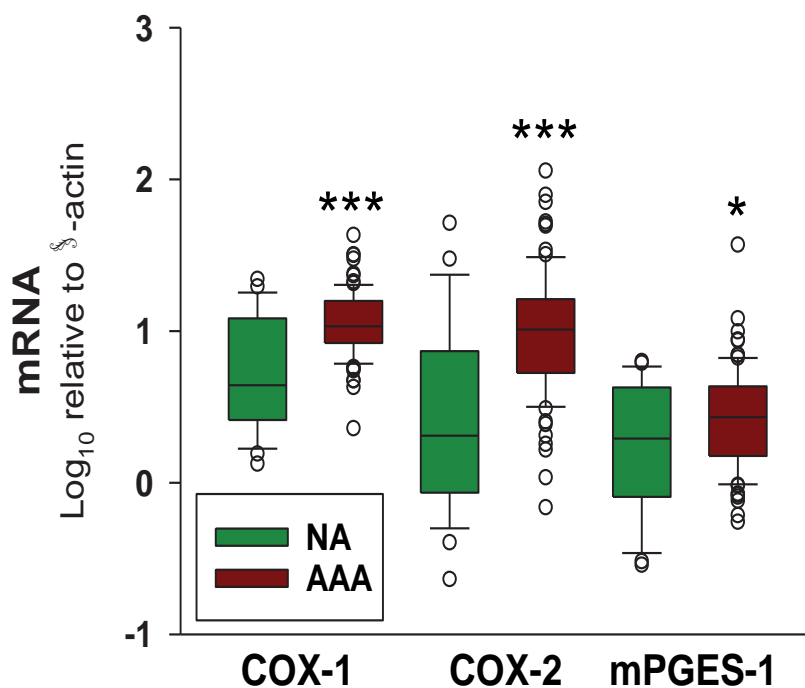


Figura 4.1: Expresión de COX-1, COX-2 y mPGES-1, en muestras de NA (n=25) y de pacientes con AAA (n=86). *P <0,05, *** p <0.001 cuando se compara con muestras de NA.

Como en los estudios anteriores para evaluar los niveles de las isoenzimas de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), en las diferentes etapas de desarrollo de la enfermedad aneurismática, se examinaron muestras de AAA, estratificadas en función del diámetro máximo en los tres grupos definidos anteriormente (Figura 4.2).

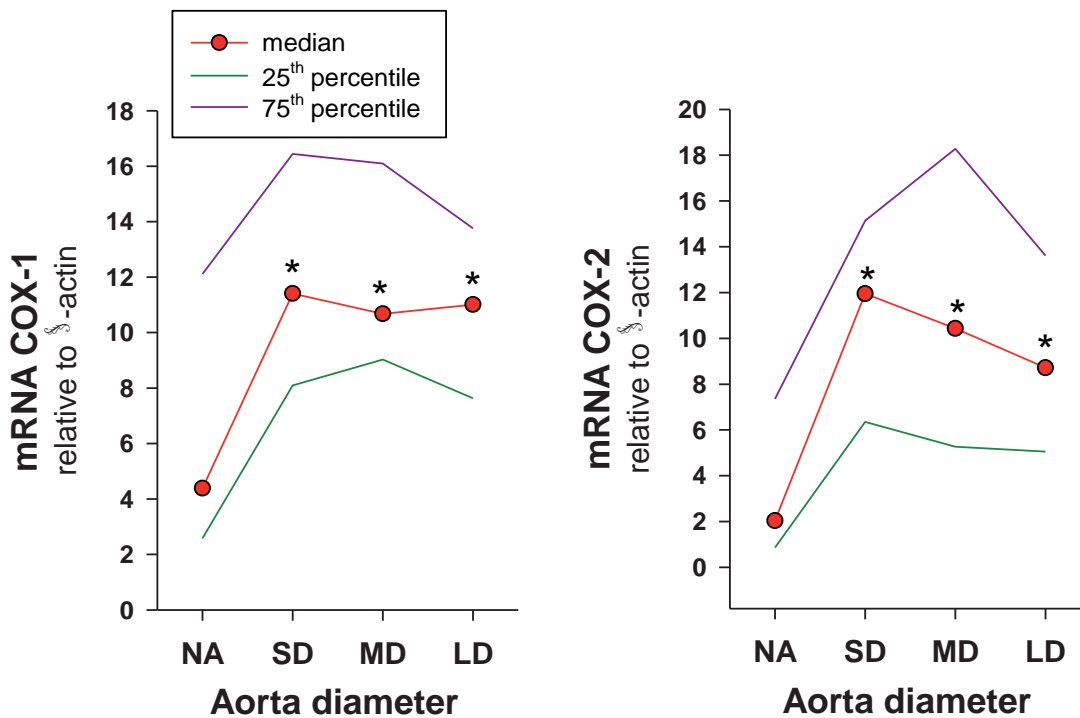


Figura 4.2: Niveles de transcritos de COX-1 y COX-2 en muestras de aorta normal (NA) y en pacientes con aneurisma (AAA), estratificados según el diámetro máximo. Los datos se expresan como la mediana acotada por los percentiles 25 y 75 relativos a la β -actina x 1000; *P <0.05 cuando comparamos con el grupo NA.

Observamos que tanto la expresión de COX-1 como de COX-2, fue estadísticamente similar en los tres grupos de pacientes y estadísticamente superior a los de NA, aunque los niveles de mRNA de la COX-2 presentaron una tendencia a disminuir con el diámetro máximo del aneurisma.

LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LA COX-1, COX-2 Y mPGES-1 Y ESTUDIO DE LOS TIPOS CELULARES IMPLICADOS EN LA VIA DE SINTESIS DE LA PGE₂.

Una vez estudiada la expresión de los enzimas de la ruta biosintética de la PGE₂ en las muestras de AAA, utilizamos inmunohistoquímica para localizar la expresión de la isoenzima COX-2, tanto en muestras de NA como en muestras de AAA. En las muestras de NA observamos una inmunotinción débil en los microvasos (Figura 4.3a) y en células de la capa media (Figura 4.3b).

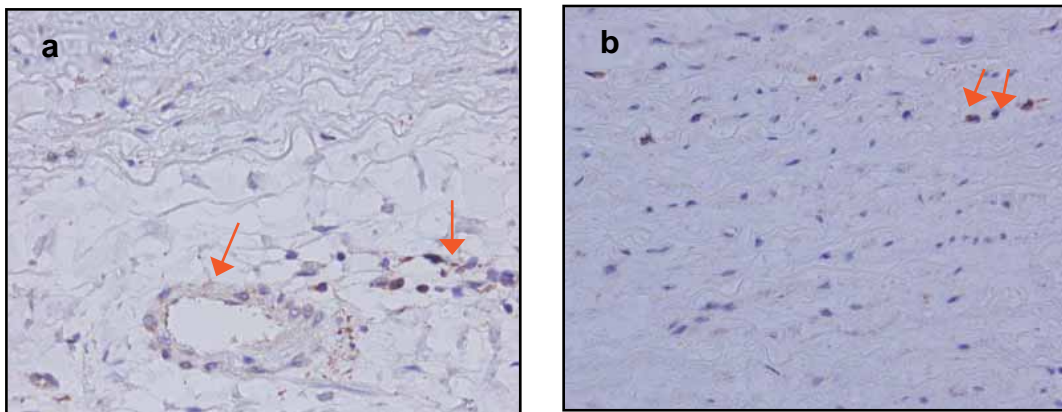


Figura 4.3: Estudio inmunohistoquímico de la COX-2 en muestras de aorta normal (NA). 4.1(a): microvasos, 4.1(b): células capa media. Aumento x400.

Sin embargo al realizar la misma inmunotinción para COX-2 en muestras de AAA, detectamos inmunotinción más marcada en las mismas zonas que en NA: en células de la capa media (Figura 4.4a) y en las células vasculares (Figura 4.4b), además también se aprecia inmunotinción en los infiltrados leucocitarios (Figura 4.4b).

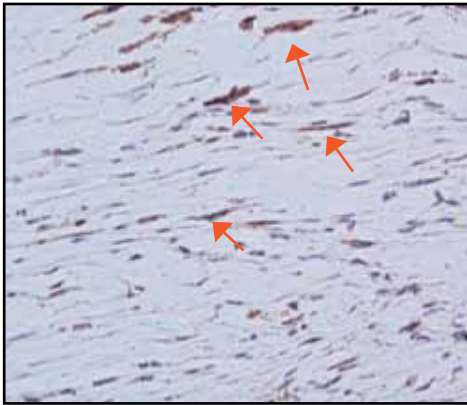


Figura 4.4a: Ejemplo representativo de la inmunohistoquímica de la COX-2, en muestras de AAA. Las flechas muestran células inmunoteñidas en capa media (aumento x400).

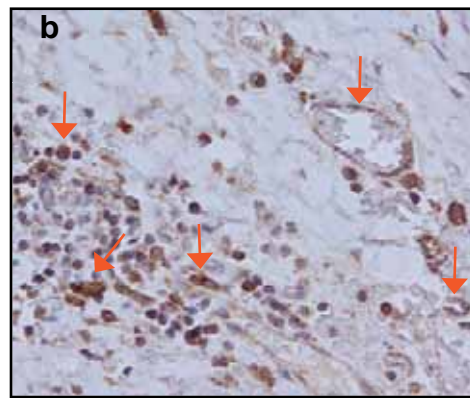


Figura 4.4b: Ejemplo representativo de la inmunohistoquímica de la COX-2 en muestras de AAA. Las flechas indican leucocitos infiltrando y microvasos (aumento x400).

Una vez localizada la expresión de los enzimas, era importante determinar si la variación en la expresión de COX-1 y COX-2 estaba asociada a la variación de algún tipo celular en concreto. Para ello se evaluó el grado de asociación entre la expresión de los isoenzimas de la COX y la de marcadores celulares, células vasculares y leucocitos, considerados como variables en principio independientes.

Los Resultados (Figura 4.5), muestran una ausencia de correlación, tanto de COX-1 como de COX-2, con la α -actina (marcador de VSMC) y con el vWF (marcador células endoteliales).

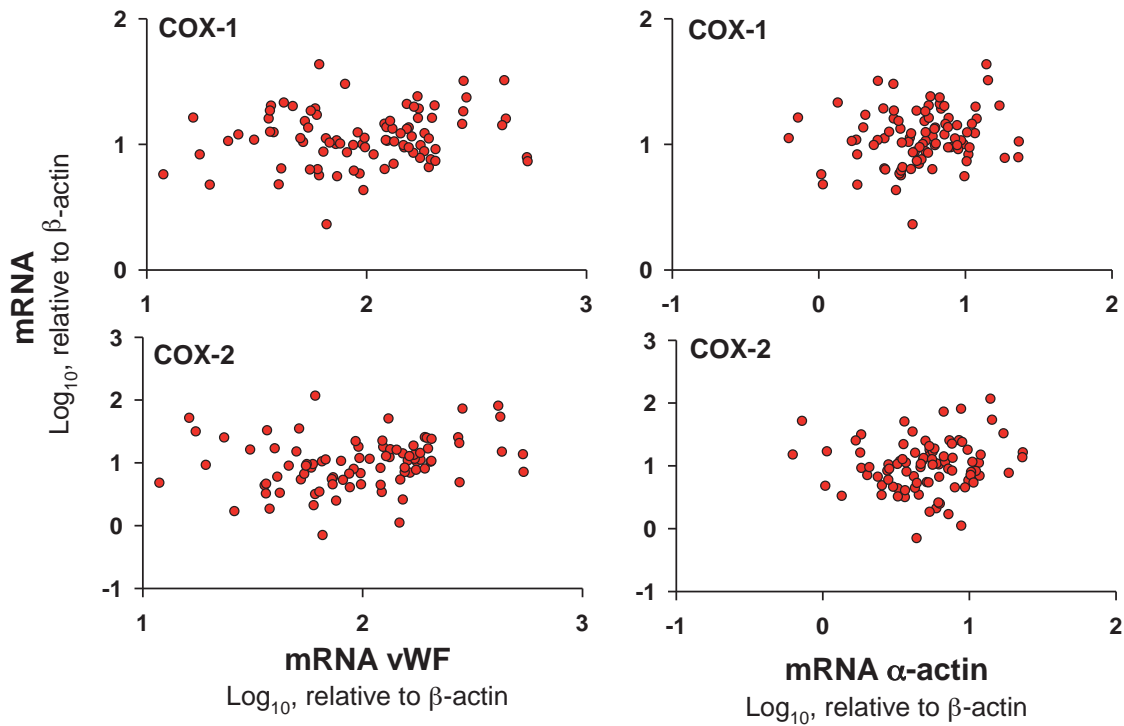


Figura 4.5: Correlación entre la expresión de COX-1 y COX-2 con la de marcadores de células vasculares: α -actina (marcador de VSMC) y con el vWF (marcador células endoteliales).

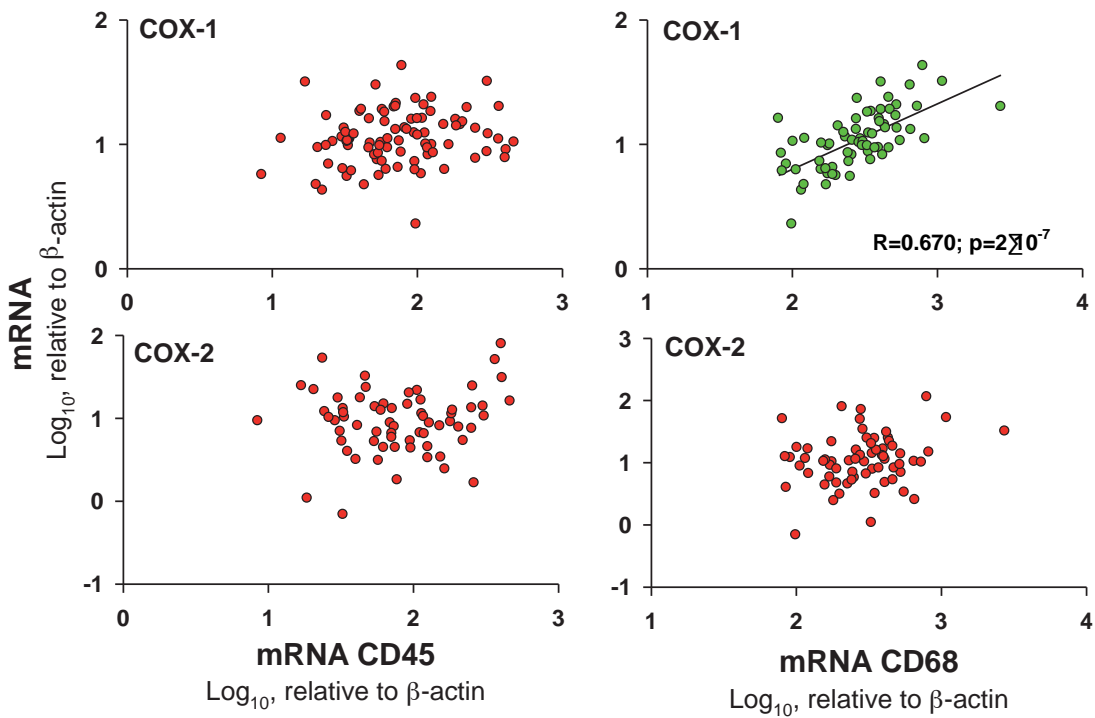


Figura 4.6: Correlación de la expresión de COX-1 y COX-2 con la de marcadores leucocitarios.

Sin embargo cuando valoramos la correlación de la expresión tanto de COX-1 como de COX-2 con CD45 (marcador panleucocitario) y con CD68 (marcador específico de macrófagos), detectamos una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de COX-1 y el CD68 (Figura 4.6).

En cuanto a la expresión de mPGES-1 los resultados de la Figura 4.1 muestran que aunque estuvo significativamente incrementada en las muestras de AAA, el incremento fue mucho más moderado que en el caso de la COX-2 (1.4-veces frente a 4.3-veces respectivamente; en términos de la mediana).

El estudio por inmunohistoquímica de la mPGES-1 mostró que efectivamente, este enzima se expresaba en todas las células del parénquima de las NA incluyendo las VSMC (Figura 4.7).

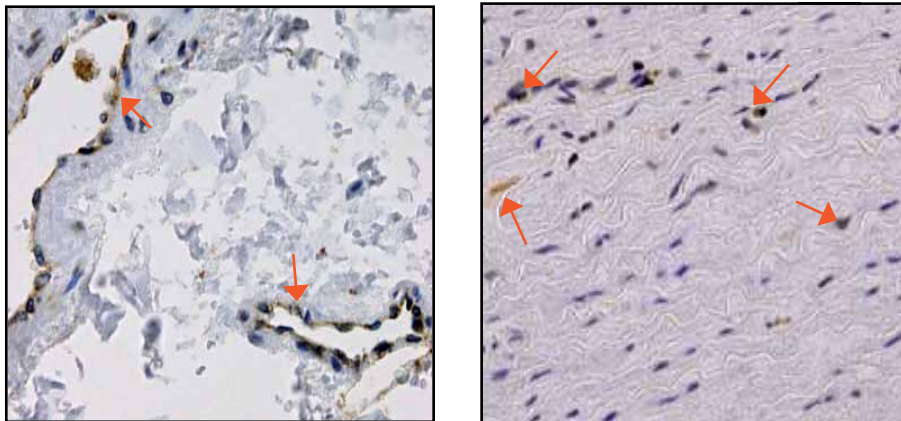


Figura 4.7: Ejemplo representativo de la inmunohistoquímica de la mPGES-1 en microvasos (4.7a) y en células de la capa media (4.7b) de muestras de aorta norma (NA). Aumentos x 400.

Cuando realizamos la inmunotinción para mPGES-1 en muestras de AAA, detectamos células inmunoteñidas en los microvasos (Figura 4.8a), la capa media (Figura 4.8b), los

infiltrados leucocitarios de la capa media (Figura 4.9a) y en los leucocitos de la capa subintimal (Figura 4.9b).

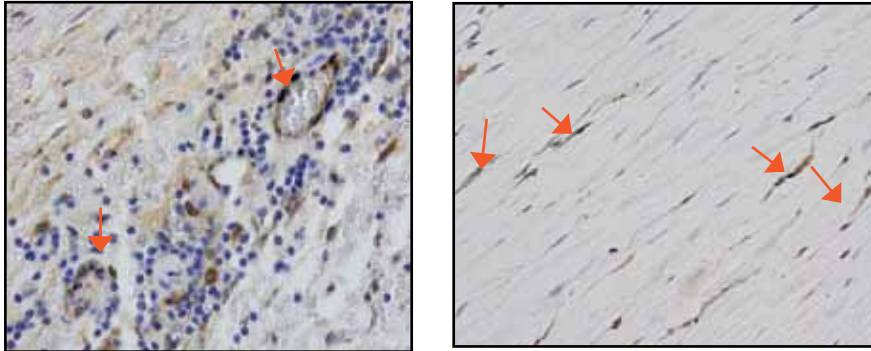


Figura 4.8: Ejemplo representativo de la inmunohistoquímica de la mPGES-1 en microvasos (4.8a) y en la capa media (4.8b) de muestras de AAA. (Aumentos x400).

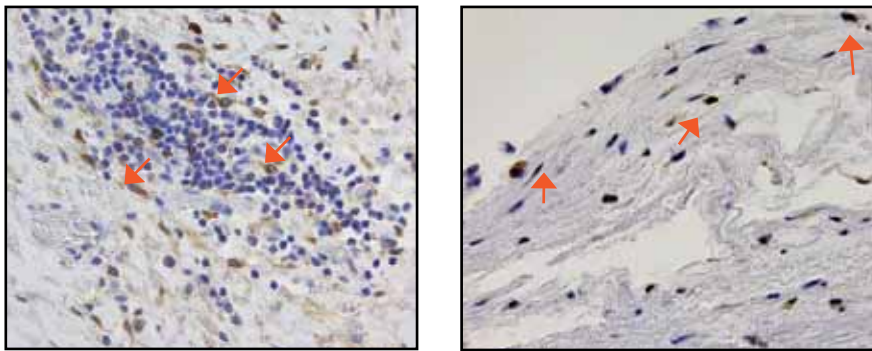


Figura 4.9: Ejemplo representativo de la inmunohistoquímica de la mPGES-1 en infiltrado leucocitario de la capa media (4.9a) y leucocitos en capa subintimal (4.9b) en muestras de aorta aneurismática (AAA). (Aumentos x400).

También se determinó la correlación entre los niveles de expresión de mPGES-1, marcadores de células vasculares y marcadores leucocitarios. Los resultados de la Figura 4.10 muestran un alto grado de asociación entre la variación de los niveles de transcrito de la mPGES-1 y la de los marcadores de células vasculares, tanto con la α -actina (marcador de VSMC) como con el vWF (marcador células endoteliales).

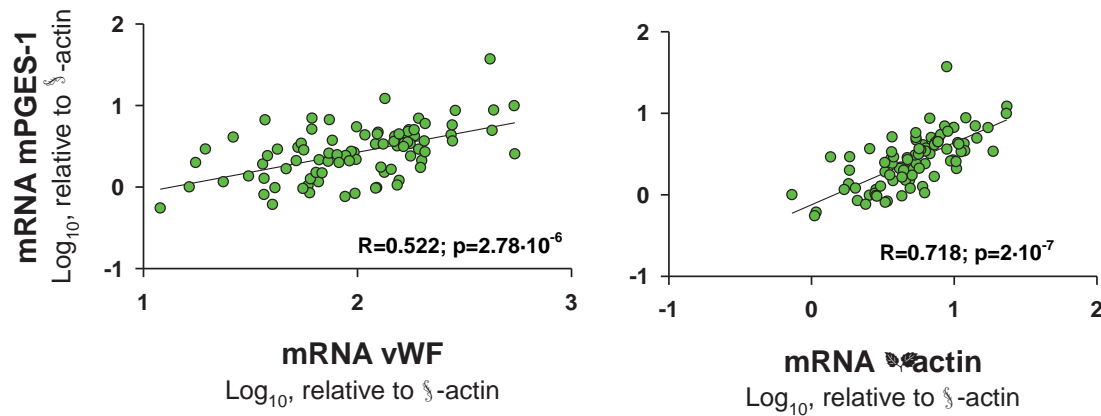


Figura 4.10: Correlación entre la expresión de mPGES-1 y los marcadores de células vasculares.

Sin embargo cuando valoramos la correlación de la expresión de mPGES-1, con la de CD45 (marcador panleucocitario) o CD68 (marcador específico de macrófagos), no detectamos ninguna correlación estadísticamente significativa (Figura 4.11).

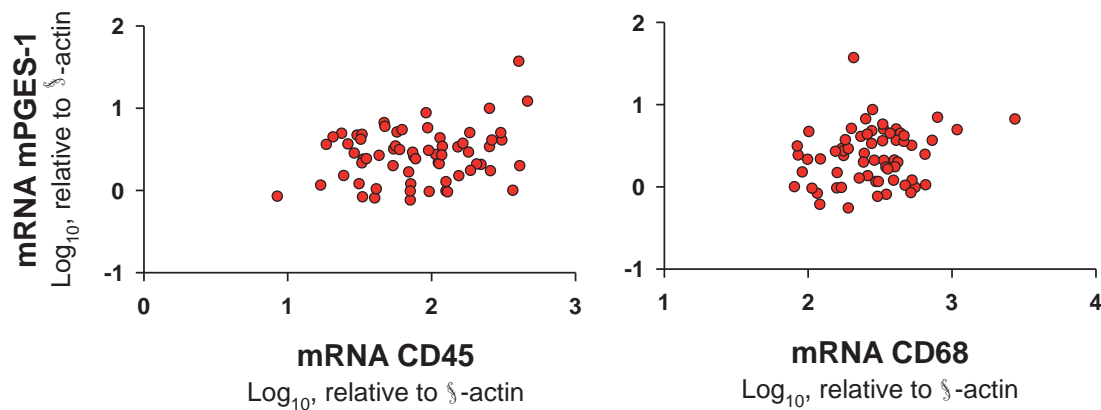


Figura 4.11: Correlación entre la expresión de mPGES-1 y los marcadores de diferentes estirpes leucocitarias.

Para evaluar el grado de expresión de los niveles de la mPGES-1, en las diferentes etapas de desarrollo de la enfermedad aneurismática, se examinaron muestras de AAA, estratificadas en función del diámetro máximo en tres grupos como hemos realizado anteriormente. Los resultados mostraron que no existían diferencias estadísticamente

significativas entre los tres grupos de estratificación (Figura 4.12). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos de pacientes y el grupo de NA. Esto último entra en aparente contradicción con los resultados de la Figura 3.1 donde se observa el hecho de que la mPGES-1 estaba aumentada respecto del grupo NA cuando las muestras de AAA se consideran en conjunto. Esta aparente contradicción creemos que se debe al hecho de que en realidad la mPGES-1 está poco incrementada en el AAA y al fraccionar la muestra en clases de diámetro máximo disminuimos la “n” de la muestra y se pierde la significación estadística.

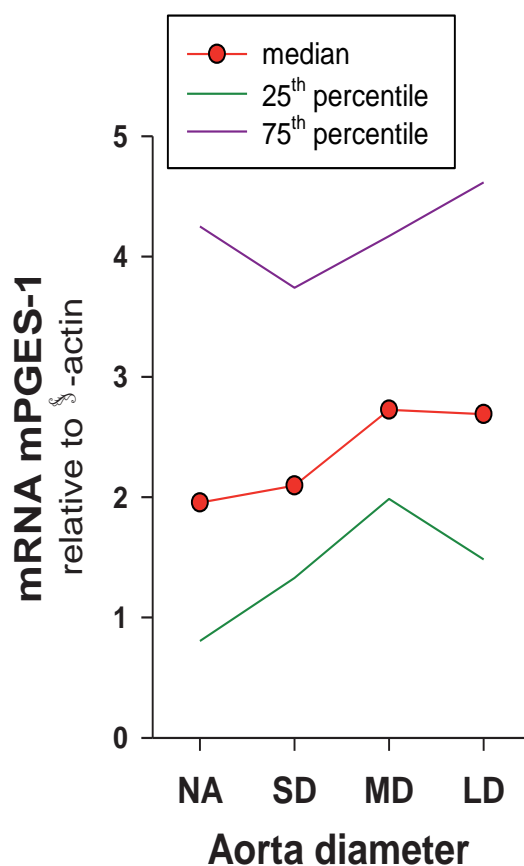


Figura 4.12: Expresión de mPGES-1 en muestras de aorta normal y en pacientes con aneurisma (AAA), estratificados según el tamaño, respecto a aortas sanas (NA).

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE PGE₂:

Como hemos comentado en la introducción, los receptores EP (“E-Prostanoid receptor”) son la parte complementaria de la biosíntesis de la PGE₂ en la acción biológica de este prostanoides, por lo que hemos estudiado los niveles de transcritos en las muestras de AAA y NA. Los resultados se muestran en la Figura 4.13.

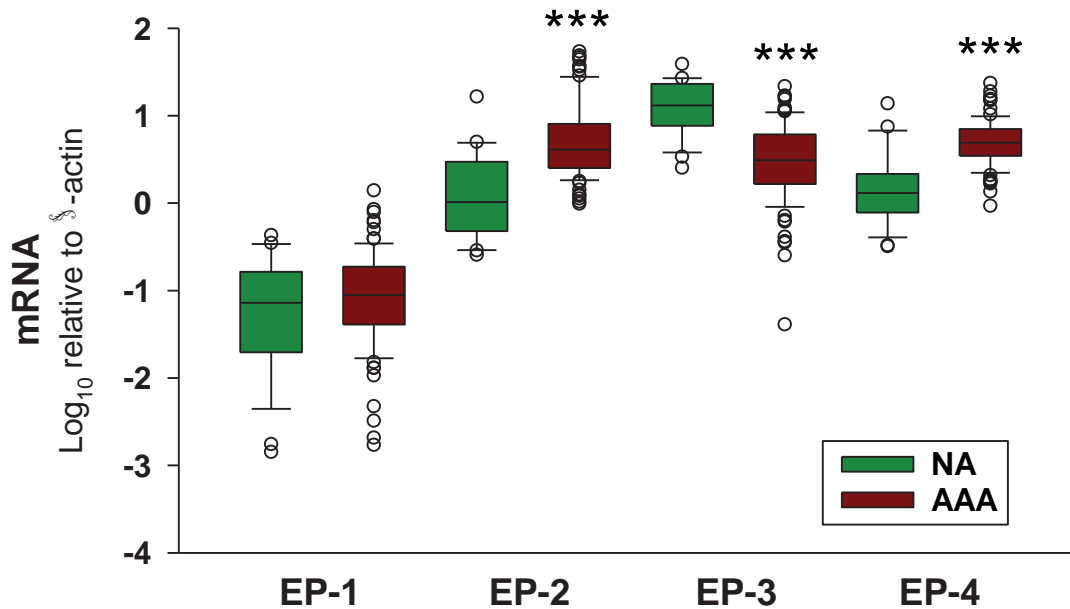


Figura 4.13: Niveles de expresión de los 4 receptores EP, en muestras de aorta sana (NA, n=25) y en muestras de aorta aneurismática (AAA; n=86).*** p <0.001 cuando se compara AAA con muestras de NA.

Como muestran los resultados de la Figura 4.13, los niveles de EP-2 y de EP-4 están significativamente aumentados en las muestras de AAA, respecto a las muestras de NA, a diferencia del EP-3 que está disminuido en muestras de AAA. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el EP-1 que además estuvo débilmente expresado en las muestras aórticas.

En general, el EP-2 y EP-4 participan en la liberación de factores angiogénicos y/o en la propia angiogénesis en diferentes modelos experimentales y patologías “in vitro” e “in vivo”²⁶³⁻²⁶⁸. Dado que al estudiar la influencia de los factores de riesgo en la expresión de los EPs únicamente encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión del EP-4 (ver Tabla 4.3 más adelante), realizamos el estudio de localización de este receptor por inmunohistoquímica.

LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES PGE₂ Y ESTUDIO GRUPOS CELULARES IMPLICADOS:

Cuando se realiza el estudio con inmunohistoquímica del EP-4, observamos que en las muestras de aorta sana prácticamente solo se tiñen células vasculares (Figura 4.14), mientras que al realizar la misma inmunotinción con muestras de AAA, observamos tinción en las células vasculares (Figura 4.15a) y también se observa en los infiltrados leucocitarios (Figura 4.15b).

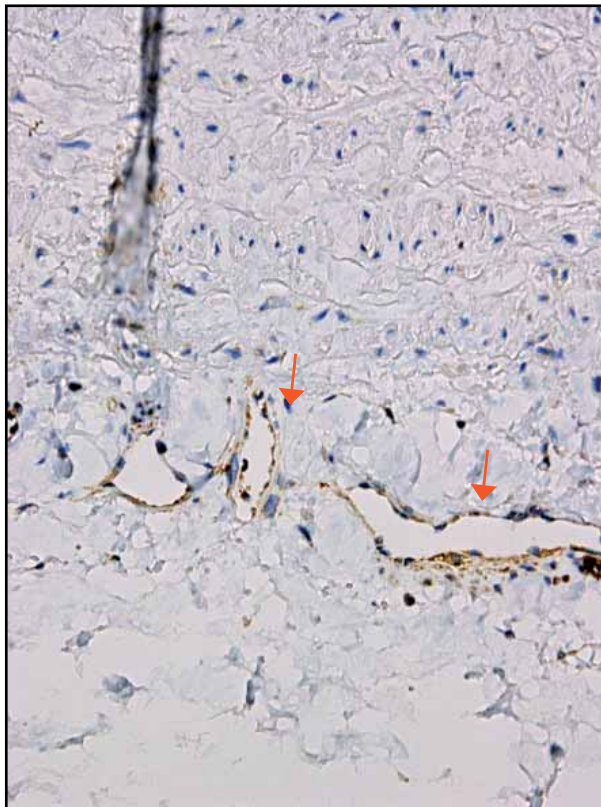


Figura 4.14: Ejemplo representativo de la inmunohistoquímica del EP-4 en muestras de aorta sana.

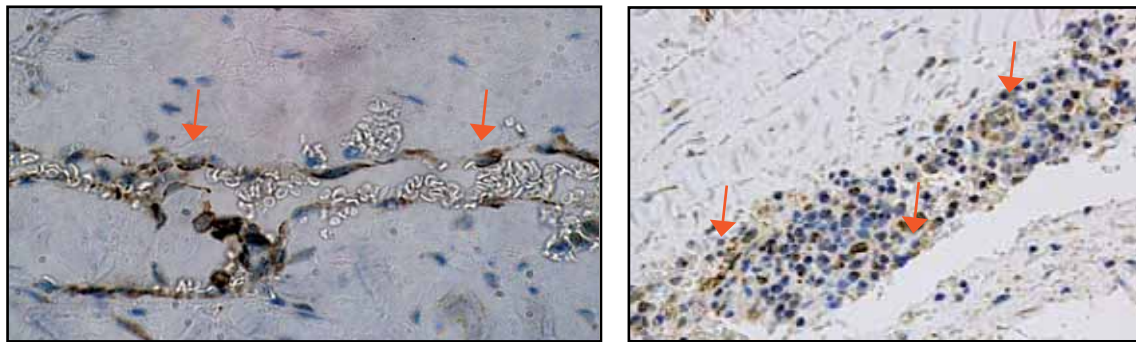


Figura 4.15: Inmunohistoquímica para EP-4 en muestras de AAA. Las flechas indican células inmunoteñidas en microvasos (a) y en la capa media (b).

Por otra parte, se analizó la expresión de los EPs en células endoteliales y VSMC en cultivo por PCR a tiempo real. Los resultados de la Figura 4.16 muestran que en las células endoteliales el EP-4 fue prácticamente el único receptor que se expresa, mientras que las VSMC expresan todos los EPs. La figura 4.17 muestra una tinción por inmunofluorescencia del EP-4 en células endoteliales en cultivo.

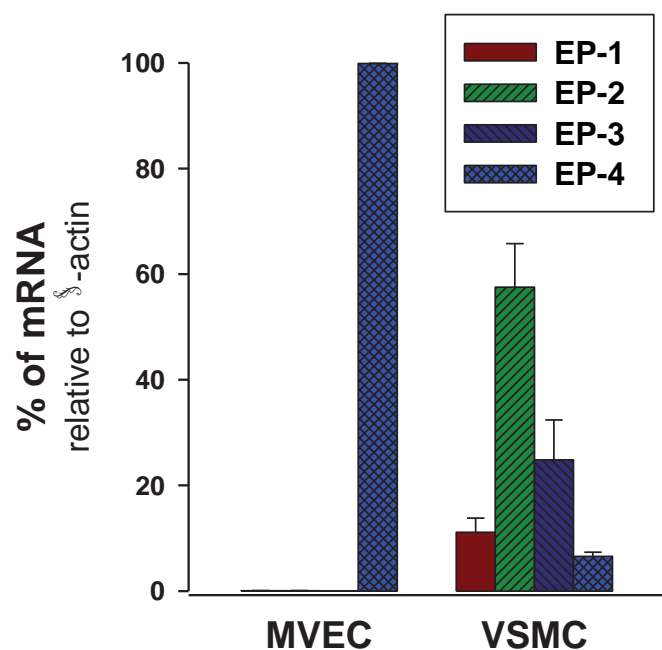


Figura 4.16: Niveles transcrito de los diferentes receptores en células microvasculatura y en células musculares lisas. Los datos se expresan relativos a la β -actina x 1000.

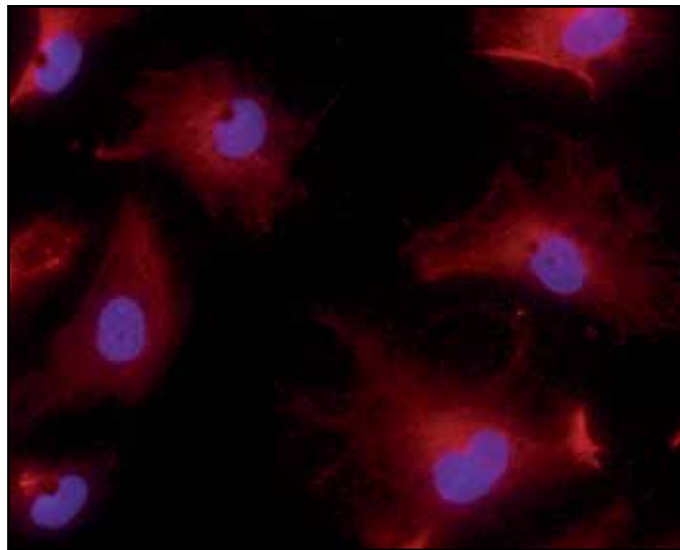


Figura 4.17: Detalle inmunofluorescencia cultivo células endoteliales de microvasculatura con anticuerpos anti-EP-4 en color rojo en azul se indican los núcleos (Aumento x600).

También se determinó la correlación entre los niveles de expresión del EP-4, tanto con la expresión de marcadores de células vasculares, como con los marcadores leucocitarios. Los resultados buena correlación de la expresión de EP-4, tanto con los CD45 (marcador panleucocitario) como con el vWF (marcador células endoteliales) y la α -actina (marcador de VSMC). La correlación aunque existente fue menos consistente con el marcador de macrófagos (CD68) (Figura 4.18).

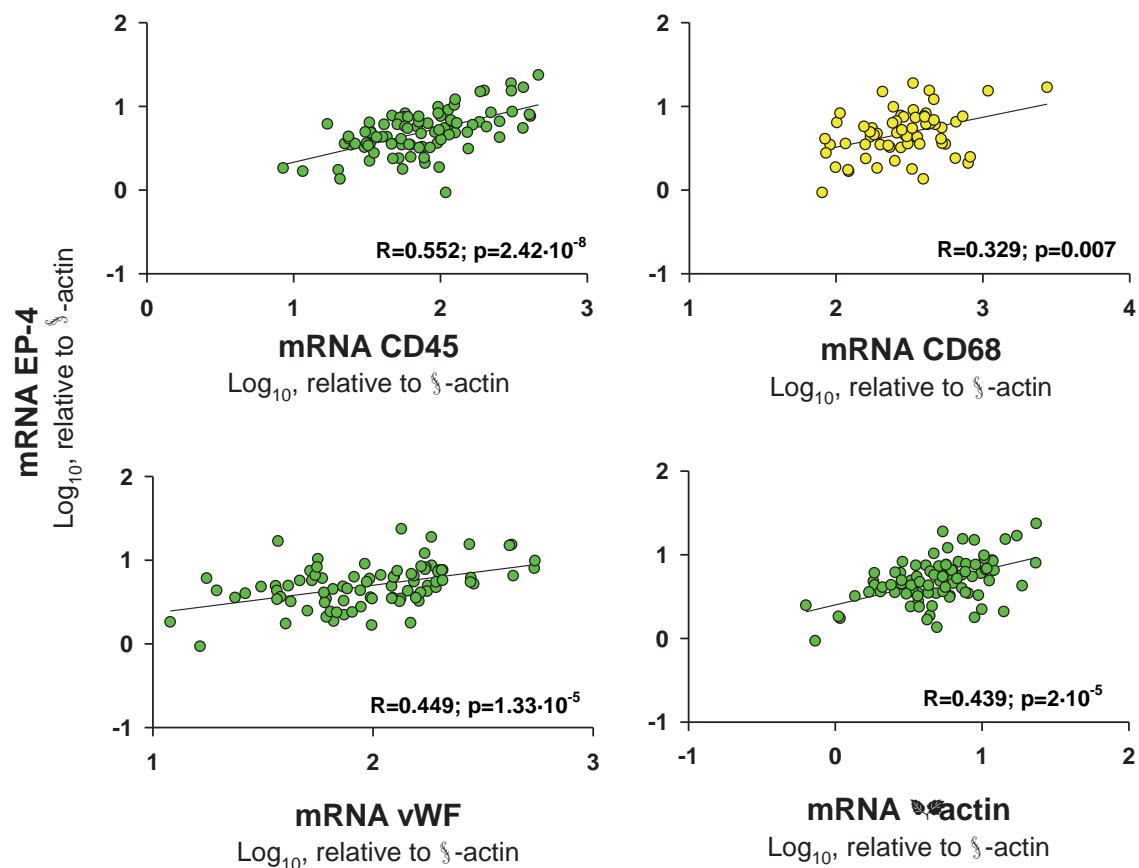


Figura 4.18: Correlación entre los niveles de expresión de EP-4 con los distintos marcadores celulares.

Como observamos en la figura 4.13, la expresión de EP-4 es significativamente mayor en las muestras de AAA, respecto a las muestras de NA. Sin embargo cuando estratificamos las muestras de aorta en 3 grupos según el diámetro máximo aneurismático como hemos realizado con anterioridad, no observamos diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos. (Figura 4.19).

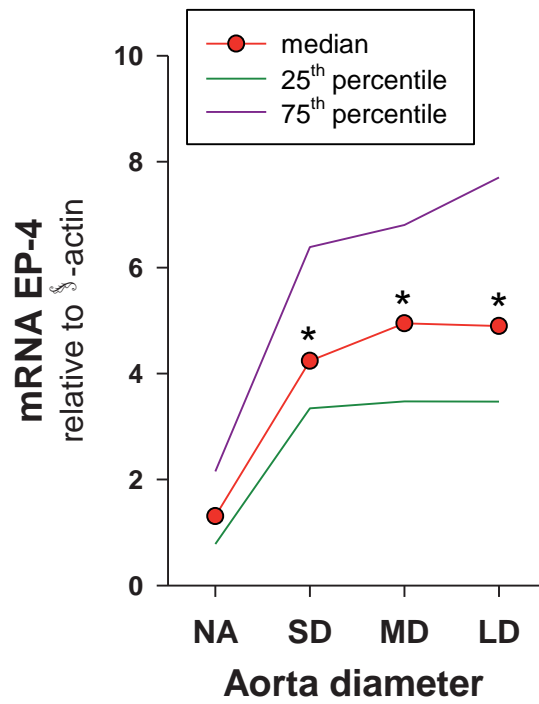


Figura 4.19: Expresión de EP-4 en muestras de aorta normal y en pacientes con aneurisma (AAA), estratificados según el tamaño, respecto a aortas sanas (NA).

INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE RIESGO EN LOS NIVELES DE TRANSCRITOS DE LOS ELEMENTOS DE LA VIA DE LA PGE₂:

El motivo del presente apartado es observar la influencia de los factores de riesgo cardiovascular en el eje COX-2/mPGES-1/EP-4.

Dado que la PGE₂ es un factor pro-angiogénico relevante, hemos estudiado la influencia de los factores de riesgo cardiovasculares clásicos y los antecedentes médicos relevantes clásicamente relacionados con patología aterosclerótica y/o aneurismática, en los niveles de expresión de los enzimas involucrados en la biosíntesis de PGE₂.

Las características clínicas, demográficas y los factores de riesgo de los pacientes utilizados para realizar el estudio, se muestran en la tabla 1 (Material y Métodos).

Los resultados de la expresión de los enzimas de la vía de la PGE₂ los podemos observar en la tabla 4.1. No observamos ninguna diferencia en la expresión local de los isoenzimas de la COX cuando estratificamos a nuestros pacientes según sus antecedentes médicos y por factores de riesgo. Sólo hemos apreciado diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tabaquismo y a la presencia de EPOC en la expresión de la mPGES-1. Los fumadores activos presentaron una expresión de mPGES-1 incrementada respecto de los no-activos (Tabla 4.1) En cuanto a la presencia de EPOC, aplicando tests no paramétricos, se observó una diferencia 2.9 en el EPOC vs 2.39 en no EPOC (p=0.06). Al realizar una transformación logarítmica para obtener una distribución normal y poder aplicar un test paramétrico, obtuvimos una p=0.057 (t Student).

Para tener en cuenta las variables confusoras en el presente estudio (ver Tabla 4.1), aplicamos, como en los apartados anteriores, la regresión lineal múltiple. Los resultados de la tabla 4.1 mostraron que la HTA y el EPOC podrían actuar como variables confusoras en el caso del tabaquismo. Tras corregir por dichas variables observamos que la diferencia entre fumadores activos y no-activos respecto de la expresión local de mPGES-1 seguía siendo estadísticamente significativa ($p=0.03$). Con lo cual concluimos que efectivamente el tabaquismo activo influencia los niveles locales de mPGES-1. Esta es la primera vez que se describe el efecto del tabaquismo en la expresión de la mPGES-1.

Tabla 4.1. Transcrito de isoenzimas COX y de mPGES-1 en muestras de AAA estratificadas según factores de riesgo y enfermedades concomitantes. El número de pacientes de cada grupo se indica en la tabla 1 (Material y Métodos), los datos se expresan relativos a β -actina x1000.

	Mediana	Percentil 25°-75°	Valor p vs ausencia ^a
COX-1			
No fumadores	10.7	7.68-14.3	
Fumadores	11.6	9.47-18.7	0.109
No insuficiencia renal	10.9	8.50-16.3	
Insuficiencia renal	10.7	7.78-15.8	0.896
No hipertensión	10.8	9.62-16.1	
Hipertensión	10.7	7.49-15.8	0.419
No diabetes mellitus	11.0	8.67-15.9	
Diabetes mellitus	9.71	6.48-15.1	0.365
No Dislipemia	12.3	8.20-16.1	
Dislipemia	10.6	8.39-14.3	0.457
No EPOC ^b	11.0	8.45-15.9	
EPOC	10.4	8.07-15.3	0.695
COX-2			
No fumadores	10.1	4.68-15.8	
Fumadores	10.3	5.34-17.6	0.604
No insuficiencia renal	9.27	5.25-18.7	
Insuficiencia renal	10.9	5.30-14.6	0.678
No hipertensión	8.57	5.09-16.7	
Hipertensión	10.4	5.70-16.0	0.695
No diabetes mellitus	9.27	4.70-15.9	
Diabetes mellitus	11.6	6.90-24.7	0.188
No Dislipemia	9.28	5.36-16.5	
Dislipemia	10.6	5.09-15.8	0.990
No EPOC ^b	10.1	5.20-16.5	
EPOC	10.6	5.60-15.0	0.889
mPGES-1			
No fumadores	2.42	1.16-4.08	
Fumadores	3.46	2.33-4.95	0.009
No insuficiencia renal	2.69	1.24-3.82	
Insuficiencia renal	2.69	1.90-4.67	0.245
No hipertensión	2.87	1.74-3.67	
Hipertensión	2.66	1.48-4.46	0.735
No diabetes mellitus	2.78	1.50-4.26	
Diabetes mellitus	2.47	1.20-4.36	0.606
No Dislipemia	2.66	2.06-3.65	
Dislipemia	2.76	1.20-4.51	0.798
No EPOC ^b	2.39	1.16-4.09	
EPOC	2.90	2.35-4.75	0.057 ^c

(a) Mann-Whitney Rank Sum Test.

(b) EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

(c) Se encontró $p=0.06$ aplicando Mann-Whitney Rank Sum Test; tras transformación logarítmica se obtuvo una distribución normal y se encontró $p=0.057$ aplicando t-Student.

También hemos estudiado los valores plasmáticos de PGE₂ en muestras sanguíneas de pacientes afectados de AAA, estratificados según los factores de riesgo cardiovasculares.

Tabla 4.2. Niveles plasmáticos de PGE₂ en muestras de AAA estratificadas según factores de riesgo y enfermedades concomitantes. El número de pacientes de cada grupo se indica en la tabla 1 (Material y Métodos). Niveles de plasma de PGE₂ se expresan en pg/mL.

	Mediana	Percentil 25°-75°	Valor p vs ausencia ^a
Plasma-PGE₂			
No fumadores	55.9	39.3-71.1	
Fumadores	68.0	57.1-119.5	0.008
No insuficiencia renal	58.4	44.0-71.4	
Insuficiencia renal	59.4	39.3-104.3	0.786
No hipertensión	70.1	53.0-95.2	
Hipertensión	56.2	39.4-77.2	0.140
No diabetes mellitus	56.5	38.6-94.9	
Diabetes mellitus	60.7	55.8-68.8	0.294
No Dislipemia	55.8	44.5-101.9	
Dislipemia	60.7	41.2-72.0	0.947
No EPOC ^b	59.4	43.3-74.3	
EPOC	57.1	43.5-115.9	0.807

^(a) Mann-Whitney Rank Sum Test

^(b) EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

Los resultados de la Tabla 4.2 muestran que de nuevo sólo los fumadores activos presentaron una diferencia estadísticamente significativa respecto a los no fumadores.

Cuando valoramos la expresión de los receptores de PGE₂, estratificados según los factores de riesgo y las enfermedades de base (Tabla 4.3), apreciamos que sólo los fumadores activos tienen una diferencia estadísticamente significativa respecto a los no fumadores en la expresión de EP-4, no apreciándose ninguna diferencia significativa con el resto de factores de riesgo en la expresión de EP-4. Respecto de la expresión de EP-2 y de EP-3 no se observaron diferencias con ningún factor de riesgo en patología de base.

Tabla 4.3. Transcrito de niveles de receptores PGE₂ en muestras de AAA estratificadas según factores de riesgo y enfermedades concomitantes. El número de pacientes de cada grupo se indica en la tabla I (Material y Métodos). los datos se expresan relativos a β -actina x1000.

	Mediana	Percentil 25°-75°	Valor p vs ausencia ^a
EP-2			
No fumadores	3.98	2.53-8.63	
Fumadores	4.84	2.42-7.46	0.811
No insuficiencia renal	3.98	2.66-9.05	
Insuficiencia renal	4.49	2.41-7.72	0.653
No hipertensión	4.58	2.42-8.22	
Hipertensión	4.10	2.56-8.41	0.946
No diabetes mellitus	3.98	2.45-7.24	
Diabetes mellitus	5.27	2.88-23.6	0.115
No Dislipemia	3.91	2.38-6.60	
Dislipemia	5.31	2.82-12.0	0.068
No EPOC ^b	3.98	2.51-9.82	
EPOC	4.95	2.60-7.46	0.846
EP-3			
No fumadores	2.80	1.30-6.18	
Fumadores	3.41	2.16-6.32	0.202
No insuficiencia renal	2.68	1.47-4.74	
Insuficiencia renal	3.36	1.94-8.02	0.172
No hipertensión	3.12	1.98-5.74	
Hipertensión	3.06	1.45-6.30	0.484
No diabetes mellitus	3.18	1.87-5.67	
Diabetes mellitus	1.94	0.64-10.4	0.305
No Dislipemia	3.47	1.82-7.19	
Dislipemia	2.54	1.46-5.32	0.288
No EPOC ^b	3.16	1.49-6.05	
EPOC	2.95	1.92-6.21	0.853
EP-4			
No fumadores	4.29	3.24-6.49	
Fumadores	5.93	4.87-8.92	0.007
No insuficiencia renal	4.63	3.47-6.25	
Insuficiencia renal	5.70	3.45-7.72	0.259
No hipertensión	4.89	3.94-7.72	
Hipertensión	4.93	3.45-6.61	0.394
No diabetes mellitus	4.92	3.48-6.66	
Diabetes mellitus	4.71	1.82-7.96	0.678
No Dislipemia	4.90	3.26-6.61	
Dislipemia	4.91	3.51-7.32	0.678
No EPOC ^b	4.90	3.52-6.57	
EPOC	5.20	2.41-7.61	0.896

(a) Mann-Whitney Rank Sum Test

(b) EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

DISCUSIÓN

La mayor expresión de marcadores para células endoteliales en las muestras de AAA así como el estudio inmunohistoquímico indican un aumento de la vascularización en las aortas aneurismáticas. Estos resultados son coherentes con los hallazgos de otros autores y confirma los resultados de artículos previos que muestran una hipervascularización en los AAA^{58, 269}. Analizando nuestros datos en conjunto, podemos considerar que si el incremento del diámetro transversal máximo aórtico es una aproximación del estado evolutivo de la enfermedad aneurismática, la hipervascularización asociada al AAA se produce ya en las fases iniciales de la enfermedad, es decir con aortas de diámetros pequeños (<55mm) y que el máximo infiltrado leucocitario y su posible respuesta inflamatoria es posterior a esta vascularización, ya que la mayor población de leucocitos la observamos en aortas de diámetros medios (55-69.9mm). Los estudios de inmunohistoquímica mostraron que los leucocitos se localizan predominantemente en las áreas perivasculares de estos neovasos posiblemente formados en estadios iniciales de la enfermedad aneurismática.

Como hemos visto en la introducción la hipervascularización del tejido aórtico, es una de las características principales que distinguen a los AAA de la aterosclerosis, donde se produce en menor grado⁵⁷ y que juega un papel fundamental en la evolución y la progresión de la enfermedad^{56, 103}. Sin embargo, una cuestión a resolver es establecer a partir de qué momento se empieza a producir la hipervascularización en la aorta y el estímulo inicial que la desencadena.

Otro de los aspectos que se ha considerado importante en los aneurismas es la inflamación de la pared aórtica y nuestros resultados son coincidentes con estudios previos que describen un aumento de los infiltrados leucocitarios en la capa media y adventicia⁵⁵. Sin embargo existe una presencia de macrófagos prácticamente máxima también en las muestras de aneurismas pequeños. Esto podría estar indicando que los macrófagos juegan un papel esencial en la progresión del AAA desde fases iniciales y posiblemente en la neovascularización^{58, 210}.

Conocemos que el VEGF es uno de los factores más importantes en los procesos de neovascularización aunque no hemos observado ninguna influencia de los FRCV en los niveles de VEGF-A. Sin embargo los pacientes diabéticos tenían disminuida la expresión de VEGFR-1 y los fumadores activos presentan una mayor expresión local de VEGFR-2 que los no-fumadores activos. Esta variación en los niveles de VEGFR-2 está asociada mayoritariamente a las células vasculares.

Cuando valoramos la expresión local de metaloproteinasas en la pared de la aorta aneurismática, nuestros resultados muestran claramente que la MMP-2 está fundamentalmente asociada a las células vasculares, especialmente VSMC mientras que la MMP-9 lo está a los leucocitos del infiltrado inflamatorio local, particularmente macrófagos.

Al igual que estudios anteriores^{97, 99, 254, 270}, nosotros hemos encontrado un aumento de la MMP-2 y MMP-9 en la pared de los AAA. Sin embargo, cuando los pacientes fueron estratificados según el diámetro máximo AAA, los niveles de transcritos de MMPs muestran patrones diferentes. Considerando que la MMP-2 alcanza un máximo ya en el

grupo de diámetro bajo, la MMP-9 tiene un máximo de expresión en el grupo de tamaño moderado. Estos resultados son coherentes con publicaciones anteriores que muestran la máxima expresión de MMP-2 en los AAA pequeños y de MMP-9 en los AAA de tamaño medio^{99, 254}.

Se ha postulado que la MMP-2 juega un papel en la expansión temprana, pero no en la ruptura de AAA y muestra una correlación positiva con el diámetro del AAA en grandes AAA asintomáticos (>70 mm), mientras que la MMP-9 tiene correlación negativa con el tamaño aórtico máximo⁹⁸ pero parece estar asociada con la expansión y la ruptura de los AAA y su expresión es máxima en los AAA de tamaño mediano^{98, 99, 254}.

La angiogénesis es un proceso invasivo y como tal requiere de actividades proteolíticas para su desarrollo. Las proteasas son necesarias para la degradación del sustrato extracelular, para la migración celular y la eliminación de la obstrucción de proteínas de la matriz y para la creación de espacio en la matriz que permita la generación de túbulos celulares endoteliales. Sin embargo, está claro que las proteasas ejercen funciones más sutiles tales como la activación y la modificación de los factores de crecimiento, de las citoquinas y de sus receptores, y la generación de fragmentos de proteínas de la matriz que inhiben la angiogénesis²⁷¹. En este contexto, la MMP-2 y MMP-9 pueden unir proteínas de la superficie celular y convertirse en proteinasas ligadas a células²⁷².

La MMP-2 y MMP-9 también difieren en cuanto a su localización, ya que la MMP-2 se expresa fundamentalmente en las células vasculares, principalmente en las VSMC de la capa media, mientras que la MMP-9 sólo la detectamos en la infiltración leucocitaria. También encontramos una buena correlación entre los niveles de transcripción de

MMP-2 y de α -actina (marcador de VSMC), mientras que las correlaciones con los marcadores leucocitarios fueron débiles. Lo contrario ocurrió con respecto a las correlaciones de MMP-9 donde observamos una excelente correlación entre los niveles de transcripción MMP-9 y del marcador macrófagos CD68. En conjunto, estos resultados indican que la MMP-2 se asocia principalmente a las células vasculares y como reportaron Newman et al.²⁷³, la MMP-9 se asocia principalmente a la infiltración leucocitaria, en particular a macrófagos.

Los diferentes factores de riesgo cardiovascular también han mostrado diferencias respecto a su influencia en los niveles locales de MMP-2 y MMP-9. Ninguno de los factores de riesgo evaluados ha influido en los niveles locales de MMP-9. En cambio, encontramos que el tabaquismo activo aumenta los niveles de MMP-2 en la aorta aneurismática.

Nuestros resultados refuerzan la idea de que, aunque tanto la MMP-2 y MMP-9 contribuyen a la degradación de las fibras elásticas intersticiales y la degradación de las proteínas de la matriz para la migración celular y están reguladas de modo similar, tienen diferente función en el desarrollo del AAA. Nuestros resultados son coherentes con el concepto que la MMP-2 juega un papel en la expansión de los AAA y que la MMP-9 participa en la progresión hacia su ruptura.

Muchos artículos proporcionan evidencias que apoyan la asociación entre la función renal y la aterosclerosis, y que el filtrado glomerular, parece ser un factor pronóstico independiente para la enfermedad cardiovascular²⁷⁴. De hecho, hemos publicado recientemente que el filtrado glomerular es un excelente predictor de eventos

vasculares en pacientes con enfermedad arterial periférica²⁷⁵. Se puede especular del análisis estadístico univariante de los datos de IR y de la expresión de MMP-2, que el grado de aterosclerosis influencia los niveles de MMP-2. Sin embargo, cuando se introducen la HTA y la EPOC, como variables de confusión, en los análisis de regresión lineal entre los pacientes con FG normal y aquellos con $FG < 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$, las diferencias no consiguen alcanzar una significación estadística. Esto indica que la influencia del estado de aterosclerosis en los niveles de MMP-2 locales, si existe, es débil.

Fumar es un factor de riesgo especialmente relevante para la AAA⁶⁵. Se ha informado de que la asociación entre el tabaquismo y la AAA es 2,5 veces más alta que la asociación entre el tabaquismo y la enfermedad coronaria⁶⁴. El humo del tabaco también aumenta la formación de AAA en los modelos animales^{276, 277}. Hemos encontrado que se mantiene la significación estadística de la diferencia entre los fumadores y los no fumadores respecto a la expresión de MMP-2, después de la introducción de la HTA y la EPOC como variables de confusión en las estadísticas. Se hace evidente a partir de nuestros datos, que la MMP-2 se vincula principalmente al estado de las células vasculares, mientras que los niveles locales de MMP-9 dependen más del infiltrado inflamatorio en la pared aórtica. De ello puede derivarse que el hecho de fumar afecta principalmente al estado de las células vasculares más que al grado de infiltración leucocitaria.

Se ha encontrado un aumento de los niveles plasmáticos del $\text{TNF}\alpha$ en pacientes con AAA, en comparación con donantes sanos, pero no se han encontrado diferencias estadísticas entre los pacientes no fumadores y los pacientes fumadores. Dado que el $\text{TNF}\alpha$ plasmático, es un marcador de estado inflamatorio global de los pacientes, estos

resultados sugieren que el efecto del tabaquismo en los niveles locales de MMP-2 es independiente de los estados inflamatorios propios de la aterosclerosis y de la EPOC en los pacientes con AAA. De hecho, algunos grupos ya han informado de que la asociación de la EPOC y del AAA es independiente del hecho de fumar²⁶².

Los niveles de MMP-2 prácticamente no cambian en función del diámetro máximo de AAA. Cuando los pacientes fueron estratificados según el diámetro de la aorta, los fumadores presentan mayores niveles de MMP-2 que los no fumadores en todos los grupos, a pesar de la significación estadística sólo se logró en el grupo de aortas mayores (LD). Además, no se encontraron diferencias entre los no fumadores y los ex fumadores. Suponiendo que el diámetro transversal máximo del AAA es una aproximación al estado evolutivo de la enfermedad aórtica aneurismática, nuestras observaciones permiten suponer que el tabaquismo actúa influyendo continuamente en el desarrollo del AAA. Parte de la información disponible sobre los efectos bioquímicos de humo de tabaco, muestra que el extracto soluble en agua del humo del tabaco, induce la expresión de MMP-1 por las células endoteliales y la de elastasa de los neutrófilos en pacientes con AAA^{278, 279}. La nicotina induce AAA en modelos animales, a través de la activación de la proteína quinasa alfa 2 activada por AMP²⁸⁰. Sin embargo, se necesita más investigación para determinar las especies moleculares y las vías de señalización implicadas en el efecto del humo del tabaco sobre la inducción de MMP-2 y su expresión en los AAA humanos para lo cual nos han concedido recientemente una ayuda SAF2013.

En conclusión, podemos decir que nuestros estudios muestran por primera vez que el tabaquismo activo, aumenta la expresión de MMP-2 en las células vasculares. Este

aumento de MMP-2, a su vez puede contribuir al aumento observado de la vascularización de los AAA contribuyendo de este modo a su expansión y ruptura.

Hemos detectado que no sólo la COX-2 (inducible) está aumentada en los AAA, sino que también lo está el isoenzima constitutivo COX-1. Dos factores pueden influir en los niveles de un transcrito en particular, uno es una verdadera “up” o “down” regulación de dichos transcritos, y la otra es una distinta proporción de tipos celulares, que expresan el transcrito en cuestión, en el tejido causada por una determinada patología, que en el caso del AAA es obvia. Es bien conocido que la COX-1 se expresa de forma ubicua y no es inducible^{171, 204}, por lo tanto, su aumento en AAA podría probablemente ser debido a la mayor proporción de células, tales como leucocitos, plaquetas y/o células endoteliales, ricas en COX-1 en la muestras de AAA. La correlación entre la expresión de COX-1 y el CD68 (marcador específico de macrófagos), indica que la variación en la expresión de COX-1 estaba fundamentalmente asociada al contenido de macrófagos en la muestra, como habíamos supuesto. Esto refuerza la idea de que la COX-1 no está “up-regulada”, sino que su expresión es mayor en AAA, por el aumento de la proporción de macrófagos en las muestras de AAA.

Sin embargo, no observamos un grado de asociación significativo de la COX-2 con la variación de ningún tipo celular en concreto. Esto sugiere que el incremento de COX-2 en las muestras de AAA es debido a una “up-regulation” auténtica. Los resultados de la inmunohistoquímica muestran que la expresión de COX-2 se localiza además de en los leucocitos infiltrantes, en las células vasculares. Teniendo en cuenta que la proporción de VSMC está disminuida en los AAA, estos resultados sugieren que la aportación de las células endoteliales de la microvasculatura es importante en el total de transcrito de la

COX-2. La expresión de mPGES-1 presenta un incremento mucho más moderado que el de la COX-2 en las muestras de AAA (1.4-veces frente a 4.3-veces respectivamente; en términos de la mediana). Este resultado fue inesperado ya que ambas enzimas son inducibles por citoquinas pro-inflamatorias como la IL-1. Este hallazgo podría ser debido al hecho de que la mPGES-1 no se regula del mismo modo que la COX-2^{168, 178}. De hecho muchos factores que inducen la expresión de la COX-2 como el H₂O₂, no inducen la mPGES-1 (resultados de nuestro grupo aun no publicados). Otro factor que puede contribuir al aumento modesto de mPGES-1 en las muestras de AAA, es el hecho de que las VSMC expresan la mPGES-1 en abundancia^{281,172}. Sin embargo, la importante reducción de este tipo celular en la capa media, es una de las características más notables del AAA.

Los datos de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica del estudio, muestran que efectivamente la COX-2, mPGES-1 y el EP-4 se expresan en MVEC. La co-expresión de COX-2, mPGES-1 y EP-4 en MVEC apoya firmemente el papel relevante de la PGE₂ mediado por el eje COX-2/mPGES-1/EP-4 en MVEC asociada a hipervascularización de los AAA. El estudio detallado de la contribución del eje COX-2/mPGES-1/EP-4 en la hipervascularización asociada al AAA forma parte de otra tesis doctoral de nuestro grupo y se discute ampliamente en un trabajo recientemente publicado²⁸¹.

Estos datos son consistentes y pueden validar los datos de AAA provocado en modelos animales, que aunque son bastante diferentes de los AAA humanos, han demostrado que la supresión de la expresión ya sea mPGES-1 o de EP-4, reduce el desarrollo de AAAs en estos modelos^{216, 220, 221}.

Nuestros resultados también refuerzan el concepto de que el eje COX-2/mPGES-1/EP-4 presente en las MVEC, podrían ser relevante desde las primeras etapas del desarrollo de los AAA en humanos y que la mPGES-1 y el EP-4 pueden ser dianas alternativas a la COX-2 en una potencial intervención terapéutica en pacientes con AAA.

Tras estudiar la influencia de los factores de riesgo cardiovascular en el eje COX-2/mPGES-1/EP-4, observamos que el tabaquismo activo fue el único factor de riesgo analizado que estuvo asociado con un incremento de la expresión local de mPGES-1 en la aorta aneurismática. Sin embargo, no observamos efecto sobre la expresión de COX-2. Esta observación es coherente con la observación de que COX-2 y la mPGES-1 muestran una regulación diferente^{168,178}. El incremento en la expresión de la maquinaria biosintética de la PGE₂ fue también coherente con el incremento de los niveles circulantes de PGE₂ en los fumadores activos. Sin embargo, el AAA debe ser considerado como una enfermedad vascular sistémica²⁶⁰ y por tanto otros territorios vasculares también pueden contribuir a los niveles circulantes de PGE₂.

La presencia de la mPGES-1 en una determinada célula es necesaria para la biosíntesis efectiva de PGE₂^{168, 172, 174, 178}. Todas las células vasculares^{172, 177, 281} y los leucocitos²⁸¹, principalmente los macrófagos, expresan la mPGES-1. Los presentes resultados muestran que los niveles de expresión de la mPGES-1 se correlacionan con la expresión de marcadores de las células vasculares más que con los de los macrófagos infiltrantes. Por supuesto, esto no descarta el importante papel que los macrófagos juegan en la progresión del AAA. De hecho, se ha descrito la relevancia que la PGE₂ derivada de la actividad de la COX-2 de los macrófagos juega en la patogénesis y ruptura del AAA^{206, 210,}

282.

Respecto de los receptores de la PGE₂, solo el tabaquismo activo tuvo un efecto sobre los niveles locales de EP-4. Los fumadores activos presentaron niveles significativamente superiores de EP-4. Nosotros hemos observado que el EP-4 es receptor de PGE₂ más abundante en las células endoteliales y es clave en la angiogénesis inducida por PGE₂²⁸¹. El EP-4 se expresa en los leucocitos pero nuestros resultados mostraron que la variación de la expresión de EP-4 se correlacionaba mejor con la expresión de vWF que con la de CD68. La significación estadística de la diferencia entre fumadores activos y no activos observando el eje mPGES-1/EP-4 se mantuvo después de introducir HTA y el EPOC como variables confusoras en la estadística. Además, la asociación de los niveles de transcrito de la mPGES-1 y de EP-4 fue altamente significativa ($r=0.463$, $p=4.8 \cdot 10^{-6}$). En conjunto estos resultados soportan el concepto de que el tabaquismo activo afecta substancialmente a las células vasculares de la aorta particularmente a las células endoteliales de la microvasculatura.

El tabaquismo es un factor de riesgo singularmente importante en el AAA⁶⁵. Como hemos comentado, se ha estimado que la asociación entre el tabaquismo y el AAA es 2.5-veces mayor que la asociación con la enfermedad coronaria⁶⁴. El tabaquismo también aumenta el desarrollo de AAA en modelos animales^{276, 277}. Nuestros resultados indican que el eje mPGES-1/EP-4 está fundamentalmente asociado al estado de las células vasculares, mientras que los niveles locales de COX-2 dependen de diversos factores entre ellos del grado de infiltración leucocitaria. Los niveles de COX-2 no se asociaron con ningún marcador celular en particular. Por tanto, parece que los efectos del humo del tabaco afectan más al estado de las células vasculares que al grado de infiltración leucocitaria. Como también hemos comentado muchos trabajos proporcionan

evidencias sobre la relación entre la función renal y la aterosclerosis, y el filtrado glomerular es un factor pronóstico independiente para la enfermedad cardiovascular^{274, 275}. Puesto que la insuficiencia renal puede indicar el grado de aterosclerosis de los pacientes, nuestros resultados sugieren que el efecto del tabaquismo sobre los niveles locales de mPGES-1 y EP-4 es independiente del grado de aterosclerosis y del EPOC en los pacientes de AAA. Nuestros resultados son coherentes con la falta de asociación de la EPOC y el AAA con el tabaquismo descrita en trabajos previos²⁶². Será necesario investigar las especies moleculares y las vías de señalización implicadas en el efecto del tabaco en la inducción de la mPGES-1 y el EP-4 en el AAA humano, lo que constituye otro de los objetivos del proyecto SAF2013 recientemente concedido.

En conclusión, aquí se muestra por primera vez la asociación del tabaquismo activo con el incremento en la expresión local de mPGES-1 y EP-4, incrementado el conocimiento de la relevancia del tabaquismo en el AAA. También estos resultados son coherentes con los trabajos que muestran que la supresión de la mPGES-1 o el EP-4 reduce el desarrollo experimental de AAA en animales ^{216, 220, 221} y refuerza la idea de éstos como potenciales dianas terapéuticas.

Analizando los resultados obtenidos en esta tesis, observamos que de todos los factores de riesgo cardiovascular clásicos y de las enfermedades de base estudiadas, el que tiene un papel más determinante en la expresión local de factores asociados con la enfermedad aneurismática de la aorta abdominal y particularmente con la hipervascularización, es el tabaquismo.

Se hace evidente a partir de los datos de esta tesis considerados en conjunto, que el tabaquismo modifica la expresión de factores como la MMP-2, mPGES-1/EP-4, y en menor medida con el VEGFR-2, vinculados principalmente al estado de las células vasculares. Por lo tanto, parece que el hecho de fumar afecta principalmente al estado de las células vasculares más que al grado de infiltración leucocitaria.

Los resultados de esta tesis permiten tener una visión mucho más amplia de la relevancia del consumo de tabaco en el desarrollo de AAA y ser mucho más agresivos en el control de los factores de riesgo cardiovascular incluso en fases muy precoces de la enfermedad.

Estos hallazgos aumentan la convicción que el despistaje de la enfermedad aneurismática debe incluir a la población fumadora pero incluso nos podría modificar las pautas de seguimiento para la patología aneurismática en rango no quirúrgico (AAA<5.5cm), que podría ser más agresiva en aquellos pacientes que fuman en el momento de diagnóstico o que siguen fumando durante su seguimiento. Estos pacientes posiblemente requieran seguimientos más próximos en el tiempo que aquellos pacientes ex-fumadores o no fumadores.

Se podría incluso sugerir que con un mismo diámetro arterial los pacientes fumadores activos tendrían un mayor riesgo de ruptura que aquellos que no fuman o que han abandonado el hábito tabáquico, por lo que para un mismo diámetro arterial la intervención profiláctica del AAA sería más beneficiosa en el paciente fumador frente al no fumador, lo que implicaría no pocos dilemas éticos.

Deberíamos considerar el tabaquismo activo como uno de los ítems a tener en cuenta en los “scores” de riesgo de ruptura de los aneurismas de aorta abdominal para poder completar los ítems clásicos como el diámetro transversal máximo o los más recientes como el grado de stress de pared.

CONCLUSIONES:

OBJETIVO PRINCIPAL:

Evaluar la influencia de los FRCV en los niveles locales de factores pro-angiogénicos bien establecidos: vía del VEGF, MMPs y la vía de la PGE₂.

Nuestros resultados muestran que de los FRCV estudiados y enfermedades de base asociadas de los pacientes con AAA, el único que tiene influencia sobre los factores pro-angiogénicos estudiados es el tabaquismo activo. Además este efecto parece fundamentalmente asociado a modificaciones en las células vasculares, MVEC y VSMC.

OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1) Evaluación de la hipervascularización y de la infiltración leucocitaria de la pared de la aorta aneurismática.

- 1.1 Existe hipervascularización en los AAA.
- 1.2 Esta hipervascularización se produce ya en las fases iniciales de la enfermedad (aortas < 55mm).
- 1.3 La infiltración leucocitaria es de predominio perivascular y el máximo infiltrado leucocitario, probablemente linfocitario, es posterior a esta vascularización.

2) Influencia de los factores de riesgo cardiovascular en la expresión local de los elementos de la familia del VEGF en la pared de la aorta aneurismática:

- 2.1 La expresión de VEGF-A y de su receptor más importante, el VEGFR-2 está localmente incrementado en las muestras de AAA.
- 2.2 No se observó influencia de los FRCV en los niveles de VEGF-A.
- 2.3 Los niveles de VEGFR-2 están asociados mayoritariamente a las células vasculares.
- 2.4 Los fumadores activos presentan mayor expresión local de VEGFR-2 que los no-fumadores activos.

3) Influencia de los factores de riesgo cardiovascular en la expresión local de metaloproteinasas mayoritarias en la pared de la aorta aneurismática:

- 3.1 Existe un aumento de expresión local tanto de MMP-2 como de MMP-9 en las muestras de AAA.
- 3.2 La MMP-2 está fundamentalmente asociada a las células vasculares, especialmente VSMC mientras que la MMP-9 lo está a los leucocitos del infiltrado inflamatorio, particularmente macrófagos.
- 3.3 El tabaquismo activo es el único FRCV que aumenta la expresión de MMP-2 mientras que ningún FRCV modifica la expresión MMP-9.

3.4 Nuestros resultados son coherentes con el concepto que la MMP-2 juega un papel en la expansión de los AAA y que podría contribuir significativamente al aumento de la tasa de crecimiento de AAA observado en los pacientes fumadores.

4) Influencia de los factores de riesgo en la expresión local de los elementos de la vía de la PGE₂:

4.1 Todos los enzimas implicados en la biosíntesis de PGE₂ están incrementados en el AAA, aunque la mPGES-1 en menor medida que las COXs. El incremento de la COX-1 está asociado al aumento de infiltración de macrófagos, mientras que la COX-2 y la mPGES-1 parecen estar up-reguladas en las muestras de AAA.

4.2 El incremento de las COXs se produce ya en las fases iniciales de la enfermedad (aortas<55mm).

4.3 Los niveles de EP-2 y de EP-4 están significativamente aumentados en las muestras de AAA, mientras que los de EP-3 están disminuidos.

4.4 El EP-4 es prácticamente el único receptor de la PGE₂ que se expresa en MVEC y su incremento también se produce ya en las fases iniciales de la enfermedad (aortas<55mm).

4.5 La co-expresión de COX-2, mPGES-1 y EP-4 en MVEC apoya firmemente el papel relevante de la PGE₂ derivada de las MVEC en la hipervascularización de los AAA.

4.6 Los pacientes fumadores activos, tienen un aumento local de mPGES-1, EP-4 y metabolitos de la PGE₂, siendo el único FRCV que tiene influencia sobre eje COX-2/mPGES-1/EP-4.

ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON ESTA TESIS DOCTORAL:

Camacho M, Dilmé J, Solà-Vilà D, Rodríguez C, Bellmunt S, Sigüero L, Alcolea S, Romero JM, Escudero JR, Martínez-González J, Vila L. Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm. *J Lipid Res.* 2013 Dec;54(12):3506-15. doi: 10.1194/jlr.M042481. Epub 2013 Oct 16.

Dilmé JF, Solà-Vilà D, Bellmunt S, Romero JM, Escudero JR, Camacho M and Vila L. Active Smoking Increases Microsomal PGE2-Synthase-1/PGE-Receptor-4 Axis in Human Abdominal Aortic Aneurysms. *Mediators of Inflammation*, Volume 2014 (2014), Article ID 316150, 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/316150>

Dilmé JF, Bellmunt S, Camacho M, Solà-Vilà D, Romero JM, Escudero JR and Vila L. Influence of cardiovascular risk factors on levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human abdominal aortic aneurysms. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.05.023>

Estos artículo completos se presentan en la sección de Anexos al final de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Dagenais F. Anatomy of the thoracic aorta and of its branches. *Thoracic surgery clinics*. 2011;21:219-227, viii
2. Feller I, Woodburne RT. Surgical anatomy of the abdominal aorta. *Annals of surgery*. 1961;154(6)Suppl:239-252
3. Hoogendam IJ, Van Rinsum AC, Olyslager J. The diameter of the distal abdominal aorta and the aetiology of local atheroma. *The Journal of cardiovascular surgery*. 1984;25:408-413
4. Hollier LH, Stanson AW, Gloviczki P, Pairolero PC, Joyce JW, Bernatz PE, Cherry KJ. Arteriomegaly: Classification and morbid implications of diffuse aneurysmal disease. *Surgery*. 1983;93:700-708
5. Muir Gray JA. Screening for abdominal aortic aneurysm (br j surg 2003; 90: 515-516). *The British journal of surgery*. 2003;90:1165
6. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on reporting standards for arterial aneurysms, ad hoc committee on reporting standards, society for vascular surgery and north american chapter, international society for cardiovascular surgery. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1991;13:452-458
7. Evans GH, Stansby G, Hamilton G. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1992;15:456
8. Conrad MF, Crawford RS, Davison JK, Cambria RP. Thoracoabdominal aneurysm repair: A 20-year perspective. *The Annals of thoracic surgery*. 2007;83:S856-861; discussion S890-852
9. Walker DI, Bloor K, Williams G, Gillie I. Inflammatory aneurysms of the abdominal aorta. *The British journal of surgery*. 1972;59:609-614
10. Downs AR, Lye CR. Inflammatory abdominal aortic aneurysm. *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie*. 1986;29:50-53
11. van Bommel EF, van der Veer SJ, Hendriksz TR, Bleumink GS. Persistent chronic peri-aortitis ('inflammatory aneurysm') after abdominal aortic aneurysm repair: Systematic review of the literature. *Vasc Med*. 2008;13:293-303
12. von Fritschen U, Malzfeld E, Clasen A, Kortmann H. Inflammatory abdominal aortic aneurysm: A postoperative course of retroperitoneal fibrosis. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1999;30:1090-1098
13. Leseche G, Schaetz A, Arrive L, Nussaume O, Andreassian B. Diagnosis and management of 17 consecutive patients with inflammatory abdominal aortic aneurysm. *American journal of surgery*. 1992;164:39-44
14. Tennant WG, Hartnell GG, Baird RN, Horrocks M. Radiologic investigation of abdominal aortic aneurysm disease: Comparison of three modalities in staging and the detection of inflammatory change. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1993;17:703-709

15. Rose AG, Dent DM. Inflammatory variant of abdominal atherosclerotic aneurysm. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 1981;105:409-413
16. Ramshaw AL, Parums DV. Immunohistochemical characterization of inflammatory cells associated with advanced atherosclerosis. *Histopathology*. 1990;17:543-552
17. Tanaka S, Komori K, Okadome K, Sugimachi K, Mori R. Detection of active cytomegalovirus infection in inflammatory aortic aneurysms with rna polymerase chain reaction. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1994;20:235-243
18. Kasashima S, Zen Y, Kawashima A, Endo M, Matsumoto Y, Kasashima F. A new clinicopathological entity of igg4-related inflammatory abdominal aortic aneurysm. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2009;49:1264-1271; discussion 1271
19. Weintraub NL. Understanding abdominal aortic aneurysm. *The New England journal of medicine*. 2009;361:1114-1116
20. van der Vliet JA, Boll AP. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 1997;349:863-866
21. Vega de Ceniga M, Gomez R, Estallo L, de la Fuente N, Viviens B, Barba A. Analysis of expansion patterns in 4-4.9 cm abdominal aortic aneurysms. *Annals of vascular surgery*. 2008;22:37-44
22. Hak E, Balm R, Eikelboom BC, Akkersdijk GJ, van der Graaf Y. Abdominal aortic aneurysm screening: An epidemiological point of view. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 1996;11:270-278
23. Rutledge R, Oller DW, Meyer AA, Johnson GJ, Jr. A statewide, population-based time-series analysis of the outcome of ruptured abdominal aortic aneurysm. *Annals of surgery*. 1996;223:492-502; discussion 503-495
24. Bengtsson H, Bergqvist D, Sternby NH. Increasing prevalence of abdominal aortic aneurysms. A necropsy study. *The European journal of surgery = Acta chirurgica*. 1992;158:19-23
25. Rantakokko V, Havia T, Inberg MV, Vanttinen E. Abdominal aortic aneurysms: A clinical and autopsy study of 408 patients. *Acta chirurgica Scandinavica*. 1983;149:151-155
26. McFarlane MJ. The epidemiologic necropsy for abdominal aortic aneurysm. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1991;265:2085-2088
27. Panneton JM, Hollier LH. Nondissecting thoracoabdominal aortic aneurysms: Part i. *Annals of vascular surgery*. 1995;9:503-514
28. Grimshaw GM, Thompson JM, Hamer JD. Prevalence of abdominal aortic aneurysm associated with hypertension in an urban population. *Journal of medical screening*. 1994;1:226-228
29. Arnell TD, de Virgilio C, Donayre C, Grant E, Baker JD, White R. Abdominal aortic aneurysm screening in elderly males with atherosclerosis: The value of physical exam. *The American surgeon*. 1996;62:861-864
30. Long A, Bui HT, Barbe C, Henni AH, Journet J, Metz D, Nazeyrollas P. Prevalence of abdominal aortic aneurysm and large infrarenal aorta in patients with acute coronary syndrome and proven coronary stenosis: A prospective monocenter study. *Annals of vascular surgery*. 2010;24:602-608

31. van Lindert NH, Bienfait HP, Gratama JW, Vriesema H, Ten Hove W, Vermeulen EG, van Leeuwen RB. Screening for aneurysm of the abdominal aorta: Prevalence in patients with stroke or tia. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 2009;16:602-607
32. Carty GA, Nachtigal T, Magyar R, Herzler G, Bays R. Abdominal duplex ultrasound screening for occult aortic aneurysm during carotid arterial evaluation. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1993;17:696-702
33. Karanjia PN, Madden KP, Lobner S. Coexistence of abdominal aortic aneurysm in patients with carotid stenosis. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1994;25:627-630
34. Barba A, Estallo L, Rodriguez L, Baquer M, Vega de Ceniga M. Detection of abdominal aortic aneurysm in patients with peripheral artery disease. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2005;30:504-508
35. Galland RB, Simmons MJ, Torrie EP. Prevalence of abdominal aortic aneurysm in patients with occlusive peripheral vascular disease. *The British journal of surgery*. 1991;78:1259-1260
36. MacSweeney ST, O'Meara M, Alexander C, O'Malley MK, Powell JT, Greenhalgh RM. High prevalence of unsuspected abdominal aortic aneurysm in patients with confirmed symptomatic peripheral or cerebral arterial disease. *The British journal of surgery*. 1993;80:582-584
37. Johnson G, Jr., Avery A, McDougal EG, Burnham SJ, Keagy BA. Aneurysms of the abdominal aorta. Incidence in blacks and whites in north carolina. *Arch Surg*. 1985;120:1138-1140
38. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Gordon IL, Chute EP, Littooy FN, Krupski WC, Bandyk D, Barone GW, Graham LM, Hye RJ, Reinke DB. Relationship of age, gender, race, and body size to infrarenal aortic diameter. The aneurysm detection and management (adam) veterans affairs cooperative study investigators. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1997;26:595-601
39. Allardice JT, Allwright GJ, Wafula JM, Wyatt AP. High prevalence of abdominal aortic aneurysm in men with peripheral vascular disease: Screening by ultrasonography. *The British journal of surgery*. 1988;75:240-242
40. Golledge J, Clancy P, Jamrozik K, Norman PE. Obesity, adipokines, and abdominal aortic aneurysm: Health in men study. *Circulation*. 2007;116:2275-2279
41. Deriu GP, Ballotta E, Grego F, Bonavina L. [abdominal aorta aneurysm and associated peripheral arterial lesions]. *Minerva chirurgica*. 1983;38:1059-1070
42. Larsson E, Granath F, Swedenborg J, Hultgren R. A population-based case-control study of the familial risk of abdominal aortic aneurysm. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2009;49:47-50; discussion 51
43. Adams DC, Tulloh BR, Galloway SW, Shaw E, Tulloh AJ, Poskitt KR. Familial abdominal aortic aneurysm: Prevalence and implications for screening. *European journal of vascular surgery*. 1993;7:709-712

44. Darling RC, 3rd, Brewster DC, Darling RC, LaMuraglia GM, Moncure AC, Cambria RP, Abbott WM. Are familial abdominal aortic aneurysms different? *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter.* 1989;10:39-43
45. Auerbach O, Garfinkel L. Atherosclerosis and aneurysm of aorta in relation to smoking habits and age. *Chest.* 1980;78:805-809
46. Simoni G, Gianotti A, Ardia A, Baiardi A, Galleano R, Civalleri D. Screening study of abdominal aortic aneurysm in a general population: Lipid parameters. *Cardiovasc Surg.* 1996;4:445-448
47. Simon G, Nordgren D, Connelly S, Shultz PJ. Screening for abdominal aortic aneurysms in a hypertensive patient population. *Archives of internal medicine.* 1996;156:2081-2084
48. van Laarhoven CJ, Borstlap AC, van Berge Henegouwen DP, Palmes FM, Verpalen MC, Schoemaker MC. Chronic obstructive pulmonary disease and abdominal aortic aneurysms. *European journal of vascular surgery.* 1993;7:386-390
49. Muluk SC, Steed DL, Makaroun MS, Pham SM, Kormos RL, Griffith BP, Webster MW. Aortic aneurysm in heart transplant recipients. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter.* 1995;22:689-694; discussion 695-686
50. Piotrowski JJ, McIntyre KE, Hunter GC, Sethi GK, Bernhard VM, Copeland JC. Abdominal aortic aneurysm in the patient undergoing cardiac transplantation. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter.* 1991;14:460-465; discussion 465-467
51. Von Allmen RS, Powell JT. The management of ruptured abdominal aortic aneurysms: Screening for abdominal aortic aneurysm and incidence of rupture. *The Journal of cardiovascular surgery.* 2012;53:69-76
52. Ward AS. Aortic aneurysmal disease. A generalized dilating diathesis. *Arch Surg.* 1992;127:990-991
53. Tilson MD. Atherosclerosis and aneurysm disease. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter.* 1990;12:371-372
54. Thompson RW. Reflections on the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Cardiovasc Surg.* 2002;10:389-394
55. Choke E, Cockerill G, Wilson WR, Sayed S, Dawson J, Loftus I, Thompson MM. A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery.* 2005;30:227-244
56. Holmes DR, Liao S, Parks WC, Thompson RW. Medial neovascularization in abdominal aortic aneurysms: A histopathologic marker of aneurysmal degeneration with pathophysiologic implications. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter.* 1995;21:761-771; discussion 771-762
57. Kobayashi M, Matsubara J, Matsushita M, Nishikimi N, Sakurai T, Nimura Y. Expression of angiogenesis and angiogenic factors in human aortic vascular disease. *The Journal of surgical research.* 2002;106:239-245

58. Paik DC, Fu C, Bhattacharya J, Tilson MD. Ongoing angiogenesis in blood vessels of the abdominal aortic aneurysm. *Experimental & molecular medicine*. 2004;36:524-533
59. Choke E, Thompson MM, Dawson J, Wilson WR, Sayed S, Loftus IM, Cockerill GW. Abdominal aortic aneurysm rupture is associated with increased medial neovascularization and overexpression of proangiogenic cytokines. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:2077-2082
60. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Holt PJ, Loftus IM, Thompson MM. Review of current theories for abdominal aortic aneurysm pathogenesis. *Vascular*. 2009;17:253-263
61. Wahlgren CM, Larsson E, Magnusson PK, Hultgren R, Swedenborg J. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in a twin population. *Journal of vascular surgery*. 2010;51:3-7; discussion 7
62. Clifton MA. Familial abdominal aortic aneurysms. *The British journal of surgery*. 1977;64:765-766
63. Johansen K, Koepsell T. Familial tendency for abdominal aortic aneurysms. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1986;256:1934-1936
64. Lederle FA, Nelson DB, Joseph AM. Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: A systematic review. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2003;38:329-334
65. Norman PE, Curci JA. Understanding the effects of tobacco smoke on the pathogenesis of aortic aneurysm. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33:1473-1477
66. MacSweeney ST, Ellis M, Worrell PC, Greenhalgh RM, Powell JT. Smoking and growth rate of small abdominal aortic aneurysms. *Lancet*. 1994;344:651-652
67. Thompson MM, Jones L, Nasim A, Sayers RD, Bell PR. Angiogenesis in abdominal aortic aneurysms. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 1996;11:464-469
68. Zarins CK, Glagov S, Vesselinovitch D, Wissler RW. Aneurysm formation in experimental atherosclerosis: Relationship to plaque evolution. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1990;12:246-256
69. Lee AJ, Fowkes FG, Carson MN, Leng GC, Allan PL. Smoking, atherosclerosis and risk of abdominal aortic aneurysm. *European heart journal*. 1997;18:671-676
70. Fowkes FG, Anandan CL, Lee AJ, Smith FB, Tzoulaki I, Rumley A, Powell JT, Lowe GD. Reduced lung function in patients with abdominal aortic aneurysm is associated with activation of inflammation and hemostasis, not smoking or cardiovascular disease. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2006;43:474-480
71. Sakamaki F, Oya H, Nagaya N, Kyotani S, Satoh T, Nakanishi N. Higher prevalence of obstructive airway disease in patients with thoracic or abdominal aortic aneurysm. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2002;36:35-40

72. Lindholt JS, Heickendorff L, Antonsen S, Fasting H, Henneberg EW. Natural history of abdominal aortic aneurysm with and without coexisting chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1998;28:226-233
73. Agusti A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease: What we know and what we don't know (but should). *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2007;4:522-525
74. Gan WQ, Man SF, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: A systematic review and a meta-analysis. *Thorax*. 2004;59:574-580
75. Siafakas NM, Antoniou KM, Tzortzaki EG. Role of angiogenesis and vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. 2007;2:453-462
76. Ong G, Thomas BJ, Mansfield AO, Davidson BR, Taylor-Robinson D. Detection and widespread distribution of chlamydia pneumoniae in the vascular system and its possible implications. *Journal of clinical pathology*. 1996;49:102-106
77. Leier CV, Baker PB, Kilman JW, Wooley CF. Cardiovascular abnormalities associated with adult polycystic kidney disease. *Annals of internal medicine*. 1984;100:683-688
78. Vanmaele R, Witbreuk M, De Broe M, Van Schil P, Lins R. Abdominal aortic aneurysm and polycystic kidneys. *Nephron*. 1995;69:107-108
79. Baxter BT, Davis VA, Minion DJ, Wang YP, Lynch TG, McManus BM. Abdominal aortic aneurysms are associated with altered matrix proteins of the nonaneurysmal aortic segments. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1994;19:797-802; discussion 803
80. Webster MW, McAuley CE, Steed DL, Miller DD, Evans CH. Collagen stability and collagenolytic activity in the normal and aneurysmal human abdominal aorta. *American journal of surgery*. 1991;161:635-638
81. Gargiulo M, Stella A, Spina M, Faggioli G, Cenacchi G, Degani A, Guiducci G, Tonelli M, Bertoni F, D'Addato M. Content and turnover of extracellular matrix protein in human "nonspecific" and inflammatory abdominal aortic aneurysms. *European journal of vascular surgery*. 1993;7:546-553
82. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 2005;365:1577-1589
83. Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: Known and unknown extracellular mediators. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23:2146-2154
84. Reeps C, Pelisek J, Seidl S, Schuster T, Zimmermann A, Kuehnl A, Eckstein HH. Inflammatory infiltrates and neovessels are relevant sources of MMPs in abdominal aortic aneurysm wall. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 2009;76:243-252
85. Dietz HC, Mecham RP. Mouse models of genetic diseases resulting from mutations in elastic fiber proteins. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2000;19:481-488
86. Sakalihasan N, Heyeres A, Nusgens BV, Limet R, Lapiere CM. Modifications of the extracellular matrix of aneurysmal abdominal aortas as a function of their size. *European journal of vascular surgery*. 1993;7:633-637

87. Thompson RW, Parks WC. Role of matrix metalloproteinases in abdominal aortic aneurysms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996;800:157-174
88. Liapis CD, Paraskevas KI. The pivotal role of matrix metalloproteinases in the development of human abdominal aortic aneurysms. *Vasc Med*. 2003;8:267-271
89. Smith RL. Degradative enzymes in osteoarthritis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 1999;4:D704-712
90. Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110:625-632
91. Thompson RW, Holmes DR, Mertens RA, Liao S, Botney MD, Mecham RP, Welgus HG, Parks WC. Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 1995;96:318-326
92. Pyo R, Lee JK, Shipley JM, Curci JA, Mao D, Ziporin SJ, Ennis TL, Shapiro SD, Senior RM, Thompson RW. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase b) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105:1641-1649
93. Morris DR, Biros E, Cronin O, Kuivaniemi H, Golledge J. The association of genetic variants of matrix metalloproteinases with abdominal aortic aneurysm: A systematic review and meta-analysis. *Heart*. 2013
94. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular aspects of medicine*. 2008;29:290-308
95. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase a-deficient mice. *Cancer research*. 1998;58:1048-1051
96. Sakalihasan N, Delvenne P, Nusgens BV, Limet R, Lapiere CM. Activated forms of mmp2 and mmp9 in abdominal aortic aneurysms. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1996;24:127-133
97. Herron GS, Unemori E, Wong M, Rapp JH, Hibbs MH, Stoney RJ. Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms. Involvement of the vasa vasorum in the pathogenesis of aortic aneurysms. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1991;11:1667-1677
98. Petersen E, Wagberg F, Angquist KA. Proteolysis of the abdominal aortic aneurysm wall and the association with rupture. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2002;23:153-157
99. Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995;15:1145-1151
100. McCawley LJ, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: They're not just for matrix anymore! *Current opinion in cell biology*. 2001;13:534-540
101. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: Effectors of development and normal physiology. *Genes & development*. 2000;14:2123-2133
102. Parks WC. Matrix metalloproteinases in repair. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 1999;7:423-432

103. Choke E, Cockerill GW, Dawson J, Wilson RW, Jones A, Loftus IM, Thompson MM. Increased angiogenesis at the site of abdominal aortic aneurysm rupture. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1085:315-319
104. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature cell biology*. 2000;2:737-744
105. Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:987-994
106. Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P. Abdominal aortic aneurysm: Pathogenesis and implications for management. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:2605-2613
107. Vorp DA, Vande Geest JP. Biomechanical determinants of abdominal aortic aneurysm rupture. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25:1558-1566
108. Wills A, Thompson MM, Crowther M, Sayers RD, Bell PR. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms--cellular and biochemical mechanisms. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 1996;12:391-400
109. Eliason JL, Hannawa KK, Ailawadi G, Sinha I, Ford JW, Deogracias MP, Roelofs KJ, Woodrum DT, Ennis TL, Henke PK, Stanley JC, Thompson RW, Upchurch GR, Jr. Neutrophil depletion inhibits experimental abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation*. 2005;112:232-240
110. Pagano MB, Bartoli MA, Ennis TL, Mao D, Simmons PM, Thompson RW, Pham CT. Critical role of dipeptidyl peptidase i in neutrophil recruitment during the development of experimental abdominal aortic aneurysms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104:2855-2860
111. Tilson MD, 3rd. The polymorphonuclear leukocyte and the abdominal aortic aneurysm: A neglected cell type and a neglected disease. *Circulation*. 2005;112:154-156
112. Tilson MD, Ozsvath KJ, Hirose H, Xia S. A genetic basis for autoimmune manifestations in the abdominal aortic aneurysm resides in the mhc class ii locus dr-beta-1. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1996;800:208-215
113. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer*. 1996;32A:2413-2422
114. Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Experimental cell research*. 1999;253:117-130
115. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (vegf) and its receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1999;13:9-22
116. Zachary I, Glikli G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovascular research*. 2001;49:568-581
117. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386:671-674
118. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological reviews*. 2004;56:549-580

119. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vegf receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Experimental cell research*. 2006;312:549-560
120. Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270:308-312
121. Brogi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate vegf and bfgf gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates vegf expression only. *Circulation*. 1994;90:649-652
122. Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation*. 1995;92:11-14
123. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (vegf). *Journal of cellular and molecular medicine*. 2005;9:777-794
124. Zachary I, Mathur A, Yla-Herttuala S, Martin J. Vascular protection: A novel nonangiogenic cardiovascular role for vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20:1512-1520
125. Servos S, Zachary I, Martin JF. Vegf modulates no production: The basis of a cytoprotective effect? *Cardiovascular research*. 1999;41:509-510
126. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor stimulates schwann cell invasion and neovascularization of acellular nerve grafts. *Brain research*. 1999;846:219-228
127. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19:5731-5740
128. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of hif-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 1998;394:485-490
129. Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *The American journal of physiology*. 1992;263:F181-191
130. Smith WL, Dewitt DL. Prostaglandin endoperoxide h synthases-1 and -2. *Advances in immunology*. 1996;62:167-215
131. Hla T, Bishop-Bailey D, Liu CH, Schaefer HJ, Trifan OC. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1999;31:551-557
132. Vane JR. The mode of action of aspirin and similar compounds. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 1976;58:691-712
133. Morham SG, Langenbach R, Loftin CD, Tian HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, Ledford A, Lee CA, Smithies O. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell*. 1995;83:473-482

134. Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: Regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*. 1993;11:371-386
135. Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *The Journal of clinical investigation*. 1994;94:2504-2510
136. Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P. Cox-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93:2317-2321
137. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*. 1997;91:197-208
138. Peskar BM, Maricic N. Role of prostaglandins in gastroprotection. *Digestive diseases and sciences*. 1998;43:23S-29S
139. Halter F, Tarnawski AS, Schmassmann A, Peskar BM. Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: Controversial issues and perspectives. *Gut*. 2001;49:443-453
140. Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The x-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin h2 synthase-1. *Nature*. 1994;367:243-249
141. Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by cox-1 and cox-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274:22903-22906
142. Marnett LJ, Kalgutkar AS. Cyclooxygenase 2 inhibitors: Discovery, selectivity and the future. *Trends in pharmacological sciences*. 1999;20:465-469
143. Talley JJ. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2 (cox-2). *Progress in medicinal chemistry*. 1999;36:201-234
144. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. 1976;263:663-665
145. Dusting GJ, Moncada S, Vane JR. Prostacyclin (pgx) is the endogenous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid. *Prostaglandins*. 1977;13:3-15
146. Spencer AG, Woods JW, Arakawa T, Singer, II, Smith WL. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide h synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:9886-9893
147. Wade ML, Voelkel NF, Fitzpatrick FA. "Suicide" inactivation of prostaglandin i2 synthase: Characterization of mechanism-based inactivation with isolated enzyme and endothelial cells. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1995;321:453-458
148. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975;72:2994-2998
149. Nagata T, Uehara Y, Numabe A, Ishimitsu T, Hirawa N, Ikeda T, Matsuoka H, Sugimoto T. Regulatory effect of thromboxane a2 on proliferation of vascular smooth muscle cells from rats. *The American journal of physiology*. 1992;263:H1331-1338

150. Morinelli TA, Zhang LM, Newman WH, Meier KE. Thromboxane α_2 /prostaglandin h_2 -stimulated mitogenesis of coronary artery smooth muscle cells involves activation of mitogen-activated protein kinase and s_6 kinase. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269:5693-5698
151. Le Breton GC, Venton DL, Enke SE, Halushka PV. 13-azaprostanic acid: A specific antagonist of the human blood platelet thromboxane/endoperoxide receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76:4097-4101
152. Ishizuka T, Kawakami M, Hidaka T, Matsuki Y, Takamizawa M, Suzuki K, Kurita A, Nakamura H. Stimulation with thromboxane α_2 (txa_2) receptor agonist enhances icam-1, vcam-1 or elam-1 expression by human vascular endothelial cells. *Clinical and experimental immunology*. 1998;112:464-470
153. Ko FN. Low-affinity thromboxane receptor mediates proliferation in cultured vascular smooth muscle cells of rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997;17:1274-1282
154. Bath PM, Hassall DG, Gladwin AM, Palmer RM, Martin JF. Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1991;11:254-260
155. Jones DA, Benjamin CW, Linseman DA. Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Molecular pharmacology*. 1995;48:890-896
156. Harada M, Toki Y, Numaguchi Y, Osanai H, Ito T, Okumura K, Hayakawa T. Prostacyclin synthase gene transfer inhibits neointimal formation in rat balloon-injured arteries without bleeding complications. *Cardiovascular research*. 1999;43:481-491
157. Numaguchi Y, Naruse K, Harada M, Osanai H, Mokuno S, Murase K, Matsui H, Toki Y, Ito T, Okumura K, Hayakawa T. Prostacyclin synthase gene transfer accelerates reendothelialization and inhibits neointimal formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999;19:727-733
158. Moncada S, Vane JR. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. *The New England journal of medicine*. 1979;300:1142-1147
159. Weksler BB, Marcus AJ, Jaffe EA. Synthesis of prostaglandin i_2 (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74:3922-3926
160. Marcus AJ, Weksler BB, Jaffe EA. Enzymatic conversion of prostaglandin endoperoxide h_2 and arachidonic acid to prostacyclin by cultured human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1978;253:7138-7141
161. Weksler BB, Ley CW, Jaffe EA. Stimulation of endothelial cell prostacyclin production by thrombin, trypsin, and the ionophore $\text{a } 23187$. *The Journal of clinical investigation*. 1978;62:923-930
162. Charo IF, Shak S, Karasek MA, Davison PM, Goldstein IM. Prostaglandin i_2 is not a major metabolite of arachidonic acid in cultured endothelial cells from human foreskin microvessels. *The Journal of clinical investigation*. 1984;74:914-919
163. Bull HA, Rustin MH, Spaul J, Cohen J, Wilson-Jones E, Dowd PM. Pro-inflammatory mediators induce sustained release of prostaglandin e_2 from

- human dermal microvascular endothelial cells. *The British journal of dermatology*. 1990;122:153-164
164. Tansik RL, Namm DH, White HL. Synthesis of prostaglandin 6-keto f1alpha by cultured aortic smooth muscle cells and stimulation of its formation in a coupled system with platelet lysates. *Prostaglandins*. 1978;15:399-408
165. MacIntyre DE, Pearson JD, Gordon JL. Localisation and stimulation of prostacyclin production in vascular cells. *Nature*. 1978;271:549-551
166. Eldor A, Falcone DJ, Hajjar DP, Minick CR, Weksler BB. Recovery of prostacyclin production by de-endothelialized rabbit aorta. Critical role of neointimal smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation*. 1981;67:735-741
167. Murakami M, Nakatani Y, Tanioka T, Kudo I. Prostaglandin e synthase. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2002;68-69:383-399
168. Camacho M GE, Escudero J-R, Antón R, García-Moll X, Vila L. . Microsomal-pge synthase-1, which is not coupled to a particular cox-isoenzyme, is essential for pge2 biosynthesis in vascular smooth muscle cells. . *J Thromb Haemostas* 2007; 5:1411-1419. 2007:1141-1419
169. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I. Molecular identification of cytosolic prostaglandin e2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin e2 biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:32775-32782
170. Vazquez-Tello A, Fan L, Hou X, Joyal JS, Mancini JA, Quiniou C, Clyman RI, Gobeil F, Jr., Varma DR, Chemtob S. Intracellular-specific colocalization of prostaglandin e2 synthases and cyclooxygenases in the brain. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2004;287:R1155-1163
171. Vila L. Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: Role in atherosclerosis. *Medicinal research reviews*. 2004;24:399-424
172. Soler M, Camacho M, Escudero JR, Iniguez MA, Vila L. Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin e synthase. *Circulation research*. 2000;87:504-507
173. Salvado MD, Alfranca A, Escolano A, Haeggstrom JZ, Redondo JM. Cox-2 limits prostanoid production in activated huvecs and is a source of pgh2 for transcellular metabolism to pge2 by tumor cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29:1131-1137
174. Camacho M, Lopez-Belmonte J, Vila L. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin i synthase activity. *Circulation research*. 1998;83:353-365
175. Gerritsen ME, Parks TP, Printz MP. Prostaglandin endoperoxide metabolism by bovine cerebral microvessels. *Biochimica et biophysica acta*. 1980;619:196-206
176. Gerritsen ME, Cheli CD. Arachidonic acid and prostaglandin endoperoxide metabolism in isolated rabbit and coronary microvessels and isolated and cultivated coronary microvessel endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*. 1983;72:1658-1671
177. Casos K, Siguero L, Fernandez-Figueras MT, Leon X, Sarda MP, Vila L, Camacho M. Tumor cells induce cox-2 and mpges-1 expression in microvascular endothelial cells mainly by means of il-1 receptor activation. *Microvascular research*. 2011;81:261-268
178. Sola-Villa D, Camacho M, Sola R, Soler M, Diaz JM, Vila L. Il-1beta induces vegf, independently of pge2 induction, mainly through the pi3-k/mtor pathway in renal mesangial cells. *Kidney international*. 2006;70:1935-1941

179. Thoren S, Weinander R, Saha S, Jegerschold C, Pettersson PL, Samuelsson B, Hebert H, Hamberg M, Morgenstern R, Jakobsson PJ. Human microsomal prostaglandin e synthase-1: Purification, functional characterization, and projection structure determination. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:22199-22209
180. Tanikawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, Hashimoto K, Kangawa K, Kojima M, Ito S, Watanabe K. Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin e synthase. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;291:884-889
181. Forsberg L, Leeb L, Thoren S, Morgenstern R, Jakobsson P. Human glutathione dependent prostaglandin e synthase: Gene structure and regulation. *FEBS letters*. 2000;471:78-82
182. Sampey AV, Monrad S, Crofford LJ. Microsomal prostaglandin e synthase-1: The inducible synthase for prostaglandin e2. *Arthritis research & therapy*. 2005;7:114-117
183. Uracz W, Uracz D, Olszanecki R, Gryglewski RJ. Interleukin 1beta induces functional prostaglandin e synthase in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. 2002;53:643-654
184. Cheng S, Afif H, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Li X, Farrajota K, Lavigne M, Fahmi H. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits interleukin-1beta-induced membrane-associated prostaglandin e2 synthase-1 expression in human synovial fibroblasts by interfering with egr-1. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:22057-22065
185. Li X, Afif H, Cheng S, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Fahmi H. Expression and regulation of microsomal prostaglandin e synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *The Journal of rheumatology*. 2005;32:887-895
186. Ouellet M, Falguyret JP, Ear PH, Pen A, Mancini JA, Riendeau D, Percival MD. Purification and characterization of recombinant microsomal prostaglandin e synthase-1. *Protein expression and purification*. 2002;26:489-495
187. Bianchi A, Moulin D, Sebillaud S, Koufany M, Galteau MM, Netter P, Terlain B, Jouzeau JY. Contrasting effects of peroxisome-proliferator-activated receptor (ppar)gamma agonists on membrane-associated prostaglandin e2 synthase-1 in il-1beta-stimulated rat chondrocytes: Evidence for ppargamma-independent inhibition by 15-deoxy-delta12,14prostaglandin j2. *Arthritis research & therapy*. 2005;7:R1325-1337
188. Kojima F, Naraba H, Miyamoto S, Beppu M, Aoki H, Kawai S. Membrane-associated prostaglandin e synthase-1 is upregulated by proinflammatory cytokines in chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2004;6:R355-365
189. Camacho M, Vila L. Transcellular formation of thromboxane a(2) in mixed incubations of endothelial cells and aspirin-treated platelets strongly depends on the prostaglandin i-synthase activity. *Thrombosis research*. 2000;99:155-164
190. Karim S, Habib A, Levy-Toledano S, Maclouf J. Cyclooxygenase-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271:12042-12048

191. Kuivaniemi H, Kyo Y, Lenk G, Tromp G. Genome-wide approach to finding abdominal aortic aneurysm susceptibility genes in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1085:270-281
192. Pakala R, Willerson JT, Benedict CR. Effect of serotonin, thromboxane a₂, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 1997;96:2280-2286
193. Daniel TO, Liu H, Morrow JD, Crews BC, Marnett LJ. Thromboxane a₂ is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer research*. 1999;59:4574-4577
194. Cheuk BL, Cheng SW. Can local secretion of prostaglandin e₂, thromboxane b₂, and interleukin-6 play a role in ruptured abdominal aortic aneurysm? *World journal of surgery*. 2008;32:55-61
195. Soler M, Camacho M, Sola R, Vila L. Mesangial cells release untransformed prostaglandin h₂ as a major prostanoid. *Kidney international*. 2001;59:1283-1289
196. Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Aze Y, Tanaka T, Yoshida N, Ueno A, Oh-ishi S, Narumiya S. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature*. 1997;388:678-682
197. Griffiths R. *Prostaglandins and inflammation. In inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Gallin J and Snyderman R (Ed). 1999.
198. Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Wahl LM. Interleukin 4 inhibition of prostaglandin e₂ synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kda type iv collagenase/gelatinase production by human monocytes. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267:515-519
199. Varga J, Diaz-Perez A, Rosenbloom J, Jimenez SA. Pge₂ causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types i and iii procollagen mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*. 1987;147:1282-1288
200. Salcedo R, Zhang X, Young HA, Michael N, Wasserman K, Ma WH, Martins-Green M, Murphy WJ, Oppenheim JJ. Angiogenic effects of prostaglandin e₂ are mediated by up-regulation of cxcr4 on human microvascular endothelial cells. *Blood*. 2003;102:1966-1977
201. Ghosh AK. Regulation by prostaglandin e₂ and histamine of angiogenesis in inflammatory granulation tissue. *Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 2003;123:295-303
202. Qian RZ, Yue F, Zhang GP, Hou LK, Wang XH, Jin HM. Roles of cyclooxygenase-2 in microvascular endothelial cell proliferation induced by basic fibroblast growth factor. *Chinese medical journal*. 2008;121:2599-2603
203. Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. The cox-2/pge₂ pathway: Key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*. 2009;30:377-386
204. Bishop-Bailey D, Mitchell JA, Warner TD. Cox-2 in cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:956-958
205. Holmes DR, Wester W, Thompson RW, Reilly JM. Prostaglandin e₂ synthesis and cyclooxygenase expression in abdominal aortic aneurysms. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1997;25:810-815

206. Walton LJ, Franklin IJ, Bayston T, Brown LC, Greenhalgh RM, Taylor GW, Powell JT. Inhibition of prostaglandin e2 synthesis in abdominal aortic aneurysms: Implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Circulation*. 1999;100:48-54
207. Bayston T, Ramessur S, Reise J, Jones KG, Powell JT. Prostaglandin e2 receptors in abdominal aortic aneurysm and human aortic smooth muscle cells. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2003;38:354-359
208. King VL, Trivedi DB, Gitlin JM, Loftin CD. Selective cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib decreases angiotensin ii-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2006;26:1137-1143
209. Gitlin JM, Trivedi DB, Langenbach R, Loftin CD. Genetic deficiency of cyclooxygenase-2 attenuates abdominal aortic aneurysm formation in mice. *Cardiovascular research*. 2007;73:227-236
210. Chapple KS, Parry DJ, McKenzie S, MacLennan KA, Jones P, Scott DJ. Cyclooxygenase-2 expression and its association with increased angiogenesis in human abdominal aortic aneurysms. *Annals of vascular surgery*. 2007;21:61-66
211. Alfranca A, Lopez-Oliva JM, Genis L, Lopez-Maderuelo D, Mirones I, Salvado D, Quesada AJ, Arroyo AG, Redondo JM. Pge2 induces angiogenesis via mt1-mmp-mediated activation of the tgfbeta/alk5 signaling pathway. *Blood*. 2008;112:1120-1128
212. Finetti F, Solito R, Morbidelli L, Giachetti A, Ziche M, Donnini S. Prostaglandin e2 regulates angiogenesis via activation of fibroblast growth factor receptor-1. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:2139-2146
213. Marwali MR, Mehta JL. Cox-2 inhibitors and cardiovascular risk. Inferences based on biology and clinical studies. *Thrombosis and haemostasis*. 2006;96:401-406
214. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (cox)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of cox-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:272-277
215. Krotz F. Preserving vascular prostacyclin levels by microsomal prostaglandin e(2) synthase isoform 1 inhibition: A new strategy for vasoprotection? *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2007;5:1409-1410
216. Wang M, Lee E, Song W, Ricciotti E, Rader DJ, Lawson JA, Pure E, FitzGerald GA. Microsomal prostaglandin e synthase-1 deletion suppresses oxidative stress and angiotensin ii-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation*. 2008;117:1302-1309
217. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiological reviews*. 1999;79:1193-1226
218. Kojima F, Kato S, Kawai S. Prostaglandin e synthase in the pathophysiology of arthritis. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2005;19:255-261
219. Tang EH, Shvartz E, Shimizu K, Rocha VZ, Zheng C, Fukuda D, Shi GP, Sukhova G, Libby P. Deletion of ep4 on bone marrow-derived cells enhances inflammation and angiotensin ii-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31:261-269

220. Cao RY, St Amand T, Li X, Yoon SH, Wang CP, Song H, Maruyama T, Brown PM, Zelt DT, Funk CD. Prostaglandin receptor ep4 in abdominal aortic aneurysms. *The American journal of pathology*. 2012;181:313-321
221. Yokoyama U, Ishiwata R, Jin MH, Kato Y, Suzuki O, Jin H, Ichikawa Y, Kumagaya S, Katayama Y, Fujita T, Okumura S, Sato M, Sugimoto Y, Aoki H, Suzuki S, Masuda M, Minamisawa S, Ishikawa Y. Inhibition of ep4 signaling attenuates aortic aneurysm formation. *PloS one*. 2012;7:e36724
222. Collin J. The epidemiology of abdominal aortic aneurysm. *British journal of hospital medicine*. 1988;40:64-67
223. Castleden WM, Mercer JC. Abdominal aortic aneurysms in western australia: Descriptive epidemiology and patterns of rupture. *The British journal of surgery*. 1985;72:109-112
224. Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW, Jr., Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the joint council of the american association for vascular surgery and society for vascular surgery. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2003;37:1106-1117
225. Vorp DA. Biomechanics of abdominal aortic aneurysm. *Journal of biomechanics*. 2007;40:1887-1902
226. Vande Geest JP, Di Martino ES, Bohra A, Makaroun MS, Vorp DA. A biomechanics-based rupture potential index for abdominal aortic aneurysm risk assessment: Demonstrative application. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1085:11-21
227. Raghavan ML, Vorp DA. Toward a biomechanical tool to evaluate rupture potential of abdominal aortic aneurysm: Identification of a finite strain constitutive model and evaluation of its applicability. *Journal of biomechanics*. 2000;33:475-482
228. Di Martino ES, Vorp DA. Effect of variation in intraluminal thrombus constitutive properties on abdominal aortic aneurysm wall stress. *Annals of biomedical engineering*. 2003;31:804-809
229. Vorp DA, Lee PC, Wang DH, Makaroun MS, Nemoto EM, Ogawa S, Webster MW. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2001;34:291-299
230. Dorfmann A, Wilson C, Edgar ES, Peattie RA. Evaluating patient-specific abdominal aortic aneurysm wall stress based on flow-induced loading. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. 2010;9:127-139
231. Ernst CB. Abdominal aortic aneurysm. *The New England journal of medicine*. 1993;328:1167-1172
232. Alcorn HG, Wolfson SK, Jr., Sutton-Tyrrell K, Kuller LH, O'Leary D. Risk factors for abdominal aortic aneurysms in older adults enrolled in the cardiovascular health study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996;16:963-970
233. Singh K, Bonna KH, Jacobsen BK, Bjork L, Solberg S. Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study : The tromso study. *American journal of epidemiology*. 2001;154:236-244

234. Darling RC, 3rd, Shah DM, McClellan WR, Chang BB, Leather RP. Decreased morbidity associated with retroperitoneal exclusion treatment for abdominal aortic aneurysm. *The Journal of cardiovascular surgery*. 1992;33:65-69
235. Darling C, 3rd, Shah DM, Chang BB, Paty PS, Leather RP. Current status of the use of retroperitoneal approach for reconstructions of the aorta and its branches. *Annals of surgery*. 1996;224:501-506; discussion 506-508
236. Matsumoto M, Hata T, Tsushima Y, Hamanaka S, Yoshitaka H, Shinoura S, Sakakibara N. Minimally invasive vascular surgery for repair of infrarenal abdominal aortic aneurysm with iliac involvement. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2002;35:654-660
237. Sanders RJ, Kempczinski RF, Hammond W, DiClementi D. The significance of graft diameter. *Surgery*. 1980;88:856-866
238. Volodos NL, Karpovich IP, Shekhanin VE, Troian VI, Iakovenko LF. [a case of distant transfemoral endoprosthesis of the thoracic artery using a self-fixing synthetic prosthesis in traumatic aneurysm]. *Grudn Khir*. 1988:84-86
239. Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Annals of vascular surgery*. 1991;5:491-499
240. van Eps RG, Leurs LJ, Hobo R, Harris PL, Buth J. Impact of renal dysfunction on operative mortality following endovascular abdominal aortic aneurysm surgery. *The British journal of surgery*. 2007;94:174-178
241. Raithel D. [results of endovascular abdominal aortic aneurysm repair (evar)]. *Zentralblatt fur Chirurgie*. 2002;127:660-663
242. Ruppert V, Leurs LJ, Hobo R, Buth J, Rieger J, Umscheid T. Tube stent-grafts for infrarenal aortic aneurysm: A matched-paired analysis based on eurostar data. *Cardiovascular and interventional radiology*. 2007;30:611-618
243. Lange C, Leurs LJ, Buth J, Myhre HO. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysm in octogenarians: An analysis based on eurostar data. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2005;42:624-630; discussion 630
244. Hobo R, Kievit J, Leurs LJ, Buth J. Influence of severe infrarenal aortic neck angulation on complications at the proximal neck following endovascular aaa repair: A eurostar study. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists*. 2007;14:1-11
245. Waasdorp EJ, de Vries JP, Hobo R, Leurs LJ, Buth J, Moll FL. Aneurysm diameter and proximal aortic neck diameter influence clinical outcome of endovascular abdominal aortic repair: A 4-year eurostar experience. *Annals of vascular surgery*. 2005;19:755-761
246. Leurs LJ, Kievit J, Dagnelie PC, Nelemans PJ, Buth J. Influence of infrarenal neck length on outcome of endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists*. 2006;13:640-648
247. Hobo R, Laheij RJ, Buth J. The influence of aortic cuffs and iliac limb extensions on the outcome of endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2007;45:79-85

248. Dalainas I, Moros I, Gerasimidis T, Papadimitriou D, Saratzis N, Gitas CG, Kiskinis D, Lazaridis J. Mid-term comparison of bifurcated modular endograft versus aorto-uni-iliac endograft in patients with abdominal aortic aneurysm. *Annals of vascular surgery*. 2007;21:339-345
249. Beebe HG, Bernhard VM, Parodi JC, White GH. Leaks after endovascular therapy for aneurysm: Detection and classification. *Journal of endovascular surgery : the official journal of the International Society for Endovascular Surgery*. 1996;3:445-448
250. Parodi JC, Berguer R, Ferreira LM, La Mura R, Schermerhorn ML. Intra-aneurysmal pressure after incomplete endovascular exclusion. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2001;34:909-914
251. Koole D, Moll FL, Buth J, Hobo R, Zandvoort HJ, Bots ML, Pasterkamp G, van Herwaarden JA. Annual rupture risk of abdominal aortic aneurysm enlargement without detectable endoleak after endovascular abdominal aortic repair. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 2011;54:1614-1622
252. Laheij RJ, Buth J, Harris PL, Moll FL, Stelter WJ, Verhoeven EL. Need for secondary interventions after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. Intermediate-term follow-up results of a european collaborative registry (eurostar). *The British journal of surgery*. 2000;87:1666-1673
253. Gray C, Goodman P, Herron CC, Lawler LP, O'Malley MK, O'Donohoe MK, McDonnell CO. Use of colour duplex ultrasound as a first line surveillance tool following evar is associated with a reduction in cost without compromising accuracy. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2012;44:145-150
254. McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, Johnson DA, Parker MA, Pearce WH. Size matters: The relationship between mmp-9 expression and aortic diameter. *Circulation*. 1997;96:2228-2232
255. Celli BR, Halbert RJ, Isonaka S, Schau B. Population impact of different definitions of airway obstruction. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*. 2003;22:268-273
256. Brotons B, Perez JA, Sanchez-Toril F, Soriano S, Hernandez J, Belenguer JL. [the prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. A cross-sectional study]. *Archivos de bronconeumologia*. 1994;30:149-152
257. Sobradillo V, Miravittles M, Jimenez CA, Gabriel R, Viejo JL, Masa JF, Fernandez-Fau L, Villasante C. [epidemiological study of chronic obstructive pulmonary disease in spain (iberpoc): Prevalence of chronic respiratory symptoms and airflow limitation]. *Archivos de bronconeumologia*. 1999;35:159-166
258. Koos BJ, Kawasaki Y, Hari A, Bohorquez F, Jan C, Roostaeian J, Wilson CL, Kruger L. Electrical stimulation of the posteromedial thalamus modulates breathing in unanesthetized fetal sheep. *J Appl Physiol*. 2004;96:115-123
259. Bru A, Souto JC, Alcolea S, Anton R, Remacha A, Camacho M, Soler M, Bru I, Porres A, Vila L. Tumour cell lines ht-29 and fadu produce proinflammatory cytokines and activate neutrophils in vitro: Possible applications for neutrophil-based antitumour treatment. *Mediators of inflammation*. 2009;2009:817498

260. Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nature reviews. Cardiology*. 2011;8:92-102
261. Shantikumar S, Ajjan R, Porter KE, Scott DJ. Diabetes and the abdominal aortic aneurysm. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2010;39:200-207
262. Meijer CA, Kokje VB, van Tongeren RB, Hamming JF, van Bockel JH, Moller GM, Lindeman JH. An association between chronic obstructive pulmonary disease and abdominal aortic aneurysm beyond smoking: Results from a case-control study. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2012;44:153-157
263. Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, Narumiya S, Taketo MM. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin e(2) receptor ep(2)-dependent angiogenesis in apc(delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer research*. 2002;62:506-511
264. Mutoh M, Watanabe K, Kitamura T, Shoji Y, Takahashi M, Kawamori T, Tani K, Kobayashi M, Maruyama T, Kobayashi K, Ohuchida S, Sugimoto Y, Narumiya S, Sugimura T, Wakabayashi K. Involvement of prostaglandin e receptor subtype ep(4) in colon carcinogenesis. *Cancer research*. 2002;62:28-32
265. Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, Tsuneyoshi M, Yamamoto T, Kuwano M, Ono M. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18:300-310
266. Jain S, Chakraborty G, Raja R, Kale S, Kundu GC. Prostaglandin e2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer. *Cancer research*. 2008;68:7750-7759
267. Yanni SE, Barnett JM, Clark ML, Penn JS. The role of pge2 receptor ep4 in pathologic ocular angiogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50:5479-5486
268. Licican EL, Nguyen V, Sullivan AB, Gronert K. Selective activation of the prostaglandin e2 circuit in chronic injury-induced pathologic angiogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51:6311-6320
269. Choke E, Cockerill GW, Dawson J, Chung YL, Griffiths J, Wilson RW, Loftus IM, Thompson MM. Hypoxia at the site of abdominal aortic aneurysm rupture is not associated with increased lactate. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1085:306-310
270. Petersen E, Gineitis A, Wagberg F, Angquist KA. Activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in abdominal aortic aneurysms. Relation to size and rupture. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery*. 2000;20:457-461
271. van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: Matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovascular research*. 2008;78:203-212
272. Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for cd44-mediated tumor invasion. *Genes & development*. 1999;13:35-48
273. Newman KM, Jean-Claude J, Li H, Scholes JV, Ogata Y, Nagase H, Tilson MD. Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter*. 1994;20:814-820

274. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *The New England journal of medicine*. 2004;351:1296-1305
275. Romero JM, Bover J, Fite J, Bellmunt S, Dilme JF, Camacho M, Vila L, Escudero JR. The modification of diet in renal disease 4-calculated glomerular filtration rate is a better prognostic factor of cardiovascular events than classical cardiovascular risk factors in patients with peripheral arterial disease. *Journal of vascular surgery*. 2012;56:1324-1330
276. Stolle K, Berges A, Lietz M, Lebrun S, Wallerath T. Cigarette smoke enhances abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin ii-treated apolipoprotein e-deficient mice. *Toxicology letters*. 2010;199:403-409
277. Buckley C, Wyble CW, Borhani M, Ennis TL, Kobayashi DK, Curci JA, Shapiro SD, Thompson RW. Accelerated enlargement of experimental abdominal aortic aneurysms in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. *Journal of the American College of Surgeons*. 2004;199:896-903
278. Lemaitre V, Dabo AJ, D'Armiento J. Cigarette smoke components induce matrix metalloproteinase-1 in aortic endothelial cells through inhibition of mtor signaling. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2011;123:542-549
279. Murphy EA, Danna-Lopes D, Sarfati I, Rao SK, Cohen JR. Nicotine-stimulated elastase activity release by neutrophils in patients with abdominal aortic aneurysms. *Annals of vascular surgery*. 1998;12:41-45
280. Wang S, Zhang C, Zhang M, Liang B, Zhu H, Lee J, Viollet B, Xia L, Zhang Y, Zou MH. Activation of amp-activated protein kinase alpha2 by nicotine instigates formation of abdominal aortic aneurysms in mice in vivo. *Nature medicine*. 2012;18:902-910
281. Camacho M, Dilme J, Sola-Villa D, Rodriguez C, Bellmunt S, Siguero L, Alcolea S, Romero JM, Escudero JR, Martinez-Gonzalez J, Vila L. Microvascular cox-2/mpges-1/ep-4 axis in human abdominal aortic aneurysm. *Journal of lipid research*. 2013;54:3506-3515
282. Cheuk BL, Cheng SW. Differential secretion of prostaglandin e(2), thromboxane a(2) and interleukin-6 in intact and ruptured abdominal aortic aneurysms. *International journal of molecular medicine*. 2007;20:391-395

ANEXOS

A continuación se muestran los artículos originales completos relacionados con esta tesis doctoral por orden de publicación.

patient-oriented and epidemiological research

Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm

Mercedes Camacho,^{1,*} Jaume Dilmé,^{2,†} David Solà-Vilà,³ Cristina Rodríguez,^{2,*} Sergi Bellmunt,^{2,†} Laura Sigüero,² Sonia Alcolea,² José-María Romero,^{2,†} José-Román Escudero,^{2,†} José Martínez-González,^{2,*} and Luis Vila²

Angiology, Vascular Biology, and Inflammation Laboratory,¹ Vascular Surgery Department,² and Cardiovascular Research Center (CSIC-ICCC),^{2,*} Institute of Biomedical Research (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain; and Autonomous University of Barcelona,³ Barcelona, Spain

Abstract We investigated the prostaglandin (PG)_{E2} pathway in human abdominal aortic aneurysm (AAA) and its relationship with hypervascularization. We analyzed samples from patients undergoing AAA repair in comparison with those from healthy multiorgan donors. Patients were stratified according to maximum aortic diameter: low diameter (LD) (<55 mm), moderate diameter (MD) (55–69.9 mm), and high diameter (HD) (≥70 mm). AAA was characterized by abundant microvessels in the media and adventitia with perivascular infiltration of CD45-positive cells. Like endothelial cell markers, cyclooxygenase (COX)-2 and the microsomal isoform of prostaglandin E synthase (mPGES-1) transcripts were increased in AAA (4.4- and 1.4-fold, respectively). Both enzymes were localized in vascular cells and leukocytes, with maximal expression in the LD group, whereas leukocyte markers display a maximum in the MD group, suggesting that the upregulation of COX-2/mPGES-1 precedes maximal leukocyte infiltration. Plasma and in vitro tissue secreted levels of PGE₂ metabolites were higher in AAA than in controls (plasma-controls, 19.9 ± 2.2; plasma-AAA, 38.8 ± 5.5 pg/ml; secretion-normal aorta, 16.5 ± 6.4; secretion-AAA, 72.9 ± 6.4 pg/mg; mean ± SEM). E-prostanoid receptor (EP)-2 and EP-4 were overexpressed in AAA, EP-4 being the only EP substantially expressed and colocalized with mPGES-1 in the microvasculature. Additionally, EP-4 mediated PGE₂-induced angiogenesis in vitro. We provide new data concerning mPGES-1 expression in human AAA. Our findings suggest the potential relevance of the COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in the AAA-associated hypervascularization.—Camacho, M., J. Dilmé, D. Solà-Vilà, C. Rodríguez, S. Bellmunt, L. Sigüero, S. Alcolea, J.-M. Romero, J.-R. Escudero, J. Martínez-González, and L. Vila. Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm. *J. Lipid Res.* 2013. 54: 3506–3515.

Supplementary key words cyclooxygenase pathway • prostaglandin • angiogenesis • cyclooxygenase • E prostanoid receptor • microsomal isoform of prostaglandin E synthase

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a late-age onset disorder that affects a high percentage of the population in industrialized countries, and rupture of AAA is associated with high mortality rates (1). The etiology of AAA is complex with a relevant contribution of genetic factors (2). Although much effort has been made to clarify the mechanism of AAA development, currently the only effective approach to prevent aneurysm rupture is surgical repair by conventional or endovascular techniques.

Evidence has been established for a relationship between atherosclerosis and AAA, both disorders being characterized by an underlying chronic inflammation. However, there are marked differences between atherosclerotic lesions and AAA. Whereas atherosclerotic plaque is characterized by leukocyte infiltration at the lumen site and hyperproliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) causing neointimal hyperplasia, AAA is characterized by leukocyte infiltration into adventitia and depletion of VSMCs in the media. Other relevant features of AAA are the wall tension strength breakdown caused by proteolytic enzymes progressively destructing elastic fibers (3) and hypervascularization of aortic tissue. It has been proposed that this vascularization might contribute to the development and rupture of aneurysms (4, 5).

Abbreviations: AAA, abdominal aortic aneurysm; AA, arachidonic acid; COX, cyclooxygenase; EC, endothelial cell; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; EP, E-prostanoid receptor; FLAP, 5-lipoxygenase-activating protein; HD, high diameter; LD, low diameter; LT, leukotriene; MD, moderate diameter; MMP, metalloproteinase; mPGES-1, microsomal isoform of prostaglandin E synthase; MVEC, microvascular endothelial cell; NA, normal aorta; PG, prostaglandin; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2; VSMC, vascular smooth muscle cell; vWF, von Willebrand factor.

[†]To whom correspondence should be addressed.
e-mail: mcamacho@santpau.cat

This study was supported partially by grants SAF2010/21392, FIS P112/01952 and Red de Investigación Cardiovascular RD12/0042/0051 and RD12/0042/0053 from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) - Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). The authors have no conflicts of interest to declare.

Manuscript received 18 July 2013 and in revised form 14 October 2013.

Published, JLR Papers in Press, October 15, 2013

DOI 10.1194/jlr.M042481

Copyright © 2013 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

Prostaglandin (PG)₂ has been recognized as a relevant mediator in AAA. Biosynthesis of PGE₂ begins with the formation of PGH₂ through the action of cyclooxygenase (COX) (6, 7) on arachidonic acid (AAc) released by phospholipases from the membrane phosphoglycerides. PGH₂ is then isomerized to PGE₂ by PGE synthases. The microsomal isoform of prostaglandin E synthase (mPGES-1) is inducible by proinflammatory cytokines and seems to be the main isoenzyme involved in PGE₂ biosynthesis under inflammatory conditions (8–11). COX-2/mPGES-1 is widely regarded as the major contributing enzymatic chain for PGE₂ biosynthesis under pathological conditions. COX-2-derived PGE₂ is involved in the pathogenesis of AAA, as data from animal models and human studies indicate (12–15). Furthermore, deletion of mPGES-1 attenuates experimental AAA in mice (16).

PGE₂ exerts its cellular effects by binding to four distinct E-prostanoid receptors (EP-1–4) that belong to the family of seven transmembrane G protein-coupled receptors. Each receptor is involved in different and often opposite biological effects of PGE₂. EP-2 and EP-4 are both Gs-protein coupled receptors that upregulate intracellular cAMP levels, whereas EP-3 usually counteracts EP-2- and EP-4-mediated upregulation of cAMP by preferentially coupling to Gi proteins (17). Recently, conflicting results have been reported on the role of EP-4 in AAA development in animal models (18–20). These studies have been focused on the involvement of EPs in the activation of leukocytes (mainly macrophages) and VSMCs, and in the release of proteases during the immune-inflammatory process associated to AAA.

Main data regarding COX-2-alternative targets for the development of new anti-inflammatory drugs for AAA comes from studies in animal models (16, 18–20). In these models, AAA develops fast and its etiology differs substantially from human pathology. Despite the role of PGE₂ in neovascularization in cancer and other pathologies, and that the relevance of angiogenesis in AAA is widely accepted, information concerning COX-2/mPGES-1-derived PGE₂ in the AAA, particularly in AAA-associated hypervascularization, is limited and restricted to COX-2-derived PGE₂ from macrophages (12, 13, 21, 22). Furthermore, the beneficial effects of COX-2 inhibitors and the deletion of mPGES-1 or EP-4 in experimental AAA are not fully understood in the context of this pathology in humans. Because PGE₂ modifiers have a possible therapeutic potential, the objective of the present study was to examine the elements involved in the PGE₂ pathway in human AAA, particularly in microvasculature.

MATERIALS AND METHODS

Tissue samples

The study was approved by the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau Ethics Committee, and informed consent was obtained from each patient. All procedures were reviewed by the Institutional Review Board at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. The aortic biopsies were obtained from patients undergoing open repair for AAA at our institution. Samples were obtained from the remaining mid-infrarenal aortic wall after exclusion and prosthetic

replacement of AAA. Normal aortas (NAs) were obtained from healthy aortas of multiorgan donors and samples were also taken from the mid-portion of the infrarenal abdominal aorta at the time of organ harvest. When a luminal thrombus was present in AAA samples, it was separated before the aortic biopsy was taken and aortic tissue was washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS). A portion of each sample was placed in RNeasy lysis solution (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at 4°C for 24 h before long-term storage at –80°C until further processing for RNA isolation. Another portion was fixed in formalin solution 10% (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) for 24 h and included in paraffin for immunohistochemical studies. Additional portions of aorta were placed in PBS to establish VSMC cultures and to obtain tissue secretomes.

Patients were stratified by the maximum transverse aortic diameter defining three groups: low diameter (LD) (<55 mm); moderate diameter (MD) (55–69.9 mm); and high diameter (HD) (≥70 mm). To determine the maximum aortic diameter, we used a transversal measurement to the true lumen center line at infrarenal level, based on computerized tomography angiography with endovenous contrast, using Workstation AGFA IMPAX 6.4.0.4010 and OsiriX MD (US Food and Drug Administration cleared/CE IIa version) for primary diagnosis. Because surgical repair is not usually indicated in patients with an AAA maximal diameter of <55 mm, the aortic samples of the LD group were from patients with concomitant iliac artery aneurysm to be surgically repaired. Table 1 shows the characteristics of the individuals included in the study.

Analysis of mRNA levels in the tissues and culture cells

For total RNA extraction, tissue samples stored in RNeasy lysis solution were homogenized in the FastPrep-24 homogenizer and Lysing Matrix D tubes (MP Biomedicals, Solon, OH) and RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. Total RNA was extracted from cell cultures using Ultraspec (Biotech Laboratories, Inc., Houston, TX) according to the manufacturer's instructions. cDNA was prepared by reverse transcribing 1 µg RNA with the high-capacity cDNA archive kit with random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA). mRNA expression of the selected genes was studied by real-time PCR in an ABI Prism 7900HT system using predesigned validated assays (TaqMan gene expression assays; Applied Biosystems) and universal thermal cycling parameters. Relative expression was expressed as transcript/β-actin ratios.

Analysis of PGE₂

To analyze plasma levels, a sample of 10 ml of peripheral blood was collected from all participants in heparin-containing tubes. In the case of AAA patients, blood was collected before anesthesia in the operating room. It was centrifuged immediately and the plasma aliquoted and frozen at –80°C until analysis. It is known that PGE₂ is rapidly transformed in vivo into 13,14-dihydro-15-oxo-PGE₂ that is unstable, and it undergoes a further transformation into 13,14-dihydro-15-oxo-PGA₂ (23, 24). To evaluate plasma levels of PGE₂, we used an enzyme immunoassay kit that converts 13,14-dihydro-15-oxo metabolites of PGE₂ into a single stable derivative (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) following manufacturer's instructions.

Secretomes were obtained from approximately 150 mg of NA and AAA aortic fragments by incubating the tissues in 1 ml serum-free DMEM (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) in a cell incubator for 48 h. Medium was then recovered and kept at –80°C until the PGE₂ metabolites, 6-oxo-PGF_{1α}, thromboxane (Tx) B₂, and leukotriene (LT) B₄, released were analyzed by enzyme immunoassay (Cayman Chemical) following manufacturer's instructions.

TABLE 1. Clinical characteristics of individuals with AAA and NA included in the study: demographics and risk factors

Characteristic	Measurements					
	mRNA levels		Plasma PGE ₂ M		Secretion*	
	AAA	NA	AAA	Controls	AAA	NA
Number	86	25	39	39	32	15
Aortic diameter ^b (mm)	66.7 ± 13.5	—	63.3 ± 9.8	—	68.26 ± 13.1	—
LD (<55 mm)	49.7 ± 6.4	—	52.8 ± 1.2	—	—	—
MD (55–69.9 mm)	60.1 ± 3.2	—	59.9 ± 3.6	—	—	—
HD (≥70 mm)	80.8 ± 7.5	—	76.5 ± 6.7	—	—	—
Age (years)	70.9 ± 6.6	56.3 ± 16.0	71.2 ± 6.7	62.9 ± 3.0	71.2 ± 8.1	55.7 ± 16.1
Male	84 (97.7%)	16 (64%)	35 (89.7%)	34 (87.2%)	32 (100%)	7 (46.7%)
Diabetes mellitus	19 (22.1%)	2 (8%) [†]	10 (25.6%)	1 (2.6%)	6 (18.8%)	2 (13.3%)
Hypertension	55 (64%)	2 (8%) [†]	34 (87.2%)	14 (35.9%)	22 (68.8%)	2 (13.3%)
Hyperlipidemia	55 (64%)	2 (8%) [†]	30 (76.9%)	1 (2.6%)	21 (65.6%)	2 (13.3%)
Smoking habit						
Non-smokers	7 (8.1%)	21 (84%) [†]	3 (7.7%)	30 (76.9%)	2 (6.2%)	11 (73.3%)
Current smokers	26 (30.2%)	3 (12%) [†]	9 (23.1%)	6 (15.4%)	10 (31.2%)	3 (20%)
Ex-smokers [†]	53 (61.6%)	1 (4%) [†]	27 (69.2%)	3 (7.7%)	20 (62.5%)	1 (6.7%)
Coronary artery disease	22 (25.6%)	0 [†]	14 (35.9%)	0	11 (34.4%)	0 [†]
Angor pectoris	3 (3.5%)	0 [†]	1 (2.6%)	0	3 (9.4%)	0 [†]
Myocardial infarction	6 (7%)	0 [†]	6 (15.4%)	0	1 (3.1%)	0 [†]
Coronary intervention/CABG	13 (15.1%)	0 [†]	7 (17.9%)	0	7 (21.9%)	0 [†]
Chronic renal insufficiency ^d	36 (41.9%)	0 [†]	13 (33.3%)	0	10 (31.2%)	0 [†]
Dialysis	0 (0%)	0 [†]	0 (0%)	0	0	0 [†]
Peripheral vascular disease	44 (51.1%)	0 [†]	21 (53.8%)	0	17 (53.2%)	0 [†]
Absence pulses	29 (33.7%)	0 [†]	14 (35.9%)	0	11 (34.4%)	0 [†]
Intermittent claudication	15 (17.4%)	0 [†]	7 (17.9%)	0	6 (18.8%)	0 [†]
Cerebrovascular disease	7 (8.1%)	1 (4%) [†]	4 (10.3%)	0	2 (6.2%)	2 (13.3%)
Cerebral vascular attack	5 (5.8%)	1 (4%) [†]	3 (7.7%)	0	2 (6.2%)	2 (13.3%)
Transient ischemic attack	2 (2.3%)	0 [†]	1 (2.6%)	0	0	0 [†]
COPD	27 (31.4%)	0 [†]	7 (17.9%)	0	7 (21.9%)	0 [†]
Antiplatelet users	39 (45.9%)	1 (4%) [†]	19 (50%)	0	15 (48.4%)	1 (6.7%)
Statins users	53 (61.6%)	0 [†]	30 (76.9%)	7 (17.9%)	19 (59.4%)	0 [†]
ACE inhibitors users	20 (24.1%)	0 [†]	13 (33.3%)	6 (15.4%)	8 (25.8%)	0 [†]
NSAID users	6 (7%)	0 [†]	3 (7.7%)	0	3 (9.4%)	0 [†]
Corticoid users	6 (7%)	0 [†]	1 (2.6%)	0	2 (6.2%)	0 [†]
Immunosuppressors users	4 (4.7%)	0 [†]	0 (0%)	0	1 (3.1%)	0 [†]

Nominal variables are presented as number and as percentage (%) and continuous variables as mean ± SD. eGFR, estimated glomerular filtration rate; CABG, coronary artery bypass grafting; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; PGE₂M, PGE₂ metabolites; ACE, angiotensin-converting enzyme; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug.

*PGE₂ secretion by NA and AAA samples.

^bAneurysm maximum transverse diameter in mm.

[†]Quit smoking for more than 1 year.

^dEstimated glomerular filtration rate <60 ml/min/1.73 m².

[†]In some cases due to the nature of NA samples some of the clinical characteristics are not always recorded and infra-evaluation of them is probable.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies were performed using a mouse monoclonal antibody anti-COX-2 (ref 160112 clone CX229, diluted 1:50), rabbit polyclonal antibodies against EP-2 (ref 101750, diluted 1:1,000), EP-3 (ref 101760, diluted 1:400), and EP-4 (ref 101775, diluted 1:100) all from Cayman Chemical; and a rabbit polyclonal antibody against mPGES-1 (ref HPA045064 Prestige antibodies, diluted 1:50) from Sigma. Blanks were performed using the corresponding blocking peptides all from Cayman. Monoclonal antibodies (ref M0616, diluted 1:35; ref IR751, without further dilution) from Dako were used for von Willebrand factor (vWF) [endothelial cell (EC) marker] and CD45 (leukocyte marker) immunostaining. Three micrometer sections of paraffin-embedded tissue samples were stained in a Dako Autostainer Link 48 using the Dako EnVision Flex kit. Diaminobenzidine was used as chromogen. Immunostainings used for comparative purposes were processed simultaneously.

Microvascular endothelial cell culture

Microvascular endothelial cells (MVECs) were isolated from human adult foreskins using a previously described technique

(25, 26). In brief, foreskins obtained from adult circumcisions were placed in PBS supplemented with penicillin (200 units/ml), streptomycin (200 µg/ml), and amphotericin B (0.5 µg/ml) (all from Biological Industries). Foreskins were cut into 3 mm squares and placed in PBS containing 0.3% trypsin and 1% EDTA at 37°C for 30 min. Segments were then washed several times with PBS, placed in a Petri dish in M199 containing 10% FBS, and individually compressed with the side of a scalpel blade to express microvascular fragments. The microvascular segments were passed through a 150 µm stainless steel mesh and collected by centrifugation at 300 g for 15 min. MVECs were seeded on a gelatin-coated cell culture flask and cultured in medium MCDB 131 with 20% FBS; L-glutamine (2 mmol/l), penicillin (200 units/ml), streptomycin (200 µg/ml), EGF (20 ng/ml), and bFGF (5 ng/ml) (all from Biological Industries). When cells reached confluence, they were purified with Dynabeads CD31 (Dynabeads; Invitrogen Dynal ASA, Oslo, Norway) following the manufacturer's instructions. Flow cytometry and positive staining for CD31 and platelet endothelial cell adhesion molecule-1 confirmed the purity of the cell population. MVECs in passage 3 were used for mRNA determinations and in passages 5–7 for angiogenesis assays.

Aortic VSMC culture

Aortic human VSMC cultures were established by an explant procedure from multi-organ donor aortas as previously described (9, 10). The artery was longitudinally split and the endothelium was removed by gently scraping. The tissue was minced and seeded onto the culture surface in a small volume of DMEM medium containing 10% FBS (Biological Industries). VSMCs were characterized by α -actin positive staining.

Immunofluorescence staining of mPGES-1 and EP-4 in MVECs

MVECs (passage 3) grown in Millicell EZslide (Millipore Corporation, Billerica, MA) were fixed in methanol:acetone (1:1) at -20°C for 20 min. For double immunostaining, cells were incubated with a mouse monoclonal antibody, anti-mPGES-1 (ref 10004350, diluted 1:100), and a rabbit polyclonal antibody, anti-EP4 (ref 101775, diluted 1:100) (both from Cayman) simultaneously for 60 min. This was followed by Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen) incubation for 1 h. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma) in PBS for 10 min. The slips were mounted in ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR) and photographed through an Olympus BX50 microscope.

In vitro angiogenesis assay

In vitro angiogenesis assays were performed with MVECs as described (27, 28). Briefly, 12.5×10^3 cells were seeded onto Matrigel (BD Matrigel basement membrane matrix; BD Biosciences, Bedford, MA) in 96-well plates and exposed to treatments as required. For IL-1 β assays, cells were preincubated for 1 h with the assay medium with or without 50 U/ml of human recombinant IL-1 β (Roche Diagnostics GmbH) before being seeded into Matrigel. After 4 h of treatment, photographs were taken with an Olympus digital camera mounted on an Olympus IMT-2 inverted microscope using a $10\times/0.40$ objective, and the number of closed polygons in the EC mesh was counted.

Statistical analysis

Sigma-Stat software was used for statistical analysis. When data fit a normal distribution, statistical significance between more than two groups was assessed using one-way ANOVA and the Student-Newman-Keuls test; Student's *t*-test was used to compare two groups. When normality failed, we used the Mann-Whitney rank sum test to compare two groups and Kruskal-Wallis one-way ANOVA on ranks for multiple comparisons (Dunn's method). To determine association between variables, data were Log10 transformed in order to normalize their distribution and the Pearson product moment correlation method was then used. A *P* value below 0.05 was considered significant.

RESULTS

Evaluation of hypervascularization and leukocyte infiltration in AAA samples

Table 1 summarizes the characteristics of patients and donors included in this study. We used vWF immunostaining to assess the distribution of microvessels in aortic samples. Microvessels in NAs originated in the adventitia, distributed regularly, traversed media, and finished in the intima (many of them after bifurcation), but round microvessels in the media were scarce (Fig. 1). Microvessels were abundant in the adventitia and in the media of AAA

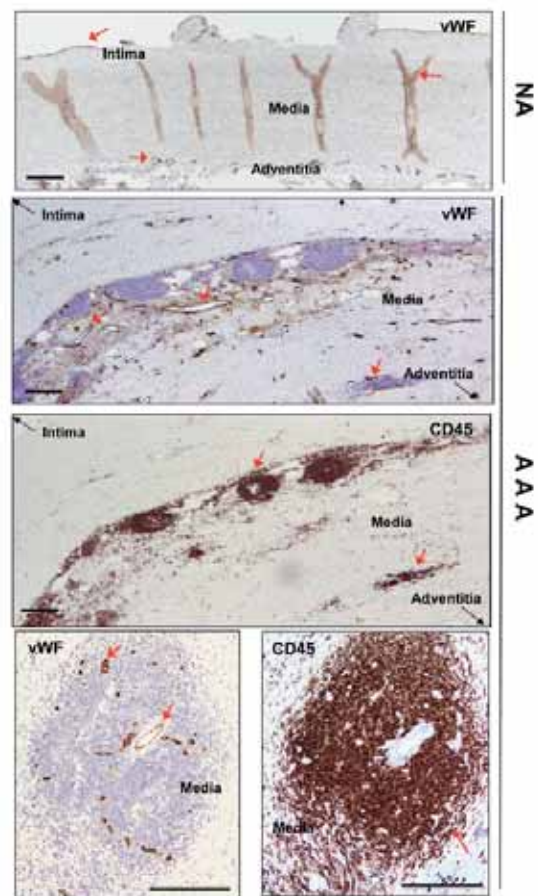


Fig. 1. Representative immunohistochemical images of vWF and CD45 in aortic samples. Top panel shows NA immunostained with anti-vWF. Middle panels show serial sections of an AAA sample immunostained for vWF and CD45. Bottom panels are serial sections of an AAA sample immunostained for vWF and CD45 showing leukocyte perivascular accumulation. Red arrows highlight specific immunostaining. In the middle panels, black arrows are used to orient the position of the vessel by indicating where the intima and adventitia are. Scale bars: 500 μm .

samples (Fig. 1), but were often absent in the intima. While infiltrated leukocytes (determined by CD45 immunostaining) were scarce in NAs, they were common in AAAs. Observation of 20 AAA samples revealed infiltrating leukocytes in the media in all of them. Adventitia was also extensively vascularized with a concomitant accumulation of leukocytes. Leukocyte infiltrate was systematically located in perivascular areas of microvessels (Fig. 1).

We determined mRNA levels of two EC markers, vWF and endothelial nitric oxide synthase (eNOS), as an index of vascularization. In addition, we also analyzed expression levels of the vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2), a gene highly expressed in EC. Expression levels of these genes did not fit a normal distribution. Results in

Fig. 2A show that mRNA expression levels of the three genes were significantly enhanced in AAA. To further evaluate levels of these markers at different stages of AAA development, we stratified AAA samples as a function of the maximum aortic diameter. Figure 2B shows the median of the EC marker expression for each AAA diameter group. We observed that expression of all three markers was maximal in the LD group and decreased thereafter. We also analyzed the expression levels of two leukocyte markers (undetectable in vascular cells in culture, data not shown), CD45 and FLAP. Additionally, we

analyzed the expression of MMP-9, a metalloproteinase highly expressed by leukocytes. All of them were highly expressed in AAA samples (Fig. 2C) and exhibited a maximum in the MD group (Fig. 2D).

Expression of the enzymes involved in PGE₂ biosynthesis

Results in Fig. 3A show that the expression of COX isoenzymes and mPGES-1 was significantly higher in AAA than in NA samples. Immunohistochemistry showed that COX-2 expression was weak but ubiquitous in NA samples, mainly in adventitial microvessels and in medial VSMCs

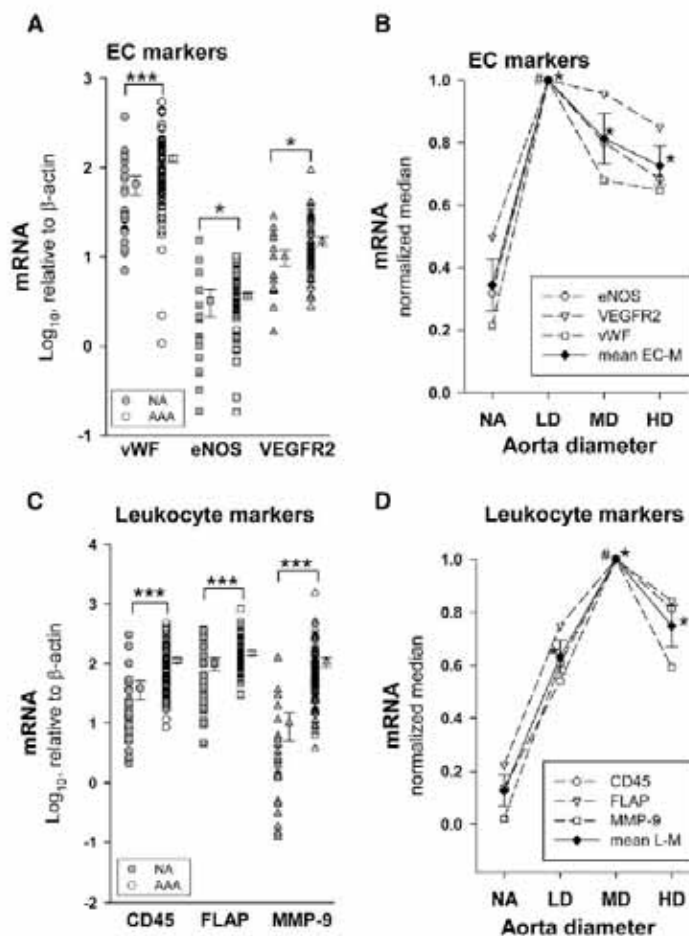


Fig. 2. A: Expression levels of EC markers in NA (eNOS and VEGFR2, n = 17; vWF, n = 25) and AAA samples (vWF, n = 86; eNOS and VEGFR2, n = 60). Points without error bars indicate individual values and points at right are the mean ± SEM. **P* < 0.05, ****P* < 0.001 when compared with NA samples. B: Open points are the relative median values of mRNA levels of EC markers normalized to the highest median value in the stratified patient groups as a function the aortic diameter [NA, n = 25; LD (<55 mm), n = 14; MD (55–69.9 mm), n = 37; and HD (>70 mm), n = 35], closed points are the mean ± SEM of the three EC markers (mean EC-M). **P* < 0.05 compared with NA; #*P* < 0.05 when compared with the other patient groups. C: mRNA levels of leukocyte markers in NA (n = 25) and AAA (n = 86) samples; ****P* < 0.001 when compared with NA samples. D: Open points are the relative median values of mRNA levels of leukocyte characteristic proteins normalized to the highest median value of the stratified patient groups; closed points are the mean ± SEM of the three leukocyte markers (mean L-M). **P* < 0.05 compared with NA; #*P* < 0.05 when compared with the other patient groups.

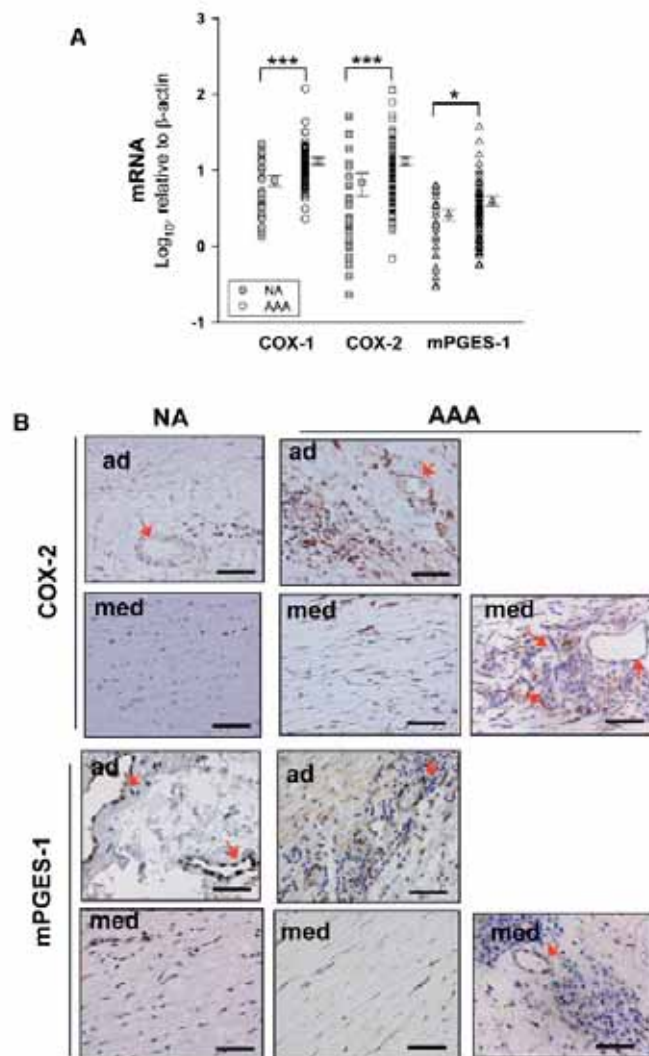


Fig. 3. A: Expression levels of COX isoenzymes and mPGES-1 in NA ($n = 25$) and AAA ($n = 86$) samples. Points without error bars indicate individual values and points at right are the mean \pm SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ when compared with NA samples. B: Representative examples of immunohistochemistry for COX-2 and mPGES-1 in NA and AAA samples. Arrows indicate some immunostained cells in microvessels. ad, adventitia; med, media. Scale bars: 100 μm .

(Fig. 3B). In AAA samples, we found COX-2 immunostained MVECs in the adventitia and media layers, VSMCs in the media, and also infiltrating leukocytes, immunostaining being markedly increased in AAA (Fig. 3B). Localization of mPGES-1 was similar to that of COX-2, NA, and AAA, displaying apparent similar immunostaining intensity (Fig. 3B).

In an attempt to approach the relative contribution of the endothelium to PGE_2 production in AAA, we determined the statistical association of PGE_2 with other cell-characteristic eicosanoids secreted by AAA samples considered as independent variables. The best association was found between PGE_2 and PGI_2 (in terms of its stable metabolite 6-oxo- $\text{PGF}_{1\alpha}$; $R = 0.890$, $P = 9.95 \times 10^{-12}$, $n = 32$). The statistical association between PGE_2 and TxA_2 (in terms of TxB_2) was weaker ($R = 0.492$,

$P = 0.007$), and no association between PGE_2 and LTB_4 was observed.

Expression levels of PGE_2 biosynthetic pathway enzymes in AAA stratified by aortic diameter

Because PGE_2 is rapidly transformed in vivo, we analyzed plasma levels of its 13,14-dihydro-15-oxo-metabolites. Circulating levels of PGE_2 metabolites were significantly elevated in AAA patients compared with normal controls (Fig. 4A). The characteristics of patients and controls included are shown in Table 1. In Fig. 4A, we also show production of PGE_2 by NA and AAA samples after 48 h of incubation. AAA samples produced about 5-fold more PGE_2 than NA samples in terms of the median. In Fig. 4B, transcript levels of COX-1, COX-2, and mPGES-1 are depicted as a function of AAA maximum diameter,

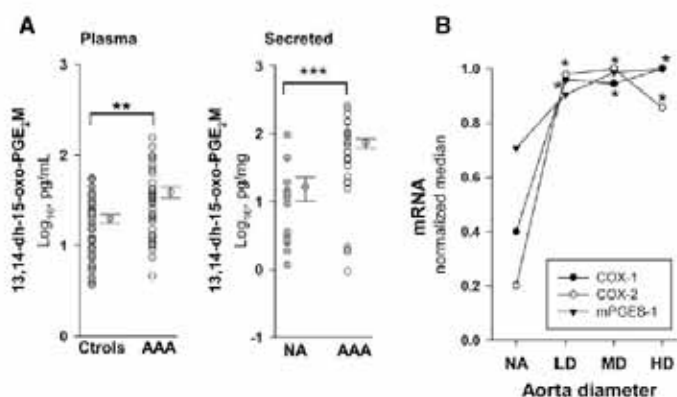


Fig. 4. A: Plasma levels of PGE₂ metabolites (PGE₂M) in controls (Ctrls) (n = 39) and AAA (n = 39) (left), and production of PGE₂M by NA (n = 15) and AAA samples (n = 32) (right). Points without error bars indicate individual values and points at right are the mean ± SEM. B: Relative median values of transcript levels of COX-1, COX-2, and mPGES-1 [NA, n = 25; LD (<55 mm), n = 14; MD (55–69.9 mm), n = 37; and HD (≥70 mm), n = 35] normalized to the highest median value of the stratified patient groups. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 when compared with NA samples.

showing that all of them displayed a maximum in the LD group.

Coexpression of EP-4 and mPGES-1 in aortic microvessels

In human aortic samples, EP-1 was scarcely expressed and no significant differences were found between NA and AAA. EP-2 and EP-4 were significantly increased in AAA while EP-3 was substantially decreased (Fig. 5). EP-4 immunostaining was not detected in the VSMCs of NA or AAA samples (not shown), but in both samples it colocalized with mPGES-1 in MVECs (Fig. 6). Additionally, EP-4 and mPGES-1 were also detected in the areas of leukocyte infiltration in AAA (Fig. 6). In contrast, none of the other receptors were appreciably expressed in microvessels (not shown). We found few EP-2-positive cells scattered in the media in both NA and AAA, but it was particularly relevant in infiltrating leukocytes in AAA. EP-3-positive cells, that were abundant in the media of NA, decreased in the media of AAA samples according to the depletion of VSMCs in AAA. Nevertheless, many EP-3 immunostained cells were found in the areas of infiltrating leukocytes (not shown).

EP-4-activation-mediated in vitro angiogenesis

To test the hypothesis that PGE₂-induced angiogenesis was mediated by EP-4, we performed experiments in MVECs. EP-4 was practically the only EP expressed in MVECs in culture (analyzed by RT-PCR; not shown). Both EP-4 and mPGES-1 were coexpressed in MVECs in culture (Fig. 7A). Exogenously added PGE₂ and Cay10598 (a specific EP-4 receptor agonist) similarly induced angiogenesis, an effect that was abolished by the EP-4 antagonist AH23848 (Fig. 7B). It is well known that IL-1β induces AAc mobilization in addition to COX-2 and mPGES-1 expression. Therefore, to explore whether the endogenous production of PGE₂ by MVECs promoted angiogenesis, we

stimulated MVECs with human recombinant IL-1β. IL-1β-induced angiogenesis was also suppressed by AH23848 (Fig. 7B).

DISCUSSION

This is the first study that analyzes the expression of the PGE₂ pathway as a whole in human AAA. The main objectives were: first, to investigate the expression of mPGES-1 in human AAA which has not been previously reported; second, to tentatively approach the contribution of microvascular endothelium to the bioavailability of PGE₂ in AAA; and third, to highlight the potential contribution of MVEC-derived PGE₂ to the AAA-associated hypervascularization.

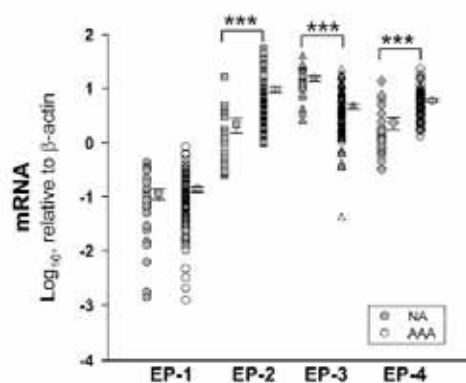


Fig. 5. Transcript levels of PGE-receptors (EP) in NA (n = 25) and AAA (n = 86) samples. Points without error bars indicate individual values and points at right are the mean ± SEM, ***P < 0.001 when compared with NA samples.

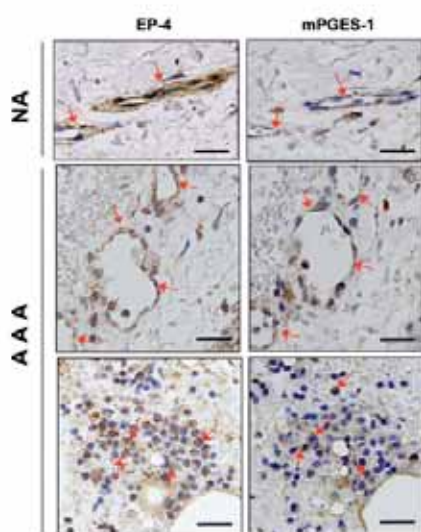


Fig. 6. Representative images of serial sections showing coexpression of EP-4 and mPGES-1 in microvessels of a NA and AAA samples. Arrows indicate some immunostained cells in microvessels and in leukocytes. Scale bars: 50 μ m.

vWF immunostaining of aortic biopsies showed notable differences between NA and AAA. NA was characterized by a regular distribution of microvessels that cross the vessel wall from the adventitia to the intima. In contrast, AAA exhibited many vessels parallel to the VSMC fibers in addition to adventitia-to-intima ones. The highest density of infiltrating leukocytes in the media was in perivascular areas of these latter microvessels. The enhanced expression of EC markers in AAA was consistent with our immunohistochemistry observations and confirms previous reports showing higher vascularization of AAA (4, 5). After stratification by the aortic diameter, the maximal transcript levels of EC markers were found in the LD group, whereas markers used to estimate leukocyte infiltration exhibited a maximum level in the MD group. These results are in agreement with the previous report by McMillan et al. (29), who found the highest MMP-9 expression in moderate-diameter AAA. Assuming that maximum diameter is an approach to the evolutionary stage of the aneurysmatic lesion, collectively our observations allow us to hypothesize that angiogenesis precedes the maximum inflammatory response during AAA development. A similar concept was proposed by Herron et al. (30) regarding levels of proteinases in AAA.

We found that not only the inducible COX-2 but also the constitutive COX-1 were elevated in AAA. Two main factors may influence relative levels of a particular transcript in heterogeneous cell samples; one is an effective up- or downregulation of its expression in one or more cell types present in the sample, and the other is the alteration of the proportion of cell types expressing that transcript. It is well-known that COX-1 is ubiquitously expressed (6, 7). Therefore, the increase of COX-1 in AAA was probably due to the enhanced proportion of cells with high

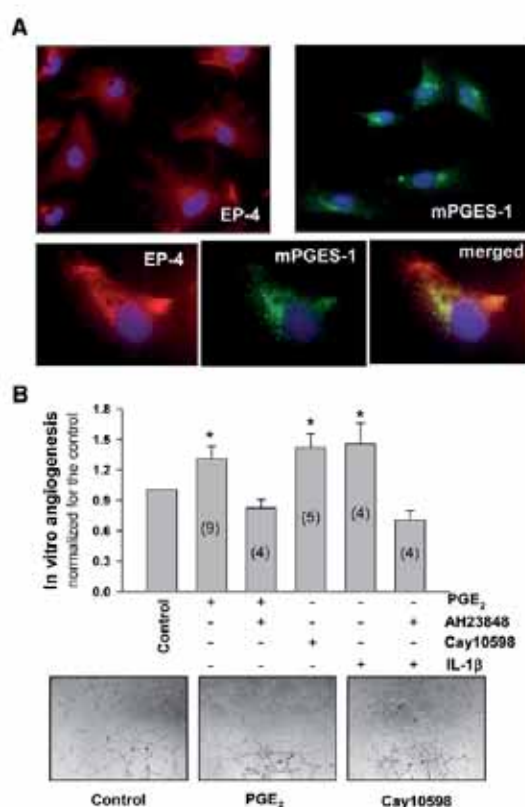


Fig. 7. A: Immunofluorescent staining of MVECs in culture for EP-4 and mPGES-1 (upper panels), and double staining for EP-4 and mPGES-1 (bottom panels). B: Effect of EP-4 activation on in vitro angiogenesis. MVECs were seeded onto Matrigel in 96-well plates and exposed to 10 nmol/l of PGE₂ or Cay10598 (an EP-4 agonist). AH23848 (200 nmol/l) was used to block EP-4. For IL-1 β assays, cells were preincubated or not for 1 h with human recombinant IL-1 β (50 U/ml) in the assay medium before being seeded in Matrigel. After 4 h of treatment, photographs (bottom) were taken and the number of closed polygons in the EC mesh was counted. Shaded bars are the mean \pm SEM (expressed as relative to the corresponding controls). Inside the shaded bars in parentheses is the number of independent experiments performed in triplicate. Representative photographs are also shown (bottom panels). * P < 0.05, when compared with controls.

COX-1 expression, such as macrophages. Consistent with this notion, an excellent statistical correlation was observed between COX-1 and CD68 in AAA samples ($R = 0.654$, $P = 2.53 \times 10^{-7}$). Our results regarding localization of COX-2 showed that it was highly expressed in vascular cells and infiltrating leukocytes in AAA but weakly expressed in NA. These data strongly suggest that in AAA COX-2 was effectively upregulated in vascular cells included MVECs. We found that, even though significant, the increase of mPGES-1 expression in AAA was not as high as that of COX-2 (1.4-fold vs. 4.3-fold, respectively). This suggests a dissimilar regulation of these two enzymes in AAA, as we previously described (8, 9). A factor that could explain the

modest increase of mPGES-1 found in AAA is the breakdown of VSMCs in AAA. Indeed, VSMCs abundantly express mPGES-1 (9, 10), and we localized mPGES-1 immunoreactivity in all vascular cells including VSMCs in both NA and AAA. The increase in the expression of PGE₂ biosynthetic machinery was also consistent with the higher in vitro production of PGE₂ by the AAA tissues, and with the higher levels of PGE₂ metabolites detected in the plasma of these patients. Nevertheless, the entire increase in plasma levels of PGE₂ may not be coming from the AAA itself, as AAA should be considered a systemic disease of the vasculature (31) and other vascular territories may contribute to the circulating PGE₂ levels.

Several reported biological activities of PGE₂ account for its involvement in AAA pathophysiology among others, its ability to induce the expression of MMPs (32) and to inhibit the production of extracellular matrix components such as fibronectin and collagens type I and III (33). The presence of mPGES-1 in a particular cell is necessary for PGE₂ biosynthesis (8–11, 34, 35). In inflammatory diseases it is generally assumed that PGE₂ comes from invading leukocytes, mainly macrophages, and from tumor cells in neoplasias. Nevertheless, we have recently shown that stroma cells present in the tumor environment could be a more relevant source of PGE₂ than tumor cells themselves (28). Because COX-2 and mPGES-1 were expressed in both, vascular cells and infiltrating cells, macrophages could also be a relevant source of PGE₂ in the AAA. Indeed, macrophage COX-2-derived PGE₂ has been found to be relevant in the pathogenesis and rupture of AAAs (12, 13, 21, 22). We cannot rule out, however, the contribution of macrophage-associated COX-1 to the PGE₂ pool, because we found that COX-1 is increased in AAA, probably due to recruited macrophages as mentioned above.

The contributions of the different cell types present in aneurysmatic tissue to the PGE₂ pool is not possible to evaluate directly without seriously modifying tissue samples. As an attempt to approach the contribution of MVECs in the PGE₂ produced by AAA samples, we explored the statistical association of PGE₂ production with other eicosanoids typically released by vascular cells or by leukocytes, considering its production as an independent variable. A statistical association between two variables could indicate either a causal relationship between them, or that the variation of these parameters has a common cause. PGI synthase is expressed in vascular cells but not in leukocytes, TxA synthase is mainly expressed in macrophages and platelets, while 5-lipoxygenase and its counterpart FLAP are expressed in leukocytes (mainly polymorphonuclear). We observed an excellent statistical association between the secretion of PGE₂ and PGI₂, a modest association between PGE₂ and TxA₂ and a lack of association between PGE₂ and LTB₄. The influence of PGI₂ or TxA₂ on PGE₂ levels is unlikely; rather a common cause should underlie these correlations. Therefore, the biosynthesis of PGE₂ in AAA would be associated with cells producing PGI₂ (vascular cells), and to a lesser extent with those producing TxA₂ (macrophages), suggesting a relevant contribution of MVECs to PGE₂ biosynthesis in these tissues. Nevertheless,

this circumstantial evidence should be corroborated by further studies.

Because EP receptors are critical in the biological action of PGE₂, we explored those receptors in AAA. The role of EP-3 in angiogenesis is not fully understood (36–39), but EP-2 and EP-4 have been reported to be involved in the release of angiogenic factors and/or angiogenesis in different experimental models and pathologies (40–42). We observed that EP-4 was practically the only PGE receptor detected in MVECs in culture and was mostly expressed in aortic microvessels and some infiltrating leukocytes. In addition, exogenous and endogenous PGE₂ induced angiogenesis in vitro via EP-4 activation. Coexpression of COX-2, mPGES-1, and EP-4 in MVECs is consistent with a role of MVEC-derived PGE₂ in AAA-associated hypervascularization and MVEC-derived PGE₂ could be biologically effective in the AAA-associated angiogenesis in an autocrine manner. Hypervascularization, per se, could be a determinant factor in reducing mechanical strength, because it turns the media layer fluffy and favors leukocyte-mediated matrix degradation besides.

In summary, we provide new evidence concerning the expression of mPGES-1 and the contribution that MVECs could have in the biosynthesis of PGE₂ in human AAA. Our data allow us to speculate that the COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in MVEC is relevant for the PGE₂-mediated hypervascularization of AAA from the early stages of human AAA development. Our data are also consistent with reports showing that suppression of either COX-2, mPGES-1, or EP-4 expression reduces AAA development in animal models (15, 16, 19, 20), and reinforce the potential of mPGES-1 and EP-4 as alternative targets for therapy in AAA patients.

The authors wish to thank Montserrat Gómez and Iris Rodríguez for assistance in the immunohistochemistry studies.

REFERENCES

- Weintraub, N. L. 2009. Understanding abdominal aortic aneurysm. *N. Engl. J. Med.* 361: 1114–1116.
- Wahlgren, C. M., E. Larsson, P. K. E. Magnusson, R. Hultgren, and J. Swadenborg. 2010. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in twin population. *J. Vasc. Surg.* 51: 3–7.
- Choke, E., G. Cockerill, W. R. Wilson, S. Sayed, J. Dawson, I. Loftus, and M. M. Thompson. 2005. A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 30: 227–244.
- Paik, D. C., C. Fu, J. Bhattacharya, and M. D. Tilson. 2004. Ongoing angiogenesis in blood vessels of the abdominal aortic aneurysm. *Exp. Mol. Med.* 36: 524–533.
- Choke, E., M. M. Thompson, J. Dawson, W. R. Wilson, S. Sayed, I. M. Loftus, and G. W. Cockerill. 2006. Abdominal aortic aneurysm rupture is associated with increased medial neovascularization and overexpression of proangiogenic cytokines. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 2077–2082.
- Vila, L. 2004. Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Med. Res. Rev.* 24: 399–424.
- Bishop-Bailey, D., J. A. Mitchell, and T. D. Warner. 2006. COX-2 in cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 956–958.
- Solà-Vilà, D., M. Camacho, R. Solà, M. Soler, J. M. Diaz, and L. Vila. 2006. IL-1 β induces VEGF, independently of PGE₂ induction, mainly through the PI3-K/mTOR pathway in renal mesangial cells. *Kidney Int.* 70: 1935–1941.

9. Camacho, M., E. Gerbolés, J. R. Escudero, R. Anton, X. García-Moll, and L. Vila. 2007. Microsomal-PGE synthase-1, which is not coupled to a particular COX-isoenzyme, is essential for PGE₂ biosynthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Thromb. Haemost.* 5: 1411–1419.
10. Soler, M., M. Camacho, J. R. Escudero, M. A. Iníguez, and L. Vila. 2000. Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase. *Circ. Res.* 87: 504–507.
11. Salvado, M. D., A. Alfranca, A. Escolano, J. Haeggström, and J. M. Redondo. 2009. COX-2 limits prostanoid production in activated HUVECs and is a source of PGH₂ for transcellular metabolism to PGE₂ by tumor cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29: 1131–1137.
12. Holmes, D. R., W. Wester, R. W. Thompson, and J. M. Reilly. 1997. Prostaglandin E₂ synthesis and cyclooxygenase expression in abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* 25: 810–815.
13. Walton, L. J., I. J. Franklin, T. Bayston, L. C. Brown, R. M. Greenhalgh, G. W. Taylor, and J. T. Powell. 1999. Inhibition of prostaglandin synthesis in abdominal aortic aneurysms. Implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 100: 48–54.
14. King, V. L., D. B. Trivedi, J. M. Gitlin, and C. D. Loftin. 2006. Selective cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib decreases angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 1137–1143.
15. Gitlin, J. M., D. B. Trivedi, R. Langenbach, and C. D. Loftin. 2007. Genetic deficiency of cyclooxygenase-2 attenuates abdominal aortic aneurysm formation in mice. *Cardiovasc. Res.* 73: 227–236.
16. Wang, M., E. Lee, W. Song, E. Ricciotti, D. J. Rader, J. A. Lawson, E. Puré, and G. A. FitzGerald. 2008. Microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion suppresses oxidative stress and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Circulation.* 117: 1302–1309.
17. Narumiya, S., Y. Sugimoto, and F. Ushikubi. 1999. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79: 1193–1226.
18. Tang, E. H., E. Shvartz, K. Shimizu, V. Z. Rocha, C. Zheng, D. Fukuda, G. P. Shi, G. Sukhova, and P. Libby. 2011. Deletion of EP4 on bone marrow-derived cells enhances inflammation and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 261–269.
19. Cao, R. Y., T. St Amand, X. Li, S. H. Yoon, C. P. Wang, H. Song, T. Maruyama, P. M. Brown, D. T. Zelt, and C. D. Funk. 2012. Prostaglandin receptor EP4 in abdominal aortic aneurysms. *Am. J. Pathol.* 181: 313–321.
20. Yokoyama, U., R. Ishiwata, M. H. Jin, Y. Kato, O. Suzuki, H. Jin, Y. Ichikawa, S. Kumagaya, Y. Katayama, T. Fujita, et al. 2012. Inhibition of EP4 signaling attenuates aortic aneurysm formation. *PLoS ONE.* 7: e36724.
21. Chapple, K. S., D. J. Parry, S. McKenzie, K. A. MacLennan, P. Jones, and D. J. Scott. 2007. Cyclooxygenase-2 expression and its association with increased angiogenesis in human abdominal aortic aneurysms. *Ann. Vasc. Surg.* 21: 61–66.
22. Cheuk, B. L., and S. W. Cheng. 2007. Differential secretion of prostaglandin (E(2), thromboxane A(2) and interleukin-6 in intact and ruptured abdominal aortic aneurysm. *Int. J. Mol. Med.* 20: 391–395.
23. Granström, E., M. Hamberg, G. Hansson, and H. Kindahl. 1980. Chemical instability of 15-keto-13,14-dihydro-PGE₂: the reason for low assay reliability. *Prostaglandins.* 19: 953–957.
24. Bothwell, W., M. Verburg, M. Wymald, E. G. Daniels, and F. A. Fitzpatrick. 1982. A radioimmunoassay for the unstable pulmonary metabolites of prostaglandin E1 and E2: an indirect index of their in vivo disposition and pharmacokinetics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 220: 229–235.
25. Brú, A., J. C. Souto, S. Alcolea, R. Antón, A. Remacha, M. Camacho, M. Soler, I. Brú, A. Porres, and L. Vila. 2009. Tumour cell lines HT-29 and FaDu produce proinflammatory cytokines and activate neutrophils in vitro: possible applications for neutrophil-based anti-tumour treatment. *Mediators Inflamm.* 2009: 817498.
26. Casós, K., L. Siguero, M. T. Fernández-Figueras, X. León, M. P. Sardá, L. Vila, and M. Camacho. 2011. Tumor cells induce COX-2 and mPGES-1 expression in microvascular endothelial cells mainly by means of IL-1 receptor activation. *Microvasc. Res.* 81: 261–268.
27. Alfranca, A., J. M. López-Oliva, L. Genís, D. López-Maderuelo, I. Mirones, D. Salvado, A. J. Quesada, A. G. Arroyo, and J. M. Redondo. 2008. PGE₂ induces angiogenesis via MT1-MMP-mediated activation of the TGFbeta/Alk5 signaling pathway. *Blood.* 112: 1120–1128.
28. Alcolea, S., R. Anton, M. Camacho, M. Soler, A. Alfranca, F. X. Aviles-Jurado, J. M. Redondo, M. Quer, X. Leon, and L. Vila. 2012. Interaction between head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE₂. *J. Lipid Res.* 53: 630–642.
29. McMillan, W. D., N. A. Tamarina, M. Cipollone, D. A. Johnson, M. A. Parcker, and W. H. Pearce. 1997. The relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation.* 96: 2228–2232.
30. Herron, G. S., E. Unemori, M. Wong, J. H. Rapp, M. H. Hibbs, and R. J. Stoner. 1991. Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms. Involvement of the vasa vasorum in the pathogenesis of aortic aneurysms. *Arterioscler. Thromb.* 11: 1667–1677.
31. Nordon, I. M., R. J. Hinchliffe, I. M. Loftus, and M. M. Thompson. 2011. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat. Rev. Cardiol.* 8: 92–102.
32. Corcoran, M. L., W. G. Stetler-Stevenson, P. D. Brown, and L. M. Wahl. 1992. Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E₂ synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 515–519.
33. Varga, J., A. Diaz-Pérez, J. Rosenbloom, and S. A. Jimenez. 1987. PGE₂ causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types I and II procollagen mRNAs in normal dermal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147: 1282–1288.
34. Camacho, M., J. López-Belmonte, and L. Vila. 1998. Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and PGI-synthase activity. *Circ. Res.* 83: 353–365.
35. Camacho, M., and L. Vila. 2000. Transcellular formation of thromboxane A₂ in mixed incubations of endothelial cells and aspirin-treated platelets strongly depends on the prostaglandin I-synthase activity. *Thromb. Res.* 99: 155–164.
36. Cattaneo, M. G., S. Pola, V. Delò, A. M. Sanguini, and L. M. Vicentini. 2003. Alprostadil suppresses angiogenesis in vitro and in vivo in the murine Matrigel plug assay. *Br. J. Pharmacol.* 138: 377–385.
37. Sennlaub, F., F. Valamanesh, A. Vazquez-Tello, A. M. El-Asrar, D. Cheechn, S. Brault, F. Gobeil, M. H. Beauchamp, B. Mwaikambo, Y. Courtois, et al. 2003. Cyclooxygenase-2 in human and experimental ischemic proliferative retinopathy. *Circulation.* 108: 198–204.
38. Shoji, Y., M. Takahashi, T. Kitamura, K. Watanabe, T. Kawamori, T. Maruyama, Y. Sugimoto, M. Negishi, S. Narumiya, T. Sugimura, et al. 2004. Downregulation of prostaglandin E receptor subtype EP3 during colon cancer development. *Gut.* 53: 1151–1158.
39. Katoh, H., K. Hosono, Y. Ito, T. Suzuki, Y. Ogawa, H. Kubo, H. Kamata, T. Mishima, H. Tamaki, H. Sakagami, et al. 2010. COX-2 and prostaglandin EP3/EP4 signaling regulate the tumor stromal proangiogenic microenvironment via CXCL12-CXCR4 chemokine systems. *Am. J. Pathol.* 176: 1469–1483.
40. Seno, H., M. Oshima, T. O. Ishikawa, H. Oshima, K. Takaku, T. Chiba, S. Narumiya, and M. M. Taketo. 2002. Cyclooxygenase 2 and prostaglandin E(2) receptor EP(2)-dependent angiogenesis in Apc(Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res.* 62: 506–511.
41. Mutoh, M., K. Watanabe, T. Kitamura, Y. Shoji, M. Takahashi, T. Kawamori, K. Tani, M. Kobayashi, T. Maruyama, K. Kobayashi, et al. 2002. Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 62: 28–32.
42. Rao, R., R. Redha, I. Macias-Perez, Y. Su, C. Hao, R. Zent, M. D. Breyer, and A. Pozzi. 2007. Prostaglandin E2-EP4 receptor promotes endothelial cell migration via ERK activation and angiogenesis in vivo. *J. Biol. Chem.* 282: 16959–16968.

Research Article

Active Smoking Increases Microsomal PGE₂-Synthase-1/PGE-Receptor-4 Axis in Human Abdominal Aortic Aneurysms

Jaime-Félix Dilmé,^{1,2} David Solà-Vilà,³ Sergi Bellmunt,^{1,2} José-María Romero,^{1,2} José-Román Escudero,^{1,2} Mercedes Camacho,¹ and Luis Vila¹

¹ Angiology, Vascular Biology and Inflammation Laboratory, Institute of Biomedical Research of Hospital Santa Creu i Sant Pau (II-B Sant Pau), 08025 Barcelona, Spain

² Vascular Surgery Department, Institute of Biomedical Research of Hospital Santa Creu i Sant Pau (II-B Sant Pau), 08025 Barcelona, Spain

³ Autonomous University of Barcelona, Institute of Biomedical Research of Hospital Santa Creu i Sant Pau (II-B Sant Pau), 08025 Barcelona, Spain

Correspondence should be addressed to Mercedes Camacho; mcamacho@santpau.cat

Received 19 January 2014; Accepted 10 April 2014; Published 30 April 2014

Academic Editor: Jonathan Peake

Copyright © 2014 Jaime-Félix Dilmé et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background. The cyclooxygenase- (COX-) 2/microsomal PGE-synthase- (mPGES-) 1/PGE-receptor- (EP-) 4 axis could play a key role in the physiopathology of abdominal aortic aneurysm (AAA) in humans. In this study, we investigated the influence of cardiovascular risk factors on the expression of the PGE₂ pathway in human AAA. **Methods.** Aortic ($n = 89$) and plasma ($n = 79$) samples from patients who underwent AAA repair were collected. Patients were grouped according to risk factors. COX-isoenzymes, mPGES-1, EPs, α -actin, and CD45 and CD68 transcripts levels were quantified by QRT-PCR and plasma PGE₂ metabolites by EIA. **Results.** Current smoking (CS) patients compared to no-CS had significantly higher local levels of mPGES-1 ($P = 0.009$), EP-4 ($P = 0.007$), and PGE₂ metabolites plasma levels ($P = 0.008$). In the multiple linear regression analysis, these parameters remained significantly enhanced in CS after adding confounding factors. Results from association studies with cell type markers suggested that the increased mPGES-1/EP-4 levels were mainly associated with microvascular endothelial cells. **Conclusions.** This study shows that elements of the PGE₂ pathway, which play an important role in AAA development, are increased in CS. These results provide insight into the relevance of tobacco smoking in AAA development and reinforce the potential of mPGES-1 and EP-4 as targets for therapy in AAA patients.

1. Introduction

Abdominal aortic aneurysm (AAA) affects a high percentage of the aged population in industrialized countries and mortality rates associated with rupture of AAA are high. The aetiology of AAA is essentially unknown, but it is generally accepted that environmental and genetic factors contribute substantially to the risk of AAA [1]. An association between AAA and atherosclerosis has long been recognized. There are, however, histological and epidemiologic differences between the two diseases. The major risk factors for AAA are increasing age, family history,

male gender, hyperlipidemia (HL), arterial hypertension (HTN), and smoking [1]. Of these, smoking seems to be the most relevant, with a considerably higher risk for AAA than for atherosclerosis [2]. Diabetes mellitus (DM) is a well-established risk factor for atherosclerosis and has been reported to be protective for AAA [3]. Studying the influence of cardiovascular risk factors, particularly those that differentially influence AAA and atherosclerosis, could help to ascertain the causes of AAA.

Human AAA is characterized by leukocyte infiltration into adventitia and media and depletion of vascular smooth

muscle cells (VSMC) in the media. Another relevant feature of the disorder is a decrease in AAA wall strength caused by the breakdown of elastic fibres and the hypervascularization of aortic tissue [4]. A key factor in the pathophysiology of AAA is PGE₂. PGE₂ induces expression of metalloproteinases and inhibits the production of macromolecules of the extracellular matrix [5, 6]. It acts as a signalling molecule in response to proangiogenic factors and also induces release of several angiogenic factors in a manner of positive loop [7–10]. Consequently, inhibition or deletion of the enzymes involved in the biosynthetic pathway of PGE₂ interferes in AAA development in animal models [11–15].

PGE₂ biosynthesis begins with the formation of PGH₂ from arachidonic acid (AAc) catalyzed by cyclooxygenase (COX). PGH₂ is in turn isomerized to PGE₂ by PGE-synthases (PGES) [16]. The microsomal isoform of PGES, mPGES-1, is inducible by proinflammatory cytokines and it seems to be the essential PGES isoenzyme involved in PGE₂ biosynthesis under inflammatory conditions [17–19]. COX-2/mPGES-1 is widely regarded as the main contributing enzymatic tandem for PGE₂ biosynthesis under pathological conditions.

PGE₂ exerts its cellular effects by binding to four distinct E-prostanoid receptors (EP1–4). EPs belong to the family of seven transmembrane G protein-coupled rhodopsin-type receptors. Each receptor has different and often opposing biological effects. EP2 and EP4 are Gs proteins-coupled receptors and they upregulate intracellular cAMP levels. EP3 usually counteracts EP2- and EP4-mediated upregulation of cAMP by preferentially coupling to Gi proteins [20]. Also, interventions on the PGE₂ receptor display benefits in experimental AAA [21, 22].

We recently reported that COX-2, mPGES-1, EP-2, and EP-4 are upregulated in AAA and that the COX-2/mPGES-1/EP-4 axis could play a relevant role in AAA-associated hypervascularization from the early stages of AAA development [23]. However, information is lacking regarding the influence of cardiovascular risk factors on local levels of the COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in AAA.

In this study, we aimed to evaluate the influence of major cardiovascular risk factors on the PGE₂ pathway in human abdominal aortic aneurysms.

2. Methods

2.1. Patients. The inclusion criteria for this study were patients who underwent open repair for AAA with an atherosclerotic aneurysm and in whom an infrarenal aorta biopsy was taken during the intervention. The exclusion criteria were absence or inadequate aortic biopsy, pseudoaneurysms, and infectious or inflammatory aneurysms. All patients underwent surgery at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP). The study was approved by the local ethics committee, and informed consent was obtained from each patient. All procedures were reviewed by the institutional review board at HSCSP. The investigation conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

2.2. Tissue Samples. Samples were obtained from remaining midinfrarenal aortic wall after exclusion and prosthetic replacement of AAA. When luminal thrombus was present it was separated before the aorta biopsy was taken and aortic tissue was washed twice with cold phosphate buffered saline (PBS). A portion of each sample was placed in RNAlater solution (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at 4°C for 24 hours before long-term storage at -80°C until further processing for RNA isolation. When possible a portion was fixed in formalin solution 10% (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) for 24 h and included in paraffin for immunohistochemical studies.

2.3. Risk Factors Definitions. The risk factors definitions used in this study were diabetes mellitus (DM): glycated haemoglobin >5.8% or use of oral antidiabetic drugs or insulin; arterial hypertension (HTN): systolic blood pressure >140 mm Hg, diastolic blood pressure >80 mm Hg, or use of antihypertensive medication; hyperlipidemia (HL): a total cholesterol >6.2 mmol/L, LDL cholesterol >1.70 mmol/L, or triglycerides >1.65 mmol/L; smoking: categorized into 2 groups: current smoking (CS): smokers and ex-smokers who stopped smoking <1 year and noncurrent smoking (N-CS): never-smokers and ex-smokers who stopped smoking >1 year; chronic obstructive pulmonary disease (COPD): FEV1/FVC < 0.7; and renal insufficiency (RI): estimated glomerular filtration rate (eGFR) ≤60 mL/min/1.73 m² calculated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation [24].

2.4. Analysis of mRNA Levels in the Tissues and Culture Cells. Tissues were homogenized in the FastPrep-24 homogenizer and Lysing Matrix D tubes (MP Biomedicals, Solon, OH). RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. cDNA was prepared by reverse transcription of 1 µg RNA using High-Capacity cDNA Archive kit with random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA). mRNA expression of the selected genes was studied by real-time PCR in an ABI Prism 7900HT using predesigned validated assays (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems) and universal thermal cycling parameters. Relative expression was expressed as transcript/β-actin ratios.

2.5. Plasma Levels of PGE₂. A sample of 10 mL of peripheral blood was collected in heparin-containing tubes. Blood was collected before anesthesia in the operating room. It was centrifuged immediately and plasma aliquoted and frozen at -80°C until analysis. PGE₂ and 13,14-dihydro-15-oxo-PGE₂ were determined using enzyme immunoassay (EIA) kits (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) following the manufacturer's instructions.

2.6. Immunohistochemistry. Immunohistochemical studies were performed using a rabbit polyclonal antibody against mPGES-1 (ref. HPA045064 prestige antibodies, diluted 1:50) from Sigma and a mouse monoclonal antibody anti-EP-4 (ref. 101775, diluted 1:100) from Cayman Chemical.

Blanks were performed using the corresponding blocking peptides all from Cayman. Monoclonal antibodies (ref. M0616, diluted 1:35; ref. IR751 and ref. IR613, without further dilution) from Dako were used for von Willebrand Factor (vWF, endothelial cell marker), CD45 (pan-leukocyte marker), and CD68 immunostaining. Three-micrometer sections of paraffin-embedded tissue samples were stained in a Dako Autostainer Link 48 using the Dako EnVision Flex kit. Diaminobenzidine was used as chromogen. Immunostainings used for comparative purposes were processed simultaneously.

2.7. Statistical Analysis. SPSS and Sigma-Stat software were used for statistical analysis. All data regarding transcript levels are expressed relative to β -actin $\times 1000$. All quantitative data in this study were nonnormally distributed and expressed as median (25th–75th percentile). We used the Mann-Whitney rank sum test to compare the two groups. The Pearson product moment correlation was used to evaluate the association between continuous variables after Log10 transformation of data with nonnormal distribution. Data were also analyzed using a multiple linear model including the effect of the identified risk factors and controlling possible confounding factors; a logarithmic transformation was applied to those outcomes without a normal distribution. A *P* value below 0.05 was considered significant.

3. Results

From 2008 to 2012, 225 elective AAA were performed in our center (Department of Vascular and Endovascular Surgery of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona, Spain). 166 patients underwent open surgery and 59 had endovascular aortic repair (EVAR). An adequate biopsy was obtained from 89 patients during the intervention.

Table 1 shows the number and characteristics of participants. None of the risk factors caused significant differences in either COX-1 or COX-2 levels between AAA samples (Table 2). Regarding mPGES-1, only current smoking (CS) showed significant high transcript levels when compared with the noncurrent smokers (N-CS) group. mPGES-1 expression was higher in patients suffering COPD than in those without COPD, but the difference did not reach statistical significance. Next we evaluated the association between risk factors. Following χ^2 analysis, we identified COPD and HTN as variables likely related to CS. As these two variables could act as confounding factors (Table 3), we applied multiple linear regression analysis. The relationship between CS and mPGES-1 remained stable even in the presence of the confounding factors (COPD and HTN) in the statistics (*P* = 0.03). We found that plasma levels of PGE₂ in AAA patients were significantly enhanced in the CS group when compared with the N-CS group (Table 4). None of the other risk factors analysed had statistically significant differences regarding circulating levels of PGE₂. When confounding variables were taken into account, multiple linear regression analysis showed statistically significant differences between CS and N-CS groups (*P* = 0.012).

TABLE 1: Clinical characteristics of individuals with AAA included in the study, demographics, and risk factors.

Measurements characteristic	mRNA	Plasma levels
Number	89	79
Aortic diameter (mm)	66 ± 12.7	64.3 ± 11.6
Age (years)	71.1 ± 6.5	72.4 ± 6.8
Male	87 (97.8%)	75 (94.9%)
Diabetes mellitus	19 (21.3%)	21 (26.6%)
Hypertension	63 (70.8%)	60 (75.9%)
Hyperlipidemia	54 (60.7%)	51 (64.6%)
Smoking habits		
Noncurrent smokers	63 (70.8%)	60 (75.9%)
Current smokers	26 (29.2%)	19 (24.1%)
Coronary artery disease (CAD)	20 (22.4%)	22 (27.9%)
Angor pectoris	2 (2.2%)	4 (5.1%)
Myocardial infarction	6 (6.7%)	6 (7.6%)
Coronary intervention/CABG	12 (13.5%)	12 (15.2%)
Chronic renal insufficiency	34 (38.2%)	23 (29.1%)
Dialysis	0	0
Peripheral vascular disease	48 (53.9%)	45 (57%)
Absence pulses	31 (34.8%)	30 (38%)
Intermittent claudication	17 (19.1%)	15 (19%)
Cerebrovascular disease	7 (7.9%)	7 (8.8%)
Cerebral vascular attack	4 (4.5%)	5 (6.3%)
Transient ischemic attack	3 (3.4%)	2 (2.5%)
COPD	26 (29.2%)	17 (21.5%)
Antiplatelet users	47 (53.4%)	48 (61.5%)
Statins users	57 (64%)	58 (73.4%)
ACEIs users	23 (20.7%)	24 (30.8%)
NSAD users	6 (6.7%)	3 (3.8%)
Corticoid users	6 (6.7%)	4 (5.1%)
Immunosuppressors	4 (3.5%)	2 (2.5%)

Nominal variables are presented as number and as percentage (%) and continuous variables as mean ± SD. Aortic diameter: aneurysm maximum transverse diameter in mm; chronic renal insufficiency: estimated glomerular filtration rate (eGFR) <60 mL/min/1.73 m²; noncurrent smokers: never smokers or quit smoking >1 year; CABG: coronary artery bypass grafting; COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

Figure 1(a) shows examples of leukocyte infiltration of AAA samples. Microvessels were abundant in the adventitia and in the media. While major infiltrated leukocytes (determined by CD45 immunostaining) systematically accumulated in perivascular areas of microvessels, macrophages (determined by CD68 immunostaining) displayed a more scattered pattern. Immunohistochemistry study of mPGES-1 was performed in AAA samples from 4 patients of each smoking group to localize the protein expression. No differences were observed between CS and N-CS groups regarding mPGES-1 protein location. mPGES-1 was located in MVEC, VSMC, and infiltrating leukocytes (Figure 2(a)). In an attempt to approach the origin of the differences of mPGES-1

TABLE 2: Transcript levels of COX isoenzymes and mPGES-1 in the AAA samples stratified by cardiovascular risk factors. The number of patients in every group is indicated in Table I. Data are expressed as relative to β -actin x1000.

	Median	25th-75th percentile	P value versus no-factor ^a
COX-1			
No current smoking	10.7	7.68-14.3	
Current smoking	11.6	9.47-18.7	0.109
No renal insufficiency	10.9	8.50-16.3	
Renal insufficiency	10.7	7.78-15.8	0.896
No hypertension	10.8	9.62-16.1	
Hypertension	10.7	7.49-15.8	0.419
No diabetes mellitus	11.0	8.67-15.9	
Diabetes mellitus	9.71	6.48-15.1	0.365
No hyperlipidemia	12.3	8.20-16.1	
Hyperlipidemia	10.6	8.39-14.3	0.457
No COPD ^b	11.0	8.45-15.9	
COPD	10.4	8.07-15.3	0.695
COX-2			
No current smoking	10.1	4.68-15.8	
Current smoking	10.3	5.34-17.6	0.604
No renal insufficiency	9.27	5.25-18.7	
Renal insufficiency	10.9	5.30-14.6	0.678
No hypertension	8.57	5.09-16.7	
Hypertension	10.4	5.70-16.0	0.695
No diabetes mellitus	9.27	4.70-15.9	
Diabetes mellitus	11.6	6.90-24.7	0.188
No hyperlipidemia	9.28	5.36-16.5	
Hyperlipidemia	10.6	5.09-15.8	0.990
No COPD ^b	10.1	5.20-16.5	
COPD	10.6	5.60-15.0	0.889
mPGES-1			
No current smoking	2.42	1.16-4.08	
Current smoking	3.46	2.33-4.95	0.009
No renal insufficiency	2.69	1.24-3.82	
Renal insufficiency	2.69	1.90-4.67	0.245
No hypertension	2.87	1.74-3.67	
Hypertension	2.66	1.48-4.46	0.735
No diabetes mellitus	2.78	1.50-4.26	
Diabetes mellitus	2.47	1.20-4.36	0.606
No hyperlipidemia	2.66	2.06-3.65	
Hyperlipidemia	2.76	1.20-4.51	0.798
No COPD ^b	2.39	1.16-4.09	
COPD	2.90	2.35-4.75	0.06

^aMann-Whitney Rank Sum Test.

^bChronic obstructive pulmonary disease.

in our AAA samples, we determined the statistical association of mPGES-1 transcript levels with cell-characteristic markers as independent variables. We analysed mRNA levels of von Willebrand Factor (vWF), α -actin, and CD68 as markers of endothelial cell, VSMC, and macrophages, respectively. No significant statistical association was found between mPGES-1 and CD68 transcript levels (not shown). In contrast, mPGES-1 levels significantly correlated with both α -actin and vWF (Figure 2(b)). We then explored the influence of CS on

the cell markers and no significant differences were found between CS and N-CS (not shown).

Regarding PGE₂ receptors, EP-1 was expressed only scarcely in AAA samples and therefore was not considered for the analysis of cardiovascular risk factors. No risk factor caused statistically significant variation of either EP-2 or EP-3. In contrast, significant differences between CS and N-CS groups were found regarding EP-4, CS having the highest transcript levels when simple statistical analysis was applied

TABLE 3: χ^2 analysis of risk factors.

Variable	COPD	CS	DM	HL	RI
HTN	$\chi^2 = 1.494$ $P = 0.222$	$\chi^2 = 3.371$ $P = 0.066$	$\chi^2 = 1.801$ $P = 0.180$	$\chi^2 = 0.0318$ $P = 0.859$	$\chi^2 = 4.448$ $P = 0.035$
COPD		$\chi^2 = 8.464$ $P = 0.004$	$\chi^2 = 0.0006$ $P = 0.981$	$\chi^2 = 0.082$ $P = 0.775$	$\chi^2 = 9.952$ $P = 0.002$
CS			$\chi^2 = 0.0326$ $P = 0.857$	$\chi^2 = 0.0009$ $P = 0.976$	$\chi^2 = 1.223$ $P = 0.269$
DM				$\chi^2 = 2.55$ $P = 0.110$	$\chi^2 = 0.04$ $P = 0.842$
HL					$\chi^2 = 0.003$ $P = 0.957$

HTN: arterial hypertension; COPD: chronic occlusive pulmonary disease; CS: current smoking; DM: diabetes mellitus; HL: hyperlipidemia; RI: renal insufficiency.

TABLE 4: Plasma levels of PGE₂ in the AAA samples stratified by cardiovascular risk factors. The number of patients in every group is indicated in Table 1. Plasma levels of PGE₂ are expressed as pg/mL.

	Median	25th-75th percentile	P value versus no-factor ^a
Plasma-PGE ₂			
No current smoking	55.9	39.3-71.1	
Current smoking	68.0	57.1-119.5	0.008
No renal insufficiency	58.4	44.0-71.4	
Renal insufficiency	59.4	39.3-104.3	0.786
No hypertension	70.1	53.0-95.2	
Hypertension	56.2	39.4-77.2	0.140
No diabetes mellitus	56.5	38.6-94.9	
Diabetes mellitus	60.7	55.8-68.8	0.294
No hyperlipidemia	55.8	44.5-101.9	
Hyperlipidemia	60.7	41.2-72.0	0.947
No COPD ^b	59.4	43.3-74.3	
COPD	57.1	43.5-115.9	0.807

^aMann-Whitney rank sum test.

^bChronic occlusive pulmonary disease.

(Table 5). Moreover, when confounding variables (COPD and HTN) were introduced in statistics the relationship between CS and EP-4 remained stable ($P = 0.007$). EP-4 was almost undetectable in VSMC in culture in terms of mRNA (78-fold lower than in MVEC, not shown). Immunohistochemical staining indicated that EP-4 was much less expressed in VSMC than in MVEC. EP-4 was detected mainly in MVEC and infiltrating leucocytes. No differences between CS and N-CS groups were observed regarding localization of EP-4 (Figure 3(a)). The association between EP-4 and CD68 transcript levels was poor (Figure 3(b)), whereas the association with vWF was stronger. In addition, we observed an excellent correlation between mPGES-1 and EP-4 transcript levels.

4. Discussion

This is the first study to describe the influence of cardiovascular risk factors on local levels of PGE₂ pathway in abdominal aortic aneurysm. We found that current smoking

was associated with increased local expression of transcript levels of mPGES-1 in AAA.

In accordance with other reports, we recently found that local expression of COX-2 was increased in aneurysmal tissue. Additionally, we reported that mPGES-1 was increased in AAA and that the upregulation of COX-2/mPGES-1 precedes maximal leukocyte infiltration [23]. We found that EP-2 and EP-4 were upregulated in AAA, whereas EP-3 was significantly downregulated. An interesting finding was that PGE₂-mediated in vitro angiogenesis was fully dependent on EP-4. Herein, we report the influence of the most relevant cardiovascular risk factors on the COX-2/mPGES-1/EP-4 axis expression.

Current smoking was the only cardiovascular risk factor that was significantly associated with increased local expression of mPGES-1 in aneurysmal aorta. However, it had no effect on COX-2 expression. This observation is consistent with the fact that COX-2 and mPGES-1 display different regulation in vitro [18, 19]. The increase in the expression of PGE₂ biosynthetic machinery was consistent

TABLE 5: Transcript levels of PGE receptors in the AAA samples stratified by cardiovascular risk factors. The number of patients in every group is indicated in Table 1. Data are expressed as relative to β -actin $\times 1000$.

	Median	25th-75th percentile	<i>P</i> value versus no-factor ^a
EP-2			
No current smoking	3.98	2.53-8.63	
Current smoking	4.84	2.42-7.46	0.811
No renal insufficiency	3.98	2.66-9.05	
Renal insufficiency	4.49	2.41-7.72	0.653
No hypertension	4.58	2.42-8.22	
Hypertension	4.10	2.56-8.41	0.946
No diabetes mellitus	3.98	2.45-7.24	
Diabetes mellitus	5.27	2.88-23.6	0.115
No hyperlipidemia	3.91	2.38-6.60	
Hyperlipidemia	5.31	2.82-12.0	0.068
No COPD ^b	3.98	2.51-9.82	
COPD	4.95	2.60-7.46	0.846
EP-3			
No current smoking	2.80	1.30-6.18	
Current smoking	3.41	2.16-6.32	0.202
No renal insufficiency	2.68	1.47-4.74	
Renal insufficiency	3.36	1.94-8.02	0.172
No hypertension	3.12	1.98-5.74	
Hypertension	3.06	1.45-6.30	0.484
No diabetes mellitus	3.18	1.87-5.67	
Diabetes mellitus	1.94	0.64-10.4	0.305
No hyperlipidemia	3.47	1.82-7.19	
Hyperlipidemia	2.54	1.46-5.32	0.288
No COPD ^b	3.16	1.49-6.05	
COPD	2.95	1.92-6.21	0.853
EP-4			
No current smoking	4.29	3.24-6.49	
Current smoking	5.93	4.87-8.92	0.007
No renal insufficiency	4.63	3.47-6.25	
Renal insufficiency	5.70	3.45-7.72	0.259
No hypertension	4.89	3.94-7.72	
Hypertension	4.93	3.45-6.61	0.394
No diabetes mellitus	4.92	3.48-6.66	
Diabetes mellitus	4.71	1.82-7.96	0.678
No hyperlipidemia	4.90	3.26-6.61	
Hyperlipidemia	4.91	3.51-7.32	0.678
No COPD ^b	4.90	3.52-6.57	
COPD	5.20	2.41-7.61	0.896

^aMann-Whitney rank sum test.^bChronic obstructive pulmonary disease.

with the higher levels of PGE₂ observed in the plasma of the smoker patients. Nevertheless, as AAA should be considered a systemic disease of the vasculature [1], other vascular territories may contribute to circulating levels of PGE₂.

The presence of mPGES-1 in a particular cell is necessary for PGE₂ biosynthesis [17-19, 25]. All vascular cells [17, 23, 26] and leukocytes [23], likely mainly macrophages, express mPGES-1. Our present results show that the expression levels of mPGES-1 correlate with the expression of vascular cell

markers rather than with infiltrating macrophages markers suggesting that mPGES-1 is expressed in VSMC and MVEC as we reported before [17, 18, 26]. Therefore, changes in the number of VSMC and MVEC influence mPGES-1 levels. The absence of statistically significant differences between the CS and N-CS groups regarding transcript levels of vascular cell markers, together with increased levels of mPGES-1 in the CS group, strongly suggests that expression of mPGES-1 is effectively upregulated in vascular cells in CS group.

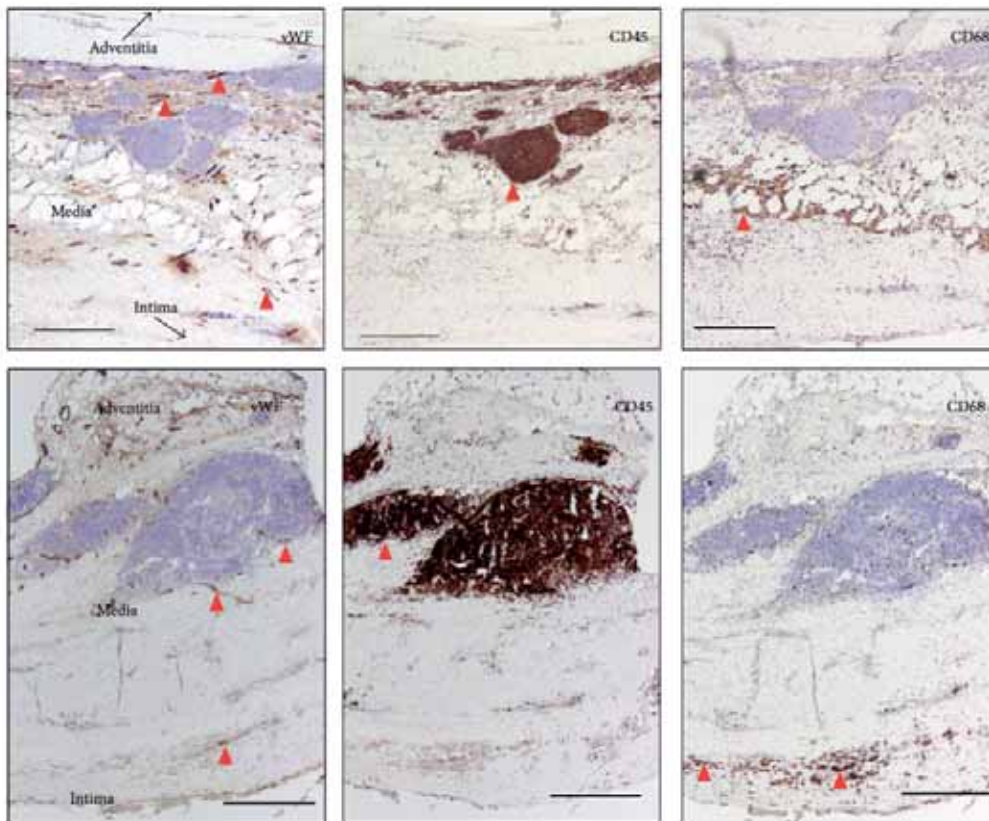


FIGURE 1: Representative immunohistochemical images of vWF (endothelial cell marker), CD45 (pan-leukocyte marker), and CD68 (macrophage marker) in aorta samples from two AAA patients. Red arrow-heads indicate some immunostained cells. Size bars: 500 μ m. In upper panels black-tipped arrows are used to orient the position of the vessel by indicating to where intima and adventitia are.

Nevertheless, VSMC tends to be reduced whereas MVEC are substantially increased in AAA [1, 4, 26]. Altogether, our results heighten the role that MVEC-associated mPGES-1 and current smoking could have in AAA progression. Of course this does not rule out the important role of macrophages in AAA progression. Indeed, macrophage COX-2-derived PGE₂ has been found to be relevant in the pathogenesis and rupture of AAA [12, 27, 28].

Regarding PGE₂ receptors, only CS had an effect on the local levels of EP-4. Active smokers had significantly higher levels of EP-4 transcript. EP-4 is the most abundant subtype of PGE₂ receptor in endothelial cells and it is a key receptor for PGE₂-induced angiogenesis [23]. It was expressed in leukocytes, but we found that variation of EP-4 expression correlated better with vWF mRNA levels (endothelial cell marker) than with CD68 (macrophage marker). The statistical significance of the difference between CS and N-CS regarding mPGES-1/EP-4 axis was maintained after

the introduction of HTN and COPD as confounding variables in the statistics. Moreover, the association of mPGES-1 and EP-4 transcript levels was highly significant. Taken together, our results support the concept that smoking substantially affects aortic vascular cells and suggest that MVEC are particularly affected.

Smoking is a particularly relevant risk factor for AAA [29]. It has been reported that the association between smoking and AAA is 2.5-fold higher than the association between smoking and coronary heart disease [2]. Tobacco smoke also enhances AAA formation in animal models [30, 31]. Our data indicated that mPGES-1/EP-4 is mainly linked to vascular cell state, whereas local levels of COX-2 depend on several factors such as the inflammatory infiltrate in the aortic wall. Local levels of COX-2 were not associated with any particular marker. Therefore, it seems that smoking affects the state of the vascular cells more than the degree of leukocyte infiltration. Many reports provide evidence supporting the

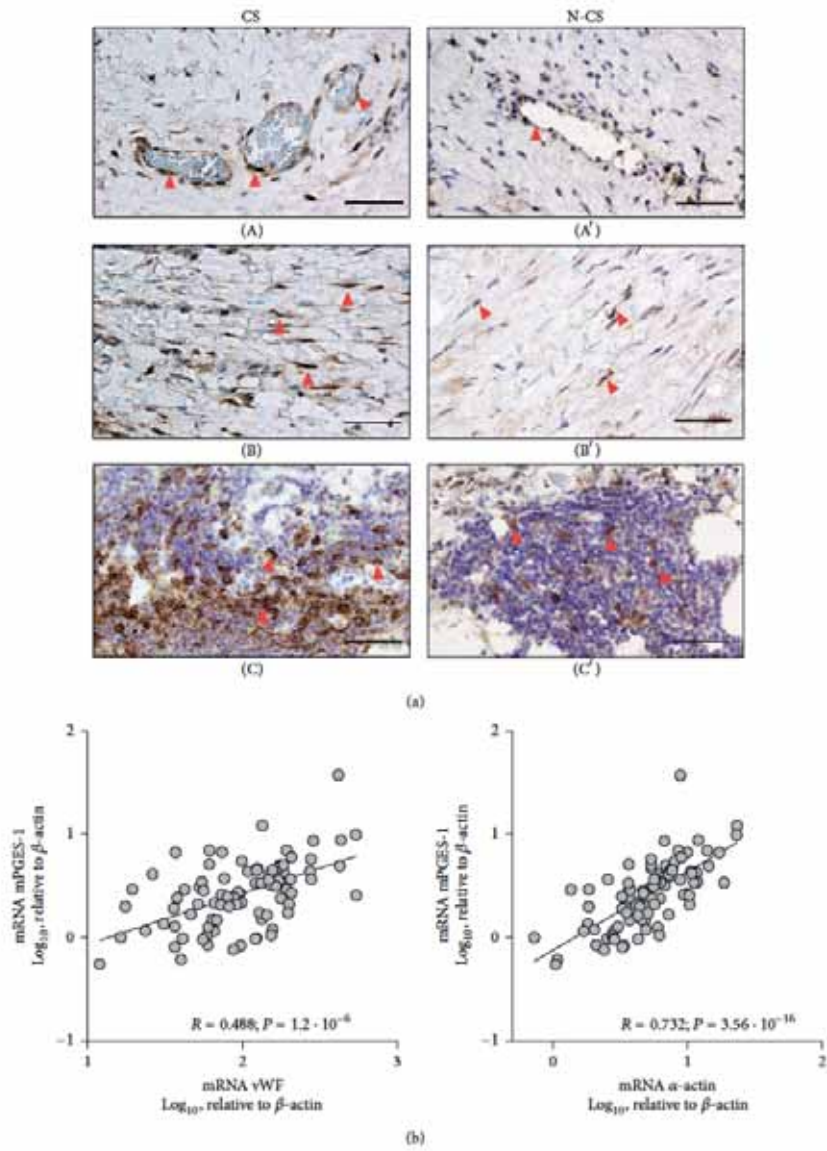


FIGURE 2: (a) Representative immunohistochemical images of mPGES-1 in aorta samples from current smokers (CS, left) and noncurrent smokers (N-CS, right) patients, showing mPGES-1 immunostaining of MVEC (A, A'), VSMC of the media layer (B, B'), and mPGES-1 positive leukocytes (C, C'). Red arrow-heads indicate some immunostained cells. Size bars: 50 μ m. (b) Correlation between mPGES-1 transcript levels and those of vascular cell markers; Pearson product moment correlation applied to log₁₀-transformed data ($n = 89$).

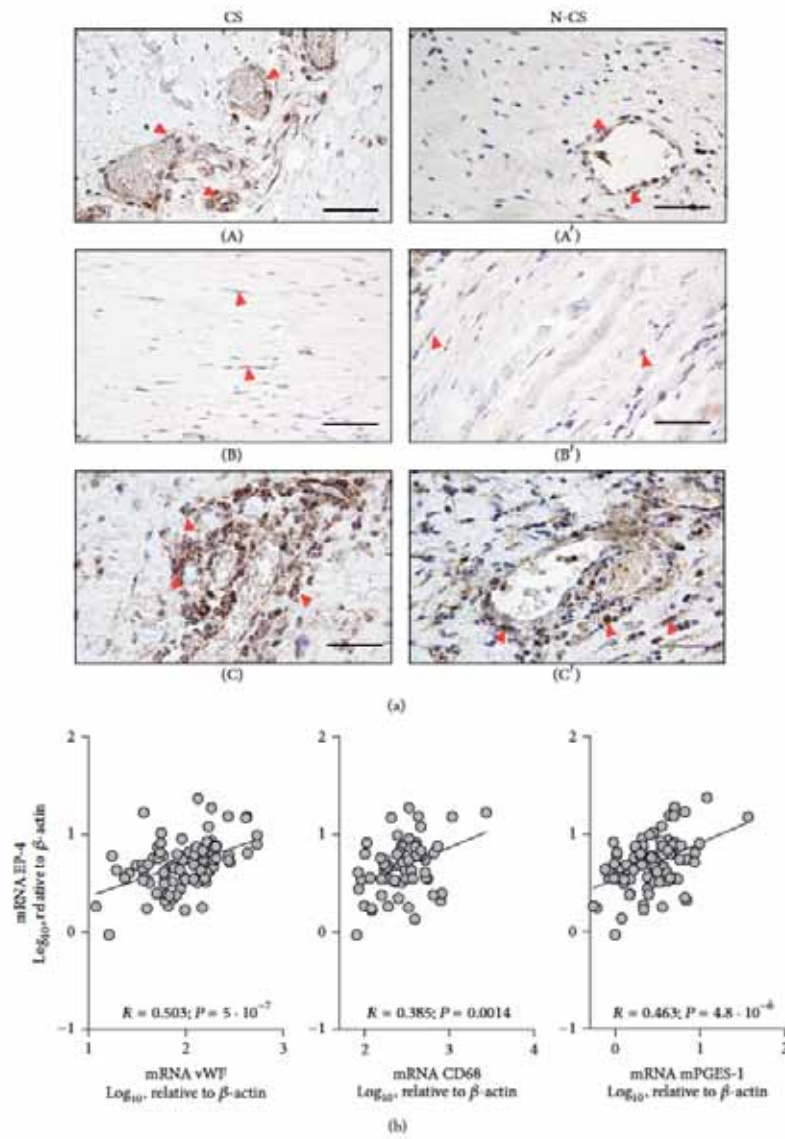


FIGURE 3: (a) Representative immunohistochemical images of EP-4 in aorta samples from current smokers (CS, left) and noncurrent smokers (N-CS, right) patients, showing EP-4 immunostaining of MVEC (A, A'), the scarce presence of EP-4 immunostaining in media layer in areas free of leucocyte infiltration (B, B'), and EP-4 positive leukocytes (C, C'). Red arrow-heads indicate some immunostained cells. Size bars: 50 μm. (b) Correlation between mPGES-1 transcript levels and those of endothelial cell and macrophage markers and between EP-4 and mPGES-1; Pearson product moment correlation applied to log₁₀-transformed data (n = 89).

association between renal function and atherosclerosis, and eGFR is an independent prognostic factor for cardiovascular disease [32]. We recently reported that eGFR is an excellent predictor of vascular events in patients with peripheral arterial disease [33]. Since RI could indicate the atherosclerosis level of patients, our results suggest that the effect of smoking on local levels of mPGES-1/EP-4 is independent of the atherosclerosis and COPD states of patients with AAA. These results support the lack of association of COPD and AAA with smoking described in a previous report [34]. More research is needed to ascertain the molecular species and signalling pathways involved in the effect of tobacco smoke on the induction of mPGES-1 and EP-4 expression in human AAA.

In conclusion, we show for the first time that current smoking increases MVEC-associated mPGES-1/EP-4 and provides further insight into the relevance of tobacco smoking in AAA development. Our data are consistent with reports showing that suppression of either mPGES-1 or EP-4 expression reduces AAA development in animal models [15, 21, 22] and reinforce the potential of mPGES-1 and EP-4 as alternative targets for therapy in AAA patients.

Abbreviations

AAA: Abdominal aortic aneurysm
 HTN: Arterial hypertension
 COPD: Chronic obstructive pulmonary disease
 CS: Current smoking
 eGFR: Estimated glomerular filtration rate
 HL: Hyperlipidemia
 MVEC: Microvascular endothelial cells
 RI: Renal insufficiency
 VSMC: Vascular smooth muscle cells.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Mercedes Camacho and Luis Vila contributed equally to this work.

Acknowledgments

The authors thank Laura Siguero, Sonia Alcolea, Montserrat Gómez, and Iris Rodríguez for their excellent technical support. This work was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (Grant no. SAF2010/21392) and MINECO-Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Red de Investigación Cardiovascular RD12/0042/0051).

References

- [1] I. M. Nordon, R. J. Hinchliffe, I. M. Loftus, and M. M. Thompson, "Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms," *Nature Reviews Cardiology*, vol. 8, no. 2, pp. 92–102, 2011.
- [2] F. A. Lederle, D. B. Nelson, and A. M. Joseph, "Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: a systematic review," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 38, no. 2, pp. 329–334, 2003.
- [3] S. Shantikumar, R. Ajjan, K. E. Porter, and D. J. A. Scott, "Diabetes and the abdominal aortic aneurysm," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 39, no. 2, pp. 200–207, 2010.
- [4] E. Choke, G. Cockerill, W. R. W. Wilson et al., "A review of biological factors implicated in abdominal aortic aneurysm rupture," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 30, no. 3, pp. 227–244, 2005.
- [5] M. L. Corcoran, W. G. Stetler-Stevenson, P. D. Brown, and L. M. Wahl, "Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E₂ synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 267, no. 1, pp. 515–519, 1992.
- [6] J. Varga, A. Diaz-Perez, J. Rosenbloom, and S. A. Jimenez, "PGE₂ causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types I and III procollagen mRNAs in normal human dermal fibroblasts," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 147, no. 3, pp. 1282–1288, 1987.
- [7] R. Salcedo, X. Zhang, H. A. Young et al., "Angiogenic effects of prostaglandin E₂ are mediated by up-regulation of CXCR4 on human microvascular endothelial cells," *Blood*, vol. 102, no. 6, pp. 1966–1977, 2003.
- [8] D. Wang, H. Wang, J. Brown et al., "CXCL1 induced by prostaglandin E₂ promotes angiogenesis in colorectal cancer," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, no. 4, pp. 941–951, 2006.
- [9] T. Nakayama, N. Mutsaers, L. Yao, and G. Tosato, "Prostaglandin E₂ promotes degranulation-independent release of MCP-1 from mast cells," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 79, no. 1, pp. 95–104, 2006.
- [10] R.-Z. Qian, F. Yue, G.-P. Zhang, L.-K. Hou, X.-H. Wang, and H.-M. Jin, "Roles of cyclooxygenase-2 in microvascular endothelial cell proliferation induced by basic fibroblast growth factor," *Chinese Medical Journal*, vol. 121, no. 24, pp. 2599–2603, 2008.
- [11] J. M. Gitlin, D. B. Trivedi, R. Langenbach, and C. D. Loftin, "Genetic deficiency of cyclooxygenase-2 attenuates abdominal aortic aneurysm formation in mice," *Cardiovascular Research*, vol. 73, no. 1, pp. 227–236, 2007.
- [12] L. J. Walton, I. J. Franklin, T. Bayston et al., "Inhibition of prostaglandin E₂ synthesis in abdominal aortic aneurysms: implications for smooth muscle cell viability, inflammatory processes, and the expansion of abdominal aortic aneurysms," *Circulation*, vol. 100, no. 1, pp. 48–54, 1999.
- [13] T. Bayston, S. Ramessur, J. Reise, K. G. Jones, and J. T. Powell, "Prostaglandin E₂ receptors in abdominal aortic aneurysm and human aortic smooth muscle cells," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 38, no. 2, pp. 354–359, 2003.
- [14] V. L. King, D. B. Trivedi, J. M. Gitlin, and C. D. Loftin, "Selective cyclooxygenase-2 inhibition with celecoxib decreases angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in mice," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 26, no. 5, pp. 1137–1143, 2006.

- [15] M. Wang, E. Lee, W. Song et al., “Microsomal prostaglandin E synthase-1 deletion suppresses oxidative stress and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation,” *Circulation*, vol. 117, no. 10, pp. 1302–1309, 2008.
- [16] L. Vila, “Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis,” *Medicinal Research Reviews*, vol. 24, no. 4, pp. 399–424, 2004.
- [17] M. Soler, M. Camacho, J.-R. Escudero, M. A. Itigüez, and L. Vila, “Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase,” *Circulation Research*, vol. 87, no. 6, pp. 504–507, 2000.
- [18] M. Camacho, E. Gerbolés, J.-R. Escudero, R. Antón, X. Garcia-Moll, and L. Vila, “Microsomal prostaglandin E synthase-1, which is not coupled to a particular cyclooxygenase isoenzyme, is essential for prostaglandin E₂ biosynthesis in vascular smooth muscle cells,” *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 5, no. 7, pp. 1411–1419, 2007.
- [19] D. Solà-Vilà, M. Camacho, R. Solà, M. Soler, J.-M. Diaz, and L. Vila, “IL-1 β induces VEGF, independently of PGE₂ induction, mainly through the PI3-K/mTOR pathway in renal mesangial cells,” *Kidney International*, vol. 70, no. 11, pp. 1935–1941, 2006.
- [20] S. Narumiya, Y. Sugimoto, and E. Ushikubi, “Prostanoid receptors: structures, properties, and functions,” *Physiological Reviews*, vol. 79, no. 4, pp. 1193–1226, 1999.
- [21] R. Y. Cao, T. St Amand, X. Li et al., “Prostaglandin receptor EP4 in abdominal aortic aneurysms,” *The American Journal of Pathology*, vol. 181, no. 1, pp. 313–321, 2012.
- [22] U. Yokoyama, R. Ishiwata, M.-H. Jin et al., “Inhibition of EP4 signaling attenuates aortic aneurysm formation,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 5, Article ID e36724, 2012.
- [23] M. Camacho, J. Dülme, D. Solà-Vilà et al., “Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm,” *Journal of Lipid Research*, vol. 54, pp. 3506–3515, 2013.
- [24] A. S. Levey, L. A. Stevens, C. H. Schmid et al., “A new equation to estimate glomerular filtration rate,” *Annals of Internal Medicine*, vol. 150, no. 9, pp. 604–612, 2009.
- [25] M. Camacho, J. López-Belmonte, and L. Vila, “Rate of vasoconstrictor prostanoids released by endothelial cells depends on cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin I synthase activity,” *Circulation Research*, vol. 83, no. 4, pp. 353–365, 1998.
- [26] K. Casós, L. Siguero, M. T. Fernández-Figueras et al., “Tumor cells induce COX-2 and mPGES-1 expression in microvascular endothelial cells mainly by means of IL-1 receptor activation,” *Microvascular Research*, vol. 81, no. 3, pp. 261–268, 2011.
- [27] K. S. Chapple, D. J. Parry, S. McKenzie, K. A. MacLennan, P. Jones, and D. J. A. Scott, “Cyclooxygenase-2 expression and its association with increased angiogenesis in human abdominal aortic aneurysms,” *Annals of Vascular Surgery*, vol. 21, no. 1, pp. 61–66, 2007.
- [28] B. L. Y. Cheuk and S. W. K. Cheng, “Differential secretion of prostaglandin E₂, thromboxane A₂ and interleukin-6 in intact and ruptured abdominal aortic aneurysms,” *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 20, no. 3, pp. 391–395, 2007.
- [29] P. E. Norman and J. A. Curci, “Understanding the effects of tobacco smoke on the pathogenesis of aortic aneurysm,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 33, pp. 1473–1477, 2013.
- [30] C. Buckley, C. W. Wyble, M. Borhani et al., “Accelerated enlargement of experimental abdominal aortic aneurysms in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure,” *Journal of the American College of Surgeons*, vol. 199, no. 6, pp. 896–903, 2004.
- [31] K. Stolle, A. Berges, M. Lietz, S. Lebrun, and T. Wallerath, “Cigarette smoke enhances abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-treated apolipoprotein E-deficient mice,” *Toxicology Letters*, vol. 199, no. 3, pp. 403–409, 2010.
- [32] A. S. Go, G. M. Chertow, D. Fan, C. E. McCulloch, and C.-Y. Hsu, “Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 351, no. 13, pp. 1296–1305, 2004.
- [33] J. M. Romero, J. Bover, J. Fite et al., “The Modification of Diet in Renal Disease 4-calculated glomerular filtration rate is a better prognostic factor of cardiovascular events than classical cardiovascular risk factors in patients with peripheral arterial disease,” *Journal of Vascular Surgery*, vol. 56, no. 5, pp. 1324–1330, 2012.
- [34] C. A. Meijer, V. B. Kokje, R. B. van Tongeren et al., “An association between chronic obstructive pulmonary disease and abdominal aortic aneurysm beyond smoking: results from a case-control study,” *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 44, no. 2, pp. 153–157, 2012.

Influence of Cardiovascular Risk Factors on Levels of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Human Abdominal Aortic Aneurysms

J.-F. Dilmé ^{a,b}, S. Bellmunt ^{a,b}, M. Camacho ^{a,c}, D. Solà-Vilà ^c, J.-M. Romero ^{a,b}, J.-R. Escudero ^{a,b}, L. Vila ^a

^aAngiology, Vascular Biology and Inflammation Laboratory, Institute of Biomedical Research (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain

^bVascular Surgery Department, Institute of Biomedical Research (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain

^cAutonomous University of Barcelona, Institute of Biomedical Research (IIB Sant Pau), Barcelona, Spain

WHAT THIS PAPER ADDS

The results in this paper indicate that active smoking influences vascular cells to increase MMP-2 expression, which contributes to expansion and the rupture risk of AAA. This finding prompts more aggressive control of cardiovascular risk factors in the very early phase of the disease, and particularly AAA screening in smokers. This could even modify monitoring guidelines for AAA in the non-surgical range, and the approach should be more aggressive in patients who continue to smoke. It allows for the possibility that active smokers have a higher risk of rupture than those with the same arterial diameter who do not smoke or who have stopped smoking.

Objective: To evaluate the influence of cardiovascular risk factors on levels of matrix metalloproteinases (MMP) 2 and 9 in human abdominal aortic aneurysms (AAA).

Methods: Aortic samples were collected from patients who underwent AAA repair ($n = 89$). Patients were stratified according to the maximum transverse aorta diameter: small diameter (<55 mm), moderate diameter ($55-69.9$ mm) and large diameter (≥ 70 mm). Aortic walls were studied using real-time PCR and immunohistochemistry. MMP-2, MMP-9, α -actin, CD45, and CD68 transcript levels were determined relative to β -actin. Quantitative data were expressed as median (IQR-range).

Results: No differences were found in MMP-2 expression between the patient groups, which was mainly associated with vascular smooth muscle cells (VSMC); however, MMP-9 displayed the maximum level in the moderate-diameter group, associated with infiltrating macrophages. Current smoking (CS) and renal insufficiency (RI) significantly increased local levels of MMP-2 (CS 349.5 [219.5–414.1] vs. no-CS 184.4 [100.0–320.5]; $p < .008$; RI 286.8 [189.6–410.8] vs. no-RI 177.3 [99.3–326.9]; $p = .047$). Nevertheless, after stepwise linear regression analysis only CS remained as an independent variable predicting local levels of MMP-2 ($p = .002$). No risk factors influenced local levels of MMP-9.

Conclusions: The results show that local levels of MMP-2, an important factor for AAA development, were increased in current smoking AAA patients. MMP-2 was mainly associated with VSMC. It is suggested that MMP-2 could contribute significantly to the increased AAA growth rate observed in current smoking patients. These findings support inclusion of smokers in screening for aneurysmal disease, and emphasize the need for more aggressive monitoring of aneurysmal disease outside the surgical range in patients who smoke at the time of diagnosis and in those who continue to smoke during follow-up.

© 2014 European Society for Vascular Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Article history: Received 30 January 2014, Accepted 27 May 2014, Available online XXX

Keywords: Abdominal aortic aneurysm, MMP-2, Cardiovascular risk factors, Tobacco smoking

INTRODUCTION

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a common, late age onset disorder in industrialized countries. Rupture of AAA has very high mortality rates. Screening studies have suggested that the prevalence of AAA in older men is about 5%.¹ Despite the aging of the population, the prevalence,

incidence, and global mortality rate of AAA appear to have declined as a result of increased elective AAA repair, lower mortality from emergency repair, and a greater proportion of emergency admissions being offered emergency repair.^{2,3}

The etiology of AAA is complex, but environmental and genetic factors are known to contribute to the risk.^{4,5} The relationship between AAA and atherosclerosis is intriguing. Both disorders share some common features and AAA usually occurs in atherosclerotic individuals. Not only are there evident histopathological differences between AAA and atherosclerotic lesions, but differences have also been observed in cardiovascular risk factors. Diabetes, for example, is a well-established risk factor for atherosclerosis,

* Corresponding author. M. Camacho, Angiology, Vascular Biology and Inflammation Laboratory of the Institute of Research of Hospital Santa Creu i Sant Pau, c/Antonio M^o Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.
E-mail address: mcamacho@santpau.cat (M. Camacho).
1078-5884/\$ – see front matter © 2014 European Society for Vascular Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.05.023>

but it has been reported to be protective for AAA,^{6,7} whereas smoking seems to be a substantially greater risk factor for AAA than for atherosclerosis,^{7,8} and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) has been associated with AAA.⁹

Current evidence on the pathogenesis of AAA indicates that aortic wall inflammation and proteolytic degradation of the aortic wall play a fundamental role in the evolution and progression of the disease. A number of reports have documented increased expression of matrix metalloproteinases (MMP) in AAA, and genetic variants have been proposed to be associated with AAA.¹⁰ The MMPs most prominently associated with AAA are MMP-2 (Gelatinase A) and MMP-9 (Gelatinase B),^{11–14} both of which display elastolytic activity and similar proteolytic activity.¹⁵ One fundamental characteristic of AAA is the hypervascularization of aortic tissue. It has been proposed that this vascularization might contribute to the development of aneurysms¹⁶ and could play a causative role in the genesis of AAA.^{11,17} As several studies have pointed to the essential role of MMP-2 and MMP-9 in the onset of angiogenesis,^{18,19} local levels of MMP-2 and MMP-9 could be relevant in AAA progression.

Information is lacking on the influence of cardiovascular risk factors on local levels of MMPs in AAA. The aim of the present study was to evaluate the influence of the major cardiovascular risk factors on MMP-2 and MMP-9 levels in human AAA.

METHODS

Patients

The inclusion criteria for this study were patients undergoing elective open repair for atherosclerotic AAA. An infrarenal aorta biopsy was taken during the intervention. The exclusion criteria were absent or inadequate aortic biopsy and patients with pseudoaneurysms, or infectious or inflammatory aneurysms. Patients were stratified according to the maximum transverse aorta diameter determined by the use of a measurement transverse to the true lumen center line at infrarenal level, based on angio-CT with endovenous contrast, using Workstation AGFA IMPAX 6.4.0.4010 and OsiriX MD, FDA Cleared/CE Ila version, as a primary diagnostic. Three groups were defined: small diameter (SD, <55 mm), moderate diameter (MD, 55–69.9 mm) and large diameter (LD, ≥70 mm). Surgical repair is not usually indicated when the maximum transverse aortic diameter is <55 mm. The SD samples in this study were obtained from patients with maximum transverse aorta diameter <55 mm, who underwent surgery for a symptomatic or rapidly growing AAA (>5 mm/6 month or >10 mm/year) or for repair of a concomitant iliac artery aneurysm.

All patients underwent surgery at Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP). The study was approved by the local ethics committee, and patients gave written informed consent prior to surgery. All procedures were reviewed by the institutional review board at HSCSP. The study

conformed to the principles of the Declaration of Helsinki. Clinical outcomes were taken from the clinical database.

Tissue samples

Biopsies were systematically obtained from the antero-lateral wall of the remaining mid-infrarenal aortic wall after exclusion and prosthetic replacement of the AAA, at the level of the inferior mesenteric artery. Luminal thrombi, if present, were separated before the aortic biopsy was taken. Biopsies were processed immediately. A portion of each sample was placed in RNAlater solution (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) and stored at 4 °C for 24 hours before long-term storage at –80 °C until further processing for RNA isolation. When possible, another portion was fixed in 10% formalin solution (Sigma-Aldrich, Inc St Louis, MO, USA) for 24 hours and embedded in paraffin for microscopic studies to locate the MMPs.

Endothelial cells and VSMC culture

Aortic human VSMC cultures were established from multi-organ donor aortas using an explant procedure as previously described.^{20,21} VSMC were characterized by α -actin positive staining and used at passage 4–6. Endothelial cells were isolated by collagenase digestion from human umbilical cord veins (HUVEC) and cultured as previously described.²² Cells were characterized by vWF positive staining and used at the first passage.

Risk factors

The risk factor definitions used in this study were: diabetes mellitus: glycated hemoglobin >5.8% or use of oral antidiabetic drugs or insulin; arterial hypertension (HTN): systolic blood pressure ≥140 mm Hg, diastolic blood pressure ≥80 mm Hg or use of antihypertensive medication; hyperlipidemia: a total cholesterol >6.2 mmol/L, LDL cholesterol >1.70 mmol/L or triglycerides >1.65 mmol/L; smoking was categorized into two groups: current smoking (CS): smokers and ex-smokers stopped smoking <1 year, and non-current smoking (N-CS): never-smoked and ex-smokers stopped smoking >1 year; COPD: FEV1/FVC <0.7; and renal insufficiency (RI): estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated with the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation considering values of eGFR ≤60 mL/min/1.73 m² as RI.²³

Analysis of mRNA levels in tissues and culture cells

Tissues were homogenized in the FastPrep-24 homogenizer and Lysing Matrix D tubes (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). RNA was extracted using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. For culture cells, total RNA was extracted using Ultraspec (Biotex Laboratories, Inc., Houston, TX, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA was prepared by reverse transcribing 1 µg RNA with a High-Capacity cDNA Archive Kit with random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). mRNA expression of the selected

Please cite this article in press as: Dilmé J-F, et al., Influence of Cardiovascular Risk Factors on Levels of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Human Abdominal Aortic Aneurysms, European Journal of Vascular and Endovascular Surgery (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.05.023>

genes was studied by real-time PCR in an ABI Prism 7900HT using pre-designed validated assays (TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems) and universal thermal cycling parameters. Relative expression was expressed as transcript/ β -actin ratios.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed using a mouse monoclonal antibody against MMP-2 (ref ab1818, diluted 1:15) from Abcam and a rabbit polyclonal antibody anti-MMP-9 (ref A0150, diluted 1:50) from Dako. Three-micrometer sections of paraffin-embedded tissue samples were stained in a Dako Autostainer Link 48 using the Dako EnVision Flex Kit. Diaminobenzidine was used as chromogen.

Double-fluorescence immunostaining

For antigen co-localization studies, double-fluorescence immunostaining was performed using a sequential method. After deparaffinization and antigen retrieval, blocking for non-specific binding was performed at 4 °C overnight. Appropriate concentrations of antibodies were then sequentially applied for 1 hour at room temperature, with PBS washing after each incubation. Slides were first incubated with anti-MMP-2 or anti-MMP-9 antibodies followed by incubation with Alexa Fluor 488 goat-antimouse IgG (diluted 1/200; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Next, MMP-2 slides were incubated with anti-alpha smooth muscle Actin antibody (ref ab5694, diluted 1:200, Abcam), and MMP-9 slides with CD45 or CD68 (IR751 and IR7613, without further dilution, Dako), followed by incubation with Alexa Fluor 555 donkey-antirabbit IgG (diluted 1/200; Life Technologies). As a negative control, sections were incubated omitting primary antibodies. Samples were then mounted with Prolong Gold antifade reagent with DAPI (Molecular Probes, Life Technologies Co, Eugene, OR, USA). Images were obtained using an SP5 Leica confocal microscope.

Statistical analysis

An exploratory study was performed to detect the relationship between cardiovascular risk factors and levels of MMP-2 and MMP-9. SPSS and Sigma-Plot software were used for statistical analysis. All data regarding transcript levels are expressed relative to β -actin $\times 1000$. All quantitative data in this study were non-normally distributed and expressed as median (25th–75th percentile). The Mann–Whitney Rank Sum Test was used to compare two groups and Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks for multiple comparisons. Bonferroni’s correction was applied to adjust significance values in multiple testing. Pearson Product Moment Correlation after logarithmic transformation of data was used to evaluate the association between continuous variables with non-normal distribution. A logarithmic transformation was applied to outcomes without a normal distribution before data analysis using linear regression tests, with an interaction analysis,

including the effect of the identified risk factors and controlling for possible confounding factors. A *p* value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

From 2008 to 2012, elective abdominal aortic aneurysm surgery was performed in 225 patients at the Department of Vascular and Endovascular Surgery of the HSCSP in Barcelona, Spain. A total of 166 patients underwent open surgery and 59 had endovascular aortic repair (EVAR). The study group was made up of 89 of the 166 patients who underwent open surgery. Table 1 shows patient demographics.

Expression of MMP-2 and MMP-9

To evaluate levels of MMPs at different stages of AAA development, AAA patient samples were stratified as a function of the maximum transverse aorta diameter (see

Table 1. Demographics for AAA included in the study.

Total number patients	89
Aortic diameter (mm) ^a	66 ± 12.7
SD (<55 mm)	49.9 ± 6.5
MD (55–69.9 mm)	59.9 ± 3.3
LD (≥70 mm)	80.2 ± 6.9
Age (years)	71.1 ± 6.5
Male	87 (97.8)
Diabetes mellitus	19 (21.3)
Hypertension	63 (70.8)
Hyperlipidemia	54 (60.7)
Smoking habit	
Non-current smokers ^b	63 (70.8)
Current smokers	26 (29.2)
Coronary artery disease	20 (22.4)
Angina pectoris	2 (2.2)
Myocardial infarction	6 (6.7)
Coronary intervention/CABG	12 (13.5)
Chronic renal insufficiency	34 (38.2)
Dialysis	0
Peripheral vascular disease	48 (53.9)
Absent pulses	31 (34.8)
Intermittent claudication	17 (19.1)
Cerebrovascular disease	7 (7.9)
Cerebral vascular attack	4 (4.5)
Transient ischemic attack	3 (3.4)
COPD	26 (29.2)
Antiplatelet users	47 (53.4)
Statin users	57 (64)
ACE inhibitor users	23 (20.7)
NSAID users	6 (6.7)
Corticoid users	6 (6.7)
Immuno-suppressors	4 (3.5)

Nominal variables are presented as number and as percentage (%) and continuous variables as mean ± SD. ACE = angiotensin converting enzyme; CABG = coronary artery bypass grafting; COPD = chronic obstructive pulmonary disease; LD = large diameter; MD = moderate diameter; NSAID = non-steroidal anti-inflammatory drugs; SD = small diameter.

^a Aneurysm maximum transverse diameter in mm.

^b Quit smoking >1 year.

Please cite this article in press as: Dilmé J-F, et al., Influence of Cardiovascular Risk Factors on Levels of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Human Abdominal Aortic Aneurysms, European Journal of Vascular and Endovascular Surgery (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.05.033>.

Table 1 for the range of the groups). Levels of mRNA of either MMP-2 or MMP-9 did not fit a normal distribution. Regarding expression of MMP-2, no significant differences were observed between stratified groups of patients, whereas MMP-9 mRNA levels were statistically higher in the MD group (Fig. 1).

Localization of MMP-2 and MMP-9

Immunohistochemistry showed that MMP-2 was widely expressed in AAA samples, with MMP-2 immunostaining mainly found in medial VSMC (Fig. 2A). Additionally, MMP-2 was occasionally found in infiltrating leukocytes. Next, the correlation was determined between mRNA levels of MMP-2 and those of VSMC and leukocyte markers. The correlation between MMP-2 and α -actin (VSMC marker) was very significant, that between MMP-2 and CD68 (a macrophage marker) was much less significant, and that between MMP-2 and CD45 (pan-leukocyte marker) was not significant (Table 2). The mRNA levels of MMP-2 in HUVEC and VSMC in culture were also examined, and MMP-2 was detected in both vascular cell types (not shown). In immunofluorescent double staining, co-expression of MMP-2 and α -actin was observed in some microvessels (Fig. 2B). Nevertheless, the co-expression of these proteins was found mainly in VSMC of the media layer (Fig. 2C).

Immunostaining with anti-MMP-9 was found in infiltrating leukocytes in AAA (Fig. 3A). No statistical association was found between MMP-9 and α -actin, but a significant correlation was found between MMP-9 and leukocyte markers, with the highest correlation being between MMP-9 and CD68 (Table 2). MMP-9 was not detected in either HUVEC or VSMC in culture (not shown). Immunofluorescence showed that MMP-9 co-expressed with CD45 in some cells (Fig. 3B), but mainly with CD68 (Fig. 3C).

Influence of risk factors on MMP-2 and MMP-9 transcript levels

When AAA patients were stratified according to risk factors it was found that MMP-2 transcript levels were statistically higher in CS than in N-CS (Table 3). As described in the

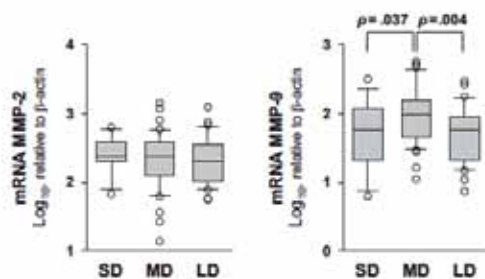


Figure 1. Expression levels of MMP-2 and MMP-9 in stratified patient groups as a function of the maximum aorta diameter; SD: <55 mm, $n = 14$; MD: 55–69.9 mm, $n = 42$; and LD: \geq 70 mm, $n = 33$.

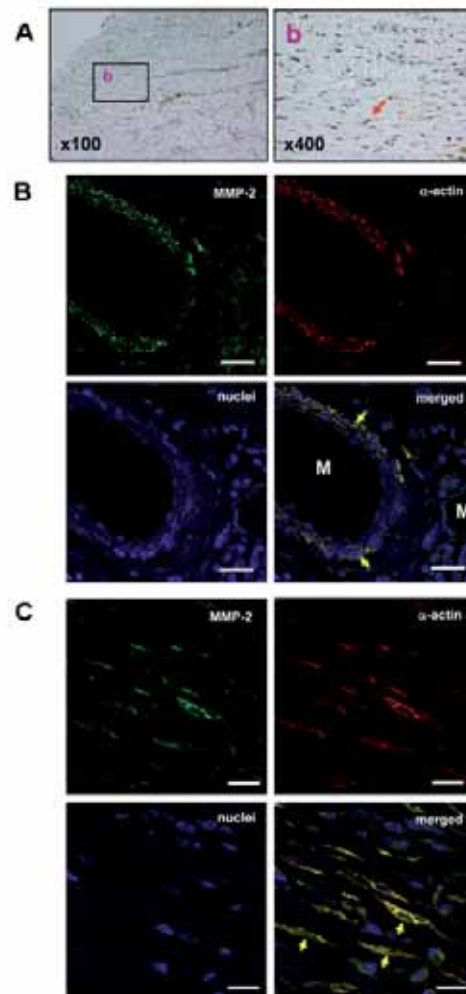


Figure 2. (A) Representative immunohistochemistry images of MMP-2 in AAA samples. Arrows show medial VSMC immunostained with anti-MMP-2. (B) Representative immunofluorescent double staining for MMP-2 and α -actin of a leukocyte infiltration area in the media. Arrows show double immunostained cells; M indicates the light of microvessels; bars are 25 μ m. (C) Representative immunofluorescent double staining for MMP-2 and α -actin of non-infiltrated area in the media layer. Arrows show some double immunostained cells; bars are 15 μ m.

Methods, the N-CS group consisted of both never-smoked and ex-smokers. In previous statistical analysis, the CS group was different from ex- and never-smoked groups regarding MMP-2. As there were no differences between these two groups regarding MMP-2 in this study, they were joined to increase statistical power as there were only seven never-smokers. Patients with RI also exhibited a higher

Please cite this article in press as: Dilmé J-F, et al., Influence of Cardiovascular Risk Factors on Levels of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Human Abdominal Aortic Aneurysms, European Journal of Vascular and Endovascular Surgery (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.05.023>

Table 2. Correlation values between mRNA levels of MMP-2 and MMP-9 and those of VSMC or leukocyte markers.

	n	MMP-2		MMP-9	
		R	p ^a	R	p ^a
α-actin	86	.512	1.7 × 10 ⁻⁶	.148	.665
CD45	86	.191	.365	.319	.012
CD68	66	.382	.012	.609	3.56 × 10 ⁻⁷

^a Pearson Product Moment Correlation after logarithmic transformation of data and Bonferroni's correction for multiple testing was applied.

MMP-2 expression than patients with normal eGFR. No differences in MMP-2 levels were found between the groups regarding the other risk factors. The association between risk factors was then evaluated. After χ^2 analysis, CS, HTN, COPD, and RI were identified as possibly related variables (Table 4). A logarithmic transformation was applied to the outcomes of MMP2 and eGFR, which did not fit a normal distribution prior to the multiple linear regression analysis. Despite the statistical significance in the univariate analysis, the multiple linear regression analysis ruled out a relationship between MMP2 and RI and no interaction was detected (Table 4). After stepwise linear regression analysis, only CS ($p = .002$) remained an independent variable predicting MMP-2 levels; and the final model was: $\text{LogMMP-2} = 2.242 + 0.259 \cdot \text{CS}$; $R = .329$. Calculating the antilogarithms, the predicted level of MMP-2 of the N-CS was 174.54 and of the CS was 316.66. No differences were found in the expression of MMP-9 between the AAA risk factor groups (Table 3).

DISCUSSION

This study describes the influence of cardiovascular risk factors on local levels of MMP-2 and MMP-9 in human aneurysmal aorta. The main characteristics that distinguish AAA from atherosclerosis are proteolytic degradation of elastic fibers, VSMC depletion, and hypervascularization of aortic tissue. In these processes, MMPs, in particular MMP-2 and MMP-9, play a fundamental role.^{11,16–19}

Previous reports show increased MMP-2 and MMP-9 levels in AAA.^{11–14} In this study, when patients were stratified according to maximum AAA diameter, levels of the two MMPs transcripts displayed different patterns: whereas MMP-2 levels were similar in all diameter-stratified groups, MMP-9 showed maximum expression in the MD group. Previous reports have shown maximal expression of MMP-2 in small AAA and MMP-9 in medium size AAA.^{13,14} These results are also consistent with a previous report showing that expression of CD45, MMP-9, and five lipoxigenase activating protein, another leukocyte associated protein, was significantly enhanced in AAA patients, with maximal expression in the MD group.¹⁷ In the present study, immunohistochemistry showed that MMP-2 and MMP-9 also differed in cellular localization. Whereas MMP-2 was expressed mainly in medial VSMC, MMP-9 was detected only in the infiltrating leukocytes. Transcript findings supported these data. A good correlation was found between

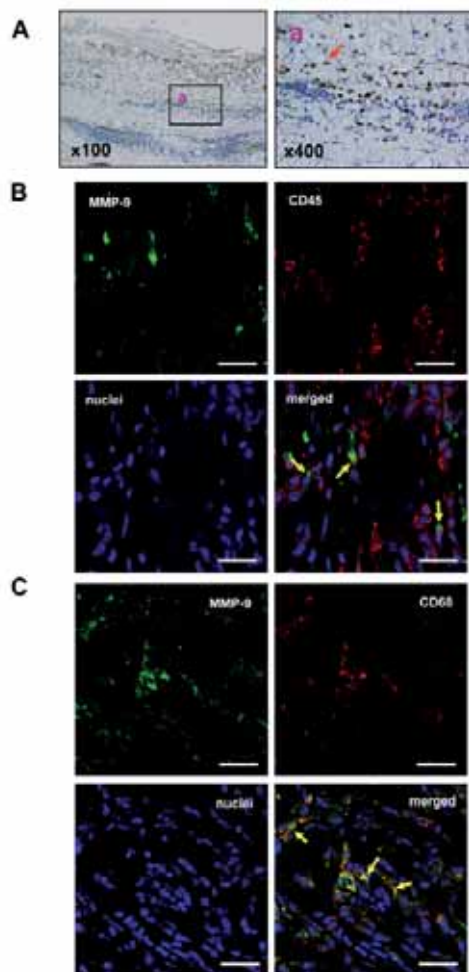


Figure 3. (A) Representative immunohistochemistry images of MMP-9 in AAA. Arrows show medial infiltrating leukocytes immunostained with anti-MMP-9. (B) Representative immunofluorescent double staining for MMP-9 and CD45 of a leukocyte infiltration area in the media. Arrows show some double immunostained cells; bars are 25 μm . (C) Representative immunofluorescent double staining for MMP-9 and CD68 of a leukocyte infiltration area in the media. Arrows show some double immunostained cells; bars are 25 μm .

MMP-2 and α -actin transcript levels, whereas correlation of MMP-2 with leukocyte markers was weak. In contrast, MMP-9 showed a correlation with transcript levels of the leukocyte markers CD45 and CD68, with the best correlation being between MMP-9 and CD68. Taken together, these results indicate that MMP-2 was mainly associated with VSMC and, as reported by Newman et al.,²⁴ MMP-9 was associated with infiltrating leukocytes, mainly macrophages.

Please cite this article in press as: Dilmé J-F, et al., Influence of Cardiovascular Risk Factors on Levels of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Human Abdominal Aortic Aneurysms, European Journal of Vascular and Endovascular Surgery (2014). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.05.023>

Table 3. Transcript levels of MMP-2 and MMP-9 in AAA samples stratified by cardiovascular risk factors.

	Median	25th–75th percentile	p vs. no-factor ^a
MMP-2			
No current smoking	184.4	100.0–320.5	
Current smoking	349.5	219.5–414.1	.008
No renal insufficiency	177.3	99.3–326.9	
Renal insufficiency	286.8	189.6–410.8	.047
No hypertension	232.7	170.2–335.8	
Hypertension	216.2	109.5–394.8	>.999
No diabetes mellitus	217.0	132.6–351.4	
Diabetes mellitus	224.3	86.5–394.1	>.999
No hyperlipidemia	219.5	104.7–347.3	
Hyperlipidemia	221.0	132.6–363.4	>.999
No COPD	207.0	109.5–334.9	
COPD	232.4	170.0–404.3	.743
MMP-9			
No current smoking	67.2	38.8–122.5	
Current smoking	61.7	35.4–110.1	>.999
No renal insufficiency	64.9	38.1–119.1	
Renal insufficiency	75.8	29.1–120.2	>.999
No hypertension	65.6	37.8–110.1	
Hypertension	66.0	34.3–123.0	>.999
No diabetes mellitus	67.7	38.1–119.1	
Diabetes mellitus	60.9	31.3–120.2	>.999
No hyperlipidemia	72.8	41.6–143.3	
Hyperlipidemia	62.2	26.6–115.0	.957
No COPD	64.1	39.0–135.6	
COPD	67.1	26.6–105.3	>.999

Data are expressed as relative to β -actin $\times 1000$. COPD = chronic obstructive pulmonary disease.

^a Mann–Whitney Rank Sum test and Bonferroni's correction for multiple testing was applied.

This study provides further evidence that MMP-2 and MMP-9 may not be regulated by the same mechanisms and may therefore have different roles in AAA development.^{11–14} It has been postulated that MMP-2 plays a role in the expansion of AAA and MMP-9 in the progression towards rupture.¹²

Although AAA and atherosclerosis are related inflammatory diseases, not all cardiovascular risk factors for atherosclerosis are associated with AAA. Differences were found regarding the influence of cardiovascular risk factors on local levels of MMP-2 and MMP-9 in AAA. None of the evaluated risk factors influenced local levels of MMP-9. In contrast, univariate analysis indicated that CS and RI patients had higher MMP-2 levels in the aneurysmal aorta than N-CS and non-RI individuals. Many reports provide evidence supporting an association between renal function and atherosclerosis, and eGFR is an independent prognostic factor for cardiovascular disease.²⁶ It was recently reported that eGFR is an excellent predictor of vascular events in patients with peripheral arterial disease.²⁶ Taking solely the univariate statistical analysis of RI data and MMP-2 expression into account, it could be concluded that the degree of atherosclerosis influenced MMP-2 levels. Nevertheless, multiple linear regression analysis indicated that the influence of RI, in terms of eGFR, on MMP-2 local levels was weak, if present at all. Taken together, these results suggest that the effect of smoking on local levels of MMP-2 is independent of the atherosclerotic and COPD states in AAA patients. Indeed, it has previously been reported that the association of COPD and AAA is unrelated to smoking.⁹

Smoking is a particularly relevant risk factor for AAA.²⁷ It has been reported that the association between smoking and AAA is 2.5-fold higher than the association between smoking and coronary heart disease.⁸ Tobacco smoke also

Table 4. Association between risk factors and multiple linear regression analysis; MMP-2 as independent variable.

χ^2 analysis of risk factors					
Variable	COPD	CS	DM	HL	RI
HTN	$\chi^2 = 1.494$ $p = .222$	$\chi^2 = 3.371$ $p = .066$	$\chi^2 = 1.801$ $p = .180$	$\chi^2 = 0.032$ $p = .859$	$\chi^2 = 4.448$ $p = .035$
COPD		$\chi^2 = 8.464$ $p = .004$	$\chi^2 = 0.001$ $p = .981$	$\chi^2 = 0.082$ $p = .775$	$\chi^2 = 9.952$ $p = .002$
CS			$\chi^2 = 0.033$ $p = .857$	$\chi^2 = 0.001$ $p = .976$	$\chi^2 = 1.223$ $p = .269$
DM				$\chi^2 = 2.55$ $p = .110$	$\chi^2 = 0.040$ $p = .842$
HL					$\chi^2 = 0.003$ $p = .957$

Multiple linear regression					
$\text{Log}_{10}(\text{MMP-2}) = a_0 + a_1 \cdot \text{CS} + a_2 \cdot \text{Log}_{10}(\text{eGFR}) + a_3 \cdot \text{COPD} + a_4 \cdot \text{HTN}$; $R = 0.378381$					
Variable	Coefficient	Coefficient value	Coefficient	Std. Error	p
	a_0	2.885		0.434	<.001
CS	a_1	0.206		0.087	.019
eGFR	a_2	-0.339		0.220	.126
COPD	a_3	0.044		0.088	.615
HTN	a_4	-0.049		0.088	.576

COPD = chronic obstructive pulmonary disease; CS = current smoking; DM = diabetes mellitus; HL = hyperlipidemia; HTN = arterial hypertension; RI = renal insufficiency.

Please cite this article in press as: Dilmé J-F, et al. Influence of Cardiovascular Risk Factors on Levels of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Human Abdominal Aortic Aneurysms, *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.05.023>

enhances AAA formation in animal models.^{28,29} A statistically significant difference was found between CS and N-CS regarding MMP-2, and this was maintained after introducing RI, HTN, and COPD as confounding variables into the statistics. From the present data, it seems that MMP-2 is mainly linked to the VSMC state, whereas local levels of MMP-9 appear to depend more on the inflammatory infiltrate in the aortic wall. This suggests that smoking affects the state of VSMC rather than the degree of leukocyte infiltration. As MMP-2 plays a role in the expansion of AAA,¹² the present results suggest that it could significantly contribute to the increased AAA growth rate observed in the smoking patients.⁷

Several studies on the biochemical effects of tobacco smoke are available. Water-soluble tobacco smoke extract has been found to induce MMP-1 expression in endothelial cells and neutrophil elastase in AAA.^{30,31} It has also been observed that nicotine induces AAA in an animal model through activation of AMP activated protein kinase alpha2.³² Nevertheless, more research is needed to ascertain the molecular species and signaling pathways involved in the effect of tobacco smoke on MMP-2 expression in human AAA, particularly in VSMC.

In conclusion, the present work shows that current smoking patients had higher MMP-2 levels than non-current smokers. However, no correlation was found between MMP-9 and smoking. These results add further evidence for the role of tobacco smoking in AAA development, supporting the need to include smokers in AAA screening, and to implement more aggressive monitoring of aneurysmal disease outside the surgical range (<5.5 cm) in patients who smoke at the time of diagnosis and in those who continue to smoke during follow-up. More research is needed to elucidate the pathways involved in the regulation of MMP-2 expression by tobacco smoke in AAA, particularly in VSMC.

FUNDING

This study was supported partially by grants SAF2010/21392, and Red de Investigación Cardiovascular RD12/0042/0051 from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) – Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

CONFLICT OF INTEREST

None.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laura Siguero, Sonia Alcolea, Montserrat Gómez, and Iris Rodríguez for their excellent technical support, Angel Martínez for his expert statistical advice, and Catolyn Newey for the language revision.

REFERENCES

1 Cornuz J, Sidoti PC, Tevaearai H, Egger M. Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review

and meta-analysis of population-based screening studies. *Eur J Public Health* 2004;14:343–9.

2 Anjum A, Powell JT. Is the incidence of abdominal aortic aneurysm declining in the 21st century? Mortality and hospital admissions for England & Wales and Scotland. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012;43:161–6.

3 Anjum A, von Allmen R, Greenhalgh R, Powell JT. Explaining the decrease in mortality from abdominal aortic aneurysm rupture. *Br J Surg* 2012;99:637–45.

4 Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:92–102.

5 Wahlgren CM, Larsson E, Magnusson PKE, Hultgren R, Swadenborg J. Genetic and environmental contributions to abdominal aortic aneurysm development in twin population. *J Vasc Surg* 2010;51:3–8.

6 Shantikumar S, Ajjan R, Porter KE, Scott DJA. Diabetes and the abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2010;39:200–7.

7 Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Powell JT. RESCAN Collaborators. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg* 2012;99:655–65.

8 Lederle FA, Nelson DB, Joseph AM. Smokers' relative risk for aortic aneurysm compared with other smoking-related diseases: a systematic review. *J Vasc Surg* 2003;38:329–34.

9 Meijer CA, Kokje VB, van Tongeren RB, Hamming JF, van Bockel JH, Möller GM, et al. An association between chronic obstructive pulmonary disease and abdominal aortic aneurysm beyond smoking: results from a case-control study. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2012;44:153–7.

10 Morris DR, Biroš E, Cronin O, Kuivaniemi H, Gollidge J. The association of genetic variants of matrix metalloproteinases with abdominal aortic aneurysm: a systematic review and meta-analysis. *Heart* published online first 27 June 2013. PMID:23813847.

11 Herron GS, Unemori E, Wong M, Rapp JH, Hibbs MH, Stoney RJ. Connective tissue proteinases and inhibitors in abdominal aortic aneurysms. Involvement of the vasa vasorum in the pathogenesis of aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1991;11:1667–77.

12 Petersen E, Wagberg F, Angquist KA. Proteolysis of the abdominal aortic aneurysm wall and the association with rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;23:153–7.

13 Freestone T, Turner RJ, Coady A, Hignam DJ, Greenhalgh RM, Powell JT. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1145–51.

14 McMillan WD, Tamarina NA, Cipollone M, Johnson DA, Parker MA, Pearce WH. The relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation* 1997;96:2228–32.

15 Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008;29:290–308.

16 Paik DC, Fu C, Bhattacharya J, Tilson MD. Ongoing angiogenesis in blood vessels of the abdominal aortic aneurysm. *Exp Mol Med* 2004;36:524–33.

17 Camacho M, Díme J, Sola-Villa D, Rodríguez C, Belmunt S, Siguero L, et al. Microvascular COX-2/mPGES-1/EP-4 axis in human abdominal aortic aneurysm. *J Lipid Res* 2013;54:3506–15.

18 Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 1998;58:1048–51.

Please cite this article in press as: Díme J-F, et al., Influence of Cardiovascular Risk Factors on Levels of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Human Abdominal Aortic Aneurysms, *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* (2014). <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.05.023>

- 19 Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;2:737–44.
- 20 Camacho M, Gerbolés E, Escudero JR, Anton R, García-Moll X, Vila L. Microsomal-PGE synthase-1, which is not coupled to a particular COX-isoenzyme, is essential for PGE₂ biosynthesis in vascular smooth muscle cells. *J Thromb Haemostas* 2007;5:1411–9.
- 21 Soler M, Camacho M, Escudero JR, Iñiguez MA, Vila L. Human vascular smooth muscle cells but not endothelial cells express prostaglandin E synthase. *Circ Res* 2000;87:504–7.
- 22 Camacho M, Godessart N, Antón R, García M, Vila L. Interleukin-1 enhances the ability of cultured umbilical vein endothelial cells to oxidize linoleic acid. *J Biol Chem* 1995;270:17279–86.
- 23 Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro 3rd AF, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604–12.
- 24 Newman KM, Jean-Claude J, Li H, Scholes JV, Ogata Y, Nagase H, et al. Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg* 1994;20:814–20.
- 25 Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004;351:1296–305.
- 26 Romero JM, Bover J, Fite J, Bellmunt S, Dilmé JF, Camacho M, et al. The MDRD-4-calculated glomerular filtration rate is a better prognostic factor of cardiovascular events than classical cardiovascular risk factors in patients with peripheral arterial disease. *J Vasc Surg* 2012;56:1324–30.
- 27 Norman PE, Curci JA. Understanding the effects of tobacco smoke on the pathogenesis of aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:1473–7.
- 28 Stolle K, Berges A, Lietz M, Lebrun S, Wallerath T. Cigarette smoke enhances abdominal aortic aneurysm formation in angiotensin II-treated apolipoprotein E-deficient mice. *Toxicol Lett* 2010;199:403–9.
- 29 Buckley C, Wyble CW, Borhani M, Ennis TL, Kobayashi DK, Curci JA, et al. Accelerated enlargement of experimental abdominal aortic aneurysms in a mouse model of chronic cigarette smoke exposure. *J Am Coll Surg* 2004;199:896–903.
- 30 Lemaitre V, Dabo AJ, D'Armiento J. Cigarette smoke components induce matrix metalloproteinase-1 in aortic endothelial cells through inhibition of mTOR signaling. *Toxicol Sci* 2011;123:542–9.
- 31 Murphy EA, Danna-Lopes D, Sarfati I, Rao SK, Cohen JR. Nicotine-stimulated elastase activity release by neutrophils in patients with abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 1998;12:41–5.
- 32 Wang S, Zhang C, Zhang M, Liang B, Zhu H, Lee J, et al. Activation of AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ by nicotine investigates formation of abdominal aortic aneurysms in mice in vivo. *Nat Med* 2012;18:902–10.

Please cite this article in press as: Dilmé J-F, et al., Influence of Cardiovascular Risk Factors on Levels of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Human Abdominal Aortic Aneurysms, *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.05.023>